



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Scienze Cliniche, Specialistiche ed Odontostomatologiche

Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche

XXX CICLO

Tesi di Dottorato

**ALIMENTAZIONE E SALUTE: RUOLO DEI POLIFENOLI CONTENUTI
NEI LEGUMI NELLA PREVENZIONE DELLE PATOLOGIE
DISMETABOLICHE**

Dottoranda:

Imma Turco

Tutor:

Prof.ssa Gianna Ferretti

Triennio 2014-2017

INDICE

PARTE INTRODUTTIVA

1. PREMESSA E SCOPO DELLA TESI	6
2. INTRODUZIONE	9
I POLIFENOLI	9
- Classificazione e caratteristiche strutturali	9
- Biosintesi dei polifenoli	17
- Fonti alimentari	18
- Trattamenti tecnologici che influenzano il contenuto alimentare dei polifenoli.....	23
- Bioaccessibilità e biodisponibilità dei polifenoli.....	27
RUOLO DEI LEGUMI NELL'ALIMENTAZIONE UMANA	30
- I legumi: aspetti nutrizionali.....	32
<i>a. Macronutrienti e fibra dietetica.....</i>	<i>32</i>
<i>b. Micronutrienti.....</i>	<i>33</i>
- Il cece (<i>Cicer Arietinum</i>) e sue qualità nutrizionali	35
- La Cicerchia (<i>Lathyrus Sativus L.</i>) e sue qualità nutrizionali	39
- La fava (<i>Vicia Faba L.</i>) e sue qualità nutrizionali.....	41
ATTIVITA' BIOLOGICHE DEI POLIFENOLI.....	46
- Attività antiossidante.....	49
- Proprietà antidiabetiche dei polifenoli dei legumi.....	51
- Ruolo inibitorio degli enzimi <i>glicosidasi ed amilasi</i>	52
- Effetto dei polifenoli sull'assorbimento del glucosio	53
- Modulazione della glicazione proteica e formazione di prodotti	

avanzati di glicazione (AGE)	53
- Modulazione della produzione di esRAGE nelle cellule endoteliali trattate con glucosio.....	54
- Effetto dei polifenoli sulla secrezione pancreatica dell'insulina	55
- Regolazione del metabolismo epatico del glucosio	55
- Inibizione delle attività enzimatiche.....	55
- <i>Enzima di Conversione dell'Angiotensina (ACE)</i>	55
- <i>Xantina Ossidasi (XO)</i>	56
- <i>Lipossigenasi (15-LOX)</i>	56
- <i>Tirosinasi</i>	57
- Effetto cardioprotettivo e ruolo modulatore del metabolismo lipidico.....	57
- Effetto chemopreventivo. Regolazione della proliferazione cellulare e dell'apoptosi.....	58
- Attività anti-obesità dei polifenoli.....	60

INDICE GLICEMICO (IG) E CARICO GLICEMICO (GL): PARAMETRI

DI QUALITA' NUTRIZIONALE DEGLI ALIMENTI.....	62
- Indice Glicemico (IG).....	62
- Carico Glicemico (GL).....	70
- Fattori che influenzano l'IG ed il GL.....	72
- Effetto dei polifenoli su IG e GL.....	74
- Effetto della fibra su IG e GL.....	76
- Rilevanza fisio-patologica dell'IG e del GL.....	76
- <i>IG, GL e diabete</i>	77
- <i>IG, GL e obesità</i>	81
- <i>IG, GL e malattie cardiovascolari</i>	82
- <i>IG, GL e cancro</i>	85

PARTE SPERIMENTALE

3. MATERIALI E METODI	87
- Composti chimici e reagenti impiegati per le prove sperimentali: sigle ed abbreviazioni.....	88
- Preparazione degli estratti di polifenoli da legumi secchi.....	89
- Preparazione degli estratti di polifenoli dai prodotti alimentari in studio.....	89
- Determinazione del contenuto in polifenoli totali	89
- Determinazione del contenuto in flavonoidi.....	90
- Valutazione del potere antiossidante: metodica ORAC (Oxigen Radical Absorbance Capacity).....	90
- Inibizione dell'enzima α -amilasi.....	91
- Inibizione dell'enzima α -glucosidasi.....	92
- Effetto <i>in vitro</i> dei polifenoli estratti dalla fava sulla crescita e proliferazione delle cellule della linea CaCO-2.....	92
- Valutazione della vitalità cellulare: metodica MTT.....	93
- Valutazione della produzione dei ROS.....	94
- Valutazione, <i>in vivo</i> , del GI e del GL delle specialità alimentari in studio.....	95
- Analisi statistica dei dati.....	99
4. RISULTATI	100
- Valutazione dei macronutrienti contenuti nei prodotti ottenuti con combinazioni di farine di legumi e cereali.....	101
- Valutazione dei polifenoli totali, dei flavonoidi e del potere	

antiossidante (ORAC) delle specialità alimentari a base di farina di legumi del Repertorio Regionale.....	102
- Valutazione dell'inibizione, <i>in vitro</i> , degli enzimi della digestione dei carboidrati.....	103
- Effetto dei polifenoli sulla vitalità delle cellule intestinali della linea CaCO-2.....	103
- Effetto dei polifenoli sulla formazione di ROS intracellulari	104
- IG e GL in prodotti ottenuti con farine di legumi del Repertorio Regionale della Biodiversità Agraria.....	106
5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	108
6. BIBLIOGRAFIA.....	112

PARTE INTRODUTTIVA

1. PREMESSA E SCOPO DELLA TESI

L'alimentazione svolge un ruolo fondamentale per le attività vitali dell'organismo umano e per il mantenimento del benessere fisico e psichico di esso. La ricerca scientifica, sempre più focalizzata sull'identificazione di componenti alimentari biologicamente attive, cioè in grado di ottimizzare il benessere fisico e psichico e di ridurre il rischio di insorgenza di malattie, ha dimostrato che molti prodotti alimentari come frutta, verdura, cereali e legumi, contengono componenti potenzialmente benefiche per la salute umana. In particolare, lo studio dei meccanismi molecolari alla base delle più comuni patologie cronico-degenerative attribuisce un effetto protettivo ai fitonutrienti (polifenoli, carotenoidi, fitosteroli, indoli, isotiocianati, glucosinolati) ed alle fibre. Inoltre, la ricerca scientifica ha dimostrato che un'alimentazione ricca in zuccheri semplici è associata ad un aumento del rischio di insorgenza di patologie dismetaboliche quali il diabete, patologie cardiovascolari, sindrome metabolica e obesità. Tra i meccanismi molecolari ipotizzati nell'insorgenza delle suddette patologie vi è un effetto sul metabolismo del glucosio e della secrezione dell'insulina. Allo scopo di prevenire tali patologie un ruolo importante è svolto dalla qualità dei carboidrati, dall'*Indice Glicemico (IG)* e dal *Carico Glicemico (GL)* della dieta, come è emerso in numerosi studi recenti. IG e GL sono considerati utili parametri di qualità nutrizionale degli alimenti. In particolare, l'IG consente di classificare gli alimenti che contengono carboidrati in base all'incremento della glicemia post-prandiale. Recenti studi hanno evidenziato che tra i fitonutrienti, i polifenoli esercitano in vitro un effetto inibitore dell'attività degli enzimi amilasi e glicosidasi, coinvolti nella digestione dei carboidrati; pertanto si è ipotizzato che i polifenoli contribuiscano a ridurre l'IG degli alimenti in cui essi sono contenuti. Studi *in*

vitro e in modelli animali hanno dimostrato che i polifenoli sono anche in grado di modulare l'assorbimento del glucosio e la secrezione dell'insulina. Inoltre studi *in vitro* hanno dimostrato che polifenoli contenuti in diversi vegetali esercitano un effetto inibitorio sulla formazione di prodotti di glicazione avanzata, molecole responsabili dei meccanismi molecolari delle complicanze del diabete e delle patologie legate al danno ossidativo. I legumi sono tra le fonti alimentari più ricche in polifenoli ed è stata recentemente caratterizzata la composizione qualitativa di diverse varietà (ceci, cicerchie, fave, fagioli, lenticchie). Un interesse crescente è rivolto a questi alimenti ed a farine da essi ottenute, come ingredienti nella produzione di *alimenti funzionali*, cioè alimenti che si caratterizzano per l'apporto di composti che hanno un effetto benefico sulla salute umana, al di là dei nutrienti tradizionali che essi contengono.

La tesi si propone di esaminare attentamente la letteratura scientifica sul ruolo esercitato dai polifenoli contenuti in legumi nei meccanismi molecolari di patologie dismetaboliche quali il diabete, patologie cardiovascolari e obesità. La ricerca si è prefissa di indagare ulteriormente la relazione tra fitonutrienti e IG in alimenti contenenti farine di legumi. A tale scopo sono stati valutati i livelli dei polifenoli e dei flavonoidi di legumi del Repertorio della Biodiversità Agraria della Regione Marche. Lo studio è stato associato alla valutazione dell'IG e del GL di alcuni prodotti alimentari formulati con varie combinazioni di farine di cereali e legumi del Repertorio Regionale (RR), in particolare *Vicia faba* (fava), *Cicer arietinum* L. (cece) e *L. cicera* (cicerchia). Tra i cereali impiegati è inclusa la farina d'orzo nudo, una varietà di orzo inserita nel Repertorio della Biodiversità delle Marche.

La ricerca ha incluso anche uno studio *in vitro*, mirato a valutare l'effetto inibitorio dei polifenoli contenuti nei prodotti alimentari in studio sull'attività di alcuni enzimi coinvolti nella digestione dei carboidrati (α -amilasi ed α -glucosidasi). Inoltre, si è voluto anche dimostrare, mediante uno studio *in vitro*,

l'effetto dei polifenoli contenuti nei prodotti alimentari testati sulla crescita e vitalità delle cellule tumorali della linea CaCO-2. La ricerca si inserisce in un progetto di valorizzazione nutrizionale di legumi del Repertorio della Biodiversità Agraria della Regione Marche.

2. INTRODUZIONE

I POLIFENOLI

Classificazione e caratteristiche strutturali.

La classificazione dei composti fitochimici sintetizzati in numerose piante commestibili è rappresentata in figura 1. Tra i fitonutrienti sono inclusi i polifenoli. I polifenoli e i loro derivati sono composti bioattivi ampiamente diffusi in alimenti di origine vegetale (frutta, verdura, ortaggi, legumi, cereali, semi, spezie, vino, tè, caffè, cacao ed erbe) (Manach C. et al. 2004). Questi composti bioattivi hanno riscosso notevole interesse nel corso degli ultimi dieci anni a causa della loro vasta gamma di attività biologiche e per il loro possibile ruolo nella prevenzione di patologie croniche. Si tratta di un ampio gruppo di composti organici, metaboliti secondari vegetali. La composizione polifenolica delle piante è altamente variabile, sia qualitativamente che quantitativamente; alcuni di essi sono ubiquitari, mentre altri sono limitati a famiglie o a specie specifiche (Velderrain-Rodríguez G. et al. 2014). Dal punto di vista strutturale i polifenoli sono composti dotati di uno o più gruppi idrossilici, associati all'anello aromatico, che può essere presente o nella forma ossidata (chinone) o nella forma ridotta (fenolo). In funzione del numero degli anelli fenolici (da cui il nome "polifenoli") e degli elementi strutturali ad essi legati, i polifenoli possono essere distinti in: flavonoidi e non flavonoidi (acidi fenolici, stilbeni e lignani) (Del Rio D. et al 2013; Balasundrama N. et al. 2006). Attualmente sono state descritte circa 8000 diverse strutture di fenoli vegetali. I flavonoidi, a loro volta, sono divisi in sei sottoclassi principali: isoflavoni, flavoni, flavonoli, antocianine, flavanoni, flavanoli. Essi sono associati di solito ad uno zucchero, formando dei glicosidi (Kumar S. et al. 2013; Balasundrama N. 2006).

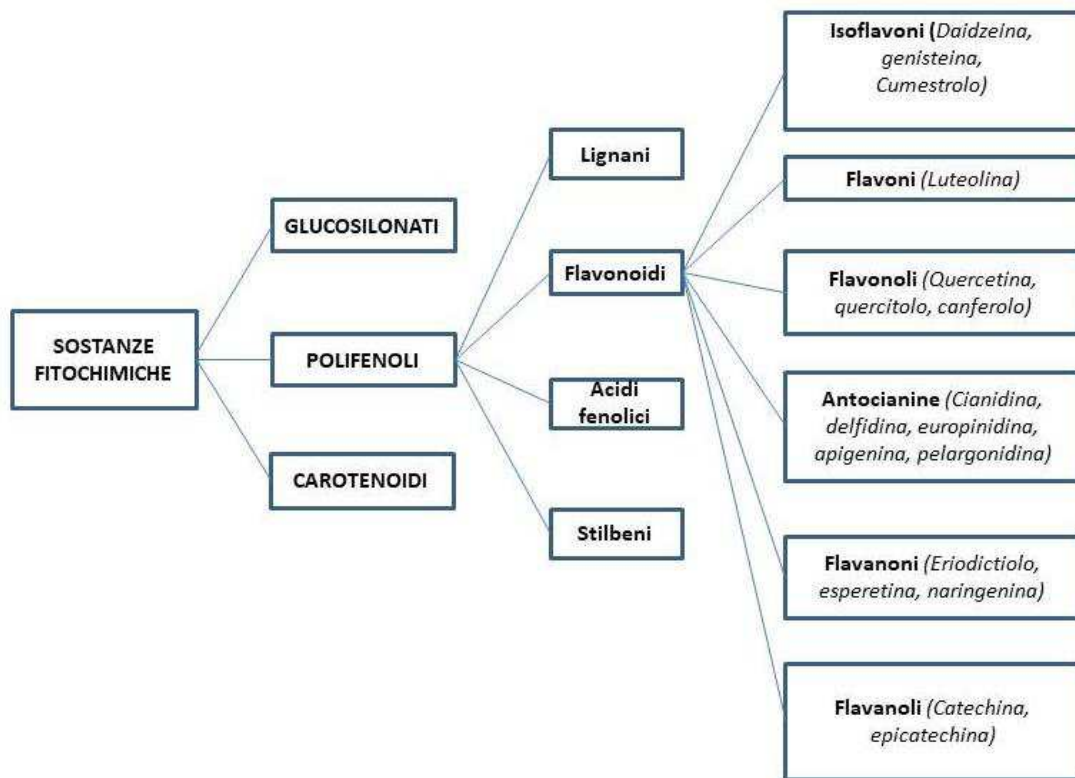


Fig. 1. Classificazione dei composti fitochimici.

I flavonoidi.

I flavonoidi sono i polifenoli più abbondanti nella dieta dell'uomo, rappresentandone circa i 2/3 di tutti quelli assunti con l'alimentazione (Panche A. N. et al. 2016). Come gli altri fitochimici, i flavonoidi sono il prodotto del metabolismo secondario delle piante. Nella frutta e nella verdura si trovano generalmente in forma di glicosidi e in alcuni casi in forma di acilglicosidi, mentre meno frequentemente, ed in concentrazioni minori, in forme acilate, metilate e solfate. Sono molecole idrosolubili che si accumulano all'interno dei vacuoli vegetali (Petrucci E. et al. 2013). La loro struttura di base è costituita da uno scheletro di difenilpropano, caratterizzata da due anelli benzenici (indicati come A e B) collegati da una catena di tre atomi di carbonio che forma un anello piranico (anello eterociclico contenente ossigeno) chiuso con l'anello benzenico A, che è detto anello C (figura 2).

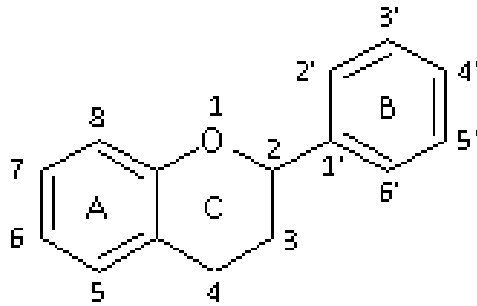


Fig 2. Struttura chimica di base dei flavonoidi.

La loro struttura è pertanto definita anche come C6-C3-C6. Nella maggior parte dei casi l'anello B si lega all'anello C in posizione 2, ma può legarsi anche in posizione 3 o 4; questo, insieme con le caratteristiche strutturali dell'anello B e gli schemi di glicosilazione ed idrossilazione dei tre anelli, fa sì che i flavonoidi siano il gruppo di fitochimici più ampio e diversificato presente in natura (Cheynier V. 2005). I flavonoidi possono essere presenti sotto forma di agliconi o glicosidi. I glicosidi sono più polari, più assorbibili e meno reattivi nei confronti dei radicali dell'ossigeno. I glicosidi possono essere legati ad uno zucchero, generalmente il D-glucosio, ma sono comuni anche le strutture come L-ramnosio, galattosio, xilosio, arabinosio, e disaccaridi come il rutinosio. I flavonoidi in cui l'anello B si lega in posizione 3 dell'anello C sono detti isoflavoni; quelli in cui l'anello B si lega in posizione 4, sono detti neoflavonoidi, mentre quelli in cui l'anello B si lega in posizione 2 a loro volta possono essere suddivisi in sei sottogruppi sulla base delle caratteristiche strutturali dell'anello C: flavoni, flavonoli, flavanoni, flavanonoli, flavanoli o catechine ed antociani. Infine, i flavonoidi con l'anello C aperto sono detti calconi (figura 3).

Flavoni

I flavoni hanno un doppio legame tra le posizioni 2 e 3, ed un chetone in posizione 4 dell'anello C. La glicosilazione si verifica per la maggior parte sulle posizioni 5 e 7, mentre la metilazione e l'acilazione sui gruppi idrossilici dell'anello B (Manach C. et al. 2004). Alcuni flavoni, come la nobiletina e la tangerina, sono polimetossilati.

Flavonoli

I flavonoli, rispetto ai flavoni, presentano un gruppo ossidrilico in posizione 3 dell'anello C, il quale può essere anche glicosilato. Come i flavoni, anche i flavonoli sono molto vari per ciò che riguarda l'idrossilazione e la metilazione. La quercitina è il più rappresentativo dei flavonoli in quanto è presente in moltissimi alimenti vegetali e dal punto di vista strutturale è solitamente presente sotto forma di O-glicoside. Sono stati identificati più di 170 differenti quercitina-glicoside, anche se il D-glucosio è il residuo zuccherino più frequente. Riconosciamo anche il kempferolo, la miricetina e l'isoramnetina (Tsao R. 2010).

Flavanoni

I flavanoni, anche detti diidroflavoni, hanno l'anello C saturo, per cui, a differenza dei flavoni, mancano del doppio legame tra le posizioni 2 e 3 e ciò rappresenta l'unica differenza strutturale tra i due sottogruppi di flavonoidi. I flavanoni possono essere multi-idrossilati, e diversi gruppi idrossilici possono essere metilati e/o glicosilati (Marella S. 2017). Negli ultimi 15 anni il numero dei flavanoni scoperti è notevolmente aumentato.

Flavanoli

I flavanoli, anche detti diidroflavanoli, sono i 3-idrossi derivati dei flavanoni; essi rappresentano un sottogruppo altamente diversificato e multisostituito (Cheynier V. 2005; Crozier A. et al. 2009).

Flavanoli o catechine.

A differenza di molti flavonoidi, i flavanoli non presentano un doppio legame tra le posizioni 2 e 3; inoltre, un altro carattere distintivo è l'assenza di un carbonile, un gruppo chetonico, in posizione 4. Questa particolare struttura chimica permette ai flavanoli di avere due centri chirali nella molecola, sulle posizioni 2 e 3, con quattro possibili diastereoisomeri. La catechina è l'isomero con configurazione trans, mentre

l'epicatechina è quello con configurazione cis. Ciascuna di queste due configurazioni ha due stereoisomeri. La (+)-catechina e (-)-epicatechina sono i due isomeri spesso presenti nelle piante commestibili. Un'altra importante caratteristica dei flavanoli, in particolare della catechina e dell'epicatechina, è quella di formare polimeri, detti proantocianidine o tannini condensati. (Tsao R. et al. 2010).

Antocianidine.

Le antocianidine costituiscono gli agliconi degli antociani, ovvero la parte priva della molecola zuccherina. In essi lo zucchero si lega per la maggior parte dei casi in posizione 3 dell'anello C, e spesso si coniuga con acidi fenolici, come l'acido ferulico. Rappresentano l'unico gruppo di flavonoidi che conferisce colore ai vegetali (tutti gli altri flavonoidi sono privi di colore). Il colore degli antociani dipende dal pH e dall'acilazione o metilazione dei gruppi idrossilici sugli anelli A e B (Veitch N. C et al. 2004). In base al numero e alla posizione dei gruppi idrossilici e metossilici sono state descritte varie antocianidine, e di queste, 6 si trovano comunemente nella frutta e verdura: pelargonidina, cianidina, delphinidina, petunidina, peonidina, malvidina (Horbowicz M. et al. 2008).

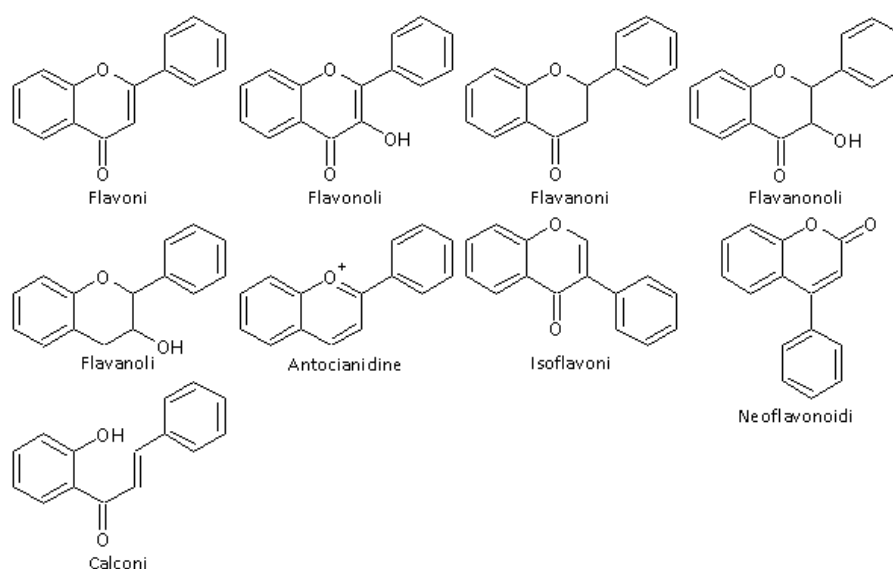


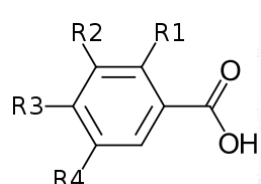
Fig 3. Struttura chimica di alcuni flavonoidi.

I non flavonoidi.

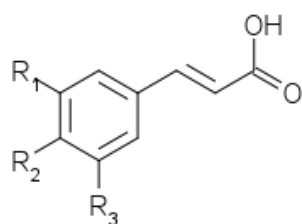
Acidi fenolici

Gli acidi fenolici comprendono due classi: quelli derivanti dall'acido benzoico (idrossibenzoici) (tabella 1) e quelli derivanti dall'acido cinnamico (idrocinnamici) (tabella 2) (Manach C. et al. 2004). Nelle piante, l'acido 4-idrossibenzoico si forma attraverso la degradazione della catena laterale dell'acido cinnamico il quale è invece formato dalla deamminazione della fenilalanina. Altri acidi cinnamici sono ottenuti da ulteriori reazioni di ossidrilazione e metilazione che, in sequenza, costruiscono la disposizione dei sostituenti tipica della via dello shikimato, cioè l'ossigenazione in posizione "orto". Possono esistere sia in forma cis sia in forma trans, interconvertibili per effetto della luce UV (Dewick P.M. 2001). I più comuni sono gli acidi: p-cumarico, caffeico, ferulico e sinapico. Raramente si trovano in forma libera, in quanto sono per lo più derivati glicosilati o esteri degli acidi chinico, shikimico o tartarico. Gli acidi caffeico e chinico si combinano a formare l'acido clorogenico (Clifford M. N. J. 2000).

ACIDI IDROSSIBENZOICI				
	R1	R2	R3	R4
Acido paraidrossibenzoico	H	H	OH	H
acido protocatechico	H	OH	OH	H
acido vanillico	H	OCH ₃	OH	H
acido gallico	H	OH	OH	OH
acido sirigico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
acido salicilico	OH	H	H	H
acido gentisico	OH	H	H	OH



Tab 1. Struttura e principali acidi idrossibenzoici.



ACIDI IDROSSICINNAMICI			
	R1	R2	R3
acido cumarico	H	OH	H
acido caffeico	OH	OH	H
acido ferulico	OCH ₃	OH	H
acido sinapico	OCH ₃	OH	OCH ₃
E-anetolo	H	OCH ₃	H
acido 3,4-dimetossicinnamico	OCH ₃	OCH ₃	H

Tab 2. Struttura e principali acidi idrossicinnamici.

I lignani

I lignani sono formati da due unità di 2-fenil-propano e costituiscono i monomeri della lignina, un materiale polimerico che rinforza le pareti delle cellule vegetali fungendo da matrice per le microfibre di cellulosa. La formazione dei lignani e la biosintesi della lignina sono catalizzati da enzimi differenti; di conseguenza i lignani naturali sono enantiomericamente puri, ossia prodotti da un accoppiamento controllato stereochimicamente, mentre le perossidasi, che formano la lignina, generano prodotti racemici attraverso un processo d'accoppiamento casuale (D'Archivio M. et al. 2010) (figura 4).

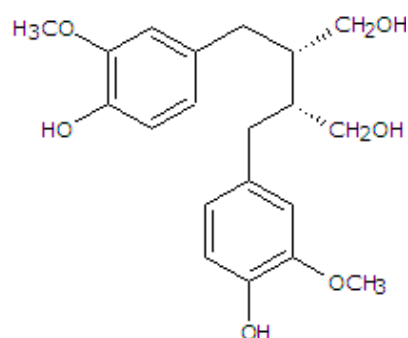


Fig 4. Struttura del secoisolariciresinolo.

Gli stilbeni

Gli stilbeni sono prodotti dalla combinazione della via dell'acetato e dello shikimato. Un esempio è il resveratrolo, un composto presente in natura nelle due forme isomeriche cis e soprattutto nella forma trans, la quale mostra una maggiore attività biologica (Souto A.H.A. et al. 2001) (figura 5).

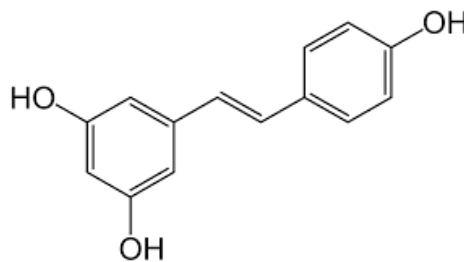


Fig 5. Struttura di uno stilbene

Tannini idrolizzabili

Dal punto di vista molecolare e strutturale i tannini si distinguono in: tannini idrolizzabili, derivati dall'acido gallico (C6-C1), di utilizzo in cosmesi, e tannini condensati, derivati dai flavonoidi, forti agenti di difesa passiva delle piante. I tannini idrolizzabili sono dei polimeri ad alto peso molecolare, e vengono detti idrolizzabili perché possono essere depolimerizzati da un enzima, chiamato tannasi. Quelli idrolizzabili sono strutturalmente diversi rispetto ai tannini condensati, anche se entrambi sono polimeri ad alto peso molecolare. Si distinguono i gallotannini, esteri dell'acido gallico e del glucosio, (figura 6) la cui idrolisi libera acido gallico, e gli ellagitannini, esteri dell'acido esaidrossidifenico e glucosio, la cui idrolisi libera acido ellagico (Yoshimura M. 2014).

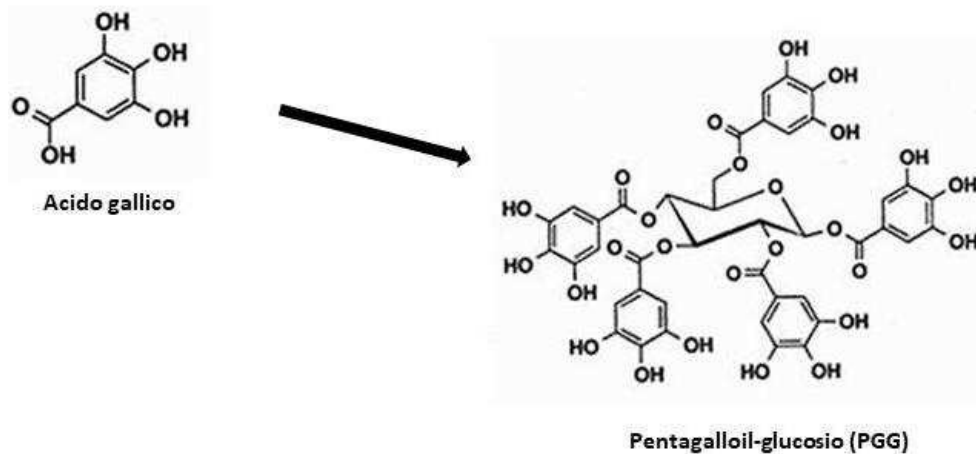


Fig 6. Struttura di un gallotannino (pentagalloyl-glucosio, o PGG).

Biosintesi dei polifenoli.

La biosintesi dei polifenoli è un processo strettamente correlato ai diversi stadi fisiologici della pianta (germinazione, crescita e sviluppo). Essa segue due diverse vie: la via dell'acido scichimico e quella dell'acido malonico (figura 7). L'acido scichimico è un prodotto del ciclo di Calvin che, in seguito a reazioni successive, porta alla formazione della fenilalanina. Nella maggior parte delle specie vegetali il passaggio chiave è rappresentato dalla conversione della fenilalanina in acido cinnamico, catalizzata dall'enzima fenilalanina-ammonio-liasi. La fenilalanina costituisce il precursore degli acidi idrossicinnamici, dei flavonoidi e dei polimeri fenolici non idrolizzabili (lignine e tannini condensati). I fenoli mostrano un discreto grado di reattività che li porta da una parte a formare sostanze più complesse, dall'altra a degradarsi in composti sempre più semplici, come i derivati benzoici, fino alla formazione dell'anidride carbonica (Quideau S. et al. 2011).

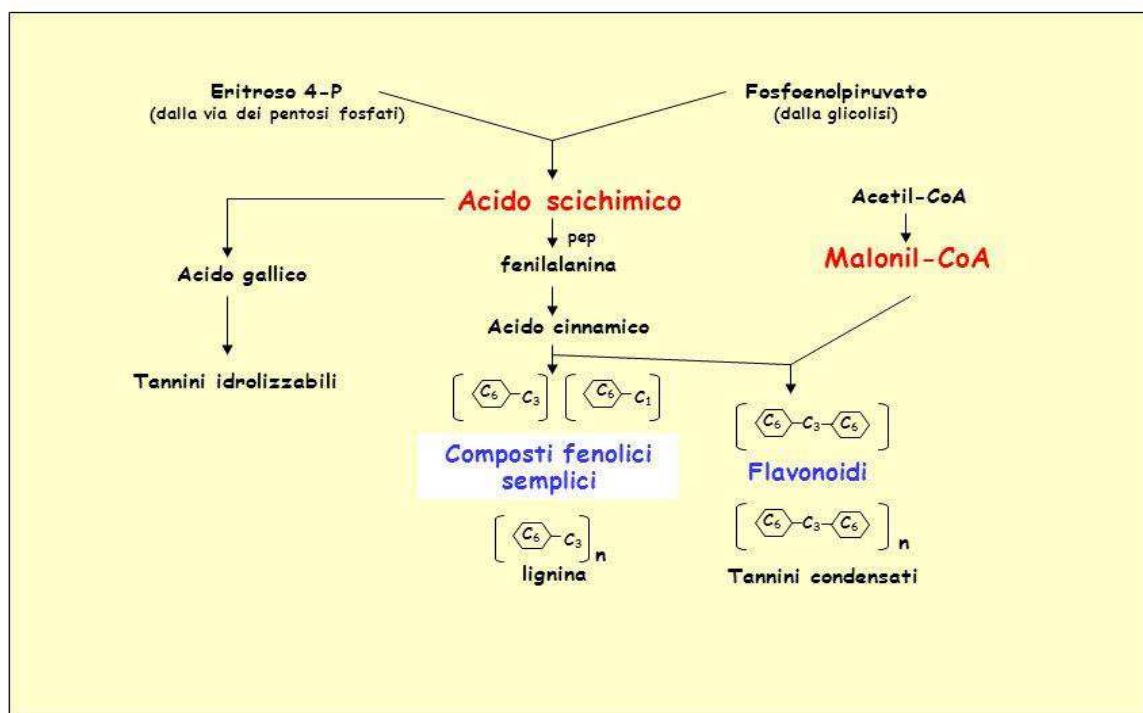


Fig 7. Biosintesi dei polifenoli.

Fonti alimentari di polifenoli.

Come riportato nei paragrafi precedenti, i polifenoli sono contenuti in alimenti vegetali di largo consumo, come frutta, verdura, legumi e cereali (particolarmente in quelli integrali), ma anche in tè verde, tè nero, vino rosso, caffè, cioccolato, olive ed olio extra vergine di oliva, erbe e spezie, frutta a guscio ed alghe. Essi non sono distribuiti uniformemente tra le diverse famiglie vegetali, determinandone spesso la diversità nel colore e le caratteristiche organolettiche. Alcuni polifenoli sono specifici di determinati prodotti alimentari (flavanoni negli agrumi, isoflavoni nella soia, floridzina nelle mele), mentre altri, come la quercitina, sono presenti in tutti i prodotti vegetali quali frutta, verdura, cereali, legumi, tè e vino. In genere quasi tutti i prodotti citati contengono una miscela complessa di più polifenoli. Le mele, ad esempio, contengono flavonoli in forma monomerica o oligomerica, acido

clorogenico e piccole quantità di altri acidi idrossicinnamici, glicosidi della quercitina, glicosidi della floretina e antocianine (Ferretti G. et al. 2014). Il profilo dei polifenoli per tutte le varietà di mele è praticamente identico, ma la concentrazione può variare notevolmente; ad esempio la mela da sidro contiene da 0,1 g di polifenoli totali/kg di peso fresco a 10 g/kg di peso fresco, a seconda della varietà. Anche il vino contiene una miscela complessa di polifenoli, la maggior parte dei quali provengono dalla buccia del chicco d'uva. Essi comprendono flavonoli, flavanoli, proantocianidine, antociani, acidi fenolici, idrossicinnamati e stilbeni. Tra questi composti il resveratrolo (stilbene) è uno dei più studiati in quanto è considerato il composto principale responsabile dei benefici apportati dal vino rosso alla salute umana. Tuttavia, la concentrazione di questo polifenolo nel vino rosso varia notevolmente. C'è molta variabilità anche nella composizione e nella concentrazione di composti fenolici tra gli olii di oliva vergini. Essi contengono almeno 36 composti fenolici strutturalmente distinti, la cui concentrazione totale varia 0,02-600 mg/kg di prodotto. Queste discrepanze sono ascrivibili a molteplici fattori, quali le stagioni di raccolta e di semina, le differenze territoriali, le modalità di coltivazione e di conservazione (luce, umidità, temperatura, tempo). Numerosi studi riferiscono che anche i legumi ed i cereali integrali sono buone fonti di polifenoli (Kumar G. et al. 2017; Singh B. et al. 2017; Wu G. et al. 2017) nei cereali integrali sono contenuti principalmente flavonoidi come catechina, galocatechina, proantocianidina, quercitina, lignani, la maggior parte dei quali si trova in forma legata alle macromolecole della parete cellulare, ma anche in forma libera, soprattutto in cereali come orzo e avena; acidi fenolici come gli acidi caffeico, ferulico, p-cumarico e sinapico (Martinez Tomè et al. 2004; Liyana-Pathirana et al. 2006; Adom et al. 2002). E' stato dimostrato che il contenuto in acidi fenolici in vari cereali integrali varia dal 15 al 38% nella forma libera, e dal 62 all' 85% nella forma legata. L'acido ferulico è il maggior composto fenolico presente nei cereali (Adom K.K. et al 2002; Perez-Jimenez J. et al. 2005).

In tabella 3 sono indicati i principali alimenti che contengono flavonoidi.

CLASSE	COMPOSTO	ALIMENTO
Isoflavoni	Genisteina Daidzeina	Legumi Legumi
Flavoni	Rutina Luteolina Crisina Apigenina Esperedina Tangeretina	Cipolle, mele, uva, broccoli, thè. Limone, olive, sedano. Buccia della frutta. Sedano, prezzemolo. Arance. Agrumi.
Flavonoli	Quercetina Miricetina Kemferolo	Thè, cipolle, broccoli, fagioli, cereali, mele, uva. Uva. Indivia, broccoli, thè.
Antocianine	Enina Cianidina Delfinidina	Uva nera e vino rosso. Uva, lamponi, fragole. Melanzane.
Flavanoli	Catechina Epicatechina Epigallocatechina	Mele, thè, vino, cioccolato, cereali integrali. Uva nera, vino rosso, legumi. Mele, thè, vino, cioccolato, legumi.
Flavanoni	Naringinina Taxifolina	Buccia degli agrumi. Agrumi.

Tab 3. Flavonoidi contenuti nei principali alimenti.

I flavoni, come apigenina e luteolina, si trovano prevalentemente in sedano, prezzemolo ed in molte erbe aromatiche. Anche alcuni cereali come il miglio ed il grano contengono C-glicosidi di flavoni (Brazier-Hicks M. et al. 2009).

I flavonoli sono molecole prive di colore che si accumulano principalmente nei tessuti esterni ed aerei, quindi in buccia ed in foglie di frutta e verdura, poiché la loro biosintesi è stimolata dalla luce solare, mentre sono assenti nella polpa. I flavonoli più diffusi negli alimenti sono la quercetina e kampferolo (Yao L. H. et al. 2004), contenuti principalmente in frutta, verdura, e bevande quali il thè ed il vino rosso. La fonte più ricca è rappresentata dai capperi, che ne contengono fino a 490 mg/100 g di peso fresco, ma sono contenuti anche in cipolle, cavolo riccio, broccoli, porri, frutti di bosco (mirtilli), uva ed in alcune erbe aromatiche e spezie, dove il contenuto varia da

10 a 100 mg/100 g di peso fresco (Slimestad R. et al. 2007). Anche il cacao, il thè (sia verde che nero), ed il vino rosso, ne sono ricchi (figura 9).

I flavanoni sono abbondanti in pomodori ed in piante aromatiche come la menta, ma sono presenti in concentrazioni elevate solo negli agrumi. I principali sono la naringenina nel pompelmo, l'esperetina nelle arance e l'eriodictiolo nei limoni. Il succo d'arancia contiene tra 200-600 mg di esperidina/L e 15-85 mg di narirutina/L; un solo bicchiere di succo di arancia può contenere tra 40 e 140 mg di flavanoni (He D. et al. 2011).

Gli isoflavoni hanno una distribuzione tassonomica limitata, trovandosi quasi esclusivamente nelle piante appartenenti alla famiglia delle Leguminose o Fabacee, in particolare nella soia (Mazur W. M. et al. 1998) che ne contiene tra 580 e 3800 mg/kg di peso fresco, mentre il contenuto di isoflavoni nel latte di soia è compreso tra 30 e 175 mg/L. Gli isoflavoni sono presenti anche nei fagioli e nelle fave, ma in concentrazioni minori rispetto a quelle della soia e dei prodotti derivati. Un'altra buona fonte di tali molecole è il trifoglio rosso o trifoglio dei prati (*Trifolium pratense*), anch'esso appartenente alla famiglia delle Leguminose.

I flavanoli, come le catechine, sono contenuti in molte varietà di frutta, quali le albicocche, che ne contengono circa 250 mg/kg di peso fresco. Sono anche presenti nel vino rosso (fino a 300 mg/L), ma il thè verde ed il cioccolato sono di gran lunga le fonti più ricche. Un infuso di thè verde contiene fino a 200 mg/L di catechine (Manach C. et al. 2004). Catechina ed epicatechina sono i principali flavanoli nella frutta, mentre galocatechina, epigallocatechina ed epigallocatechina gallato si trovano in alcuni semi di leguminose, in uva, e soprattutto nel thè. Poiché in molti casi i flavanoli sono presenti nelle bucce o nei semi di frutta e verdura, la loro assunzione da parte dell'organismo umano può essere limitata dal fatto che queste parti, essendo considerate "di scarto", sono eliminate durante i processi di lavorazione industriale di succhi di frutta o alimenti a base di frutta e verdura (Gil-Izquierdo A. et al. 2002) (figura 10).

Gli antociani sono pigmenti solubili in acqua, per cui essi sono disciolti nella linfa vacuolare dei tessuti epidermici di fiori e frutta, e sono responsabili dei colori della maggior parte dei petali, della frutta e verdura, e di alcune varietà di cereali come il riso nero. Sono contenuti in melanzane, cavoli, fagioli, cipolle, ravanelli e nel vino. Il contenuto negli alimenti è proporzionale all'intensità del colore e può raggiungere valori fino a 2-4 g/kg di peso fresco ad esempio nel ribes nero o nelle more (Clifford M.N. 2000).

Un altro gruppo di polifenoli comuni nella nostra dieta sono gli acidi fenolici, distinti in idrossibenzoici e idrossicinnamici (Russell W.R. et al. 2009) (figura 12). Tra gli acidi idrossicinnamici quelli più noti sono gli acidi caffeico, clorogenico, felurico e p-cumarico. Essi sono presenti con elevati livelli in frutta (mirtilli, uva, pere, mirtilli, mele, arance, limoni, pompelmi, pesche e ciliegie), verdura e ortaggi (patate, lattuga, brassica, broccoli, spinaci, pomodori e cavoli), bevande (thè, caffè) (Clifford M.N. 2000), legumi e cereali.

Tra gli idrossibenzoici, l'acido gallico (acido 3,4,5-trihydroxybenzoic) è ampiamente distribuito in molte famiglie differenti di piante superiori, dove è presente sia allo stato libero, sia associato a formare molecole più complesse, come i derivati esterei o polimeri. In natura, l'acido gallico e i suoi derivati sono presenti in quasi ogni parte della pianta, come corteccia, legno, foglia, frutta, radici e semi, ed in concentrazioni diverse in alimenti comuni come mirtillo, mora, fragole, prugne, uva, mango, anacardi, nocciole, noci, thè, vino (Daglia M. et al. 2014).

I lignani sono abbondanti nei semi di lino (3,7 g/kg peso secco), ma sono contenuti in tracce anche in cereali, frutta ed in alcuni ortaggi (Adlercreutz H. et al. 1997).

Gli Stilbeni sono assunti solo in piccole quantità con l'alimentazione umana; il principale rappresentante è il resveratrolo, contenuto nel vino (Guerrero R. F. et al. 2009).

Infine, è importante considerare che i dati relativi alle quantità di polifenoli contenuti negli alimenti risultano spesso discordanti a causa delle metodiche analitiche utilizzate, le quali si diversificano per strumentazione, procedimento estrattivo, specificità e sensibilità. Va altresì sottolineata l'importanza delle procedure di campionamento, che dovrebbero garantire il massimo della rappresentatività statistica. Inoltre, la presenza e la disponibilità delle sostanze fitochimiche dipendono anche dal trattamento tecnologico eventualmente subito dagli alimenti vegetali, sia esso domestico, artigianale o industriale.

Trattamenti tecnologici che influenzano il contenuto alimentare dei polifenoli.

Alcuni trattamenti tecnologici a cui vengono sottoposti gli alimenti per la loro preparazione e conservazione possono essere responsabili di diminuzioni, incrementi o cambiamenti nel contenuto e nella funzionalità dei polifenoli; da questo punto di vista, quelli di maggiore rilevanza, sono la frammentazione, la fermentazione, i trattamenti termici e l'alta pressione.

Frammentazione. Quando l'alimento viene sottoposto ad un trattamento di frammentazione subisce delle modifiche che possono portare ad una maggiore utilizzazione di alcuni composti. Studi recenti hanno suggerito che i polifenoli parzialmente ossidati durante il trattamento possono mostrare una attività antiossidante più elevata delle corrispondenti forme originarie; così come, durante la produzione di succhi, centrifugati, concentrati e del vino, le operazioni di macerazione facilitano la solubilizzazione dei polifenoli nel succo rendendoli disponibili per l'organismo umano. Il medesimo trattamento può portare ad una eliminazione non vantaggiosa di parte dell'alimento, come nel caso della crusca dei cereali ricca di fibre e vitamine, della buccia della frutta e dei pomodori che contiene oltre alla fibra e alle vitamine anche numerosi polifenoli (Anese M. et al. 2001). A questo proposito Manach (Manach C. M. et al. 2004) riporta che, durante la produzione di marmellate e conserve di frutta, il trattamento di frammentazione dei

tessuti vegetali comporta una degradazione ossidativa dei polifenoli per effetto di una compartimentazione e contatto dei substrati fenolici presenti nei vacuoli con le ossidasi citoplasmatiche. Successivamente questi sono trasformati in pigmenti marroni e polimerizzati; durante la produzione di succhi di frutta gli stadi di chiarificazione e stabilizzazione sono rivolti proprio a rimuovere alcuni flavonoidi responsabili di intorbidimento.

Fermentazione. Il trattamento di fermentazione può rendere attivi alcuni polifenoli per effetto di una modifica chimica della molecola. Questo procedimento è necessario per la produzione soprattutto dei derivati della soia, quali tofu, miso, salse di soia, yogurt e succedanei della carne; durante il trattamento avviene l'idrolisi delle forme glicosidate degli isoflavoni che si trasformano in molecole più attive (Mateo Anson N. et al. 2011). In particolare, durante la fase di fermentazione che avviene nel corso della vinificazione, i polifenoli presenti nella buccia dell'uva vengono vantaggiosamente rilasciati nel mosto, mentre durante la fermentazione delle foglie del tè verde, necessaria per la preparazione del tè nero, le catechine presenti si ossidano in sostanze aromatiche conferendo al tè un gusto più gradevole ma meno ricco in polifenoli (Manach C. M. et al 2004).

Temperatura. La temperatura è il principale parametro responsabile delle modificazioni a carico delle sostanze fitochimiche. La scottatura, che è un pre-trattamento abbastanza comune a partire dal materiale crudo prima delle operazioni successive, provoca la denaturazione degli enzimi prevenendo così l'attacco enzimatico ad alcuni fitocomposti che sono invece termoresistenti. Viceversa, durante la cottura delle Brassicacee (cavoli e broccoli), si ha una riduzione delle proprietà funzionali dei glucosinolati dovuta all'inattivazione dell'enzima mirosinasi, alla degradazione termica dei glucosinolati stessi e dei loro prodotti di idrolisi, alla degradazione dei cofattori enzimatici, acido ascorbico e ferro, e dissoluzione degli stessi e dei loro prodotti di idrolisi nell'acqua di cottura (figura 8) (Chevolleau S. et al 1997; Rowland I. 1999). Anche la quercetina è sensibile alla temperatura: si è visto

infatti che cipolle e pomodori perdono il 75-80% del contenuto iniziale dopo bollitura per 15 minuti, il 65% dopo cottura a microonde ed il 30% dopo frittura (Crozier A. et al 1997). Similmente gli acidi fenolici subiscono una perdita nelle patate durante la preparazione di frittura industriale (Clifford M.N. 2000). La temperatura, se da un lato causa la diminuzione del contenuto di vitamina C nei pomodori, dall'altro aumenta la quantità di licopene e la capacità antiossidante totale; inoltre lascia inalterati i livelli di polifenoli e di flavonoidi totali (Capanoglu E. et al. 2019). Gli isoflavoni della soia non vengono distrutti dal calore, ma piuttosto sono soggetti ad una conversione fra forme differenti; inoltre, le eventuali perdite riscontrate durante la cottura sarebbero il risultato del procedimento di lisciviazione e non della temperatura. Anche Coward L. (Coward L. et al 1998) non ha riscontrato modificazioni significative nel contenuto totale di isoflavoni della soia in seguito alla cottura in forno o alla frittura, piuttosto un cambiamento nel profilo. Un'alterazione è stata riscontrata solo a temperature maggiori e a tempi più lunghi rispetto a quelli usualmente utilizzati nei trattamenti tecnologici (temperature comprese fra i 95-215 °C per più di 90 minuti).

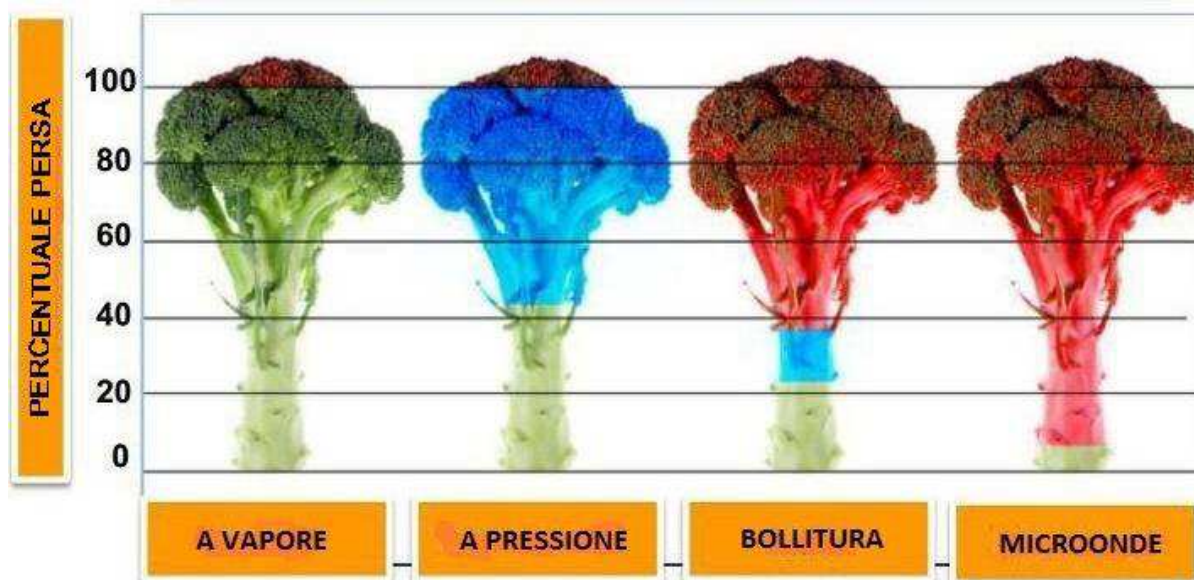


Fig 8. Confronto della perdita in fitochimici nei vegetali tra i quattro metodi di cottura. Rosso: fitochimici distrutti; blu: perdita dei fitochimici nell'acqua di cottura; verde: fitochimici conservati).

Numerosi studi sono stati effettuati sui legumi; ad esempio è stato studiato l'effetto della bollitura, della cottura in autoclave e della cottura a microonde sulla composizione nutrizionale dei semi di ceci (Tarek A. 2002). Tutti i trattamenti di cottura hanno causato una diminuzione significativa ($p < 0,05$) della frazione lipidica, delle ceneri totali, della frazione di carboidrati, dei fattori antinutrizionali, quali minerali e vitamine del gruppo B. Inoltre, i trattamenti di cottura hanno ridotto le concentrazioni di lisina, triptofano, degli amminoacidi aromatici e di quelli contenenti zolfo. Le perdite in vitamine del gruppo B e in minerali nei ceci cotti al microonde erano inferiori rispetto a quelli cotti in ebollizione ed in autoclave. Pertanto, sulla base dei risultati di questo studio, la cottura al microonde risulta essere la migliore alternativa per la preparazione dei legumi nella dieta.

Alta pressione. Nel panorama dei trattamenti subiti dagli alimenti, bisogna anche considerare la tecnologia dell'alta pressione che viene utilizzata come valida alternativa ai metodi convenzionali di pastorizzazione e sterilizzazione. Studi condotti su carote, pomodori e broccoli hanno dimostrato che il loro contenuto in licopene, beta-carotene, vitamina C e la capacità antiossidante non subiscono modifiche dopo un trattamento di pressurizzazione di 60 minuti; tuttavia, si possono produrre alterazioni strutturali fisico-chimiche che potrebbero alterarne la biodisponibilità (Fernandez Garcia A. et al. 2014; Butz P. et al. 2002). Inoltre, per effetto della luce e/o dell'ossigeno atmosferico si può avere anche un depauperamento per modificazioni della struttura chimica; il trattamento può poi favorire o accelerare reazioni redox tra antiossidanti, ossigeno e/o altri costituenti (Zanoni B. 1998; Hurrell R. F. 1999). Le conseguenze del trattamento sul destino delle sostanze fitochimiche differisce in relazione, oltre che al tipo di intervento che viene applicato, alla concentrazione, alla struttura chimica, allo stato ossidativo, alla localizzazione nella struttura vegetale e alle possibili interazioni con altri componenti dell'alimento.

Bioaccessibilità e biodisponibilità dei polifenoli

Ogni volta che si ingerisce un alimento o una bevanda, le sostanze nutritive ivi contenute vengono estratte dall'apparato digerente, riversate nel sangue e trasportate ai rispettivi tessuti. Tuttavia, non tutti i nutrienti possono essere utilizzati allo stesso modo. In altre parole, essi differiscono nella loro *biodisponibilità* e *bioaccessibilità*. La bioaccessibilità indica la frazione di nutrienti rilasciata dalla matrice alimentare durante la digestione gastro-intestinale e disponibile per l'assorbimento: pertanto essa comprende le intere sequenze di eventi che avvengono durante la digestione dei cibi in materiale che può essere assimilato dall'organismo tramite le cellule epiteliali della mucosa gastro-intestinale (Marín L. et al. 2015). La biodisponibilità, invece, indica la frazione di nutrienti che l'organismo è in grado di assorbire e di utilizzare per le proprie funzioni fisiologiche; in genere comprende anche le velocità con cui questi nutrienti vengono assorbiti e resi disponibili nel sito di azione (Crozier A. et al 2009). Un nutriente scarsamente biodisponibile non è assorbito in modo significativo, non arriva agli organi bersaglio e ciò può ridurre la sua efficacia. Per questa ragione la determinazione della biodisponibilità di un composto o molecola risulta essere di primario interesse al fine di valutare la funzione e gli effetti derivanti dall'assunzione di una sostanza nutritiva. La biodisponibilità dipende dalla bioaccessibilità (Bohn T. 2014) la quale è fortemente influenzata dalle proprietà fisico-chimiche della matrice (composizione, viscosità, solubilità, pH) e dai processi tecnologici eseguiti nella produzione dell'alimento, oltre che dalle condizioni fisiologiche dell'individuo.

L'assorbimento dei polifenoli dipende dalle loro caratteristiche strutturali e il loro metabolismo avviene attraverso un pathway comune: fegato e rene sono gli organi principalmente coinvolti (Lewandowska U. et al. 2013; Scalbert A. et al. 2000; Walle T. 2004) (figura 9).

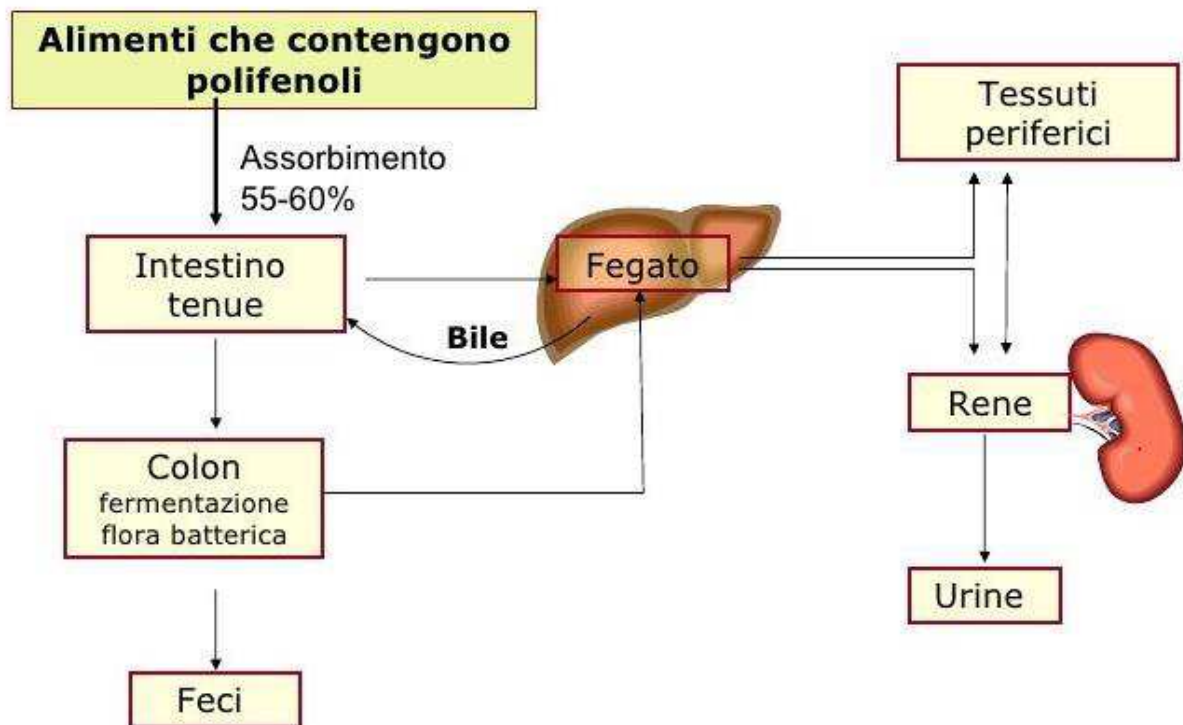


Fig 9. Ciclo metabolico dei polifenoli introdotti con la dieta.

La maggior parte dei composti è presente negli alimenti come esteri, glucosidi o polimeri che non possono essere assorbiti nella loro forma originaria, ma devono essere idrolizzati dagli enzimi intestinali e/o dalla microflora del colon. La microflora possiede una grande capacità di deglicosilazione che avviene molto rapidamente. L'assorbimento a livello gastrico è invece limitato. Quando è coinvolta la flora intestinale l'efficienza dell'assorbimento è spesso ridotta in quanto la flora può degradare anche gli agliconi e produrre acidi aromatici semplici. Ha inoltre in questa fase una funzione importante anche lo stato fisiologico dell'organismo, come ad esempio, durante l'assunzione di farmaci. L'aglicone libero, ossia la parte non zuccherina del glucoside, può passare nella cellula epiteliale passivamente o per diffusione facilitata; comunque, la forma glucosidica può essere trasportata anche intatta all'interno della cellula attraverso un carrier e poi essere idrolizzata dalle beta-glucosidasi presente nel citosol (Scalbert A. 2000; D'Archivio M. 2010). Nelle

cellule dell'intestino tenue avviene la coniugazione con l'acido glucuronico e in minor misura a forme solfate e metilate; le antocianine rappresentano un'eccezione perché è stata riscontrata la presenza nel plasma e nelle urine della forma glicosilata imm modificata, il che implicherebbe il coinvolgimento di recettori di trasporto del glucosio durante l'assorbimento (Milbury P.E. et al. 2002). Alcuni flavonoidi, come ad esempio la rutina, non vengono deglicosilati e raggiungono l'ileo terminale e l'intestino crasso (Williamson G. 2002). Gli isoflavoni invece vengono assorbiti nel colon perché genisteina e daidzeina sono relativamente resistenti alla degradazione, anche se la daidzeina in alcuni individui viene convertita dagli enzimi batterici in equolo (Setchell K.D. et al. 2002; Hendrich S. 2002). La quercetina è rapidamente idrolizzata dalla flora del colon in composti fenolici a basso peso molecolare e pertanto viene assorbita meno efficientemente nell'intestino tenue. In uno studio in cui venivano utilizzati soggetti ileostomizzati si è riscontrato un assorbimento dell'aglicone della quercetina, quest'ultima somministrata oralmente, pari al 24% (Hollman P.C. 1999). Nel fegato i flavonoidi coniugati vengono deglucuronidati dall'enzima β -glucuronidasi e poi solforati, mentre i glucuronidi intatti subiscono la metilazione; invece gli agliconi che raggiungono il fegato come tali vengono ivi coniugati. I coniugati sono secreti via biliare nel duodeno dove sono soggetti all'azione dell'enzima β -glucosidasi e poi riassorbiti (circolo enteroepatico). Le assunzioni con la dieta di flavonoli, flavoni e flavanoli monomerici risultano relativamente basse e le concentrazioni plasmatiche raramente superano 1 mmoli/l a causa dell'assorbimento limitato e della loro rapida eliminazione. Flavanoni ed isoflavoni sono i flavonoidi con il profilo di biodisponibilità migliore: infatti, la concentrazione plasmatica può raggiungere i 5 mmoli/l (Manach C.M. et al. 2004). I bassi livelli di polifenoli riscontrati nel plasma rispetto ai 10-100 mg di ogni singolo composto assunti con la dieta mettono in evidenza i complessi meccanismi che regolano la biodisponibilità. Sono necessarie ulteriori informazioni sulla influenza della microflora intestinale, sulla natura dei metaboliti e sulla distribuzione nei tessuti.

RUOLO DEI LEGUMI NELL'ALIMENTAZIONE UMANA

I legumi rappresentano una componente importante della dieta umana in diverse aree geografiche. Essi rappresentano una fonte rilevante di proteine vegetali e completano il fabbisogno di proteine vegetali ottenute da cereali, radici, tuberi, in particolare nei paesi in via di sviluppo. Nel corso degli ultimi anni, un'attenzione crescente è stata rivolta ai legumi e alle loro proprietà nutrizionali e salutistiche fino alla dichiarazione da parte della Fao del 2016 come “Anno internazionale dei legumi”. Si riconosce quindi un ruolo peculiare a questi alimenti nel mantenimento di un buono stato di salute e nella prevenzione di malattie croniche non trasmissibili (malattie cardiovascolari, neoplasie, malattie respiratorie, diabete e altre minori), responsabili del 93% di tutte le morti in Italia. Nell'ultimo decennio, grazie alla riscoperta della dieta Mediterranea, l'uso dei legumi secchi è lievemente aumentato e loro proprietà sono state riconosciute pienamente in linea con le attuali raccomandazioni dei nutrizionisti. Anche nei paesi in via di sviluppo, questi alimenti, che hanno rappresentato da sempre la base dell'alimentazione per gli adulti, vengono attualmente raccomandati dalle organizzazioni internazionali (FAO, OMS) anche per l'alimentazione infantile. Tutti questi fattori hanno rinnovato l'interesse per la coltivazione dei legumi in molte zone; in particolare nel bacino del Mediterraneo sono stati avviati progetti agronomici e di miglioramento genetico per una crescita quantitativa e qualitativa delle Leguminosae da granella.

I legumi appartengono alla famiglia delle *Fabaceae*, comunemente detta anche delle *Leguminose*. È, dopo quella delle *Asteracee*, la più vasta famiglia delle *Dicotiledoni* (circa 12.000 specie). Secondo l'attuale classificazione le *Fabacee* comprendono tre sottofamiglie: *Cesalpinoidee* (per es. carrubo, tamarindo), *Mimosoidee* (per es. acacia, mimosa), *Papilioidee* (per es. fagiolo, fava, cece, lenticchia, lupino, cicerchia, pisello, soia, glicine) (figura 10).

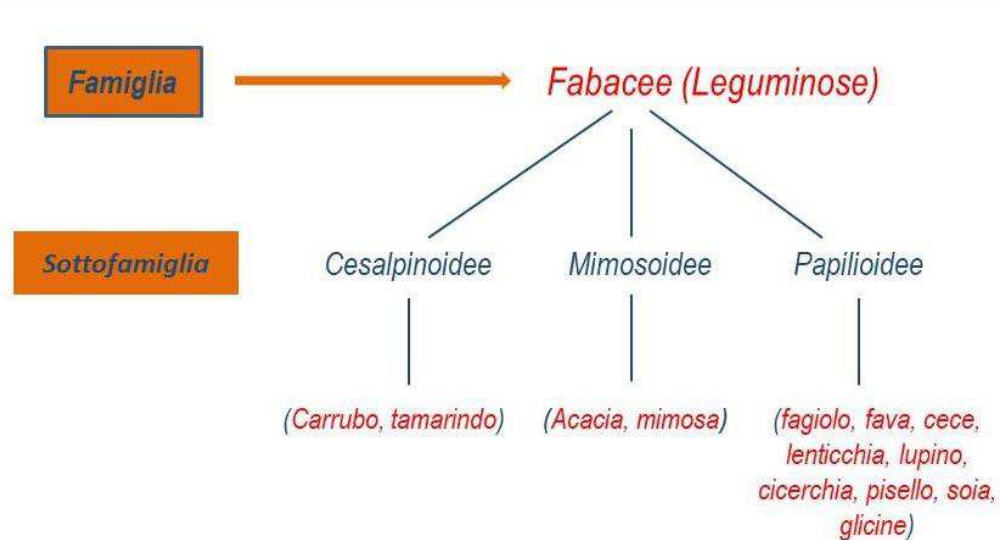


Fig 10. Classificazione delle Fabacee (Leguminose).

Si tratta di un gruppo di piante che condividono una serie di caratteristiche comuni. La dimensione della pianta può variare, così che esistono delle leguminose *erbacee*, delle leguminose *arbustive* e anche alcune piante *arboree*, strutturate come un albero, tra cui la mimosa. La caratteristica che distingue tutte le piante appartenenti alla famiglia, senza eccezioni, è il frutto: viene chiamato *baccello* che contiene i semi. I semi vengono consumati freschi o conservati (fave, piselli) mentre in altri casi vengono fatti essiccare e poi reidratati per il consumo oppure lavorati per la creazione di farina, o per l'estrazione di concentrati proteici od oli. I legumi possono anche essere conservati con diverse tecnologie. In Italia i legumi più diffusi sono: fagioli, ceci, piselli, fave e lenticchie; altri come i lupini e le cicerchie sono meno diffusi e tipici soprattutto di alcune zone.

Nei prossimi paragrafi verranno riportati i dati di studi in vitro e in vivo sui potenziali meccanismi molecolari coinvolti nel ruolo protettivo esercitato dai polifenoli dei legumi. Particolare attenzione è riservata a tre legumi del Repertorio Regionale (RR) della Biodiversità agraria delle Marche tra cui la varietà di Fava di Fratte Rosa (PU), il Cece Quercia di Appignano (MC) e la Cicerchia di serra dei Conti (AN). Le farine

ottenute mediante macinazione a pietra, sono impiegate per produrre delle specialità alimentari che saranno oggetto di studi composizionali e funzionali.

Legumi: aspetti nutrizionali

a. Macronutrienti e fibra dietetica

Il contenuto in proteine dei semi di legumi va da 20% a 41%, valori che dipendono dalla varietà (Guéguen J. et al. 1994). I carboidrati variano dal 7% al 47%. I lipidi sono circa 1,2-4%. La fibra dietetica è compresa tra il 15 e il 30%, di cui l'emicellulosa sembra essere la componente principale (60%): i legumi sono anche una buona fonte di minerali alimentari, come il fosforo, il potassio, lo zolfo e il ferro. Il contenuto in calcio varia da 45 mg/100 g (nei lupini) a 257 mg/100 g (nella soia) di massa secca (Baginsky C. et al. 2013). Come si può notare dalla tabella 5, l'energia proveniente dai legumi è ripartita quasi esclusivamente tra proteine e carboidrati, eccezion fatta per la soia che ha anche un alto contenuto di lipidi. La quantità di proteine che apportano è così alta da risultare, infatti, molto più simile a quella contenuta negli alimenti di origine animale, che notoriamente ne rappresentano la fonte principale nell'alimentazione occidentale. Questo significa che, opportunamente combinati, i legumi possono essere dei sostituti più che validi di carne, uova, formaggi e pesce.

	Fagioli Borlotti secchi	Ceci secchi	Piselli secchi	Fave secche	Lenticchie secche	Lupini	Soia secca
Composizione chimica	Valori per 100g	Valori per 100g	Valori per 100g	Valori per 100g	Valori per 100g	Valori per 100g	Valori per 100g
Parte edibile %	100	100	100	100	100	76	100
Acqua (g)	10,3	10,3	13	10,2	11,2	69	9,5
Proteine (g)	20,2	20,9	21,7	21,3	22,7	16,4	36,9
Lipidi (g)	2	6,3	2	3	1	2,4	19,1
Colesterolo (mg)	0	0	0	0	0	0	0
Carboidrati disponibili	47,5	46,9	48,2	29,7	51,1	7,1	23,2
Amido (g)	40	39,3	41,2	13,9	44,8	6	11,1
Zuccheri solubili (g)	3,5	3,7	2,9	14,5	1,8	0,5	11
Energia (kcal)	291	316	286	224	291	114	407
Energia (kJ)	1216	1323	1195	935	1219	476	1701
Sodio (mg)	3	6	38		8		4
Potassio (mg)	1478	881	990		980		1740
Ferro (mg)	9	6,4	4,5		8	5,5	6,9
Calcio (mg)	102	142	48		57	45	257
Fosforo (mg)	464	415	320		376	100	591
Magnesio (mg)	163	130			83		
Zinco (mg)	2,9	3,2			2,9		
Rame (mg)	0,7	1			1		
Selenio (µg)	16	2			10,5		
Tiamina (mg)	0,5	0,3	0,58		0,47	0,1	0,99
Riboflavina (mg)	0,12	0,1	0,15		0,2	0,01	0,52
Niacina (mg)	2,1	2,5	2,2		2	0,2	2,5
Vitamina A retinolo eq. (mg)		10	10		10		
Vitamina C (mg)	tr	tr	4	tr	tr		tr

Tab 5. Composizione nutrizionale dei principali legumi (CREA- Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione).

b. Micronutrienti

Vitamina C. I legumi sono una fonte di vitamine idrosolubili tra cui la Vitamina C. L'effetto di trattamenti tecnologici sui livelli di vitamina C è stato studiato in diverse varietà di fave da Kmiecik et al (Kmiecik et al. 1990). Il contenuto della vitamina C diminuisce con l'aumentare del grado di maturazione del seme dal 25% al 40%. Il trattamento del Blanching provoca una diminuzione del contenuto della vitamina C del 14-43%. Con il congelamento dei semi ed una conservazione di circa 6 mesi del prodotto surgelato il contenuto di vitamine diminuisce di circa 24-56%. I semi interi congelati contengono 93-138 mg · kg⁻¹ di vitamina C dopo cottura (rispetto ai semi freschi, le perdite hanno raggiunto il 56-73%), mentre i semi conservati in scatola

contengono 82-117 mg · kg⁻¹ (confrontati con semi freschi, le perdite in vitamine raggiungono il 63-73%).

Folati. I semi di legumi sono anche un'importante fonte di folati. Il processamento industriale, come ad esempio la conservazione o il congelamento, la germinazione, il tipo di cultivar e la fase di maturità modulano il contenuto in folati (Sánchez-Moreno C. et al. 2005; Hefni M. E. et al. 2015). E' stato confrontato il contenuto in folati di quattro varietà di semi di fava, ed è stato trovato che esso varia nell'intervallo 1,1-1,3 mg · kg⁻¹ di peso fresco, e inoltre esso risulta essere da quattro a sei volte più in alto rispetto ai semi secchi. La conservazione industriale dei semi secchi provoca una riduzione del contenuto in folati di circa 20%, mentre il congelamento non mostra alcun effetto. Con la germinazione dei semi di fava si raggiunge un contenuto in folati maggiore del 40%.

Carotenoidi e tocoferoli. I legumi sono anche ottime fonti di carotenoidi (compresa la provitamina A) e tocoferoli (vitamina E), i quali svolgono un ruolo fondamentale nella prevenzione dei processi infiammatori, e nella prevenzione di disturbi coronarici, neuromuscolari e visivi (Fernández-Marín B. et al. 2014).

Fibre. Nei legumi le fibre alimentari sono comprese tra il 15-32%, di cui approssimativamente un terzo è formato da fibre insolubili ed il restante da fibra solubile. La frazione insolubile è localizzata prevalentemente nei tegumenti del seme ed è costituita da cellulosa, emicellulosa e lignina, mentre quella solubile, comprende le pectine ed una parte delle emicellulose. Il rapporto tra fibra solubile ed insolubile varia nei diversi legumi ed è più elevato nei fagioli e più basso nelle lenticchie (Brummer Y. et al. 2015). Nella tabella 6 sono riportati i livelli di fibra totale, fibra solubile e fibra insolubile di alcuni tipi di legumi e cereali. I valori sono espressi in g/100 g di peso secco.

	Fibra totale (g/100g)	Fibra solubile (g/100g)	Fibra insolubile (g/100g)
Fagioli borlotti secchi	17,3	1,54	15,71
Ceci secchi	13,6	1,13	12,45
Piselli secchi	15,7		
Fave secche	21,1	1,1	20
Lenticchie secche	13,8	0,92	12,91
Soia secca	11,9		
Farro	6,8	1	5,75
Orzo	9,2	4,41	4,83
Segale	14,3	3,58	10,69

Tab 6. Composizione in fibre dei principali legumi e cereali minori. (CREA- Centro di Ricerca per gli Alimenti e la Nutrizione)

Il cece (*Cicer Arietinum*)

Il cece è una delle leguminose da granella più antiche e largamente utilizzate nel Medio ed Estremo Oriente. Ritrovamenti archeologici, ad Hacilar in Turchia, di campioni di seme probabilmente ascrivibili a forme selvatiche di *Cicer* sono stati fatti risalire ad oltre 5000 anni a.C. Prove di coltivazione risalenti all'età del Bronzo sono state ritrovate in Iraq nei millenni successivi. Tracce scritte, recentemente identificate, proverebbero la presenza del cece nella valle del Nilo tra il 1580 e il 1100 a. C. Il termine Cicer deriverebbe dal greco "Kikus" che significa forza, potenza. In Grecia, dove era consumato sin dai tempi di Omero, era chiamato "Erèbinthos" ed anche "Krios" con riferimento all'ariete del quale il seme del cece richiamerebbe la forma della testa.

Il genere *Cicer* comprende 9 specie annuali (*C. arietinum*, *C. reticulatum*, *C. echinospermum*, *C. pinnatifidum*, *C. judaicum*, *C. bijugum*, *C. cuneatum*, *C. yamashitae*, *C. chorassanicum*), 33 specie perenni ed 1 non specifica (Van der Maesen L. J. G. 1987). Il cece è una pianta annuale con apparato radicale caratterizzato da una radice principale (fittone) che può raggiungere profondità fino a 1,20 m e produce radici laterali più piccole. È coltivato in diversi paesi dove sussistono notevoli differenze riguardo: temperature, fotoperiodo, precipitazioni atmosferiche e tutta una serie di fattori che condizionano notevolmente lo sviluppo della pianta, il suo aspetto fenologico e la riproduzione. La germinazione può verificarsi sotto un'ampia gamma di temperature, ma quelle che assicurano risultati soddisfacenti sono comprese tra i 15 ed i 30 °C. La temperatura ottimale è di 20 °C ed al di sotto dei 15 °C si possono creare emergenze con ritardi e problemi vari: tale condizione può verificarsi a seconda dell'epoca di semina in ambiente mediterraneo. I ceci rappresentano uno dei più vecchi e più consumati legumi nel mondo, in particolare nelle aree tropicali e subtropicali. I semi sono coltivati principalmente nell'area mediterranea, nel Vicino Oriente, in Asia Centrale e in America (Singh U. et al. 1991).

Cece Quercia di Appignano (MC) La varietà del Cece Quercia di Appignano (MC) è stata reperita nella zona riferibile al comune di Appignano (MC) a circa 400 m di altitudine posta a cavaliere tra le medie valli del Potenza e del Misa a circa 15 Km dal capoluogo di provincia. Trattasi di zone caratterizzate da terreni fortemente argillosi senza pendenze di rilievo. La varietà è inserita nel Repertorio della Biodiversità Agraria della Regione Marche.

Qualità nutrizionali dei ceci. I pregi nutrizionali di questo legume sono dovuti principalmente al discreto contenuto in proteine (21,7% -23,4%), associato ad un elevato contenuto in carboidrati (41,1% -47,4%), tra cui l'amido è la principale frazione, rappresentandone circa l'83,9% dei carboidrati totali (Rincón F. et al. 1998). Per questo il cece è considerato un alimento bilanciato nell'apporto proteico ed

energetico (Sarmiento A. et al. 2015). Per quanto riguarda i carboidrati, il cece contiene: monosaccaridi, disaccaridi e oligosaccaridi tra cui lo stachiosio, ciceritolo, raffiniosio e verbascosio (Han I. H. et al. 2006).

Interessante è il contenuto basso in lipidi, che sono responsabili del caratteristico sapore del cece e di alcune sue caratteristiche tecnologiche (Carnovale et al. 1987). I lipidi sono presenti in quantità basse. Il contenuto di acidi grassi totali nei semi di ceci varia dal 2,70-6,48% (Alajaji S.A. et al. 2006). Gli acidi grassi polinsaturi (PUFA) sono ~ 66%, gli acidi grassi monoinsaturi ~ 19% e gli acidi grassi saturi ~ 15%. Tra i PUFA, l'acido linoleico è circa il 51,2%, mentre tra i monoinsaturi l'acido oleico è circa il 32,6%. Il cece ha una maggiore quantità di acido linoleico e acido oleico rispetto ad altri tipi di legumi come lenticchie (44,4% acido linoleico e 20,9% acido oleico), pisello (45,6% acido linoleico e 23,2% acido oleico) e fagioli (46,7% di acido linoleico e 28,1% acido oleico).

Il β -sitosterolo, il campesterolo e lo stigmasterolo sono importanti steroli presenti nell'olio di ceci. Ca, Mg, P e, soprattutto, K sono presenti anche nei semi di ceci. Il cece è una buona fonte di importanti vitamine come la riboflavina, la niacina, la tiamina, il folato e il precursore della vitamina A, il β -carotene.

I ceci sono un alimento mediamente calorico ed energetico; infatti 100 grammi di ceci cotti (ceci secchi bolliti in acqua distillata senza aggiunta di sale) apportano al nostro organismo circa 120 calorie. In tabella 7 sono riportati i valori nutrizionali corrispondenti per 100 grammi di ceci cotti ottenuti da ceci secchi bolliti in acqua distillata senza aggiunta di sale (fonte: INRAN).

Acqua	63,6 g
Proteine	7,0 g
Lipidi	2,4 g
Carboidrati	18,9 g
Amido	16,0 g
Zuccheri solubili	1,3 g
Fibra totale	5,8 g
Sodio	5 mg
Potassio	302 mg
Ferro	2,2 mg
Calcio	58 mg
Fosforo	148 mg
Tiamina	0,20 mg
Riboflavina	0,04 mg
Niacina	0,90 mg
Vitamina A	4 mcg

Tab 7. Valori nutrizionali del cece riferiti a 100 g di ceci cotti ottenuti da ceci secchi bolliti in acqua distillata senza aggiunta di sale (INRAN).

Sebbene i semi di questo legume siano stati consumati per migliaia di anni per le loro qualità nutrizionali, solo negli ultimi 2-3 anni è stato riproposto l'interesse per i legumi come cibo e il loro potenziale impatto sulla salute umana. Dall'esame della letteratura emerge che il consumo di ceci esercita benefici fisiologici e possono contribuire a ridurre il rischio di malattie croniche (Jukanti A. K. et al. 2012), come malattie cardiovascolari (Kushi L.H. et al. 1999; Dilis V. et al. 2009; Bouchenak M. et al. 2013), il diabete di tipo 2, le malattie dell'apparato digerente, alcuni tipi di cancro (Pittaway J. K. et al. 2007) e l'obesità (Crujeiras A. B. et al. 2007; Yang Y. et al. 2007).

Il cece è un legume molto ricco in sostanze fitochimiche antiossidanti, tra i composti fenolici, i ceci contengono in particolar modo tannini, isoflavoni e lignani (Champ M. M-J. 2002). Nei legumi la presenza dei polifenoli è spesso correlata al colore del

seme e alla sua attività antiossidante. Mediante HPLC-DAD sono stati analizzati simultaneamente 14 composti polifenolici, tra cui due antociani, in diverse varietà di legumi ed è stato correlato il contenuto in polifenoli con il colore del rivestimento del seme e l'attività antiossidante (Giusti F. et al. 2017).

La cicerchia (*Lathyrus sativus* L.)

L'origine della cicerchia è molto antica; essa proviene dal Medio Oriente ed i greci la chiamavano *lathiros*, per i romani era *cicercula*. In Italia erano diffuse una ventina di specie, coltivate nel centro e sud. Nel tempo la produzione si è progressivamente ridotta, fino quasi a scomparire. La varietà preferibile, per la facilità di cottura ed il sapore, è minuta. La cicerchia (*Lathyrus sativus* L.) è un legume appartenente alla famiglia delle Fabaceae, rappresentato da oltre 200 specie in tutto il mondo (Tamburino R. et al. 2012). Come la maggior parte dei membri delle Fabaceae, il genere *Lathyrus* presenta diversi usi: alimentare, agricolo, industriale, ornamentale e nella medicina tradizionale. È una coltura particolarmente importante in aree tendenti alla siccità ed alla carestia, ed è per questo nota come *coltura di assicurazione* poiché fornisce un buon raccolto quando le altre colture falliscono. Il consumo di questa pianta leguminosa in Italia è limitato ad alcune aree del centro-sud ed è in costante declino.

Qualità nutrizionali della cicerchia. Sarmento A. e collaboratori (Sarmento A. et al. 2015) hanno caratterizzato il profilo nutrizionale e le proprietà bioattive di *L. sativus*; questo legume ha mostrato un elevato contenuto in carboidrati, proteine, ceneri, acidi grassi saturi e acidi grassi polinsaturi, un basso contenuto in grassi insaturi ed un basso valore energetico. Dall'esame della letteratura scientifica sui profili chimici e biologici di due specie di *Lathyrus* (*L. czeczottianus* e *L. nissolia*) (Llorent-Martínez E.J. et al. 2017) emerge che la cicerchia presenta un interessante contenuto in

polifenoli e flavonoidi totali. Inoltre, sono stati studiati anche gli effetti antiossidanti, l'inibizione enzimatica degli enzimi colinesterasi, tirosinasi, α -amilasi e α -glucosidasi. Estratti di cicerchia esercitano effetti citotossici *in vitro*, sulle cellule renali embrionali umane (HEK293). *L. czechottianus* mostrava proprietà antiossidanti maggiori rispetto a *L. nissolia*. Tuttavia, *L. nissolia* esibiva maggiori effetti inibitori enzimatici contro la colinesterasi, amilasi e glucosidasi. L'analisi HPLC-ESI-MSn ha rivelato che i flavonoidi erano i componenti principali negli estratti di entrambe le varietà di legume, gli estratti di *Lathyrus* erano maggiormente ricchi in componenti biologicamente attivi.

I risultati dei macronutrienti e del valore energetico ottenuti per i semi di *C L. sativus* sono riportati nella tabella 8. I carboidrati rappresentano i macronutrienti predominanti ed includono le fibre. Le proteine rappresentano il secondo componente più abbondante, ed a seguire le ceneri.

	SEMI CRUDI	SEMI IN AMMOLLO	SEMI COTTI
Carboidrati (g kg⁻¹ dw)	642.25 ± 12.32	666.26 ± 8.61	698.98 ± 16.33
Proteine (g kg⁻¹ dw)	316.58 ± 12.83	289.47 ± 8.94	256.98 ± 15.76
Ceneri (g kg⁻¹ dw)	35.80 ± 0.57	36.05 ± 0.21	29.15 ± 2.19
Grassi (g kg⁻¹ dw)	5.35 ± 0.92	8.20 ± 1.27	14.85 ± 0.78
Valore energetico (kcal kg⁻¹ dw)	3883.65 ± 1.65	3896.72 ± 5.09	3957.67 ± 8.94

Tab.8 Composizione in macronutrienti e valore energetico dei semi di *Lathyrus sativus*. I risultati sono espressi come media ± la deviazione standard, con $p < 0,05$. (dw: peso secco)

Cicerchia di Serra de Conti. Nel territorio di Serra de' Conti (AN) si coltiva con tecniche a basso impatto ambientale una varietà particolare di cicerchia: piatta e spigolosa, con colorazioni che vanno dal grigio al marrone maculato, con una buccia poco coriacea e un gusto meno amaro delle altre varietà. Queste caratteristiche la rendono apprezzabile al gusto e adatta a piacevoli ricette sia tradizionali che innovative. Analisi eseguite con marcatori molecolari hanno messo in evidenza che la cicerchia di Serra de' Conti è caratterizzata da un elevato livello di variabilità genetica.

La cicerchia è caratterizzata dall'accumulare nel seme (prodotto commerciale) una neurotossina denominata acido 3-(N-oxalyl)-L-2,3-diaminopropionico(ODAP). Analisi eseguite su cicerchie collezionate nella regione Marche hanno evidenziato che tutte le popolazioni esaminate sono caratterizzate da un contenuto in ODAP di 0,36 g/100g. Campbell A. J. (Campbell A. J. et al. 1997) ha determinato i seguenti valori indicativi per valutare il livello di ODAP del seme:

-linee a basso ODAP: contenuto < 0,07 g/100g SS;

-linee ad elevato contenuto in ODAP: contenuto > 0,25 g/100g/SS.

La neurotossina viene inattivata dai trattamenti termici tra cui la cottura, sebbene i dati presenti in letteratura siano contrastanti. Comunque si consiglia di consumare il prodotto dopo averlo sottoposto ad imbibizione in acqua, eliminando successivamente l'acqua di lavaggio, e dopo cottura. Il consumo che attualmente riguarda la cicerchia è estremamente limitato, essendo consumata sporadicamente come prodotto tipico locale. Comunque, vista l'incidenza in passato del latirismo, patologia causata da un eccessivo consumo di cicerchia, si consiglia di consumare il prodotto dopo cottura prolungata.

La fava (*Vicia Faba L.*)

Tra i legumi, un interesse crescente sta assumendo negli ultimi anni la *Vicia faba*, per le sue proprietà nutrizionali (Jukanti A. K. et al. 2012; Dahl W. J. et al. 2012;

Sandberg A. S. 2002; Hart J. J. et al. 2015). La fava è una delle principali colture leguminose seminate in inverno nel nostro Paese. Ha un ruolo importante nelle tradizionali diete del Mediterraneo, ma anche in quelle indiana, cinese, inglese, medio orientale, africana, sudamericana e ha una notevole importanza come un cibo a basso costo ricco in proteine e in carboidrati (Sandberg A. S. et al. 2002; Hart J.J. et al. 2015). I suoi frutti, tipici semi a forma di fagiolo verde, vengono raccolti in fase vegetativa quando i baccelli sono freschi e verdi. In alternativa, possono essere raccolti in fase di maturazione dopo che i baccelli ed i semi risultano più secchi. La composizione dei semi di fava in nutrienti e in composti polifenolici è stata precedentemente studiata (Tako E. et al. 2015; Luo Y. et al. 2014; Luo Y. et al. 2013). Grazie alla sua particolare composizione chimica, e soprattutto al suo contenuto in polifenoli, la fava ed i suoi derivati sono stati proposti come alimenti utili nel trattamento nutrizionale di alcune patologie, quali il diabete e l'ipertensione, e possono contribuire a prevenire le patologie cardiovascolari (Crépon K. et al. 2010). Questo legume contiene, inoltre, levo-3,4-diidrossi-fenilalanina (L-DOPA) (Borowska J. et al. 2003), un precursore della dopamina, il che conferisce a questo legume grande interesse nella gestione del morbo di Parkinson. D'altra parte, i semi, soprattutto quelli di grandi dimensioni, contengono anche alcaloidi le cui forme agliconate dovrebbero essere prese in considerazione per alcune persone che soffrono di favismo o deficit di glucosio-6-fosfato deidrogenasi (carenza di G6PD) (Luzzatto L. et al. 2014). Gli studi sul favismo, una malattia causata da alcune varietà di fava, hanno avuto inizio molti anni fa (Pritchard P. J. et al. 1973). Si tratta di una sindrome emolitica causata sia dall'inspirazione del polline dalle piantine di fava, sia dall'ingestione dei semi (freschi e secchi). L'attacco emolitico varia in intensità da un individuo all'altro e viene seguito da emoglobinuria, ittero e sintomi vascolari. Pritchard P.J. (Pritchard P. J. et al. 1973) ha rilevato che la malattia si verifica più frequentemente nei maschi rispetto alle femmine e nei bambini di età inferiore ai quattro anni. Una notevole diminuzione dell'enzima G6PD era persistente in tutti gli individui che presentavano una storia di favismo. Tuttavia, un basso livello di G6PD

non implicava necessariamente un caso di favismo. Le recenti evidenze riportate da Luzzatto L. (Luzzatto L. et al. 2018) hanno suggerito che le sostanze responsabili del favismo sono i glucosidi di pirimidina contenuti naturalmente nel seme di fava. Una principale pirimidina isolata e identificata da molti ricercatori è ritenuta responsabile dell'emolisi e pertanto come agente responsabile del favismo.

La fava di Fratte Rosa. La fava di Fratte Rosa è inserita nel Repertorio della Biodiversità Agraria della Regione Marche. Fratte Rosa sorge tra le valli del Metauro e del Cesano a 419 mt s.l.m. su terreni fortemente argillosi denominati “lubachi”. L'eccessiva presenza di argilla ha favorito la costruzione di “case di terra” prima, delle pignatte e cocci poi, nonché la coltivazione di poche specie vegetali come leguminose che ben si adattavano all'ambiente. Nel tempo l'interazione tra le piante coltivate ed il terreno così argilloso ha portato alla selezione di un ecotipo di fava molto particolare. La varietà locale che si è imposta nel tempo si distingueva dalle altre per la particolare dolcezza e tenerezza del grano anche a piena maturazione. Il detto, una volta diffuso tra i residenti di Fratte Rosa, che la fava migliore è quella che viene dai “lubachi”, non è una questione campanilistica ma un dato certo dovuto alla natura argillosa dei terreni. Una delle tradizioni gastronomiche che distinguono Fratte Rosa è la preparazione di una particolare pasta alimentare denominata “Tacconi” (il nome deriva dalle forme simili ai ritagli dei tacchi delle scarpe) ottenuta da una miscela di farina di grano e farina di quella particolare varietà di fava.

Aspetti nutrizionali della fava.

Il contenuto in proteine dei semi di fava va da 20% a 41%, valori che dipendono dalla varietà (Rabey J. M. et al. 1993). I semi di fava contengono dal 51% al 68% di carboidrati totali, la cui maggioranza è costituita da amido (41-53%) (Rabey J. M. et al. 1993; Mehran S. M. et al. 2013). I lipidi sono circa 1,2-4%. La fibra dietetica è compresa tra il 15 e il 30%, di cui l'emicellulosa sembra essere la componente principale (60%). Le fave sono anche una buona fonte di minerali alimentari, come il

fosforo, il potassio, il calcio, lo zolfo ed il ferro. Infine, il contenuto in calcio varia da 120 a 260 mg/100 g di massa secca (Luo Y. et al. 2013).

Polifenoli. I semi di fava sono particolarmente ricchi in composti fenolici (Turco I. et al. 2016; Tako E. et al. 2015; Luo Y. et al. 2013; Luo Y. et al. 2014), i quali comprendono le procianidine, le catechine, i flavonoli, gli isoflavoni, gli acidi fenolici e i derivati del jasmonato (Cardador-Martinez A. et al. 2012; Shetty P. et al. 2001; Madar Z. et al. 2002; Kumar G. P. et al. 2012; Liu R. H. 2003). Recentemente Abu-Reidah I. M. (Abu-Reidah I. et al. 2014) ha identificato un totale di 104 composti fenolici, di cui le principali classi sono indicate nella tabella 9.

Class	
Flavanol	Gallocatechin, (Epi)gallocatechin, (Epi)gallocatechin hexose I, (Epi)gallocatechin dihexoside, Catechin, Epicatechin, Quercetin hexose deoxyexose II, (Epi)catechin di-C-glucoside, Myricetin hexose III, (Epi)afzelechin, 4'-or5'-O-Methyl-(epi)catechin I.
Prodelphinidin	(Epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin I, (Epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin II, (Epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin III, (Epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin IV, (Epi)gallocatechin-(epi)catechin I, (Epi)gallocatechin-(epi)catechin II, (Epi)gallocatechin-(epi)catechin III, (Epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin V, (Epi)catechin-(epi)gallocatechin II, (Epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin VI, (Epi)catechin-(epi)gallocatechin III, (Epi)catechin-(epi)gallocatechin IV, (Epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin VII, (Epi)gallocatechin-(epi)gallocatechin VII, (Epi)catechin-(epi)gallocatechin VI.
Phenolic acid	Salicylic acid O-glucoside, Protocatechuic acid hexoside, 3'-O-methyl(3',4'-dihydroxybenzyl tartaric acid)(3'-O-methylfukiic acid), Hydroxyeucomic acid, Hydroxybenzyl-malic acid (eucomic acid).
Procyanidin	(Epi)catechin-(Epi)catechin (procyanidin B I), (Epi)catechin-(Epi)catechin II (procyanidin B II), (Epi)catechin-(Epi)catechin II (procyanidin B III), (Epi)catechin-(Epi)catechin II (procyanidin B IV),
Flavanone	Naringenin 7-glucoside (prunin), Dihydrochrysin (pinocembrin).
Flavone	Isoschaftoside, Apigenin 8-or-6-C-glucoside (vitexin or isovitexin).
Flavonol	Myricetin Hexose I, Kaempferol3-O- α -L-arabinopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranoside.
Stilbene	Resveratrol, Resveratrol 3-O- β -D-glucoside.
Dihydrochalcone	Phloretin 3',5'-di-C-glucoside.
Phenylpropene	Eugenol malonylglucoside (citrusin C malonate)
Thearubigin	(-)-theaflavin.
Isoflavone	Genistein, Formonetin, Daidzein

Tab 9. Composti fenolici caratterizzati estratti da semi di *Vicia fava* L.

Il contenuto fenolico totale e le proprietà antiossidanti nei semi sono modulate da aspetti genetici, come dimostrato nei diversi genotipi di fava (Luo Y. et al. 2014). Inoltre sono state osservate differenze in differenti fasi di crescita (vegetativa, riproduttiva e maturità). I profili polifenolici quantitativi e qualitativi nei semi sono influenzati da trattamenti come l'ammollo, il congelamento, la bollitura, la cottura a pressione e a vapore (Hefni M. E. et al. 2015). La tostatura dei semi di fava per 120 min riduce rispettivamente il contenuto totale di fenoli, flavonoidi e proantocianidina di 42, 42 e 30%, ma provoca anche la produzione di nuovi composti fenolici (Fernandez-Marin B. et al. 2014).

ATTIVITA' BIOLOGICHE DEI POLIFENOLI

Le principali attività biologiche esercitate dai polifenoli nell'organismo umano sono schematizzate in figura 11. I polifenoli stanno assumendo negli ultimi anni un interesse crescente in quanto hanno mostrato un ampio spettro di potenziali benefici per la salute, quali gli effetti antiossidanti, antinfiammatori, anticarcinogenici, antidiabetici o gastroprotettivi (Arts I. C. et al. 2005; Schroeter H. et al. 2010). In particolare, il consumo di alimenti ricchi in polifenoli o di bevande a base di frutta sono stati segnalati per svolgere un ruolo nella prevenzione di alcune importanti patologie (Graf B. A. et al. 2005), come patologie cardiovascolari (Ness A. R. et al. 1997), cancro (Scalbert A. et al. 2005), osteoporosi, disturbi neurodegenerativi quali il morbo di Parkinson e l'Alzheimer (Scalbert A. et al. 2005), diabete e obesità (Xiao J. B. et al. 2015; Shu Wang et al. 2014). Diversi studi epidemiologici hanno valutato l'associazione tra il consumo di alcuni sottogruppi di polifenoli e gli alimenti che li contengono con l'incidenza di malattie croniche degenerative (Sies H. 2010; Andriantsitohaina R. et al. 2012; Erlund I. et al. 2008; Medina-Remón A. et al. 2013). Numerosi meccanismi molecolari sono stati ipotizzati; ad esempio, è riferito che le proantocianidine proteggono dalle malattie cardiovascolari prevalentemente attraverso la regolazione dell'omeostasi lipidica. In 18 studi condotti su modelli

animali è stato ampiamente dimostrato che questa classe di polifenoli riduce nel plasma i livelli di trigliceridi, di VLDL (lipoproteine ricche in trigliceridi) e di LDL (lipoproteine ricche in colesterolo) per inibizione della secrezione epatica delle VLDL. L'effetto ipolipidemizzante delle proantocianidine potrebbe essere legato al rallentato assorbimento intestinale dei lipidi e del colesterolo ed alla successiva ridotta secrezione dei chilomicroni a causa di una minore disponibilità nell'enterocita dei lipidi necessari all'assemblaggio dei chilomicroni. L'evento primario potrebbe essere a livello dell'idrolisi dei trigliceridi esogeni ad opera della lipasi pancreatica, la cui attività sembra essere inibita dalle proantocianidine. Queste ultime promuovono parallelamente l'escrezione di steroidi neutri e di acidi biliari, riducendone il loro assorbimento e, di conseguenza, la sintesi del colesterolo esterificato (Bladé C. et al. 2010).

Studi su modelli animali hanno mostrato come anche le catechine del thè (EC, EGC, ECG e EGCG) inibiscano l'attività della lipasi pancreatica, riducendo l'ipertrigliceridemia post-prandiale, per rallentato assorbimento dei trigliceridi (Bladé C. et al. 2010). E' stato osservato che un consumo di 690 mg/die di catechine per un periodo di 12 settimane aumenta la spesa energetica nell'uomo, riducendo la massa grassa (Nagao T. et al. 2005) attraverso una aumentata captazione del glucosio nel muscolo scheletrico a sfavore della sua captazione nel tessuto adiposo. Sono stati esaminati, inoltre, gli effetti degli estratti del thè verde sull'ipertensione arteriosa nei ratti. Gli animali sono stati trattati con angiotensina II per indurre lo sviluppo dell'ipertensione. Alla fine dell'esperimento, questi animali mostravano un aumento della pressione arteriosa e della massa del ventricolo sinistro (Kinoshita T. et al. 2005). Sottoponendo, poi, gli stessi animali all'assunzione di thè verde, si osservava una riduzione dell'attività dell'Angiotensina II, dell'espressione aortica endoteliale, dell'emeossigenasi I e delle superossidodismutasi, indicando una riduzione dello stress ossidativo vascolare (Sae-tan S. et al. 2011). I flavonoidi del cioccolato possiedono proprietà anti-infiammatorie, esplicate attraverso la modulazione dell'attività dell'interleuchina-5 e del TNF- α . Essi influenzano il metabolismo e la

produzione dell'ossido nitrico endoteliale, riducendo l'attivazione delle piastrine e delle cellule endoteliali attraverso l'inibizione dello stress ossidativo (Di Castelnuovo A. et al. 2012).

Comparando gli effetti del cioccolato fondente con quelli del cioccolato al latte, in soggetti sani e in soggetti fumatori (caratterizzati questi ultimi da un aumento dello stress ossidativo e dell'aggregazione piastrinica), il cioccolato fondente ha mostrato in soggetti fumatori la capacità di inibire l'8-iso-PGF2 α piastrinico, per una down-regulation nella formazione delle specie reattive dell'ossigeno (ROS), indotta dalla NADPH ossidasi piastrinica. L'effetto antiossidante e antiaggregante piastrinico non è osservato nei non-fumatori, suggerendo che la generazione dei ROS è un prerequisito fondamentale per l'induzione dello stress ossidativo.

I flavonoidi del cacao sembrano diminuire i livelli di pressione arteriosa ed aumentare la dilatazione flusso-mediata (Di Castelnuovo A. et al. 2012).

Anche il resveratrolo aumenta nelle cellule endoteliali la produzione dell'ossido nitrico (potente vasodilatatore) ed inibisce l'attività della COX-2 riducendo, di conseguenza, la produzione di PGF2 α . Inoltre, rallenta il rilascio dell'IL-8, protegge i lipidi dalla perossidazione lipidica e inibisce l'assorbimento delle LDL-ossidate nella parete vascolare grazie alla sua capacità di scavenger dei ROS e di chelare i metalli (in particolare, il rame).

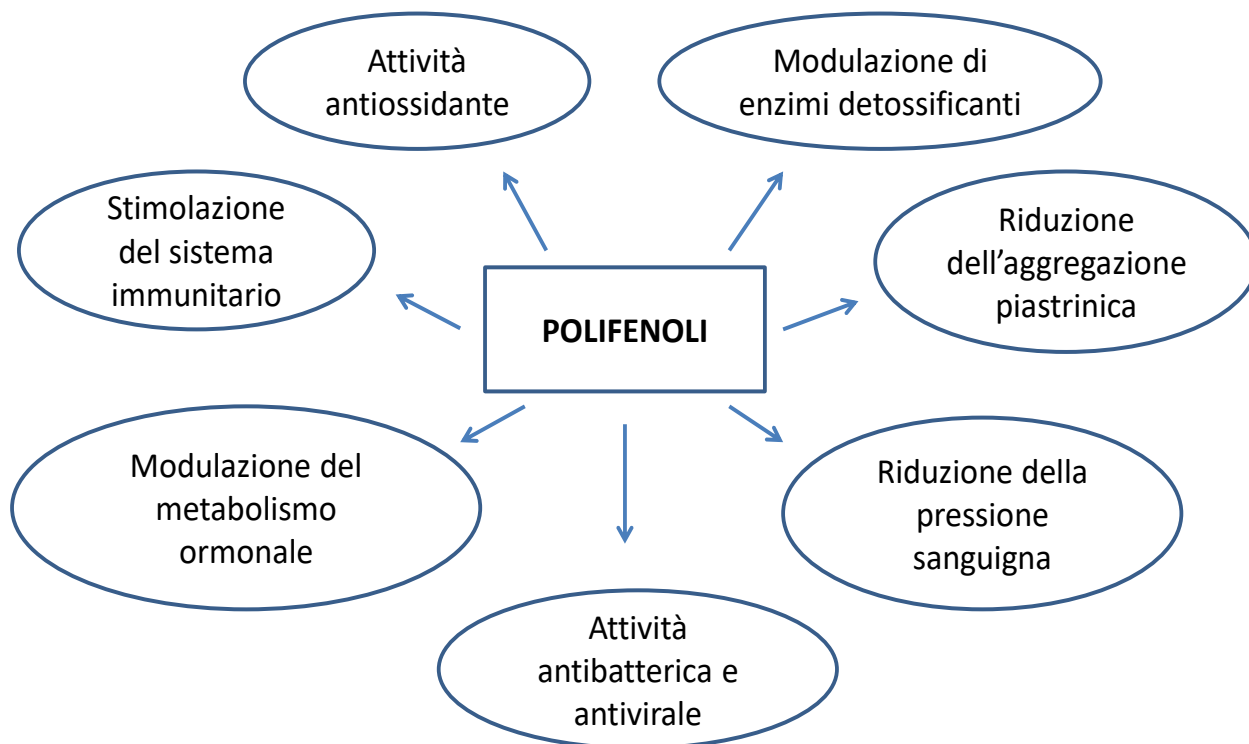


Fig 11. Attività biologiche dei polifenoli nell'organismo umano.

Attività antiossidante.

La capacità antiossidante degli alimenti vegetali deriva dall'azione sinergica cumulativa di una vasta gamma di antiossidanti, come le vitamine C ed E e i polifenoli, principalmente acidi fenolici e flavonoidi, carotenoidi e terpenoidi (Dillard C. J. et al. 2000). I polifenoli sono probabilmente le molecole più studiate di interesse nutrizionale. Essi si comportano come antiossidanti naturali e modulano altre funzioni cellulari con un interessante futuro in vari campi di applicazione della medicina (Rochfort S. et al. 2007). La capacità antiossidante degli estratti di fave è stata ampiamente studiata utilizzando approcci metodologici diversi, come il test

FRAP, che misura la capacità riducente degli antiossidanti nei confronti degli ioni Ferro, il test ORAC, che studia il potere antiossidante degli alimenti, così come il test DPPH e il test TEAC. Le proprietà antiossidanti sono correlate alla presenza dei flavonoidi e differenze significative sono state osservate in diversi genotipi di fava raccolti durante tre diverse fasi di crescita (vegetativa, riproduttiva e di maturazione). I risultati hanno mostrato diverse proprietà antiossidanti per lo stesso genotipo, considerando le diverse parti della pianta. L'elevato contenuto dei composti fenolici totali ($> 92,85$ mg come equivalente dell'acido gallico (GAE)/g) e del contenuto in flavonoidi ($> 11,87$ mg come rutina equivalente (RE)/g) sono stati trovati per tutti i genotipi durante la fase vegetativa e riproduttiva, e mostravano anche l'attività antiossidante più elevata (valore FRAP ≥ 1.157 mmol / g e DPPH $> 43.49\%$), indicando il loro potenziale come fonte naturale di antiossidanti. Utilizzando il test ORAC, è stato riscontrato che la capacità antiossidante varia da 109-149 μ mol di Trolox equivalente (TE)/g di peso fresco. L'attività di "cattura" dei radicali liberi in estratti di polifenoli di semi di fava valutati con il test DPPH esibiva un IC50 di $0,25 \pm 0,05$ e $0,17 \pm 0,01$ sia per gli estratti preparati in metanolo che per quelli preparati in acqua (Fernández-Marín et al. 2014; Dillard et al. 2000).

Gli effetti delle diverse tecniche di lavorazione e preparazione dei prodotti alimentari sul contenuto fenolico e sul potenziale antiossidante sono stati studiati in diversi genotipi di semi di fava. In particolare, la bollitura ed il trattamento in autoclave hanno dimostrato di causare perdite nei contenuti fenolici e del potere antiossidante nei semi di fava. Tuttavia, una sostanziale quantità di composti fenolici è stata mantenuta nei semi cotti, suggerendo che i piatti a base di semi di fava preparati in casa possono contenere un livello significativo di composti fenolici più elevato rispetto a quello dei semi di fava lavorati industrialmente (Siah S. et al. 2014). Anche la torrefazione riduce la capacità antiossidante ed il FRAP, rispettivamente di 15 e 8%.

Vari agenti chimici causano la rottura dei singoli filamenti del DNA, con conseguente trasformazione della forma elicoidale aperta a quella circolare (Lee J. et al. 2001). È stato osservato un effetto protettivo di estratti di semi di fava contro la scissione del filamento di DNA provocato da radicali liberi perossilici prodotti dalla decomposizione termica di AAPH (2,2'-azobis (cloridrato 2-amidino-propano) sul DNA plasmidico. Un effetto protettivo è stato osservato anche contro la scissione dei filamenti di DNA indotta da radicali idrossilici generati dalla fotolisi UV del perossido di idrogeno (H₂O₂) (Spanou C. et al. 2007). I radicali liberi ROO• costituiscono uno dei principali fattori che innescano le reazioni a cascata della perossidazione lipidica; pertanto è possibile suggerire che i polifenoli di semi freschi di fava possano impedire la perossidazione dei lipidi. È stato ipotizzato che l'attività protettiva degli estratti vegetali di questa leguminosa contro il danno del DNA indotto dai radicali idrossilici possa essere dovuta alla loro capacità di prevenire la reazione dei gruppi OH con atomi di idrogeno nei siti C3, C4 e C5 nella molecola dello zucchero del DNA (Spanou C. et al. 2007).

Proprietà antidiabetiche dei polifenoli dei legumi.

Vari studi clinici hanno dimostrato l'impatto dell'assunzione giornaliera di legumi su vari parametri metabolici. In uno studio condotto su 121 soggetti con diabete di tipo 2 si è evidenziato che un regime alimentare composto da alimenti a basso IG, tra cui i legumi (assunzione media di 211 g/die), determinava dopo tre mesi una diminuzione significativa dei livelli di emoglobina glicata ed una diminuzione significativa del colesterolo totale e dei trigliceridi (Radulian G. et al. 2009). Altri autori hanno confermato gli effetti positivi dell'assunzione giornaliera di legumi sui livelli di emoglobina glicata (Rizkalla S. W. et al. 2002). In soggetti con diabete di tipo 2 la sostituzione di due porzioni di carne rossa con legumi per 3 giorni/settimana era associata ad un miglioramento del profilo lipidico, della glicemia e dei livelli di insulina (Hosseinpour-Niazi S. et al. 2015). Bouchenak M. (Bouchenak M. et al.

2013) riassume i principali aspetti e ruoli dei legumi nella prevenzione contro le patologie dismetaboliche. Oltre a questa proprietà, alcuni polifenoli esercitano proprietà antinfiammatorie e regolano l'innalzamento della glicemia e dell'insulina post-prandiale e il metabolismo dei carboidrati. I meccanismi molecolari ipotizzati per le proprietà anti-diabetiche sono brevemente riassunti.

Ruolo inibitorio degli enzimi *glucosidasi* ed *amilasi*. La digestione dei carboidrati inizia ad opera delle α -amilasi salivari e continua con l'attività catalitica dell'*amilasi* pancreatica. Nella mucosa dell'intestino tenue è presente anche l'enzima amilo-1,6-glucosidasi che interviene nella degradazione metabolica dell'amido a livello del legame 1,6-glucosidico. Studi effettuati *in vitro* hanno evidenziato che l'attività della α -amilasi e della amilo-1,6-glucosidasi è inibita dalle proantocianidine, dai flavonoli e dalle teaflavine. L'inibizione dell'attività dell' α -glucosidasi potrebbe potenzialmente ridurre la digestione dell'amido e l'assorbimento dei carboidrati contribuendo ad una minore risposta iperglicemica postprandiale. Pertanto la glucosidasi è stata riconosciuta come un obiettivo terapeutico per la modulazione dell'iperglicemia postprandiale. E' stato osservato che gli estratti di fava ottenuti sia da semi crudi che da semi cotti inibiscono l'attività enzimatica anche se la tostatura riduce il livello di attività inibitoria dell' α -glucosidasi di genotipi diversi. Tra gli estratti ottenuti da entrambi i semi crudi e cotti, la varietà Rossa ha mostrato la più alta attività di inibizione della α -glucosidasi, seguito dalla varietà Nura (Fernández-Marín B. et al 2014). Un ruolo inibitore dell' α -glucosidasi è esercitata dai flavonoidi delle lenticchie, i dati suggeriscono che il consumo di lenticchie potrebbe gestire la glicemia post-prandiale e il peso corporeo (Siah S. et al. 2012).

Effetto dei polifenoli sull'assorbimento del glucosio. L'assorbimento intestinale del glucosio è mediato da trasporto attivo mediante il trasportatore del glucosio SGLT1 sodio-dipendente e dal trasporto facilitato sodio-indipendente tramite il GLUT2. L'effetto dei polifenoli sui trasportatori del glucosio è stato studiato *in vitro* sulle cellule CaCO-2 che sono considerate un utile modello sperimentale per lo studio delle cellule intestinali (Andrade N. et al. 2017). Alcuni flavonoidi e acidi fenolici esercitano un effetto inibitore del trasporto del glucosio in queste cellule. In particolare, il trasporto del glucosio mediato dall' SGLT1 è inibito dagli acidi clorogenico, ferulico, caffeico e tannico (Welsch C.A. et al. 1989), dalla quercetina monoglucoside (Cermak R. et al. 2004), dalle catechine del thè (Kobayashi Y. et al. 2000; Johnston K. L. et al. 2003) e dalla naringenina (Li J. M. et al. 2006), mentre il trasporto del glucosio mediato dal GLUT2 è inibito dalla quercetina, miricetina, apigenina e catechina (Johnston K. et al. 2005; Song J. et al. 2002).

Modulazione della glicazione proteica e formazione di prodotti avanzati di glicazione (AGE). I prodotti finali di glicazione avanzata (AGEs) hanno un ruolo nei meccanismi molecolari di complicanze diabetiche, tra cui neuropatia, nefropatia, retinopatia, aterosclerosi e cataratta (Brownlee M. 2005). Per “glicazione avanzata” si intende il prodotto della reazione tra uno zucchero, come il fruttosio o il glucosio, o metaboliti come il metilgliosale e una proteina senza l'azione catalitica di un enzima. In condizioni di iperglicemia le reazioni di glicazione sono favorite e portano alla formazione di AGEs. Gli AGEs in quantità elevate possono contribuire all'inflammation e a processi perossidativi. La glicazione pregiudica la struttura e il funzionamento di biomolecole. Pertanto, la scoperta e la ricerca degli inibitori della formazione di AGE offrirà un potenziale approccio terapeutico per la prevenzione delle complicanze diabetiche. Studi condotti *in vitro* hanno dimostrato che alcuni flavonoidi inibiscono la glicazione di diverse proteine plasmatiche. La reazione di Maillard avviene anche negli alimenti trattati ad elevate temperature. Studi recenti hanno dimostrato che i polifenoli possono contribuire ad una diminuzione della

formazione degli AGEs negli alimenti. Yao Y. e collaboratori hanno dimostrato che estratti di fagioli inibivano la formazione di prodotti avanzati di glicazione (Yao Y. et al. 2011) e inibivano anche la glicazione dell'albumina sierica bovina (BSA) innescata dal glucosio o dal Metilgliosale (MGO). L'inibizione della glicazione indotta dall'MGO e dal glucosio sull'albumina plasmatica è significativamente correlata con il contenuto dei fenoli totali. La correlazione è probabilmente dovuta all'effetto esercitato dai composti fenolici. È stato suggerito che i polifenoli inibiscono la formazione di prodotti avanzati di glicazione mediante inibizione della generazione di radicali liberi nel processo di glicazione e successiva inibizione delle modificazioni proteiche.

Modulazione della produzione di esRAGE sulle cellule endoteliali trattate con glucosio. I recettori dei prodotti della glicazione avanzata (RAGE) sono membri della superfamiglia delle immunoglobuline (Basta G. 2008). Essi sono coinvolti nelle complicazioni microvascolari del diabete attraverso la produzione di stress ossidativo, la regolazione della aterogenesi, la risposta angiogenica e il danno vascolare. Le cellule vascolari umane esprimono un recettore per i prodotti avanzati di glicazione, chiamato esRAGE. L'esRAGE neutralizza l'azione degli AGE sulle cellule endoteliali. Pertanto gli antagonisti di RAGE sono impiegati come agenti terapeutici nelle complicazioni del diabete. Okada e collaboratori hanno dimostrato che gli estratti metanolici di polifenoli della fava esercitano un ruolo modulatore del potenziale di produzione di esRAGE sulle cellule endoteliali trattate con glucosio (Okada Y. et al. 2015). È stata dimostrata una correlazione tra il ruolo regolatore del recettore ed il contenuto fenolico totale di estratti metanolici di semi di fava. L'effetto ha una rilevanza fisiopatologica in quanto è stato dimostrato che l'interferenza con l'attivazione di RAGE, mediante sRAGE, è in grado di prevenire o migliorare le complicazioni vascolari negli studi sperimentali (Win M. T. T. et al. 2012).

Effetto dei polifenoli sulla secrezione pancreatica dell'insulina. Gli approcci più comunemente applicati nel determinare l'effetto dei polifenoli sulla secrezione dell'insulina pancreatica sono la valutazione della secrezione in cellule pancreatiche in coltura, con o senza stimolazione di glucosio. La secrezione di insulina da parte delle cellule del pancreas coinvolge varie reazioni che sono potenziali target per l'azione dei polifenoli. Alcuni flavonoidi sono in grado di migliorare la secrezione insulinica (Velayutham P. et al. 2013). Inoltre in diversi modelli sperimentali, i polifenoli possono regolare vari meccanismi enzimatici coinvolti nella trasduzione del segnale, direttamente collegati alla regolazione della glicemia.

Regolazione del metabolismo epatico del glucosio. Alcuni polifenoli sono in grado di regolare alcune delle vie principali del metabolismo dei carboidrati a livello epatico tra cui la glicolisi, la glicogenesi e la gluconeogenesi (Hanhineva K. et al. 2010). In modelli animali, sia l'acido ferulico che l'acido idrossicinnamico modulano l'attività della glucocinasi e la produzione di glicogeno nel fegato. Tutti i vari meccanismi molecolari riassunti in figura 12 possono chiarire i ruoli esercitati dai polifenoli dei legumi e di altri alimenti nel controllo della glicemia post-prandiale e potrebbero essere alla base del minore IG osservato in cereali non raffinati ed in legumi ricchi in polifenoli; pertanto, un'alimentazione ricca in polifenoli può contribuire alla prevenzione delle patologie dismetaboliche.

Inibizione delle attività enzimatiche.

L'attività di numerosi enzimi è inibita da estratti di polifenoli ottenuti da legumi (Sindu S. N. et al. 2013). Tale ruolo potrebbe essere coinvolto nei meccanismi molecolari con cui i legumi esercitano un ruolo nella prevenzione di alcune patologie.

a) Enzima di conversione dell'angiotensina (ACE). Siah et al. (Siah S. D. et al. 2012) ha dimostrato che i polifenoli di tre genotipi di semi di fava di tre varietà australiane

(Nura, Rossa e TF (Ic * As) * 483/13) esercitano un effetto inibitorio sull'ACE che è responsabile della vasocostrizione, responsabile dell'aumento della pressione sanguigna. Gli estratti della varietà di fava Nura mostravano la maggiore attività di inibizione dell'ACE nei semi, sia crudi che arrostiti, seguiti da quelli della fava Rossa. Purtroppo, la torrefazione riduceva in modo significativo l'attività di inibizione dell'ACE. L'inibizione dell'attività ACE può potenzialmente impedire a questo enzima di causare un aumento dei valori della pressione sanguigna, riducendo così il rischio di ipertensione. Un effetto inibitore è esercitato anche dai polifenoli delle lenticchie (Yao F. et al. 2012).

b) Xantina Ossidasi (XO). XO è l'enzima che partecipa al metabolismo delle purine, ed è il principale fattore che contribuisce alla formazione dei radicali liberi durante l'esercizio fisico (Viña J. et al. 2000). La XO utilizza ossigeno molecolare come accettore di elettroni, con conseguente produzione del radicale superossido (O_2^-). La XO è anche coinvolta nella patogenesi di diverse patologie, quali disturbi vascolari, cancro e gotta. È stato dimostrato che gli estratti isolati dai semi di fava si comportano come potenti inibitori di XO, con valori di IC(50) compresi tra 40 e 135 $\mu\text{g/mL}$. Le molecole identificate come inibitori della XO sono i flavonoidi presenti negli estratti di fava. Questi risultati indicano che gli estratti di legumi possono comportarsi come inibitori naturali dell'enzima XO (Spanou C. et al. 2012).

c) Lipossigenasi (15-LOX). L'attività anti-infiammatoria di estratti di due varietà di fava (*V. major* e *V. minor*) in etanolo è stata valutata studiando l'inibizione dell'enzima 15-LOX (Boudjou S. et al. 2013). In questo studio è stato osservato che gli estratti inibiscono la 15-LOX a seconda della concentrazione: l'inibizione risulta maggiore con concentrazioni comprese tra 30 e 242 $\mu\text{g/ml}$, ad eccezione di *V. minor*. L'effetto è ascrivibile alla presenza dei flavonoidi, tra cui prevalentemente procyanidine. La 15-LOX è coinvolta nei meccanismi molecolari dell'aterosclerosi e nello sviluppo di lesioni aterosclerotiche (Kühn H. et al. 1997), in quanto è

responsabile delle modificazioni ossidative delle lipoproteine a bassa densità (LDL). Pertanto l'inibizione di questo enzima riveste notevole rilevanza fisiologica.

d) Tirosinasi. Recentemente è stato osservato che i polifenoli estratti da semi di fava esercitano attività inibitoria nei confronti dell'enzima tirosinasi (Mastore M. et al. 2005) e che tale effetto è correlato ai fenoli totali. Agendo come un enzima chiave per la sintesi della melanina, la tirosinasi catalizza due reazioni distinte nella sintesi di questo pigmento: l'idrossilazione della L-tirosina a L-dopa e l'ossidazione di L-dopa a dopaquinone (Liu-Smith F. et al. 2016). Gli inibitori della tirosinasi sono stati utilizzati per trattare una patologia dermatologica caratterizzata da iperpigmentazione legata alla sovrapproduzione di melanina.

Effetto cardioprotettivo e ruolo modulatore del metabolismo lipidico.

Una meta-analisi condotta su 10 studi randomizzati ha confermato che l'assunzione giornaliera di legumi (non a base di soia) per un minimo di 3 settimane ha un effetto positivo sui livelli di colesterolo totale e di colesterolo LDL. La variazione netta media del colesterolo totale era -11.8 mg/dL, e la diminuzione netta media del colesterolo LDL era -8.0 mg/dl (Bazzano L. A. et al. 2011). In 18 studi condotti su modelli animali è stato ampiamente dimostrato che i polifenoli riducono nel plasma i livelli di trigliceridi e delle LDL. L'effetto ipolipidemizzante delle proantocianidine potrebbe essere legato al rallentato assorbimento intestinale dei lipidi e del colesterolo ed alla successiva ridotta secrezione di chilomicroni a causa di una minore disponibilità nell'enterocita di lipidi necessari all'assemblaggio dei chilomicroni (Bladé C. et al. 2010). Il consumo di lenticchie, che sono ricche di fenoli, ha un effetto protettivo contro le patologie cardiovascolari (Kumar G. P. et al. 2017). Tra gli studi condotti per verificare i meccanismi molecolari, si è osservato che i composti bioattivi delle lenticchie possiedono attività antiossidante, e ACE-inibitoria come descritto sopra. Oltre a ciò, i semi di lenticchie hanno la capacità di ridurre i livelli di lipidi plasmatici e dell'omocisteina. In modelli animali ipertesi, la

somministrazione di lenticchie riduce attivamente i livelli del colesterolo totale, dei trigliceridi, e delle LDL. Questi risultati supportano l'importanza dei legumi, tra cui le lenticchie, e la loro prescrizione dietetica come potenziale terapeutico per i pazienti ipertesi (Kumar G. P. et al. 2017).

Effetto chemopreventivo. Regolazione della proliferazione cellulare e dell'apoptosi. I polifenoli regolano l'espressione genica e le vie di trasduzione del segnale (Hakimuddin F. et al. 2008). Tali meccanismi sono potenzialmente coinvolti nel ruolo antitumorale esercitato su diverse linee cellulari in coltura. La capacità antiossidante dei polifenoli è stata considerata come uno dei meccanismi di azione per inibire la mutagenesi grazie alla loro capacità di eliminare i ROS, di attivare gli enzimi antiossidanti, di migliorare la riparazione del DNA e di ridurre le lesioni del DNA ossidato (Dillard C. J. et al. 2000). Lo stress ossidativo, i radicali perossilici e i prodotti di perossidazione lipidica possono causare mutazioni nel DNA (Marnett L. J. 1999), fenomeni cruciali per l'inizio del processo cancerogeno. I polifenoli estratti dalle fave presentano una capacità di captazione dei radicali liberi e una capacità di protezione contro i danni causati al DNA. Esercitano anche un ruolo inibitore dell'attività del plasmide topoisomerasi I (Li M. et al. 2016). La topoisomerasi I è uno degli enzimi che svolgono un ruolo cruciale nella replicazione, nella trascrizione, nella ricombinazione, nella condensazione dei cromosomi e nel mantenimento della stabilità genomica. Poiché è un enzima essenziale per funzioni vitali del DNA durante la normale crescita cellulare, gli inibitori della sua attività sono considerati promettenti agenti antitumorali.

La capacità di estratti di fava di inibire la proliferazione di diverse linee cellulari tumorali umane (BL13, AGS, Hep G2 e HT-29) è stata osservata da Siah (Siah et al. 2014). Gli estratti di fava ottenuti da semi freschi, utilizzati in esperimenti *in vitro* in un intervallo di concentrazione di 0,2-2,0 mg/ml, presentavano una soppressione dose-dipendente della proliferazione delle cellule tumorali. Le analisi citometriche

hanno dimostrato che gli estratti di fava inducevano con successo l'apoptosi delle cellule HL-60 (leucemia acuta di promyelociti). Studi *in vivo* hanno dimostrato che il consumo di lenticchie riduce l'incidenza di vari tumori tra cui colon, tiroide, fegato, seno e prostata (Kumar G. P. et al. 2017). Un ampio studio prospettico epidemiologico condotto su 90.630 donne mostrava una relazione inversa tra apporto di lenticchie ricche e rischio di cancro al seno. Le lenticchie hanno un alto contenuto di polifenoli che potenzialmente potrebbero prevenire gli agenti cancerogeni attraverso attività chemioprotettive, incluso l'assorbimento di agenti cancerogeni, l'attivazione o la formazione, la disintossicazione, il legame al DNA e la fedeltà della riparazione del DNA. Inoltre, le lectine contenute nelle lenticchie hanno proprietà antitumorali, che sono state osservate in vari studi *in vitro*, *in vivo* e sull'uomo (Akcicek E. et al. 2005). Il meccanismo molecolare del potenziale ruolo antitumorale dei composti fenolici contenuti nelle lenticchie consiste nella loro capacità di legarsi ai ribosomi, con conseguente inibizione della sintesi proteica. Inoltre, ciò provoca un cambiamento del ciclo cellulare, inducendo meccanismi di accumulo di fase G1, arresto del ciclo cellulare di fase G2/M ed apoptosi. In aggiunta a ciò, questo processo può anche attivare la cascata della caspasi nei mitocondri. Pertanto i composti fenolici delle lenticchie sembrano essere agenti terapeutici promettenti contro la genesi dei tumori. Tra i legumi, le lenticchie mostrano un maggiore potenziale chemiopreventivo rispetto ai piselli verdi e gialli. L'effetto chemiopreventivo è esercitato dai flavonoidi (flavanoni, flavan-3-oli, flavoni, flavonoli, antocianidine e tannini, inclusi tannini condensati o proantocianidine).

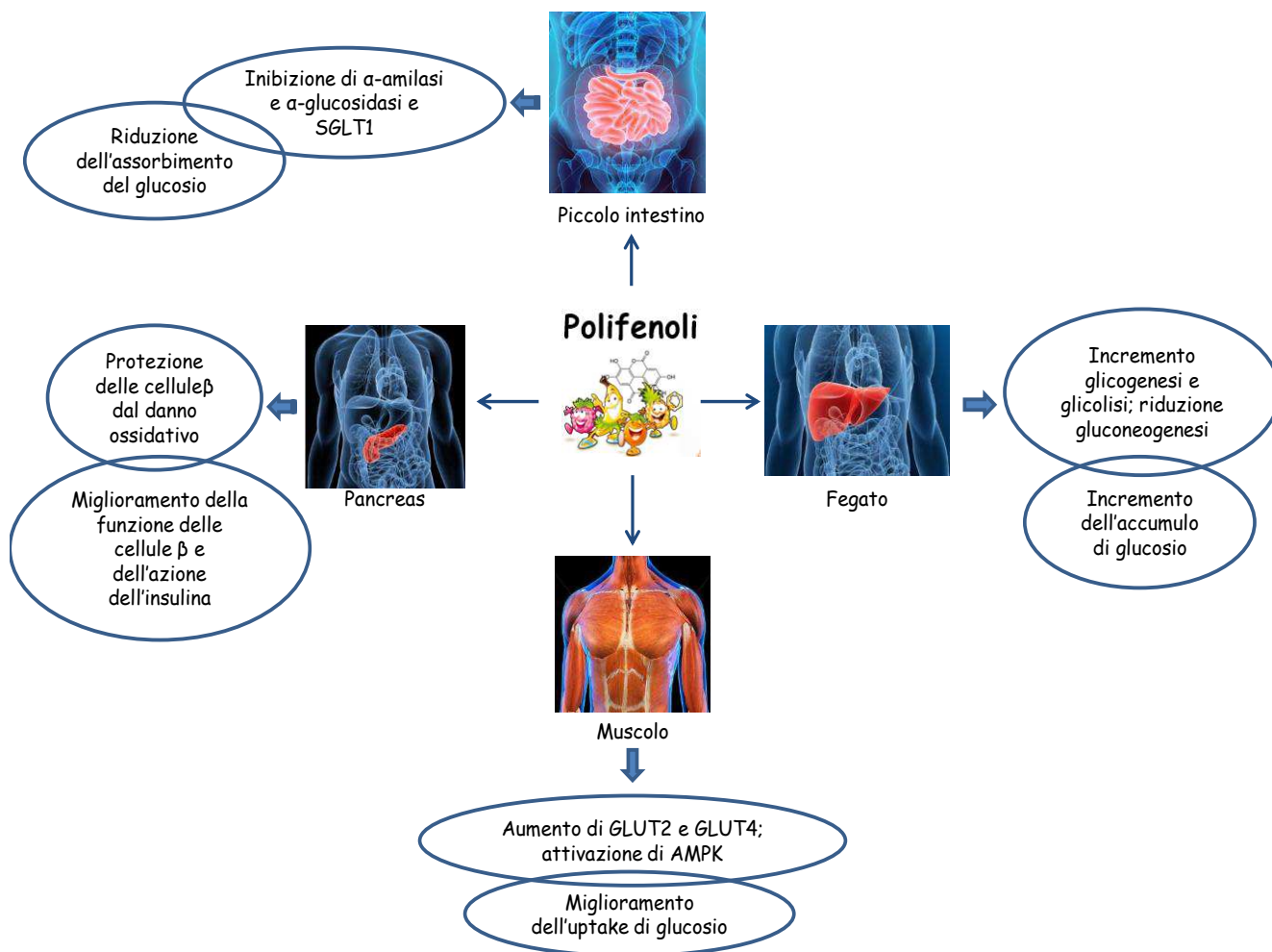


Fig 12. Ruolo dei polifenoli nel diabete di tipo 2.

Attività anti-obesità dei polifenoli. Il ruolo dei polifenoli nei meccanismi molecolari dell'obesità è stato ampiamente studiato. E' stato valutato l'impatto delle catechine e di altri polifenoli sull'obesità in modelli animali e cellule in coltura (Wang S. et al. 2014). Gli studi cellulari hanno dimostrato che i polifenoli riducono la vitalità degli adipociti e la proliferazione dei preadipociti, sopprimono la differenziazione degli adipociti e l'accumulo dei trigliceridi, stimolano la lipolisi e l'ossidazione degli acidi grassi e riducono l'infiammazione. Parallelamente, i polifenoli modulano i percorsi di segnalazione, tra cui la proteina chinasi A (PKA) attivata dall' adenosina monofosfato, il recettore attivato dal PPAR- γ , la proteina CCAAT/enhancer a legame

α , il fattore nucleare-kB che regola l'adipogenesi, le risposte antiossidanti e antinfiammatorie. Numerosi studi epidemiologici prospettici hanno riportato che l'assunzione di lenticchie è inversamente correlata all'incidenza dell'obesità e del diabete (Becerra-Tomás N. et al. 2017; Kris-Etherton P.M. et al. 2002). Studi su soggetti umani hanno evidenziato che l'assunzione di lenticchie insieme alla pasta e ragù riduce il peso corporeo e la circonferenza della vita (Mollard R. et al. 2012). Inoltre, l'assunzione dei semi di lenticchie aumenta la sazietà, il che facilita il mantenimento del peso corporeo nei soggetti obesi (Mollard R. et al. 2012). Studi osservazionali hanno inoltre riportato una relazione inversa tra il consumo di lenticchie ed il rischio associato all'obesità (McCrary M. A. et al. 2010). Inoltre, studi interventistici hanno dimostrato il potenziale delle lenticchie di inibire l'attività di enzimi come l' α -glucosidasi e la lipasi pancreatica, con conseguente riduzione dell'assorbimento del glucosio e dei grassi nell'intestino, effetto cruciale nella gestione del diabete e dell'obesità (Xu B. J. et al. 2005; Balasubramaniam V. et al. 2013).

INDICE GLICEMICO (IG) E CARICO GLICEMICO (GL): PARAMETRI DI QUALITÀ NUTRIZIONALE DEGLI ALIMENTI

I Paesi industrializzati, negli ultimi decenni, sono stati caratterizzati dal diffondersi di patologie ritenute responsabili per il 60% della mortalità generale (World Health Organization “WHO”). Numerosi fattori (ambiente, genetica e stile di vita) intervengono nello sviluppo di patologie come diabete di tipo 2, obesità e patologie cardiovascolari. Uno dei fattori coinvolti è senza dubbio il tipo di alimentazione. È noto che un apporto eccessivo di calorie e di alcuni fattori nutrizionali (grassi saturi, grassi *trans*, carboidrati semplici), associato ad un apporto inadeguato di fibre vegetali, possa contribuire all’insorgenza di patologie dismetaboliche. Studi epidemiologici hanno infatti dimostrato che un’assunzione eccessiva di alimenti ricchi in carboidrati semplici, i quali sono responsabili di un innalzamento della glicemia postprandiale, possa svolgere un ruolo molto importante nei meccanismi molecolari alla base delle patologie dismetaboliche. Al contrario un’alimentazione che privilegia cibi ricchi in carboidrati complessi e fibre, è caratterizzata da una ridotta risposta glicemica postprandiale e può svolgere un ruolo protettivo nei confronti di malattie croniche come il diabete di tipo 2, le patologie cardiovascolari e l’obesità. Sulla base di queste premesse sono stati identificati due parametri in grado di valutare le risposte glicemiche indotte dall’assunzione dei diversi alimenti: l’Indice Glicemico (IG) ed il Carico Glicemico (GL).

INDICE GLICEMICO (IG)

L’Indice Glicemico (IG), esprime la capacità dei carboidrati contenuti in un alimento, di innalzare la concentrazione ematica di glucosio. Tale concetto fu introdotto per la prima volta nel 1981 da David J.A. Jenkins (Jenkins D. J. et al. 1981). Il lavoro di Jenkins pose le basi per una nuova chiave di lettura in merito alla relazione tra carboidrati e glicemia. Da allora numerosi studi sono stati condotti per valutare l’IG di numerose tipologie di prodotti (Scazzina F. et al. 2015; Scazzina F. et al. 2016).

Gli alimenti che presentano un IG alto incrementano di più la glicemia postprandiale rispetto agli alimenti a basso IG. L'attenzione alla risposta glicemica postprandiale ed alla sua rilevanza fisiopatologica è da collegare al destino a cui può andare incontro il glucosio ad elevate concentrazioni. Come riassunto in figura 13, il glucosio può andare incontro ad una autossidazione e contribuire alla generazione di specie radicaliche, che portano alla formazione di prodotti di glicazione enzimatica (AGE) (Esfahani A. et al. 2009; Larsen T. M. et al. 2010; Brand-Miller J. C. 2003). Il glucosio in eccesso si lega alle proteine tramite reazioni spontanee; le proteine glicate mostrano alterazioni sia strutturali che funzionali.

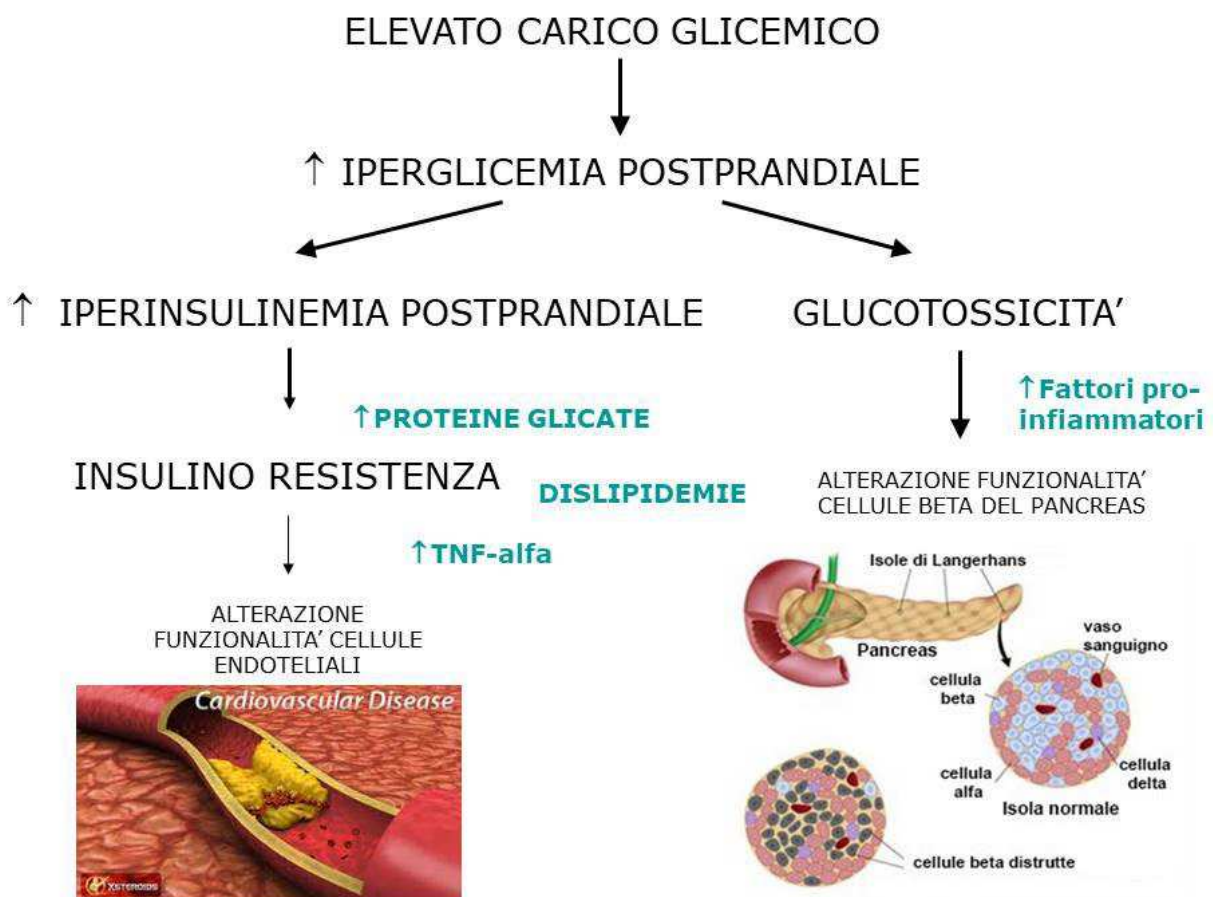


Fig 13. Meccanismi molecolari di danno conseguente ad un'elevata glicemia postprandiale.

Gli alimenti ricchi in fibre, come cereali e legumi, inducono un aumento della glicemia postprandiale minore rispetto ad alimenti che contengono zuccheri semplici. Pertanto il concetto di IG è strettamente connesso all'ipotesi della fibra dietetica" proposta negli anni '70 da Trowell e Burkitt (Burkitt D.P. et al. 1977). Secondo questa ipotesi i cibi che vengono assimilati più lentamente potrebbero avere effetti positivi per diabetici e pazienti con rischio di malattie coronariche. L'ipotesi inoltre spiega il ruolo protettivo delle fibre alimentari che riducono il livello dell'afflusso di nutrienti all'intestino e riducono di conseguenza la risposta glicemica ed insulinemica postprandiale. Infine gli alimenti che contengono grassi e proteine mostrano una correlazione negativa con l'IG.

L'IG può essere valutato *in vivo* osservando la modificazione della risposta glicemica in soggetti volontari (Wolever T. M. et al. 2008), oppure *in vitro*, inducendo la digestione enzimatica degli alimenti da testare e la valutazione del successivo rilascio di glucosio (Goni I. et al. 2007).

Calcolo dell'IG. L'IG è definito dagli esperti della FAO/WHO (1997) come il rapporto percentuale tra l'area incrementale della risposta glicemica postprandiale di un alimento test e quella della risposta glicemica di un determinato alimento standard, ingerito in quantità isoglucidica. Generalmente, come alimento standard si utilizza il glucosio. E' fondamentale che le porzioni assunte, di alimento test e standard (o controllo), contengano esattamente la stessa quantità di carboidrati; in genere il riferimento è di 50 g.

Per capire meglio come si calcola l'IG è opportuno ricordare come varia la glicemia in risposta all'ingestione del bolo alimentare. Dopo pochi minuti dall'introduzione del cibo nella bocca, il bolo giunge all'intestino tenue dove avviene l'assorbimento del glucosio. I carboidrati complessi, per poter essere assorbiti, vanno prima separati in subunità più piccole, ad opera di enzimi digestivi quali le amilasi salivari e pancreatiche. Solo a questo punto, attraverso appositi canali presenti sulla superficie

delle cellule intestinali (GLUT), i monosaccaridi passano nel torrente ematico e determinano un innalzamento della glicemia.

In risposta all'aumento glicemico, le cellule beta del pancreas iniziano a secernere insulina. Quest'ultima ha un ruolo chiave nel metabolismo glucidico, in quanto permette che il glucosio circolante venga internalizzato. In risposta all'innalzamento dell'insulinemia nel soggetto sano, vi è un'inevitabile abbassamento della glicemia ed a volte è possibile assistere ad un effetto rebound, con un ritorno dei valori glicemici al di sotto di quelli basali.

Se rappresentassimo su di un grafico l'andamento della glicemia postprandiale nel tempo, otterremmo una curva, come quelle riportate in figura 14.

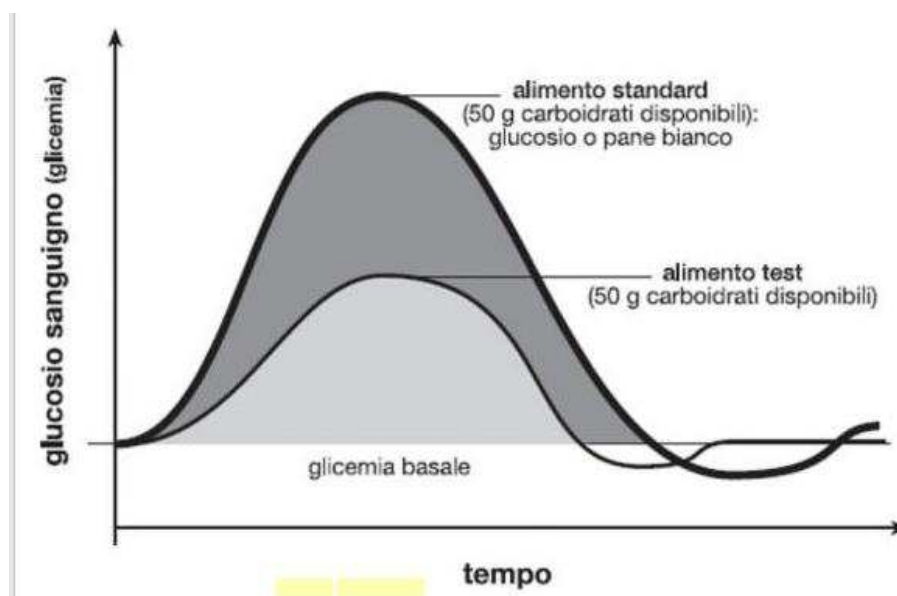


Fig 14. Aumento della glicemia dopo assunzione di un alimento standard (50g di glucosio) e di un alimento test (50 g di carboidrati disponibili).

Il calcolo dell'IG si esegue sull'area incrementale netta (IAUC), cioè l'area sottesa alla curva, non considerando nel calcolo l'area negativa che si può riscontrare in seguito ad un rebound ipoglicemico (Wolever M. S. T. et al. 1986). Una volta calcolata l'area sotto la curva relativa all'alimento test e quella relativa all'alimento controllo (glucosio) si esegue il rapporto tra i due valori, secondo la formula:

Determinazione dell'indice glicemico (IG):

$$IG = \frac{\text{alimento test (area grigio chiaro)}}{\text{alimento standard (area grigio scuro)}} \cdot 100$$

La valutazione dell'IG può essere anche effettuata *in vitro*. La prova sperimentale consiste nel misurare la digeribilità dell'amido dopo che una porzione di alimento contenente 1g di carboidrati viene incubata in presenza di enzimi idrolitici. La percentuale di amido digerito viene calcolata valutando gli zuccheri semplici liberati (Brand J. C. et al. 1985).

Mediante l'IG è possibile classificare gli alimenti in base alla risposta glicemica che essi inducono. Nel 1995 è stata pubblicata la prima edizione dell'*International Tables of the Glycemic Index* (Foster-Powell K. et al. 2002); la tabella è stata poi corretta con lo scopo di unire tutti i dati più importanti pubblicati tra il 1981 e il 2001. Il lavoro finale è l'*International Tables of Glycemic Index and Glycemic Load Values:2002*, che raccoglie circa 1300 dati derivanti da studi di letteratura e studi effettuati presso l'Università di Sydney. La tabella 10 riporta i valori dell'IG di alcuni alimenti.

ALIMENTO	IG
All-Bran (cereali ad alto contenuto di fibra)	42±5
Ananas	59±8
Arancia	da 31 a 51
Banana (Sudafrica)	70±5
Biscotti (Oro Saiwa, Italia)	64±3
Carote	47±16
Ciliegie	22
Coca Cola	58±5
Croissant	67
Corn flakes (KELLOGG'S, USA)	91
Cracker	da 52 a 98
Datteri (secchi)	103±21
Fagioli	29±9
Fanta	68±6
Fruttosio	19±2
Gelato (vaniglia e cioccolato, Italia)	da 57 a 80
Glucosio	100
Kiwi	53±6
Latte di soia	32±2

Latte intero	27±4
Latte scremato	32±5
Mango	51±5
Mela	da 28 a 44
Miele	da 32 a 95
Muffin	da 44 a 102
Muesli	da 39 a 75
Pane integrale	53±3
Pane bianco	da 30 a 110
Pane di frumento senza glutine	76±5
Pane di segale	da 50 a 64
Patate al forno	89±12
Patate bollite	da 56 a 101
Patate fritte (surgelate)	75
Pera	38±2
Pesca fresca	da 28 a 56
Pesche in scatola	da 30 a 71
Popcorn	72±17
Prugna	39±15
Riso bianco	da 48 a 112

Saccarosio/zucchero di canna	68±5
Spaghetti	57±6
Succo d'ananas	46
Succo di pomodoro	38±4
Yogurt bianco	36±4
Yogurt magro	da 14 a 45

Tab 10. Indice glicemico di alcuni alimenti (tratti da “International table of glyceimic index and glyceimic load values” di Foster-Powell K. et al. 2002).

Dall’analisi dei dati riportati in tabella 10 si può notare che i valori di IG per gli stessi tipi di cibi possono variare. Questa variazione riflette i fattori metodologici e le differenze nelle caratteristiche chimico-fisiche di essi. Inoltre per ogni alimento viene indicato l’IG riferito sia al glucosio che al pane, il tipo ed il numero di soggetti studiati, l’alimento di riferimento (pane o glucosio) utilizzato nello studio esaminato, l’intervallo di tempo per cui è stata controllata la glicemia dopo l’assunzione del cibo, il GL dell’alimento calcolato su una porzione standard (di cui viene indicato il peso in gr. o in ml.) ed il suo contenuto in carboidrati.

Bisogna precisare che l’IG è un valore medio, in quanto risulta dalla media dei valori individuali registrati nei soggetti del gruppo di studio. Inoltre, l’IG di un determinato alimento è ottenuto dalla media dei valori ottenuti da vari alimenti appartenenti alla stessa categoria; ad esempio, per un cereale come il grano ogni varietà può, per via del suo specifico contenuto (proteine, fibre, etc.), portare ad un calcolo leggermente diverso. Le tabelle indicano quindi dei valori medi per i quali viene anche precisata la deviazione standard. Analizzando le risposte glicemiche ottenute in seguito all’assunzione degli alimenti, l’IG può essere classificato in:

IG ALTO  IG SUPERIORE O UGUALE A 70

IG MEDIO  IG COMPRESO TRA 56 E 69

IG BASSO  IG INFERIORE O UGUALE A 55

In generale i cibi contenenti zuccheri raffinati hanno un alto IG, mentre la frutta, la verdura, i legumi e gli alimenti ricchi in fibre tendono ad avere un IG più basso.

CARICO GLICEMICO (GL)

Il concetto di IG non fa riferimento alle porzioni comunemente assunte degli alimenti testati, ma tiene esclusivamente in considerazione la quantità di carboidrati contenuti. In alcuni casi l'IG simula condizioni che poco hanno a che vedere con quelle reali. Esistono infatti alimenti che sono costituiti prevalentemente da acqua, come frutta (cocomero), e che hanno perciò bassa densità glucidica. In tal caso per assumere 50 g di carboidrati potrebbe essere necessario consumare porzioni molto abbondanti di un alimento, poco verosimili se paragonate alle abitudini alimentari della popolazione. Da qui la necessità di elaborare un concetto in grado di esprimere l'effetto del cibo sulla glicemia, in relazione alle porzioni comunemente assunte. Il Carico Glicemico (GL) tiene conto anche della quantità di carboidrati presenti in una porzione di alimento. Il suo concetto è stato introdotto nel 1997 da alcuni ricercatori dell'Harvard University per quantificare la risposta glicemica dopo assunzione di una porzione di cibo (Salmeron J. et al. 1997).

Calcolo del GL. Il GL di un alimento si calcola moltiplicando il suo IG per la quantità di carboidrati che esso contiene, dividendo poi il risultato per 100.

$$GL = GI * g \text{ di carboidrati contenuti nella porzione} / 100$$

Usando una mela come esempio, il GL si calcola in questo modo:

valore di GI = 38; carboidrati per porzione = 15g

$$GL = \frac{38 \times 15}{100}$$

Il GL di una mela solitamente è di 6.

Il GL permette di avere un'idea delle modificazioni glicemiche in base al tipo ed alle quantità di un dato alimento. Il GL combina la qualità e la quantità in un unico parametro. Similmente all'IG, a valori più alti di GL corrispondono ad innalzamenti più marcati della glicemia postprandiale. Alimenti con IG alto possono avere un GL relativamente basso se il loro contenuto in carboidrati è trascurabile.

Anche il GL può essere classificato come basso, medio o alto:

GL ALTO  GL SUPERIORE O UGUALE A 20

GL MEDIO  GL COMPRESO TRA 11 E 19

GL BASSO  GL INFERIORE O UGUALE A 10

Gli alimenti ad alto contenuto percentuale di carboidrati, come la pasta, hanno generalmente un GL alto, pur essendo spesso caratterizzati da un IG basso. Questo si verifica perché le porzioni comunemente assunte di tale alimento, intorno ai 100g, contengono una buona dose di carboidrati, all'incirca 75g. Moltiplicando questo valore per l'IG otteniamo un valore che è più alto rispetto a quello derivante dal

consumo di un alimento ad alto IG, ma a bassa concentrazione di carboidrati, come ad esempio l'anguria. Infatti, una porzione di anguria apporta solo pochi grammi di zuccheri, essendo essa costituita prevalentemente da acqua.

Fattori che influenzano l'IG ed il GL.

L'IG ed il GL di un alimento sono influenzati da numerosi fattori:

- Caratteristiche dell'alimento;
- Natura dei carboidrati presenti nell'alimento;
- Contenuto e composizione di fibre;
- Contenuto di proteine e grassi;
- Acidità dell'alimento;
- Tipo di trattamento tecnologico e chimico sull'alimento;
- Presenza di sodio (favorisce il trasporto del glucosio);
- Contenuto di polifenoli.

Analizzando alcuni punti di quelli sopra citati, possiamo dire per esempio che la natura dei carboidrati presenti nell'alimento ha una marcata influenza sulla glicemia postprandiale (Ray K. S. et al. 2014). In genere i carboidrati complessi (amido, pane bianco) inducono una risposta glicemica più bassa rispetto a quella indotta dai carboidrati semplici, come mostrato in figura 15. I carboidrati semplici che normalmente sono contenuti in alcuni alimenti comprendono: il lattosio, il saccarosio, il glucosio e il fruttosio, in proporzione variabile secondo l'alimento. Il comune zucchero da tavola, il saccarosio, ha un IG compreso tra 60-65. Questo valore moderatamente basso è dovuto alla sua composizione chimica, costituita da una molecola di glucosio accoppiata ad una molecola di fruttosio per formare un disaccaride. Il fruttosio presenta un IG molto basso, pari a 19-20, quindi quando assumiamo il saccarosio, la quantità di glucosio assorbita corrisponde solamente alla

metà dei suoi componenti. Questo chiarisce perché la risposta glicemica a 50 gr di saccarosio sia simile a quella ottenuta con 50 g di glucosio.

Alcuni tipi di frutta hanno un basso IG (es. pompelmo), mentre altri hanno un valore elevato (es. melone); in questo secondo caso, oltre alla natura degli zuccheri presenti, sono coinvolti altri fattori, come l'acidità e l'osmolarità.

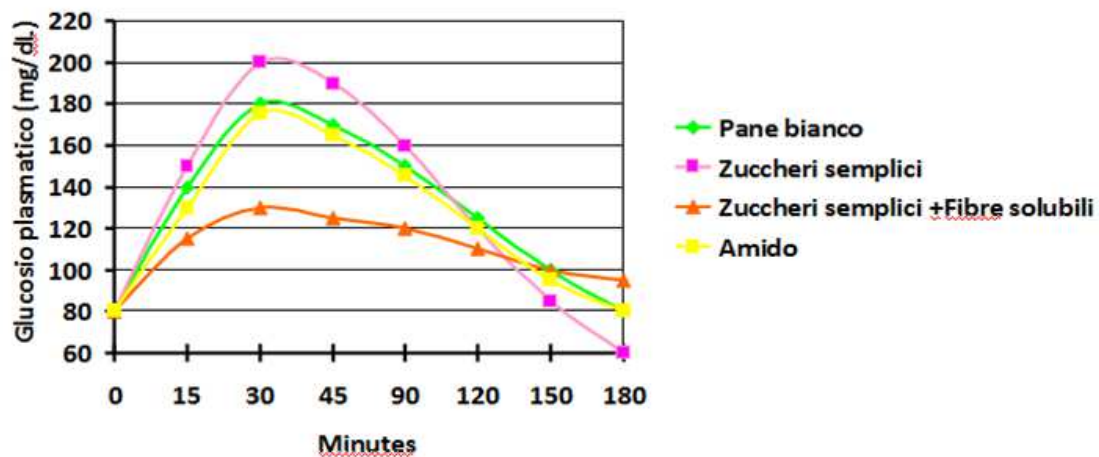


Fig 15. Risposta glicemica a diversi tipi di carboidrati.

Il contenuto in proteine e in grassi può influenzare la risposta glicemica, e di conseguenza l'IG, ritardando il transito gastrointestinale (Welch I. M. L. et al. 1987) ed aumentando la secrezione di insulina (Nuttall F. Q. et al. 1984). Per alcuni alimenti, il contenuto in proteine può rallentare la idrolisi dei carboidrati e di conseguenza ridurre l'IG. I grassi rallentano lo svuotamento gastrico, influenzano i processi digestivi e l'assorbimento intestinale dei carboidrati per cui abbassano l'IG. In conclusione, la presenza negli alimenti di altri macronutrienti (grassi e proteine) oltre ai carboidrati, crea un abbassamento dell'IG dell'alimento stesso. Diverse ricerche hanno messo in evidenza come anche l'acidità abbia un ruolo importante nel determinare l'IG di un alimento. È stato notato che se all'interno di un pasto si consuma una quantità di aceto e/o succo di limone l'IG delle diverse preparazioni alimentari è minore. L'acidità di un alimento infatti rallenta lo svuotamento gastrico e la successiva immissione del bolo alimentare nel duodeno. Per questo motivo la

digestione degli alimenti ad elevata percentuale di carboidrati avverrà più lentamente e di conseguenza l'IG sarà decisamente più basso. Questo spiega perché, ad esempio, il pane a lievitazione naturale, in cui l'acido lattico e l'acido propionico sono prodotti dalla fermentazione spontanea degli amidi e degli zuccheri da parte di microorganismi di specie diverse, determina un innalzamento glicemico e insulinico inferiore rispetto al pane prodotto con lievito chimico. Un ruolo particolarmente importante sull'influenza dell'IG e del GL è svolto dal contenuto in polifenoli e dalla fibra alimentare; questo aspetto sarà approfondito nei capitoli che seguono.

Effetto dei polifenoli su IG e GL.

Numerosi studi, sia su modelli animali che umani, hanno cercato di dimostrare la correlazione tra i polifenoli alimentari e le variazioni di IG e GL.

Studi sugli animali. L'assunzione di una frazione polifenolica estratta dall'Acerola (contenente antociani) è in grado di ridurre in modo significativo il livello di glucosio plasmatico dopo somministrazione di maltosio o glucosio nel topo (Hanamura T. et al. 2006). Un estratto dalle foglie di *Nerium indicum*, una pianta usata come rimedio popolare per il trattamento del diabete di tipo 2 in Pakistan, ha dimostrato di ridurre l'aumento della glicemia post-prandiale indotta dall'assunzione di maltosio o saccarosio nei ratti (Ishikawa A. et al. 2007). Estratti di *Ginkgo biloba*, ed in particolare la loro frazione di flavonoidi, riducono i livelli di glucosio nel plasma dei ratti dopo somministrazione orale di amido, maltosio, saccarosio o glucosio (Tanaka S. et al. 2004). Anche nei ratti diabetici, la frazione di flavonoidi attenua la risposta del glucosio in seguito alla somministrazione di glucosio e saccarosio. Quando a ratti diabetici è stato somministrato il glucosio con la quercetina, l'iperglicemia era significativamente diminuita rispetto alla sola somministrazione di glucosio (Song J. et al. 2002).

Studi sull'uomo. E' noto che le bacche dei frutti rossi sono ricche di polifenoli, in particolare antociani, flavonoli, proantocianidine e acidi fenolici. In un gruppo di 12 soggetti sani, l'ingestione di saccarosio (35 g) associato a quella delle bacche (150 g di purea fatta di mirtilli, ribes nero, mirtilli rossi e fragole che forniscono circa 800 mg di polifenoli) produce una diversa risposta glicemica postprandiale rispetto al gruppo di controllo che non assume le bacche (Torrönen R. et al. 2009). Le bacche riducono significativamente il picco dell'incremento di glucosio. Il consumo di 25 g di glucosio con il caffè (400 ml di caffè che contengono 350 mg di acido clorogenico) indicano un ritardato assorbimento intestinale di glucosio in un gruppo di 9 soggetti sani (Johnston K. L. et al. 2003). Questi dati indicano che l'acido clorogenico, il maggiore polifenolo del caffè, potrebbe attenuare l'assorbimento intestinale del glucosio. In uno studio condotto su uomini in sovrappeso, l'acido clorogenico (1 g) ha ridotto la risposta insulinica nel corso di un test di tolleranza al glucosio orale (Van Dijk et al. 2009). La risposta glicemica attenuata è stata anche osservata quando il saccarosio (25 g) è stato consumato con un caffè arricchito con acido clorogenico (Thom E. 2007).

Tra i meccanismi molecolari descritti per spiegare l'effetto dei polifenoli sulla glicemia postprandiale, come detto in precedenza, è compreso l'effetto inibitorio sugli enzimi correlati alla digestione dei carboidrati e l'effetto inibitore sull'assorbimento del glucosio.

Effetto della fibra alimentare su IG e GL.

Jenkins, già nelle sue prime pubblicazioni nel 1981 (Jenkins D. J. A. et al. 1981), aveva indicato il contenuto di fibre come uno dei fattori in grado di influenzare la glicemia postprandiale e l'IG degli alimenti. Egli ebbe la conferma che alimenti ricchi in fibre, come cereali e legumi, aumentano la glicemia di un livello molto basso. Il concetto di IG è, per certi versi, strettamente collegato all'ipotesi della fibra dietetica sviluppata da Trowell e Burkitt negli anni '70 (Burkitt D. P. e Trowell H. C.

1977) in cui si sosteneva che alcune patologie della civiltà del benessere erano riconducibili all'eccessivo consumo di zuccheri e amidi raffinati, e poveri in fibra. Esaminando gli effetti biologici del consumo di fibre è stato notato che si verifica una modificazione della risposta glicemica e quindi dell'IG. Numerosi studi hanno dimostrato che il consumo di fibre, soprattutto di quelle idrosolubili, riduce le risposte glicemiche ed insulinemiche postprandiali.

Studi condotti su pazienti diabetici, hanno dimostrato che l'introduzione della fibra nella loro dieta migliora significativamente il controllo glucometabolico, riducendo la glicemia postprandiale. L'influenza delle fibre sull'IG di un alimento amidaceo dipende dal tipo e dal grado di viscosità delle fibre stesse. Se le fibre mantengono la loro integrità, queste riescono ad agire come una barriera fisica alla digestione, riescono ad interferire con i processi di assorbimento dei nutrienti e quindi ad abbassare l'IG. Le fibre viscosi limitano l'azione degli enzimi digestivi sui nutrienti ed il loro assorbimento intestinale (Dikeman C. L. et al. 2006). Le fibre particolarmente efficaci nella regolazione della glicemia sono il β -glucano, le pectine e la gomma di guar, le quali sono contenute in alimenti come avena e legumi. Altro esempio di prodotti alimentari ricchi in fibre, e quindi a basso IG, sono la crusca ed i cereali integrali.

Rilevanza fisio-patologica dell'IG e del GL.

Numerosi studi epidemiologici hanno suggerito che una dieta a basso IG e GL può svolgere un ruolo protettivo nei confronti di malattie croniche come obesità (Brand-Miller J. et al. 2002), diabete di tipo II (Willet W. et al. 2002) e patologie cardiovascolari (Brand-Miller J. et al. 2007; Liu S. et al. 2002).

Una recente meta analisi condotta su studi osservazionali ha confermato che diete a basso IG e a basso GL sono associate ad un minor rischio di insorgenza non solo di patologie cardiovascolari e del diabete, ma anche di patologie tumorali (Barclay A.W. et al. 2008).

IG, GL e diabete

Se l'IG o il GL degli alimenti o di una dieta completa abbiano una rilevanza per la salute umana è stato un punto centrale della polemica che da anni accompagna questi parametri, in parte a causa della mancanza di studi a lungo termine. Solo recentemente i dati ottenuti da studi epidemiologici a lungo termine sono diventati disponibili, confermando il ruolo protettivo di diete a basso IG e GL nello sviluppo e trattamento del diabete di tipo 2 (Thomas D. et al. 2009). Su 11 studi epidemiologici che esaminano la relazione tra IG e rischio di diabete, 7 riportano delle associazioni positive (Chiu C. J. et al. 2011) (figura 16). In questa indagine, che ha avuto una durata di 20 anni, anche il GL è risultato essere associato al diabete di tipo 2 (figura 17).

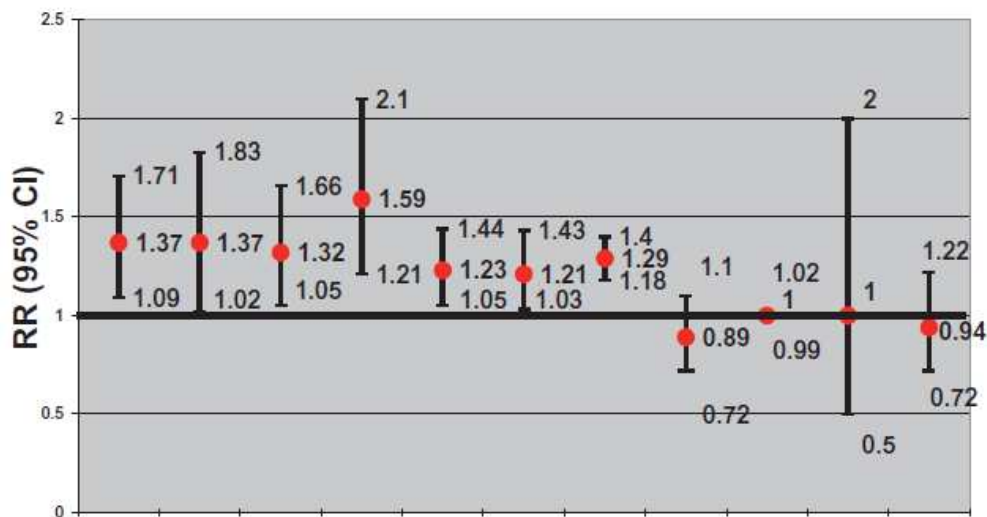


Fig 16. Rischio relativo (RR) riportato da studi che associano l'IG ed il diabete di tipo 2 (Chiu C.J. et al. 2011).

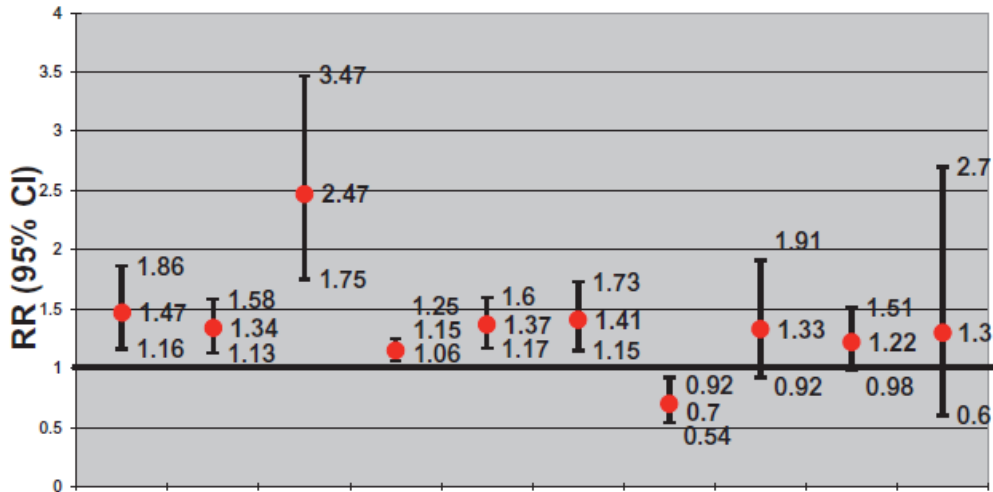


Fig 17. Rischio Relativo (RR) riportato da studi che mettono in relazione il GL e il diabete di tipo 2 (Chiu C.J. et al. 2011).

Altri studi epidemiologici hanno rivolto l'attenzione dell'effetto di IG e GL sul rischio di sviluppare il diabete di tipo 2 (Schulze M. B. et al. 2004; Hodge A. M. et al. 2004), mentre uno studio sperimentale ha posto l'attenzione sugli effetti dell'IG sul rischio di sviluppare il diabete gestazionale (Zhang C. et al. 2006). Di questi 7 studi, 4 hanno mostrato un significativo effetto protettivo di diete a basso IG contro il rischio di sviluppare il diabete di tipo 2. Gli altri 3 studi non hanno trovato associazione tra IG e GL e diabete (Meyer K. et al. 2000; Hodge A. M. et al. 2004). Recentemente questi studi sono stati raggruppati in una meta-analisi, la quale suggerisce un effetto protettivo di diete a basso IG e GL sul rischio di sviluppare il diabete di tipo 2 (Barclay A.W. et al. 2008). Inoltre, un'altra metanalisi che ha incluso 11 studi clinici controllati, durati dalle 4 settimane ai 12 mesi, in pazienti diabetici (3 studi su diabete di tipo 1, 7 su diabete di tipo 2 e 1 su entrambi i tipi di diabete), ha dimostrato che diete a basso IG sono associate ad una significativa riduzione dei livelli dei markers di controllo glicemico come i livelli di emoglobina glicata (HbA1c) rispetto a diete ad elevato IG (Thomas D. 2009); la riduzione dei

livelli di emoglobina glicata (HbA1c) è circa 0,5%. Questa riduzione è clinicamente significativa, in quanto la riduzione dell'1% dei livelli di HbA1c corrispondono al 21% di riduzione del rischio per morte correlata al diabete e di altre patologie associate al diabete di tipo 2 (Stratton I. M. et al. 2000). Altre 3 metanalisi hanno confermato che una dieta a basso IG è associata ad un miglioramento del controllo della glicemia sia a breve termine, come dimostrato dalla riduzione dei livelli di proteine glicate (fruttosamina), sia a lungo termine, come dimostrato dalla riduzione dei livelli di emoglobina glicata (Livesey G. et al. 2008; Sievenpiper J. L. et al. 2009). Tuttavia un recente studio non ha confermato questi risultati e non ha osservato una relazione tra IG della dieta e markers di controllo glicemico (Wolever M. S. T. et al. 2008). In conclusione, le prove scientifiche supportano largamente la tesi secondo cui diete a basso IG e GL, attraverso i loro effetti sulla glicemia post-prandiale e sulla riduzione dei livelli delle proteine glicate, sia a breve che a lungo termine, potrebbero avere rilevanza nel trattamento e nella prevenzione del diabete di tipo 2 (Esfahani A. et al. 2009). Lo studio dei meccanismi molecolari alla base del ruolo dell'IG sul diabete di tipo 2 ha evidenziato che un ruolo fondamentale è svolto dall'insulina rilasciata dopo un pasto. L'assunzione di un alimento ad alto IG, produce alte concentrazioni di glucosio nel sangue ed aumenta la richiesta di insulina. Questo determina una iperinsulinemia post-prandiale che, se protratta nel tempo, può indurre alterazioni della funzionalità delle cellule β del pancreas e quindi lo sviluppo del diabete di tipo 2. Inoltre, elevati livelli di insulina post-prandiale causano un aumentato rilascio di acidi grassi liberi che causa alterazioni del metabolismo glucidico e concorre all'instaurarsi di una condizione di insulino-resistenza. Al contrario, l'assunzione di alimenti a basso IG è associata ad un assorbimento più lento degli zuccheri presenti nell'alimento e ad un lento e ridotto aumento della glicemia. Ciò si traduce in un minor rilascio di insulina nella fase post-prandiale, il che è associato ad una minore liberazione di acidi grassi liberi e a un miglioramento del metabolismo glucidico (figura 18).

RISCHIO DI INSORGENZA DEL DIABETE E DIETE A ELEVATO INDICE GLICEMICO: POSSIBILI MECCANISMI

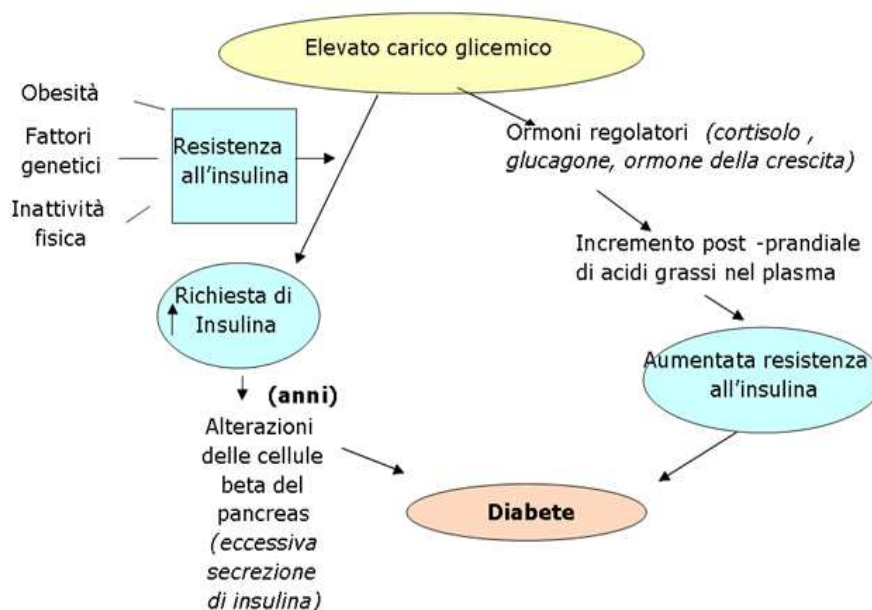


Fig 18. Rischio di insorgenza del diabete e diete a elevato indice glicemico: possibili meccanismi.

Le basi fisiopatologiche dell'aumento del rischio di insorgenza del diabete di tipo 2 includono la disfunzione delle cellule β e l'insulino-resistenza (De Fronzo R. A. 2009), il secondo dei quali è implicato anche nell'aumento del rischio cardiovascolare (De Fronzo R. A. 2010). Pertanto, la funzione delle cellule β , l'azione dell'insulina e del glucosio, risultano connessi dal punto di vista fisiopatologico e ognuno gioca un ruolo nel rischio del diabete di tipo 2 e/o nella malattia cardiovascolare di ciascun individuo (De Fronzo R. A. 2009; De Fronzo R. A. 2010). I fattori dietetici sono importanti modificatori di questo complesso sistema. Cambiamenti nella quantità e nella qualità del contenuto in grassi e/o carboidrati della dieta possono alterare uno o più componenti di base del ciclo insulina-glucosio, almeno in parte attraverso i complessi processi biologici di lipotossicità e glucotossicità (Poitout V. 2008), che a loro volta possono influenzare i percorsi che portano ad alterazioni dell'omeostasi del glucosio e alla malattia cardiovascolare. In uno studio è stato valutato l'impatto dei carboidrati della dieta sul sistema glucosio-insulina (Scazzina F. et al. 2016); tale

studio è giunto allo sviluppo di un nuovo indice, chiamato “ β -cell burden index”. Una caratteristica che differenzia quest’indice da quello glicemico ed insulinemico è che il primo stima lo stress (secrezione di insulina) che subisce la cellula β , mentre gli altri due tengono conto del glucosio e dell’insulina, rispettivamente.

IG, GL e obesità.

Recenti studi hanno evidenziato una possibile relazione tra IG e GL e sazietà. Infatti studi a breve termine hanno mostrato che cibi a basso IG inducono sazietà in misura superiore rispetto alla stessa quantità di cibi ad alto IG (Bornet F. R. J. et al. 2007). I meccanismi che regolano l’appetito e la sazietà si articolano su tre livelli, basati su processi fisiologici e metabolici perfettamente sincronizzati. Il primo livello riguarda gli eventi fisiologici come la percezione della fame, le sensazioni e il desiderio di mangiare stimolate, per esempio, dalla vista e dall’odore del cibo. Il secondo livello corrisponde ad eventi metabolici, ed il terzo livello coinvolge le interazioni con il sistema nervoso. Durante ed immediatamente dopo aver mangiato entrano in gioco “i segnali di sazietà” che danno luogo ai processi inibitori che fermano la fame. Visto che i cibi a basso IG sono caratterizzati da un livello di digestione ed assorbimento più lento, i recettori dei nutrienti nel tratto gastrointestinale potrebbero essere stimolati per un periodo di tempo più lungo, e ciò risulterebbe in un prolungato feedback al centro di sazietà del cervello (Bornet F. R. J. et al. 2007). Una possibile spiegazione della regolazione a breve termine dell’appetito è data dalla teoria glucostatica, proposta da Mayer nel 1953 (Mayer J. 1953), secondo la quale lo stimolo più importante per la regolazione dell’appetito è la glicemia. Non appena la glicemia postprandiale tende a scendere al di sotto dei valori soglia si innescano meccanismi che conducono allo stimolo della fame. Viceversa quando il glucosio ematico si innalza eccessivamente, il cervello percepisce segnali inibitori. Il consumo di cibi ad alto IG promuove un più rapido ritorno alla fame rispetto ad una quantità isocalorica di cibi a basso IG, perché si verifica un rapido declino del picco glicemico. Il senso di sazietà osservato dura per un periodo di tempo molto breve. Al

contrario, i cibi a basso IG provocano un intervallo di sazietà più lungo ed il ritorno dei segnali di fame viene rallentato.

L'iperinsulinemia postprandiale è associata all'attivazione di vie metaboliche lipogeniche. Pertanto è stato suggerito che l'iperinsulinemia indotta da alimenti ad alto IG possa favorire l'accumulo di lipidi nel tessuto adiposo (Lavin J. H. 1995). Nonostante le evidenze che dimostrano che i cibi a basso IG hanno proprietà sazianti maggiori rispetto ai cibi ad alto IG, gli studi disponibili non permettono di dimostrare benefici sulla sazietà ed il peso corporeo a lungo termine. Nel 2007 una meta-analisi, che ha incluso 6 studi sperimentali, ha concluso che le diete a basso IG e basso GL portano a riduzioni, statisticamente significative, di circa 1 Kg del peso corporeo, di 1 Kg della massa grassa totale e di 1,3 unità nel BMI (Body Mass Index) rispetto a diete controllate ad alto IG, sia negli adolescenti che negli adulti (Thomas D. 2009). Inoltre, un'altra meta-analisi condotta su 23 studi ha confermato una riduzione del peso corporeo a seguito di una dieta a basso IG (Livesey G. et al 2008).

Riguardo all'obesità infantile, è stato studiato l'effetto di una dieta a basso GL della durata di 6 settimane, su bambini obesi o in sovrappeso (Fajcsak Z. et al. 2008). I risultati ottenuti hanno mostrato una significativa diminuzione della massa grassa e dei livelli della fame (riduzione delle quantità di cibo). Questi studi suggeriscono che la riduzione dell'IG e del GL della dieta, anche per breve tempo, può rappresentare un utile approccio per ridurre il peso corporeo; tuttavia studi a lungo termine sono ancora necessari in relazione all'effetto protettivo di una dieta a basso IG per il trattamento e la prevenzione dell'obesità.

IG, GL e malattie cardiovascolari.

Le malattie cardiovascolari restano la principale causa di mortalità mondiale (Lloyd-Jones D. et al. 2009). È stato stimato che circa 16 milioni di persone negli Stati Uniti sono affette da malattie cardiovascolari che nel 2006 hanno causato circa il 20% delle morti negli Stati Uniti. Una metanalisi condotta su studi di coorte ha concluso che il consumo di alimenti ad alto IG e CG è associato ad un maggior rischio di insorgenza

di patologie cardiovascolari (Chiu C. J. et al. 2011) (figura 19). Uno studio condotto su un ampio gruppo di donne americane, e che ha avuto una durata di circa 20 anni, ha evidenziato che una dieta ad alto IG era associata ad un aumento del rischio di malattie cardiache di circa il 90% (Halton T. L. et al. 2006) rispetto alle donne che seguivano una dieta a basso IG. In un gruppo di donne tedesche, seguite per 9 anni, è stato osservato un aumento del rischio delle patologie cardiovascolari del 47% (Beulens J. W. et al. 2007). In un gruppo di uomini e donne italiani, originariamente seguiti dall'European Prospective Investigation per 7 anni, in uno studio su "Cancro e Nutrizione", la dieta ad alto GL e l'elevato assorbimento di carboidrati contenuti in cibi ad alto IG ha provocato un aumento del rischio di malattie coronariche, soprattutto nelle donne, non negli uomini (Sieri S. et al. 2010). Infine il quinto studio condotto su 36246 uomini svedesi, tra i 45 e i 79 anni, senza diabete o precedenti problemi di cuore, ha evidenziato che una dieta ad alto GL non era associata a malattie ischemiche cardiovascolari o a mortalità dopo 8 anni di indagini, ma la dieta ad alto GL è stata associata ad un aumentato rischio di infarto emorragico (Levitan E. B. et al. 2007).

Tuttavia altri studi non hanno confermato questi risultati (figura 20). Ad esempio, uno studio condotto su 646 uomini seguiti per circa 10 anni, non ha evidenziato alcun effetto protettivo associato ad una dieta a basso IG (Van Dam R. M. et al. 2000). Alla luce di tutti gli studi esaminati possiamo affermare che una dieta a basso IG e GL può ridurre il rischio di insorgenza di patologie cardiovascolari, modificando importanti fattori di rischio come diabete e obesità. Tuttavia recenti studi hanno evidenziato che una dieta a basso IG è associata ad altri effetti protettivi, in particolare al miglioramento dell'assetto lipidico e dello stato infiammatorio.

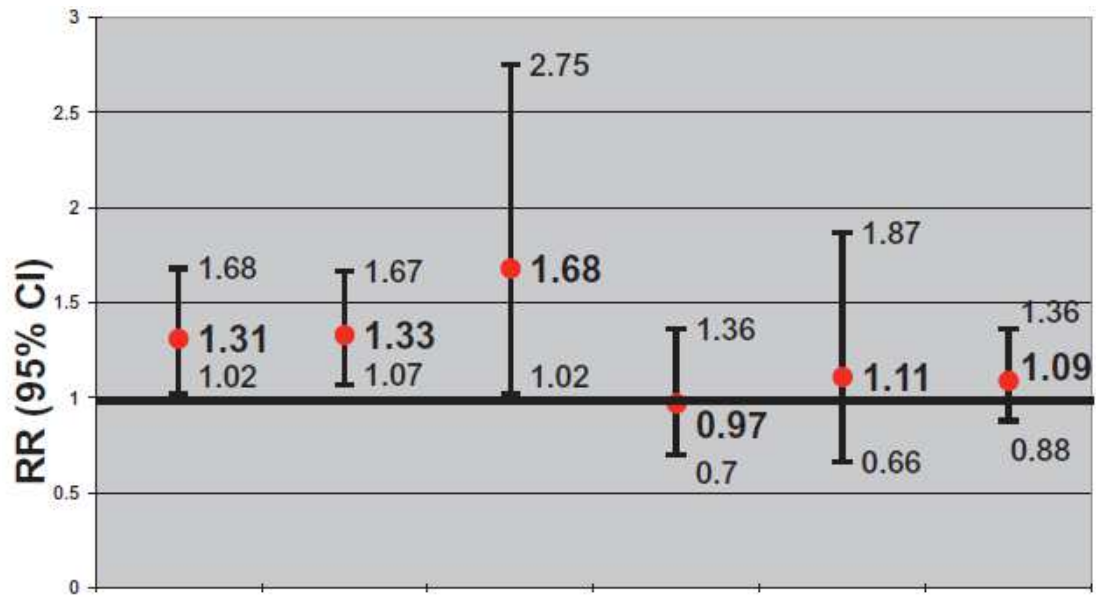


Fig 19. Rischio Relativo (RR) riportato da studi che associano IG e le malattie cardiovascolari.

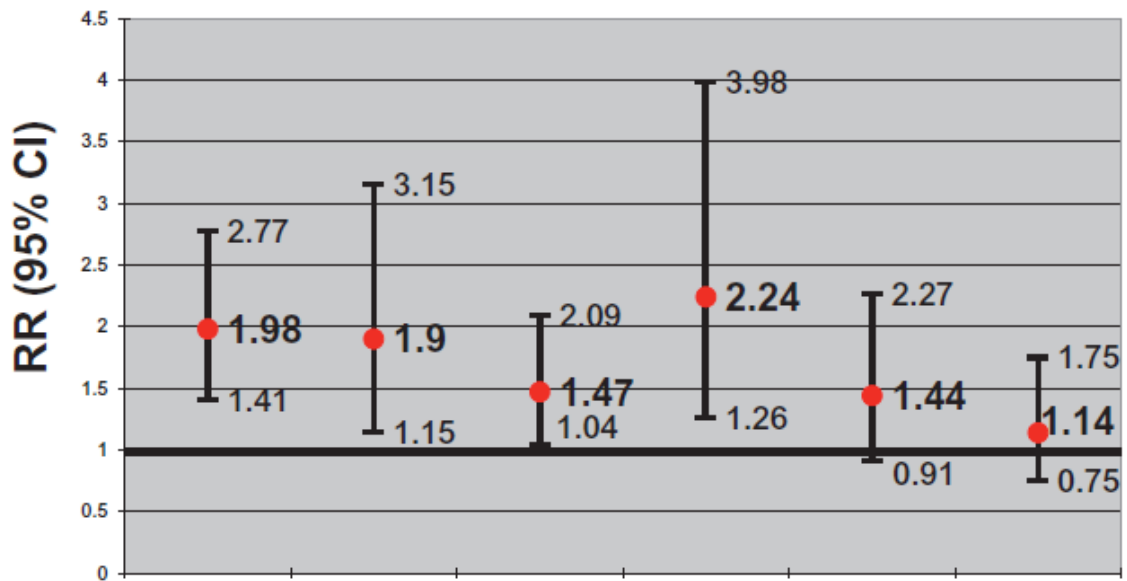


Figura 20. Rischio Relativo (RR) riportato da studi che associano CG e malattie cardiovascolari.

Frost G. nel 1999 (Frost G. et al. 1999) e Ford nel 2001 (Ford E. S. et al. 2001) hanno dimostrato una relazione inversa tra IG e GL della dieta ed i livelli di colesterolo associato alle HDL (HDL-C). Un aumento dei livelli delle HDL sono considerati un fattore protettivo nei confronti dello sviluppo di patologie cardiovascolari. Inoltre Levitan E. B. nel 2007 (Levitan E. B. et al. 2007) ha riportato che una dieta a basso IG e GL è associata anche ad una riduzione dei markers di infiammazione come la proteina C–reattiva (CRP). Elevati livelli di CRP sono legati al rischio di sviluppare patologie cardiovascolari e diabete di tipo 2 (Ridker P.M. et al. 2000; Pradhan A. D. et. 2001). Trials clinici hanno confermato un effetto positivo di una dieta a basso IG nei confronti dei livelli delle HDL e della CRP, e inoltre hanno riportato una riduzione dei livelli delle LDL e dei trigliceridi, i quali sono importanti fattori di rischio per le patologie cardiovascolari (De Rougemont A. et al. 2007). Sono tuttavia necessari studi a lungo termine per confermare l'effetto della dieta a basso IG e GL nei confronti delle patologie cardiovascolari e per comprenderne meglio i meccanismi molecolari.

IG, GL e cancro.

Negli ultimi anni, l'IG è stato collegato al rischio di insorgenza di vari tipi di cancro, quali il cancro al seno, alla prostata, al colon ed al pancreas. È stato suggerito che la riduzione dell'iperglicemia e iperinsulinemia postprandiale associata alla dieta a basso IG possa svolgere un ruolo protettivo nei confronti della trasformazione cellulare e proliferazione tumorale (Brand-Miller J. 2003). Uno studio italiano multicentrico ha mostrato una stretta associazione tra consumi elevati di zuccheri ad elevato assorbimento e il rischio di tumore alla prostata (Augustin L. S. et al. 2004). Tuttavia una metanalisi condotta da Mulholland nel 2008 (Mulholland H. G. et al. 2008) sugli effetti di IG e GL sul cancro al seno in donne in pre- e post- menopausa, non ha trovato riscontri significativi. Al contrario una metanalisi condotta da Barclay nel 2008 (Barclay et al. 2008) ha evidenziato una relazione positiva tra IG della dieta e rischio di sviluppare il cancro al seno. Risultati contraddittori sono stati osservati

anche per quanto riguarda la relazione tra IG della dieta e rischio di insorgenza del cancro al colon-retto (Franceschi S. et al. 2001) e del cancro al pancreas (Michaud D. S. et al. 2002). Due metanalisi hanno invece confermato che diete ad alto IG e CG sono associate ad un aumento del rischio di tumori all'endometrio (Gnagnarella P. et al. 2008; Mulholland H. G. et al. 2008). Queste contraddizioni potrebbero essere dovute, in parte, al limitato numero di studi ed alle differenze nel calcolare accuratamente i valori di IG e CG.

PARTE SPERIMENTALE

3. MATERIALI E METODI

La Regione Marche, nell'ambito delle politiche di sviluppo, promozione e protezione degli agro-ecosistemi e delle produzioni di qualità, ha approvato la Legge Regionale 3 giugno 2003 n. 12 "Tutela delle risorse genetiche animali e vegetali del territorio marchigiano". La legge difende le risorse genetiche non più coltivate o allevate sul territorio regionale ma attualmente conservate presso Istituti sperimentali, Orti botanici, Banche del Germoplasma, Università e Centri di ricerca anche di altre Regioni o Paesi, per le quali esista un interesse economico, scientifico, ambientale, paesaggistico o culturale. Numerosi ortaggi, legumi, cereali e frutta sono inseriti nel Repertorio della Biodiversità Agraria della Regione Marche. L'ASSAM (Agenzia per i Servizi nel Settore Agroalimentare delle Marche) cura l'attuazione dei programmi pluriennali e annui in materia di tutela della biodiversità per il settore agricolo e gestisce i due strumenti operativi della Legge cioè il Repertorio Regionale e la Rete di Conservazione e Sicurezza. Nel Repertorio Regionale vengono iscritte le risorse genetiche autoctone a rischio di erosione.

La tesi si inserisce in un progetto di valorizzazione nutrizionale di alcuni legumi del Repertorio della Biodiversità della Regione Marche e prodotti derivati. A tale scopo sono state condotte anche valutazioni dei prodotti trasformati in cui sono state impiegate farine ottenute dai vari legumi combinate con farine di cereali, tra cui uno dei cereali del Repertorio regionale è l'Orzo nudo. I campioni dei legumi e dei prodotti alimentari a base di farina di legumi utilizzati per lo studio sono stati gentilmente resi disponibili dall'ASSAM e da aziende gestite dagli agricoltori Custodi presenti sul territorio marchigiano:

1. Fava di Fratte Rosa (PU);
2. Cece Quercia di Appignano (MC);

3. Cicerchia di Serra dei Conti (AN);
4. Specialità alimentare* con 35% farina di Fave di Fratterosa (Tacconi) azienda Rosatelli (PU);
5. Specialità alimentare* con 60% semola di grano duro, 35% farina di orzo mondo e 5% farina ceci (azienda Bertini (MC);
6. Specialità alimentare con 60% farina di cicerchia e 40% di ceci (Azienda la Bona Usanza, Serra dei Conti, AN);
7. Pasta di semola di grano duro, come riferimento (Pastificio Montagna, MC).

Ogni prodotto alimentare è stato analizzato per il contenuto nutrizionale (carboidrati, proteine, grassi, fibre) utilizzando protocolli sperimentali validati.

Composti chimici e reagenti impiegati per le prove sperimentali: sigle ed abbreviazioni.

Acido gallico; Cloruro di Alluminio; Catechina; Nitrito di Sodio; Idrossido di Sodio; Fluoresceina (*3',6'-dihydroxyspiro-[isobenzofuran-1-[3H],9'[9H-xanthen]-3one]*) o FL ; 2,2'-azobis(2-ammidino-propano) o AAPH; Trolox (*acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico*); *Phosphate buffered saline* o PBS; α -amilasi; amido; *3,5-dinitrosalicylic acid* o DNSA; α -glucosidasi; *p-nitrofenil- α -D-glucopiranoside* o PNP; Carcinoma Colorectal Cells o CaCO2; terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle Medium o DMEM; L-glutamina; Fetal Bovin Serum o FBS; penicillina/streptomicina; *bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio* o MTT; *dimethyl-sulfoxide* o DMSO; *5-(e-6-)-2',7'-carbossidiclorodididrofluoresceina diacetato* o H₂DCFDA; glucosio.

Tutti i reagenti elencati sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich.

Preparazione degli estratti di polifenoli da legumi secchi.

Gli estratti di polifenoli da legumi secchi Fava di Fratte Rosa (PU), Cece Quercia di Appignano (MC) e Cicerchia di Serra dei Conti (AN) sono stati ottenuti in accordo con la letteratura (Adedayo B. C. 2012).

Preparazione degli estratti polifenolici dei prodotti alimentari in studio

Gli estratti dei prodotti alimentari trasformati sono stati ottenuti liofilizzando 200g di ciascun prodotto e diluendo 4g di polvere ottenuta in 20 ml di acqua distillata. I campioni solubilizzati sono stati incubati per 24 ore, in agitazione continua su una piastra, a temperatura ambiente. Infine sono stati centrifugati a 2000 rpm per 10 minuti. I surnatanti sono stati filtrati attraverso filtri di carta "Whatman" con diametro di 90 mm, e conservati ad una temperatura di + 4° C per l'esecuzione delle successive prove sperimentali (Adedayo B. C. et al. 2012).

Determinazione del contenuto in polifenoli totali (metodica di Folin-Ciocalteu).

Il contenuto in polifenoli totali di ciascun estratto è stato determinato con la metodica del Folin-Ciocalteu, descritto da Singleton (Singleton V. L. et al. 1965), apportando delle opportune modifiche. Una soluzione di acido gallico è stata inizialmente preparata per la determinazione della retta standard, diluendo 0,0068 g di acido gallico in 2 ml di acqua distillata. I valori di assorbanza di ciascun campione e degli standard, sono stati valutati a 765 nm, utilizzando lo spettrofotometro (UVIKON 941 PLUS). I risultati dei livelli di polifenoli nei campioni di specialità alimentari e nei legumi secchi sono espressi in mg di acido gallico equivalente (GAE)/100g di campione.

Determinazione del contenuto in flavonoidi.

Il contenuto in flavonoidi di ciascun estratto è stato determinato con la metodica del Cloruro di Alluminio descritto da Smirnova, apportando delle opportune modifiche (Smirnova L. P. et al. 1998). La soluzione per la determinazione della retta standard è stata preparata utilizzando la catechina. Dopo incubazione delle provette contenenti lo standard e i campioni di estratti con i reattivi nitrito di sodio al 5%, cloruro di alluminio al 10% ed infine 2 mL di una soluzione di idrossido di sodio 1 M per circa 10 minuti a temperatura ambiente, sono stati valutati i valori di assorbanza a 510 nm. I risultati sono espressi in mg di catechina equivalente (CAE)/100g di campione.

Valutazione del potere antiossidante: metodica ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity).

La valutazione dell'attività antiossidante in vitro degli estratti è stata condotta con il saggio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity). Studi preliminari hanno evidenziato che questo parametro è molto utile nella valutazione del potere antiossidante (Magalhaes L. M. et al. 2008) di campioni biologici e alimentari. Il metodo ORAC si basa sulla capacità degli antiossidanti presenti nell'estratto di proteggere dall'ossidazione una molecola bersaglio sensibile al radicale perossido, e utilizza la fluoresceina (FL) come sonda fluorescente e l'AAPH come agente ossidante. L'AAPH è un azocomposto solubile in acqua che va incontro a decomposizione termica a 37°C, portando alla formazione, a velocità costante, di radicali perossilici idrosolubili. La fluoresceina è una sonda fluorescente che se eccitata a 485 nm ha un picco di emissione a 530 nm. L'ossidazione della FL da parte dei radicali perossilici causa il decadimento della sua fluorescenza. Gli antiossidanti presenti nei campioni neutralizzano l'azione del radicale, proteggendo la FL dall'ossidazione con conseguente ritardo nella decadenza della fluorescenza della FL. La determinazione del potere antiossidante del campione viene effettuata calcolando

la differenza delle AUC (area sottostante la curva cinetica) di decadimento della FL tra il campione in esame e il bianco non contenente antiossidanti aggiunti:

$$\Delta AUC = AUC_{\text{campione}} - AUC_{\text{bianco}}$$

Questo parametro è proporzionale alla quantità degli antiossidanti presenti nel campione. Il risultato è convertito in μmol di Trolox equivalenti (TE). Il Trolox è usato come standard ed è un analogo idrosolubile della vitamina E. Nelle condizioni sperimentali, il dosaggio ORAC è stato eseguito mediante lettore di micropiastre. Le micropiastre sono state caricate con soluzioni contenenti: 25 μl di PBS (75mM) o di campione, 150 μl di FL, 25 μl di AAPH e 25 μl di Trolox. Il decadimento della fluorescenza della fluoresceina (eccitazione a 485 nm ed emissione a 530 nm) è stato eseguito per 3 ore. La velocità di decadimento della fluoresceina in presenza di ROS è stata confrontata con la capacità antiossidante dello standard di riferimento, il Trolox, utilizzando concentrazioni comprese tra 6,25 μM e 200 μM . I risultati sono espressi come μmoli di Trolox equivalenti in 100 g di campione ($\mu\text{mol TE}/100\text{g}$).

Inibizione dell'enzima α -amilasi.

Per valutare l'effetto inibitorio dei polifenoli estratti sull'attività dell'enzima α -amilasi è stato eseguito il metodo colorimetrico descritto da Adedayo B.C. (Adedayo B. C. et al. 2012), al quale sono state apportate alcune modifiche. L' α -amilasi che abbiamo utilizzato è di derivazione pancreatica bovina. Una soluzione di enzima è stata preparata diluendo 0,005g di α -amilasi in 10 mL di PBS (0.02 M, pH 6,9). Il substrato specifico è l'amido; 0,1g di amido solubile, diluito in 10 mL di PBS (0,02 M, pH 6,9). Tutte le provette sono state incubate a 25°C per 10 minuti, dopodichè è stato aggiunto in tutte le provette 1 ml di DNSA e queste incubate nuovamente per 5 minuti a 95°C. Infine le provette sono state lasciate raffreddare a temperatura ambiente per la successiva misura dell'assorbanza a 540 nm. I risultati sono stati espressi come % di inibizione.

$$\% \text{ inibizione} = [(Abs_{\text{controllo}} - Abs_{\text{campione}}) / Abs_{\text{controllo}}] \times 100$$

In una fase preliminare il saggio per valutare l'inibizione dell'enzima è stato condotto testando concentrazioni crescenti di estratto (da 100 a 400 μL), al fine di identificare le condizioni ottimali. Gli esperimenti successivi sono stati condotti utilizzando 100 μL di estratto acquoso.

Inibizione dell'enzima α -glucosidasi.

Per valutare l'effetto inibitorio dei polifenoli contenuti negli estratti sull'attività dell'enzima α -glucosidasi è stato eseguito il metodo colorimetrico descritto da Jong-Sang K. (Jong-Sang K. et al. 2000), al quale sono state apportate delle modifiche. Il substrato dell' α -glucosidasi è il PNP. Tutti i campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 10 minuti, dopodichè è stata misurata l'assorbanza allo spettrofotometro a 405 nm. I risultati sono stati espressi come % di inibizione.

$$\% \text{ inibizione} = [(Abs_{\text{controllo}} - Abs_{\text{campione}}) / Abs_{\text{controllo}}] \times 100$$

In una fase preliminare il saggio è stato condotto testando concentrazioni crescenti di estratto da 100 a 400 μL , al fine di identificare le condizioni ottimali. Gli esperimenti successivi sono stati condotti utilizzando 100 μL di estratto acquoso.

Effetto *in vitro* dei polifenoli estratti dalla fava sulla crescita e proliferazione delle cellule della linea CaCO-2.

Per lo studio è stata utilizzata una coltura di cellule CaCO-2 (Pinto M. et al. 1983). Il modello cellulare è ampiamente usato per studi sulla permeabilità intestinale per farmaci, sostanze chimiche e molecole come il glucosio. Questa linea cellulare, *in vitro*, subisce spontaneamente una completa differenziazione, assumendo le

caratteristiche degli enterociti; pertanto è stata riconosciuta come un modello adatto per valutare l'effetto di fattori nutrizionali e loro ruoli.

Le cellule CaCO-2 sono state fatte crescere in adesione e mantenute in terreno DMEM contenente 5 mM di L-glutamina, supplementato con il 10% di FBS, 10 mM di amminoacidi non essenziali e 100 U/ml di penicillina/streptomicina. Le cellule CaCO-2 sono state conservate in termostato a 37°C in presenza di 5% CO₂ e 95% di aria atmosferica, in ambiente umidificato. Il cambio del terrenodi coltura è stato effettuato ogni 2 giorni.

Trattamento con i polifenoli. Le cellule sono state trattate aggiungendo direttamente al terreno di coltura l'estratto di polifenoli delle fave contenente concentrazioni crescenti di polifenoli: 25; 75; 150 e 300 µg/mL. Il controllo è stato realizzato con cellule in normali condizioni di crescita incubate in assenza di estratto polifenolico. Il trattamento è stato prolungato per 48 h a 37 °C. Al termine di tale periodo sono state effettuate le determinazioni della vitalità cellulare e della formazione di ROS.

Valutazione della vitalità cellulare: metodica MTT.

La vitalità cellulare è stata studiata mediante saggio colorimetrico impiegando l'MTT. Le cellule CaCO-2 sono state coltivate in una piastra da 96-well (5 × 10⁴ cellule per pozzetto) e dopo 24 ore di incubazione sono state trattate per 48 ore, rispettivamente con

- terreno DMEM (controllo);
- polifenoli µg/ml: (25, 75,150,300).

Ogni esperimento è stato eseguito in triplicato e le cellule mantenute in termostato a 37° C in atmosfera al 5% di CO₂.

Dopo 48 ore di trattamento e incubazione è stato eseguito il test dell'MTT.

Un volume pari a 10 μ l di MTT (5mg/ml in PBS) è stato depositato all'interno di ciascun pozzetto. Dopo un'incubazione di 1 ora a 37 °C il terreno è stato rimosso e sono stati aggiunti 300 μ l di DMSO.

Dopo 30 minuti è stata eseguita la lettura dell'assorbanza ad una lunghezza d'onda di 540 nm, mediante un lettore ELISA per piastre da 96 pozzetti (Opsys MR; Dynex technologies, Chantilly, VA).

Valutazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

La produzione dei ROS nelle cellule trattate in assenza o presenza di polifenoli, è stata valutata impiegando la H₂DCFDA (Molecular Probes; Eugene, OR). Questo composto presenta due gruppi acetile che lo rendono lipofilo e gli consentono di attraversare la membrana plasmatica; all'interno della cellula, le esterasi intracellulari rimuovono i gruppi acetile e la molecola ottenuta (DCFH) viene così ossidata dai ROS eventualmente presenti, e convertita in un prodotto fluorescente (DCF, diclorofluoresceina).

Per dosare i ROS le cellule sono state incubate in numero di 25.000 in una multiwell-96 (Euroclone s.p.a.) e 24 ore dopo sono stati eseguiti i trattamenti:

- terreno DMEM (controllo);
- polifenoli μ g/ml: (25, 75,150, 300).

Il trattamento ed il saggio sono stati eseguiti in quadruplicato e le cellule mantenute in termostato a 37° C in atmosfera al 5% di CO₂. Dopo 48 ore di incubazione il terreno è stato rimosso, ogni pozzetto è stato lavato con PBS ed è stata aggiunta la H₂DCFDA (25 mM) nel terreno di coltura per 45 minuti a 37° C. Trascorso il tempo di incubazione è stata rimossa la sonda, aggiunto 100 μ l di PBS e la fluorescenza della DCF è stata misurata mediante fluorimetro con un massimo di assorbimento a λ =485 nm e di emissione a λ =535 nm per un'ora (Giorgio M. et al. 2007).

Valutazione, *in vivo*, di IG e GL delle specialità alimentari in studio.

Numerosi fattori metodologici possono alterare le misure della risposta glicemica, uno dei metodi riconosciuti per valutare l'IG ed il GL è quello proposto da Wolever nel 2008 (Wolever T. M. et al. 2008).

Sono stati inclusi nello studio 20 volontari sani, non affetti da diabete o da altre patologie del metabolismo glucidico. Ciascun volontario, prima di iniziare la prova sperimentale, è stato informato sulle procedure mediante la lettura e l'approvazione del consenso informato ed il consenso al trattamento dei dati personali. I valori medi di parametri quali l'età, il BMI (indice della massa corporea) e della glicemia a digiuno (mmol/L) ed il sesso dei soggetti inclusi nello studio sono riportati in tabella 10, con le relative deviazioni standard.

N. soggetti	20
Maschi/femmine	6/14
Età (anni)	31 ± 10
BMI (Kg/m ²)	23 ± 4
Livello basale di glucosio (mmol/L)	4.97 ± 0.4

Tab. 10. Caratteristiche dei soggetti inclusi nello studio

La valutazione dell'IG e del GL degli alimenti da testare è stata eseguita in varie fasi.

a) Valutazione della glicemia basale.

Tutti i volontari sono stati sottoposti alla valutazione della glicemia a digiuno. Il test su ciascun volontario è stato effettuato entro le ore 10 del mattino, dopo aver digiunato durante la notte, e dopo aver consumato la dieta abituale il giorno precedente al test. La valutazione della glicemia è stata effettuata con tecnica "Self-

Monitoring Blood Glucose” o SMBG e consiste nella misurazione del glucosio presente nel sangue capillare, prelevato tramite ago pungi-dito. Tale misurazione è stata ottenuta mediante l’utilizzo di un pratico dispositivo portatile, detto glucometro (BAYER) (figura 21), che consente di misurare la glicemia su sangue intero, di solito sangue capillare ottenuto dalla puntura del polpastrello di un dito; la goccia di sangue viene poi posta su una striscia reattiva inserita nello strumento per la lettura. Il principio su cui si basa la misura dei più comuni glucometri validati per uso clinico consiste nella quantificazione di una reazione enzimatica, l'ossidazione del glucosio, che risulta proporzionale alla sua concentrazione nel sangue. La reazione avviene dunque ponendo un campione di sangue su una striscia reattiva alla glucosio-ossidasi.



Figura 21. Glucometro per la misurazione della glicemia.

b) Valutazione dell’incremento della glicemia dopo assunzione dell’alimento standard.

I soggetti sono stati invitati ad assumere una soluzione contenente 50 grammi di glucosio anidro diluito in 200 ml di acqua (alimento standard). In seguito all’ingestione dello standard è stato valutato l’incremento della glicemia per due ore e ad intervalli di tempo regolari (15, 30, 45, 60, 90, 120 minuti). Il primo prelievo è stato effettuato al tempo 0, cioè prima dell’assunzione dello standard, e poi dopo ogni 15 min nella prima ora e ogni 30 minuti nella seconda ora, ad intervalli regolari. Durante gli intervalli di tempo tra un prelievo e l’altro, i soggetti hanno rispettato un

riposo relativo. Il valore della glicemia è stato di volta in volta registrato. La raccolta di questi dati consente di tracciare graficamente le variazioni glicemiche in relazione al trascorrere del tempo per ciascun soggetto. La registrazione grafica dei due parametri (concentrazione di glucosio, in mmoli/L ed il tempo, in secondi) genera una curva, la cui area sottesa da essa, indicata con AUC, è un dato fondamentale per il calcolo dell'IG. All'area sottesa da questa curva (AUC_{standard}) viene attribuito il valore 100, poiché il glucosio rappresenta l'alimento di riferimento per valutare l'indice glicemico degli altri alimenti.

c) Valutazione dell'incremento della glicemia dopo assunzione dell'alimento test.

In giorni diversi, agli stessi soggetti è stata somministrata una determinata quantità di prodotto alimentare di controllo e di prodotto alimentare a base di farine di legumi. La quantità di ciascuna porzione è stata calcolata in modo che essa contenesse esattamente 50 grammi di carboidrati disponibili. In seguito è stato valutato l'incremento della glicemia ad intervalli di tempo regolari (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 minuti) dall'ingestione dell'alimento. Dopo aver riportato i valori registrati in grafico è stata calcolata l'area sottesa dalla curva (AUC_{test}) risultante per ciascun prodotto testato.

d) Calcolo dell'area sotto la curva glicemica (AUC).

Il calcolo dell'AUC equivale all'area dei triangoli e dei trapezi, come è riportato nell'esempio della figura 22.

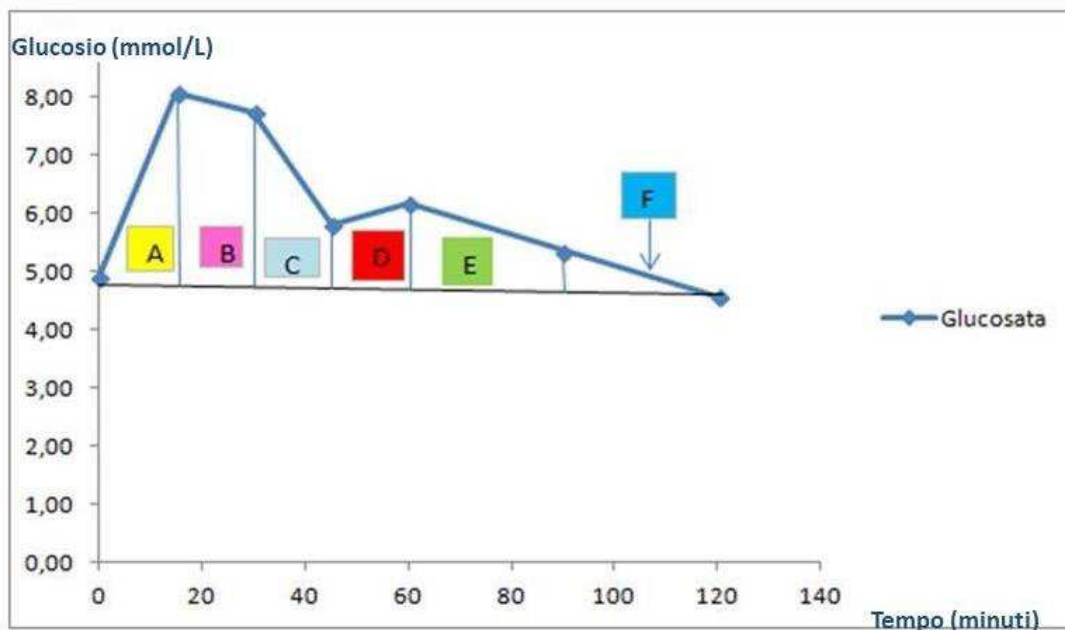


Fig 22. Esempio di calcolo dell'area incrementale sotto la curva della risposta glicemica.

e) Calcolo dell'IG.

L' IG è stato calcolato come rapporto tra il valore dell'AUC della risposta glicemica di ciascun prodotto alimentare ed il valore dell'AUC dell'alimento di riferimento (glucosio), secondo la formula:

$$IG = (AUC_{\text{prodotto testi}} / AUC_{\text{glucosio}}) \times 100.$$

f) Calcolo del GL.

Dopo aver calcolato l'IG è possibile valutare il GL, moltiplicando la quantità di carboidrati disponibili contenuti in una porzione di prodotto alimentare (50g) per il corrispondente valore di IG, secondo la formula:

$$CG = (IG \times \text{g carboidrati per porzione}) / 100.$$

Analisi statistica dei dati

I risultati riferiti alle caratteristiche composizionali dei legumi inclusi nella ricerca e nelle diverse tipologie di pasta incluse nello studio ed i risultati relativi ai valori di IG e GL ottenuti sono stati espressi come media \pm deviazione standard. Per valutare la significatività dei risultati ottenuti è stato applicato il test t di Student ($p < 0,05$).

4. RISULTATI

Le tabelle 11 e 12 riassumono il contenuto dei macronutrienti, fibre, polifenoli e ORAC in alcuni legumi del Repertorio Regionale (RR) le cui farine sono state impiegate per la produzione di diverse specialità alimentari. I dati ottenuti confermano che i legumi del RR sono una buona fonte di proteine vegetali e di fibre. Di rilievo è anche il contenuto in polifenoli ed il potenziale antiossidante, in accordo con i dati della letteratura.

	Cicerchia di Serra de'Conti	Cece Quercia di Appignano	Fava di Fratte Rosa
Proteine (g)	24	20	21
Lipidi (g)	1,3	21	2,3
Carboidrati (g)	63	61	62
Fibre (g)	24	25	17

Tab. 11 Contenuto in macronutrienti e fibre di alcuni legumi del Repertorio Regionale (RR). I valori sono riferiti a 100 g di prodotto secco.

LEGUME	Polifenoli Totali (mgGAE/100g)	ORAC (μmolTE/100g)
Cece Quercia di Appignano	150 \pm 10	1314 \pm 60
Cicerchia di Serra de' Conti	120 \pm 10	1019 \pm 40
Fava di Fratte Rosa	700 \pm 20	5571 \pm 50

Tab. 12 Contenuto in polifenoli e potenziale antiossidante in alcuni legumi del Repertorio Regionale (RR).

Valutazione dei macronutrienti dei prodotti ottenuti con combinazioni di farine di legumi e cereali.

Le tabelle 13 e 14 mostrano i dati composizionali in macronutrienti, in polifenoli e flavonoidi di alcune specialità alimentari ottenute con farine di legumi in combinazione con semola di grano duro o farina di orzo. L'aggiunta del 35% di farina di fava di Fratte Rosa (PU) è associata ad un significativo aumento dei livelli di proteine ($p < 0,01$). Un livello più alto è osservato anche nei prodotti ottenuti con le altre combinazioni di farine di legumi. Tutte le paste ottenute con farine di legumi mostrano un livello maggiore di fibre rispetto alla pasta ottenuta con la sola semola di grano duro (tab. 13).

	Pasta con semola di grano duro*	Specialità alimentare* con 35% di farina di Fave di Fratte Rosa	Specialità alimentare* con 35% di farina di Orzo Mondo e 5% di farina di Ceci	Specialità alimentare* con 60% di farina di Cicerchia e 40% di Ceci
Carboidrati (g/100g)	72 ± 0,3	69 ± 0,01	59 ± 0,5	49 ± 0,01
Amido (g/100g)	65,1 ± 0,01	61,5 ± 0,05	52,6 ± 0,03	46 ± 0,02
Amiloso/Amilopectina	26,8/73,2	29,2/70,8	ND	ND
Fibra (g/100g)	3,2 ± 0,1	6,8 ± 0,1	10,3 ± 0,5	8,2 ± 0,1
β-glucani (g/100g)	ND	ND	1,49 ± 0,02	ND
Proteine (g/100g)	14,2 ± 0,01	16,1 ± 0,05	13,17 ± 0,01	26,1 ± 0,04
Grassi (g/100g)	4,2 ± 0,05	3,4 ± 0,02	2,3 ± 0,01	2,8 ± 0,01

Tab. 13. Valori nutrizionali medi dei campioni di specialità alimentari (tipologia pasta) a base di farina di legumi del Repertorio Regionale della Biodiversità (valori riferiti a 100g di prodotto); (nd, non determinato; * pasta all'uovo).

Valutazione dei polifenoli totali, dei flavonoidi e del potere antiossidante (ORAC) delle specialità alimentari a base di farina di legumi del Repertorio Regionale.

Il prodotto con farina di fava di Fratte Rosa (PU) ha un livello maggiore di polifenoli totali ($185,3 \pm 8,2$ mgGAE/100g) rispetto alla pasta di riferimento ($p < 0,003$). Anche il prodotto alimentare ottenuto con farina di orzo e ceci mostra un maggior contenuto in polifenoli totali rispetto a quello ottenuto con semola di grano duro ($172,3 \pm 8,6$ mg GAE/100g vs $63,8 \pm 10,1$ mgGAE/100g, rispettivamente). Nella specialità alimentare con 60% farina di cicerchia e 40% di ceci il livello di polifenoli è $105,6 \pm 8$ mgGAE/100g.

Anche i livelli di flavonoidi totali risultano più elevati nei prodotti con farine di legumi e cereali (con orzo e ceci è di $20,5 \pm 2,7$ mg CAE/100g) e $28,7 \pm 1,3$ mg CAE/100g nel prodotto con farina di fava rispetto a quello di controllo ($13,6 \pm 1,5$ mg/100g) ($p < 0,001$) (Tabella 14).

	Polifenoli Totali (mgGAE/100g)	Flavonoidi Totali (mgCE/100g)	ORAC μmolTE/100g)
Controllo	$63,8 \pm 10,1$	$16,5 \pm 1,5$	$859 \pm 24,6$
Prodotto con farina di orzo e ceci	$172,3 \pm 8,6^{**}$	$20,5 \pm 2,7^*$	$2789 \pm 25^*$
Prodotto con farina di fave	$185,3 \pm 8,2^*$	$28,7 \pm 1,3^*$	$1017 \pm 19,9^*$
Prodotto con farina di ceci e cicerchia	$92 \pm 5,3^*$	$6,3 \pm 1,2^*$	$1625,3 \pm 24^*$

Tab 14. Livelli di polifenoli totali, di flavonoidi e potere antiossidante (ORAC) dei prodotti in studio. I valori sono presentati come media \pm la deviazione standard. ($p < 0,001$; ** $p < 0,003$).*

Il contenuto in polifenoli totali e in flavonoidi si riflette nelle proprietà antiossidanti totali dei prodotti testati. Le proprietà antiossidanti totali, valutate mediante metodica ORAC, sono significativamente più elevate negli estratti dei prodotti ottenuti con farina di orzo e ceci ($2789 \pm 25 \mu\text{molTE}/100\text{g}$), con aggiunta di farina di fava ($1017 \pm 19,9 \mu\text{molTE}/100\text{g}$) e con aggiunta di farina di ceci e cicerchia ($1625,3 \pm 24$) rispetto al controllo ($859 \pm 24,6 \mu\text{molTE}/100\text{g}$) ($p < 0,001$).

Valutazione dell'inibizione, *in vitro*, degli enzimi della digestione dei carboidrati

Allo scopo di indagare se i composti bioattivi contenuti nei prodotti alimentari in studio siano in grado di modulare l'attività di enzimi coinvolti nella digestione dei carboidrati, è stata valutata la capacità degli estratti di inibire l'attività degli enzimi α -amilasi e α -glucosidasi. I risultati hanno evidenziato che gli estratti di due dei prodotti testati sono in grado di inibire l'attività dell'enzima α -glucosidasi. L'estratto del prodotto a base di farina di orzo e ceci mostra un'attività inibitoria sull'enzima α -glucosidasi ($53,5 \pm 2,5\%$). Una inibizione minore è stata osservata con gli estratti ottenuti dalla pasta contenente farina di fave (inibizione del 10%). Una attività inibitoria dei due estratti polifenolici è stata osservata anche nei confronti dell'enzima α -amilasi (inibizione dell'11%) senza significative differenze tra le due varietà di prodotti inclusi nello studio.

Effetto dei polifenoli sulla vitalità delle cellule intestinali CaCO2

L'effetto degli estratti polifenolici ottenuti dalle fave sulla vitalità cellulare è stato valutato mediante il saggio dell'MTT. Come riportato in figura 23, non sono state osservate modificazioni significative della vitalità cellulare.

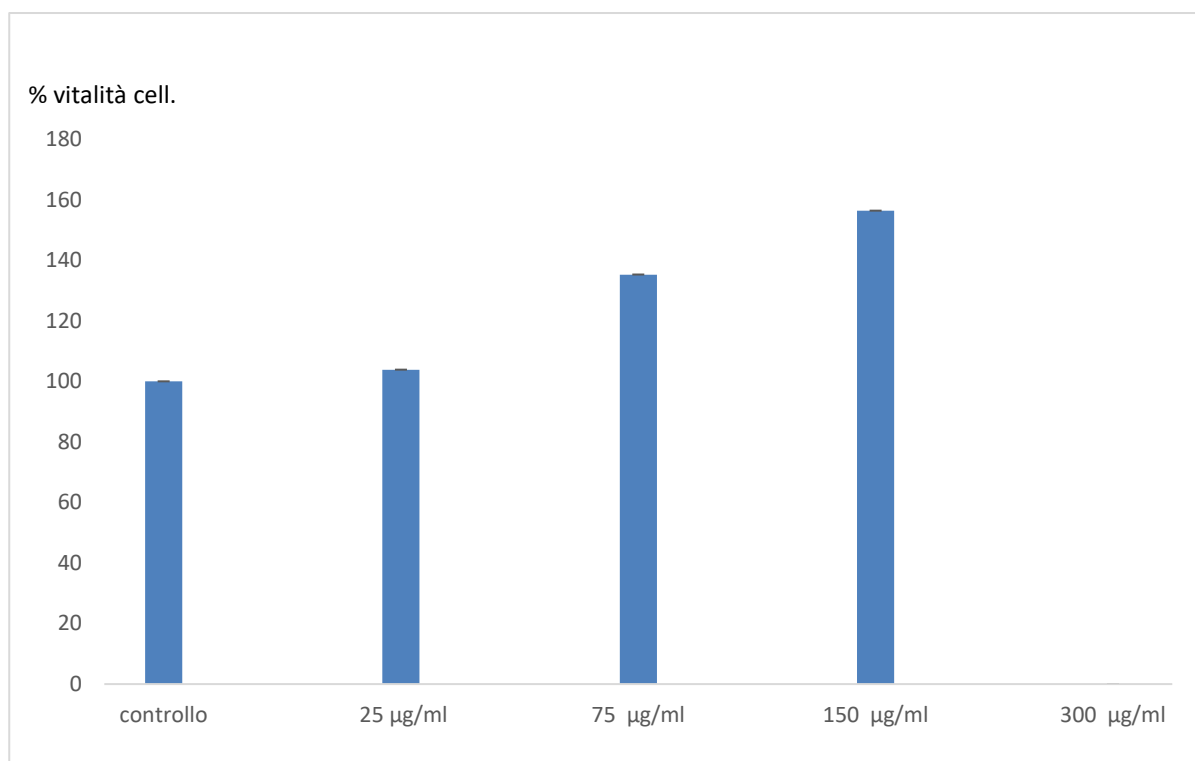


Fig. 23. Valutazione della proliferazione cellulare mediante il saggio dell'MTT in presenza di concentrazioni crescenti di polifenoli.

Effetto dei polifenoli sulla formazione di ROS intracellulari

Come mostrato in figura 24, i livelli di ROS nei campioni trattati con 4 diverse concentrazioni di estratti polifenolici di fava, rispettivamente con 25 µg/ml, 75 µg/ml, 150 µg/ml e 300 µg/ml riduce la formazione di ROS nelle cellule in coltura.

In particolare, i livelli di ROS nelle CaCO₂ incubate con 300 µg/ml di polifenoli ($55 \pm 0,98$ Arbitrary Unit) sono più bassi del controllo ($174,67 \pm 1,4$ Arbitrary Unit) (figura 24). I dati ottenuti suggeriscono che nel modello cellulare da noi usato, i polifenoli potrebbero esercitare un ruolo antiossidante.

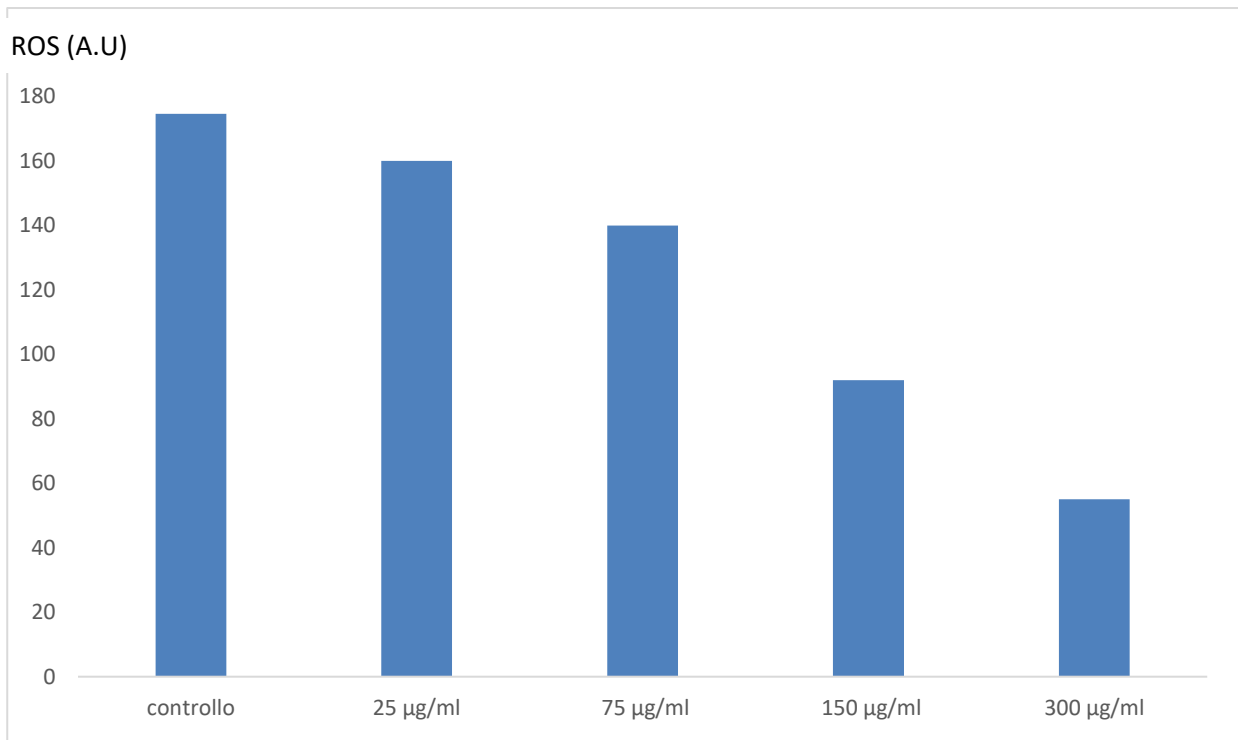


Fig. 24. Valutazione, in assenza o in presenza di polifenoli, della produzione di ROS riportata come unità arbitraria di fluorescenza.

IG e GL: confronto tra il prodotto di controllo (a base di semola di grano duro) ed i prodotti ottenuti con farine di legumi del Repertorio Regionale.

Al fine di indagare gli effetti dei prodotti alimentari in studio sulla glicemia post-prandiale, sono stati valutati *in vivo* i valori dell'IG e successivamente è stato calcolato il carico glicemico. In figura 25 sono rappresentate le curve glicemiche ottenute considerando i valori glicemici medi registrati dopo l'assunzione di tre prodotti alimentari (controllo, prodotto con farina di orzo e ceci, prodotto con farina di fava e con farine di cicerchia e ceci), ciascuno assunto in porzioni contenenti 50 grammi di carboidrati disponibili.

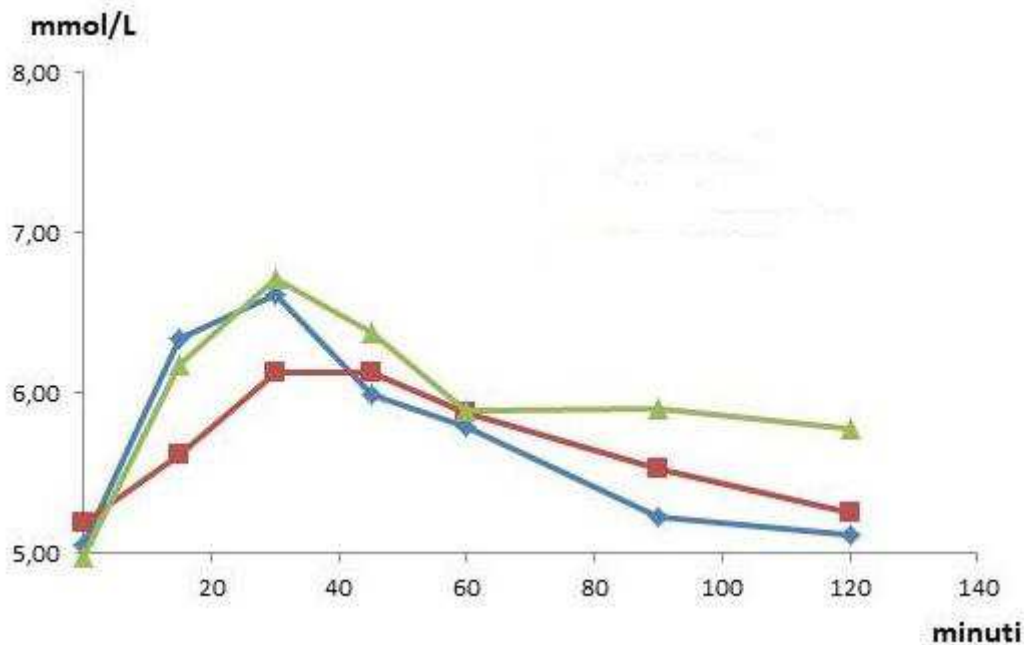


Fig 25. Curve glicemiche dei prodotti testati (curva verde: con farina di fave; curva rossa: con farina di orzo e ceci; curva blu: con farina di semola di grano duro).

I massimi valori di glicemia osservati dopo il consumo di una porzione di prodotto ottenuto con farina di grano duro o prodotto ottenuto con farina di orzo Mondo (varietà esastica) e farina di ceci, o prodotto ottenuto con farina di fava, sono pari a

6,74 ± 0,05 mmol/L, 6,23 ± 0,063 mmol/L, e 6,58 ± 0,07 mmol/L, rispettivamente, con p<0,003.

Il valore medio di IG riferito al prodotto di controllo 72 ± 8. I valori individuali di IG riferiti al prodotto a base di farina di orzo e ceci sono compresi tra 18,3% e 36,5 % e il valore medio è pari a 26,9 ± 1,7 %; il livello di IG del prodotto a base di farina di fava è pari a 40 ± 4,5 %. Gli ultimi due risultano significativamente più bassi rispetto a quello del prodotto di controllo (p<0,05).

Il GL è stato calcolato considerando una porzione di prodotto pari a 70g, porzione consigliata dalle Linee guida di una sana e corretta alimentazione (LARN). I valori medi di GL osservati nel prodotto ottenuto con farina di orzo e ceci ed il GL del prodotto con farina di fava sono significativamente più bassi (11,8 ± 1,0 e 20 ± 2,2 rispettivamente) rispetto a quelli del prodotto di controllo (37 ± 4) (p<0.007). I valori più bassi sono stati osservati nel prodotto ottenute con farina di ceci e di cicerchia di Serra De Conti (tabella 15).

	AUC (mmoli*min/L)	IG	GL
Controllo	128 ± 12	72 ± 8	37 ± 4
Prodotto con farina di orzo e ceci	58,2 ± 8	26,9 ± 1,7 ~	11,8 ± 1~~
Prodotto con farina di fave	75 ± 11 **	40 ± 4,5*	20 ± 2,2*
Prodotto con farina di ceci e cicerchia	30 ± 5*	21 ± 5*	7,3 ± 3*

Tab. 15. Valori medi di AUC, IG e GL dei prodotti in studio. (*p<0,002; **p<0,008; ~p<0,05; ~~p<0,007 vs pasta di controllo). I dati sono presentati come media ± deviazione standard.

5. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Negli ultimi anni una attenzione crescente è rivolta alle farine di legumi come ingredienti funzionali per la preparazione di prodotti alimentari con peculiari aspetti nutrizionali e salutistici (Chillo S. et al. 2010). Fino ad oggi le proprietà nutrizionali di prodotti alimentari ottenuti con farine di legumi del Repertorio della Biodiversità Agraria delle Marche non erano conosciute. Le specialità alimentari ottenute con farina di fave di Fratterosa (azienda "I Lubachi", PU, Rosatelli Rodolfo), farina di orzo nudo e ceci (Azienda Agricola "Bertini", Treia, MC), farina di cicerchia di Serra de Conti e cece Quercia di Appignano, presentano un ridotto contenuto di carboidrati disponibili. Inoltre tutti i prodotti ottenuti con farina di legumi del RR hanno maggior contenuto di proteine e di fibre rispetto al campione di riferimento. Sulla base della Legislazione Europea sui claims nutrizionali (Regolamento CE n. 1924/2006 del Ministero della Salute relativo alle indicazioni nutrizionali fornite sulle etichette dei prodotti alimentari) a queste specialità alimentari può essere riferito il claim "*ad alto contenuto in fibre*" in quanto un alimento è ad alto contenuto in fibre se esso contiene almeno 6 g di fibre per 100 g o almeno 3 g di fibre per 100 kcal.

Inoltre, il prodotto alimentare ottenuto con farina di orzo contiene 1,49g/100g di β -glucani. I β -glucani sono "polisaccaridi non amilacei lineari costituiti da molecole di glucosio unite insieme mediante legami glicosidici β -(1-3) e β -(1-4)". Essi sono i maggiori componenti della frazione solubile della fibra alimentare di alcuni cereali (grano, avena ed orzo), e come tali, esercitano, nel nostro organismo, taluni effetti benefici come, ad esempio, il rallentamento dello svuotamento gastrico ed il contenimento del livello di colesterolo ematico, come confermato dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (Opinione Scientifica EFSA, 2010).

L'analisi composizionale ha dimostrato che le specialità alimentari ottenute con farina di legumi presentano maggiori livelli di polifenoli e flavonoidi rispetto alla pasta ottenuta con semola di grano duro. Ciò conferma che in questi prodotti viene conservato parte del patrimonio di fitonutrienti presenti nei legumi. Il contenuto in polifenoli negli estratti delle fave può spiegare il ruolo antiossidante esercitato sulle

cellule della linea CaCO-2. Studi successivi sono necessari per comprendere in maggior dettaglio i meccanismi molecolari con cui i polifenoli dei legumi esercitano il loro ruolo antiossidante.

Lo studio dell'IG nelle specialità alimentari ha evidenziato un IG basso ed un GL medio-basso. L'IG più basso è stato osservato nel prodotto ottenuto con farina di ceci e di cicerchia. Le caratteristiche composizionali (maggiore contenuto in fibre, proteine e polifenoli) delle specialità alimentari testate possono spiegare il minor IG rispetto alla pasta convenzionale come descritto in precedenza (Turco I. et al. 2016; Greffeuille V. et al. 2015). Infatti dall'esame della letteratura emerge che i polifenoli e le fibre esercitano un effetto sulla glicemia post-prandiale e diversi meccanismi molecolari sono stati ipotizzati (Schulze M. B. et al. 2004). In particolare i polifenoli (catechina, epicatechina, genisteina e diadzeina) contenuti nei legumi, hanno un effetto inibitore degli enzimi coinvolti nella digestione dei carboidrati (McDougall G. J. et al. 2008). I nostri dati, sebbene preliminari, confermano che i polifenoli estratti dai legumi inclusi nello studio esercitano un effetto inibitorio sull'attività dell'enzima α -glucosidasi. Dall'esame della letteratura emerge che l'effetto dell'aggiunta di diverse farine di legumi a prodotti alimentari come la pasta o il pane sull'IG era già stato studiato in precedenza (Osorio-Díaz P. et al. 2008); ad esempio, era stato dimostrato che l'aggiunta della farina di ceci (25%) nella formulazione di una pasta in formato "spaghetti" mostrava un IG significativamente inferiore (IG 58,9) rispetto a quello misurato per gli spaghetti tradizionali (IG 72,8) (Goni I. et al. 2003). Nessuna modifica di IG è stata invece osservata, in studi in vitro, da Chillo S. con spaghetti che contengono il 10% di fagioli, semi di soia, lenticchie o ceci rossi rispetto al controllo. Al contrario Marinangeli (Mariangeli C. P. et al. 2009) in studi con pasta ottenuta con aggiunta del 30% di farina di piselli gialli a quella di grano duro non ha riscontrato alcuna riduzione significativa di IG (93,3) rispetto al controllo. Recentemente è stato dimostrato che l'IG di spaghetti con aggiunta del 35% di farina di fave è più basso, ma non in modo significativo, rispetto alla pasta di controllo (Greffeuille V. et al. 2015). I risultati sono probabilmente correlati alla

natura e al tipo di legume utilizzato per l'arricchimento del prodotto alimentare, ma anche dalla struttura della matrice del prodotto di partenza. Da un punto di vista tecnologico, la pasta non è un prodotto omogeneo. Studi precedenti hanno valutato l'IG di vari tipi di pasta ottenuti con diversi processi tecnologici e diversi ingredienti, ed i valori erano compresi tra 56 e 71. Le farine di legumi e di cereali, per le loro proprietà nutrizionali descritte in precedenza, possono essere utilizzate come ingrediente mirato a migliorare il valore nutrizionale di alimenti di largo consumo alimentare.

I concetti di IG e GL sono particolarmente importanti in patologie in cui è necessario controllare il livello di glicemia e di insulina postprandiale quali il diabete e obesità. La conoscenza dell'IG degli alimenti può aiutare a selezionare gli alimenti più appropriati nella dieta del paziente diabetico al fine di mantenere la glicemia sotto controllo. Infatti l'iperglicemia può portare a danni cellulari e contribuire allo sviluppo di altre malattie croniche. L'IG ed il GL hanno una valenza anche negli individui sani in termini di prevenzione del diabete (Willett W. et al. 2002) e delle malattie cardiovascolari (Brand-Miller J. 2003; Brand-Miller J. et al. 2007). Studi osservazionali su popolazioni non diabetiche suggeriscono che le diete con un elevato IG si associano in modo indipendente all'aumento di rischio per diabete di tipo 2, diabete gestazionale, e malattie cardiovascolari. L'IG ha dimostrato di essere un fattore di rischio indipendente per l'infarto miocardico. Al contrario, studi clinici hanno dimostrato che una dieta a basso IG migliora il controllo della glicemia in soggetti diabetici (Sacks F. M. et al. 2014), aumenta la sensibilità all'insulina (Visuthranukul C. et al. 2015) ed è associata ad una riduzione dei livelli di colesterolo plasmatico (Sloth B. et al. 2004).

Diverse Istituzioni che si occupano di Sanità pubblica e di prevenzione hanno recentemente integrato la considerazione dell'IG nelle loro raccomandazioni nutrizionali per i pazienti con patologie metaboliche e per la popolazione generale. Si raccomanda che il picco di glucosio postprandiale sia tra 4,0-7,5 mmol/L per gli

individui sani e non superiore a 9 mmol/L per le persone con diabete. Pertanto, anche una modesta riduzione tra 0,5-1,0 mmol/L di glucosio postprandiale è considerato benefico per aiutare le persone a mantenere la concentrazione di glucosio entro i limiti massimi consigliati.

In conclusione i nostri risultati suggeriscono che i prodotti alimentari formulati con combinazioni di legumi e cereali sono alimenti a basso IG e a basso-medio GL.

I dati ottenuti rivestono una rilevanza fisio-patologica, in quanto numerosi studi confermano che una alimentazione ricca di fibre e a basso IG costituisce un approccio alimentare utile nel trattamento del diabete ed esercita un effetto protettivo contro l'insorgenza di alcune patologie cronico degenerative, quali dislipidemie, obesità, patologie cardio-vascolari, ed alcuni tipi di neoplasie, tra cui il tumore al colon-retto.

BIBLIOGRAFIA

Abu-Reidah I. M., Contreras M., Arráez-Román, D., Fernández-Gutiérrez A. UHPLC-ESI-QTOF-MS-based metabolic profiling of *Vicia faba* L. (Fabaceae) seeds as a key strategy for characterization in foodomics. 2014. *Electrophoresis*. (35): 1571-1581.

Adedayo B. C., Ademiluyi A. O., Oboh G., Akindahunsi A. A. Interaction of aqueous extracts of two varieties of Yam tubers (*Dioscorea* spp) on some key enzymes linked to type 2 Diabetes in vitro. 2012. *International Journal of Food Science and Technology*. 47(4): 703-709.

Adom K.K., Liu R.H. Antioxidant activity of grains. 2002. *J. Agric. Food Chem.* (50): 6182-6187.

Akcicek E., Otles S., Esiyok D. Cancer and its prevention by some horticultural and field crops in Turkey. 2005. *Asian Pacific J Cancer Prev* 6:224–230.

Alajaji S. A., El-Adawy T. A. Nutritional composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by microwave cooking and other traditional cooking methods. 2006. *J Food Composition and Analysis* (19): 806-812.

Andrade N., Araújo J. R., Correia-Branco A., Carletti J. V., Martel F. Effect of dietary polyphenols on fructose uptake by human intestinal epithelial (Caco-2) cells. 2017. *Journal of Functional Foods*. (36): 429-439.

Andriantsitohaina R., Auger C., Chataigneau T., Etienne-Selloum N., Li H., Martinez M. C., Schini-Kerth V. B., Laher I. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. 2012. *Br J Nutr.* (108): 1-18.

Anese M., Nicoli M.C. Optimising phytochemicals release by process technology. In: Pfannhauser W, Fenwick GR, Khokhar S. 2001. (Ed.) *Biologically-active phytochemicals in food*. Cambridge: RSC. 455-70.

Arts I. C., Hollman P.C. Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. 2005. *Am J Clin Nutr.* (81): 317-325.

Augustin L. S., Galeone C., Dal Maso L., Pelucchi C., Ramazzotti V., Jenkins D. J., Montella M., Talamini R., Negri E., Franceschi S., La Vecchia C. Glycemic index, glycemic load and risk of prostate cancer. 2004. *Int J Cancer*; 112: 446-450.

Baginsky C., Pena-Neira A., Caceres A., Hernandez T., Estrella I., Morales H., Pertuze R. Phenolic compound composition in immature seeds of fava bean (*Vicia faba* L.) varieties cultivated in Chile. 2013. *Journal of Food Composition and Analysis* (31): 1–6.

Balasubramaniam V., Mustar S., Khalid N. M., Rashed A. A., Noh M. F. M., Wilcox M. D., Pearson J. Inhibitory activities of three Malaysian edible seaweeds on lipase and α -amylase. 2013. *J. Appl. Phycol.* 25: 1405–1412.

Balasundrama N., Sundramb K., Sammana S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. 2006. *Food Chem.* (99):191–203.

Barclay A.W., Ptocz P., McMillan-Price J. Glycemic index, glycemic load and chronic disease risk- a meta analysis of observational studies. 2008. *Am J Clin Nutr.* 87: 627-637.

Basta G. Receptor for advanced glycation endproducts and atherosclerosis: From basic mechanisms to clinical implications. 2008. *Atherosclerosis.* 196: 9–21.

Bazzano L. A., Thompson A. M., Tees M. T., Nguyen C. H., Winham D.M. Non-soy legume consumption lowers cholesterol levels: a meta-analysis of randomized controlled trials. 2011. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 21(2):94-103.

Beulens J. W., de Bruijne L. M., Stolk R. P. High dietary glycemic load and glycemic index increase risk of cardiovascular disease among middle-aged women: a population-based follow-up study. *J Am Coll Cardiol.* 2007. 50:14-21.

Bladé C., Arola L., Salvadó M. J. “Hypolipidemic effects of proanthocyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms”. 2010. *Mol Nutr Food Res.* 54 (1): 37-59.

Bohn T. Dietary factors affecting polyphenol bioavailability. 2014. *Nutr Rev.* 72(7):429-52.

Bornet F. R. J., Jardy-Gennetier A. E., Jacquet N., Stowell J. Glycemic response to foods: Impact on satiety and long-term weight regulation. 2007. *Science Direct.* 49: 535-553.

Borowska J., Giczewska-Gąterska A., Zadernowski R. Nutritional value of broad bean seeds. Part 2: Selected biologically active components. 2003. *Food/Nahrung*, (47): 98-101.

Bouchenak M., Lamri-Senhadji M. Nutritional quality of legumes, and their role in cardiometabolic risk prevention. 2013. *J Med Food*. 16(3):185-98.

Boudjou S., Oomah B.D., Zaidi F., Hosseinian F. Phenolics content and antioxidant and anti-inflammatory activities of legume fractions. 2013. *Food. Chem.* (138): 2-3.

Brand J. C., Nicholson P. L., Thorburn A.W., Truswell A. S. Food processing and the glycemic index. 1985. *Am J Clin Nutr.* (42): 1192-6.

Brand-Miller J. Glycemic load and chronic disease. 2003. *Nutr Rev*; 61: S49-S55.

Brand-Miller J., Dickinson S., Barclay A., Celermajer D. The glycemic index and cardiovascular disease risk. 2007. *Curr Atheroscler Rep.* 9(6):479-85.

Brand-Miller J., Holt S. H. A., Pawlak D. B., Mc Millan J. Glycemic index and obesity. 2002. *Am J Clin Nutr.* 76 (suppl): 281S-5S.

Brazier-Hicks M., Evans K. M., Gershater M. C., Puschmann H., Steel P. G., Edwards R. The C-Glycosylation of Flavonoids in Cereals. 2009. *J Biol Chem.* 284(27): 17926–17934.

Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications. 2005. *Diabetes.* (54): 1615–1625.

Brummer Y., Kaviani M., Tosh S. M. Structural and functional characteristics of dietary fibre in beans, lentils, peas and chickpeas. 2015. *Food Research International*

Burkitt D. P., Trowell H.C. Dietary fiber and western diseases. 1977. *Ir Med J.* (70): 272-277.

Butz P., Edenharder R., Fernandez Garcia A., Fister H., Merkel C., Tauscher B. Changes in functional properties of vegetables induced by high pressure treatment. 2002. *Food Res Int.* (35):295- 300.

Campbell A. J., Robertson M. C., Gardner M. M., Norton R. N., Tilyard M. W., Buchner D. M. Randomised controlled trial of a general practice programme of home based exercise to prevent falls in elderly women. 1997. *BMJ*. 315(7115):1065-9.

Capanoglu E., Beekwilder J., Boyacioglu D., De Vos R., Hall R. D. The Effect of Industrial Food Processing on Potentially Health-Beneficial Tomato Antioxidants. 2010. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 50:919–930.

Cardador-Martínez A., Maya-Ocaña K., Ortiz-Moreno A., Herrera-Cabrera B.E., Dávila-Ortiz G., Múzquiz M., Martín-Pedrosa M., Burbano C., Cuadrado C., Jiménez-Martínez, C. Effect of Roasting and Boiling on the Content of Vicine, Convicine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine in *Vicia faba* L. 2012. *Journal of Food Quality*. (35): 419–428.

Carnovale E., Marletta L., Cappelloni M. Caratteristiche nutrizionali e tecnologiche del cece. 1987. *Terra e sole*. (534): 149-151.

Cermak R., Landgraf S., Wolffram S. Quercetin glucosides inhibit glucose uptake into brushborder-membrane vesicles of porcine jejunum. *Br. J. Nutr.* 2004. 91: 849–855.

Champ M. M-J. Non-nutrient bioactive substances of pulses. 2002. *Br J Nutr.* (88): 307-319.

Chevolleau S., Gasc N., Rollin P., Tulliez J. Enzymatic chemical and thermal breakdown of H-labeled glucobrassicin, the parent indole glucosinolate. 1997. *J Agr Food Chem.* (45):4290-8.

Cheynier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. 2005. *Am J Clin Nutr.* (81): 223-229.

Chillo S., Monro J. A., Mishra S., Henry C.J. Effect of incorporating legume flour into semolina spaghetti on its cooking quality and glycaemic impact measured in vitro. 2010. *Int J Food Sci Nutr.* 61(2):149-60.

Chiu C. J., Liu S., Willet W. C., Wolever T., Brand-Miller J., Barclay A. W., Taylor A. Informing food choices and health outcomes by use of the dietary glycemic index. 2011. *Nutrition Reviews*, Vol.69(4): 231-242.

Clifford M.N. Chlorogenic acids and other cinnammates-nature, occurrence dietary burden, absorption and metabolism. 2000. *J Sci Food Agric.* (80): 1033-43.

Coward L., Smith M., Kirk M., Barnes S. Chemical modification of isoflavones in soy foods during cooking and processing. 1998. *Am J Clin Nutr.* (68): 1486-91.

Crépon K., Marget P., Peyronnet C., Carrouée B., Arese P., Duc G. Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. 2010. *Field Crops Research.* (115): 329–339.

Crozier A., Jaganath I. B., Clifford M. N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. 2009. *Natural Product Reports.* (26): 1001–1043.

Crozier A., Lean M. E. J., McDonald M. S., Black C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. 1997. *J Agric Food Chem.* (45) :590-5.

Crujeiras A. B., Parra D., Abete I. A hypocaloric diet enriched in legumes specifically mitigates lipid peroxidation in obese subjects. 2007. *Free Radical Research.* (41):498-506.

Daglia M., Di Lorenzo A., Nabavi F. S., Talas Z., Nabavi S. Polyphenols: Well Beyond The Antioxidant Capacity: Gallic Acid and Related Compounds as Neuroprotective Agents: You are What You Eat!. 2014. *Current Pharmaceutical Biotechnology.* 15(4): pp. 362-372(11).

D'Archivio M., Filesi C., Vari R., Scazzocchio B., Masella R. Bioavailability of the polyphenols: Status and controversies. 2010. *International Journal of Molecular Sciences.* (11):1321–1342.

De Fronzo R. A. Banting lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. 2009. *Diabetes.* 58(4):773e95.

De Fronzo R. A. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. 2010. *Diabetologia.* 53(7):1270e87.

De Rougemont A., Normand S., Nazare J. A., Skilton M. R., Sothier M., Vinoy S., Laville M. Beneficial effects of a 5-week low-glycemic-index regimen on weight control and cardiovascular risk factors in overweight non-diabetic subjects. 2007. *Br J Nutr.* 98: 1288-1298.

Del Rio D., Rodriguez-Mateos A., Spencer J.P., Tognolini M., Borges G., Crozier A. Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. 2013. *Antioxid. Redox Signal.* (18):1818–1892.

Dewick P.M. The mevalonate and deoxyxylulose phosphate pathways: terpenoids and steroids. 2001. *Medicinal Natural Products: a Biosynthetic Approach.* *Nat. Prod. Rep.* (16): 97-130.

Di Castelnuovo A., Di Giuseppe R., Iacoviello L. Consumption of cocoa, tea and coffee and risk of cardiovascular disease. 2012. *Eur J Intern Med.* 23 (1): 15-25.

Dikeman C. L., Fahey G. C. Viscosity as related to dietary fiber: a review. 2006. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 46 (8): 649-63.

Dilis V., Trichopoulou A. Nutritional and health properties of pulses. 2009. *Mediterr J Nutr Metab.* (1): 149.157.

Dillard C. J., German J. B. Phytochemicals: nutraceuticals and human health. 2000. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* (80): 1744–1756.

Erlund I., Koli R., Alfthan G., Marniemi J., Puukka P., Mustonen P., Mattila P., Jula A. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. 2008. *Am J Clin Nutr.* (87): 323-331.

Esfahani A., Wong J. M., Mirrahimi A., Srichaikul K., Jenkins D. J., Kendall C. W. The glycemic index: physiological significance. 2009. *J Am Coll Nutr. Suppl:*439S-445S.

Fajcsak Z., Gabor A., Kovacs V., Martos E. The Effects of 6-Week Low Glycemic Load Diet Based on Low Glycemic Index Foods in Overweight/Obese Children- Pilot Study. 2008. *Journal of American College of Nutrition.* (27): 12-21.

Fernandez-Marin B., Milla R., Martín-Robles N., Arc E. Kranner I., Becerril J.M., García-Plazaola J.I. Side-effects of domestication: cultivated legume seeds contain

similar tocopherols and fatty acids but less carotenoids than their wild counterparts. 2014. *Biomed Central Plant Biology*. (20): 1599.

Ferretti G., Turco I., Bacchetti T. Apple as a source of dietary phytonutrients: Bioavailability and evidence of protective effects against human cardiovascular disease. 2014. *Food and Nutrition Sciences*. 5: 1234–1246.

Ford E. S., Liu S. Glycemic index and serum high-density lipoprotein cholesterol concentration among US adults. 2001. *Arch Intern Med*; 161: 572-576, 2001.

Foster-Powell K., Holt S. H. A., Brand-Miller J. International table of glycemic index and glycemic load values. 2002. *Am J Clin Nutr*. 76: 5-56.

Franceschi S., Dal M. L., Augustin L. Dietary glycemic load and colorectal cancer risk. 2001. *Ann Oncol*. 12: 173- 8.

Frost G., Leeds A. A., Dore C. J., Madeiros S., Brading S., Dornhorst A. Glycemic index as a determinant of serum HDL-cholesterol concentration. 1999. *Lancet*. 353: 1045-1048.

Gil-Izquierdo A., Gil M. I., Ferreres F. Effect of Processing Techniques at Industrial Scale on Orange Juice Antioxidant and Beneficial Health Compounds. 2002. *J. Agric. Food Chem*. 50 (18): 5107–5114.

Giorgio M., Trinei M., Migliaccio E., Pelicci P. G. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? 2007. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 8(9):722-8.

Giusti F., Caprioli G., Ricciutelli M., Vittori S., Sagratini G. Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. 2017. *Food Chemistry*. (221): 689-697.

Gnagnarella P., Gandini S., La Vecchia C., Maisonneuve P. Glycemic index, glycemic load and cancer risk: a meta-analysis. 2008. *Am J Clin Nutr*; 87: 1793-1801.

Goni I., Garcia A., Alonso A. G., Saura-Calixto. A starch hydrolysis procedure to estimate glycemic index. 2007. *Nutrition research*. (17): 427-437.

Graf B. A., Milbury P. E., Blumberg J. B. Flavonols, flavonones, flavanones and human health: Epidemiological evidence. 2005. *J Med Food*. (8):281–290.

Greffeuille V., Marsset-Baglieri A., Molinari N., Cassan D., Sutra T., Antoine Avignon A., V. Enrichment of pasta with faba bean does not impact glycaemic or insulin response but can enhance satiety feeling and digestive comfort when dried at very high temperature. 2015. *Food and function*. 6(9):2996-3005.

Guerrero R. F., García-Parrilla M. C., Puertas B., Cantos-Villar E. Wine, resveratrol and health: a review. 2009. *Nat Prod Commun*. 4(5):635-58.

Guéguen J., Cerletti P. Proteins of some legume seeds, soybean, pea, faba bean and lupin. 1994. In: Hudson B.J.F., editor. *New and developing sources of food proteins*. New York: Chapman and Hall. p. 145.

Hakimuddin F., Tiwari K., Paliyath G., Meckling K. Grape and wine polyphenols down-regulate the expression of signal transduction genes and inhibit the growth of estrogen receptor-negative MDA-MB231 tumors in nu/nu mouse xenografts. 2008. *Nutr Res*. 28(10):702-13.

Halton T. L., Willet W. C., Liu S. Low-carbohydrate diet score and the risk of coronary heart disease in women. 2006. *N Engl J Med*. 355: 1991-2002.

Han I.H., Baik B.K. Oligosaccharide content and composition of legumes and their reduction by soaking, cooking, ultrasound and high hydrostatic pressure. 2006. *Cereal Chem* (83):428-433.

Hanamura T., Mayama C., Aoki H., Hirayama Y., Shimizu M. Antihyperglycemic effect of polyphenols from Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruit. 2006. *Biosci Biotechnol Biochem*. 70(8):1813-20.

Hanhineva K., Törrönen R., Bondia-Pons I., Pekkinen J., Kolehmainen M., Mykkänen H., Poutanen K. Impact of Dietary Polyphenols on Carbohydrate Metabolism. 2010. *Int J Mol Sci*. 11(4): 1365–1402.

Hart J. J., Tako E., Kochian L.V., Glahn R.P. Identification of Black Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Polyphenols That Inhibit and Promote Iron Uptake by Caco-2 Cells. 2015. *Journal Agriculture Food Chemistry*. (63):5950-5956.

He D., Shan Y., Wu Y., Liu G., Chen B. Simultaneous determination of flavanones, hydroxycinnamic acids and alkaloids in citrus fruits by HPLC-DAD-ESI/MS. 2011. *Food Chemistry*. 127:880-885.

Hefni M. E., Shalaby M.T., Witthöft C. M. Folate content in faba beans (*Vicia faba* L.)-effects of cultivar, maturity stage, industrial processing, and bioprocessing. 2015. *Food Science Nutrition*. (3): 65-73.

Hendrich S. Bioavailability of isoflavones. 2002. *J Chromatogr B*. (707):203-10.

Hodge A. M., English D. R., O’Dea K., Giles G. G. Glycemic index and dietary fiber and the risk of type 2 diabetes. 2004. *Diabetes Care*; 27: 2701-2706.

Hollman P.C., Katan M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. 1999. *Food Chem Toxic*. (37): 937-42.

Horbowicz M., Kosson R., Grzesiuk A., Dbski H. Anthocyanins of fruits and vegetables – Their occurrence, analysis and role in human nutrition. 2008. *Vegetable crops research*. (68): 5-22.

Hosseinpour-Niazi S., Mirmiran P., Fallah-ghohroudi A., Azizi F. Combined effect of unsaturated fatty acids and saturated fatty acids on the metabolic syndrome: Tehran lipid and glucose study. 2015. *J Health Popul Nutr*. 11;33:5.

Hurrell R.F. Inhibition of non-haem iron absorption in man by polyphenolic-containing beverages. 1999. *British J Nutr*. (81): 289-95.

Ishikawa A., Yamashita H., Hiemori M., Inagaki E., Kimoto M., Okamoto M., Tsuji H., Memon A. N., Mohammadio A., Natori Y. Characterization of inhibitors of postprandial hyperglycemia from the leaves of *Nerium indicum*. 2007. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*. 53: 166–173.

Jenkins D. J., Wolever T. M., Taylor R. H., Barker H., Fielden H., Baldwin J. M., Bowling A. C., Newman H. C., Jenkins A. L., Goff D.V. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange. 1981. *Am J Clin Nutr*. 34(3):362-6.

Johnston K., Sharp P., Clifford M., Morgan L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. 2005. *FEBS Lett*. 579: 1653–1657.

Johnston K. L., Clifford M. N., Morgan L. M. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: Glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. 2003. *Am. J. Clin. Nutr.* 78: 728–733.

Jong-Sang K., Chong-Suk K., Kun Ho S. Inhibition of Alpha-glucosidase and Amylase by Luteolin, a Flavonoid. 2000. *FOOD & NUTRITION SCIENCE NOTES*. 2000. (11): 2458-2461.

Jukanti A. K., Gaur P. M., Gowda C. L. L., Chibbar R. N. Nutritional Quality and Health Benefits of Chickpea (*Cicer Arietinum L.*): A Review. 2012. *British Journal of Nutrition*. (108): 11-26.

Kaufman P. B., Duke J. A., Brielmann H., Boik J., Hoyt J. E. A Comparative Survey of Leguminous Plants as Sources of the Isoflavones, Genistein and Daidzein: Implications for Human Nutrition and Health. 2007. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. (3): 7-12.

Kinoshita T., Lepp Z., Chuman H. Construction of a novel database for flavonoids. 2005. *J Med Invest*. (52): 291-2.

Kmiecik W., Lisiewska Z., Jaworska G. Vitamin C levels in fresh, frozen and canned broad beans in relation to their varieties and degree of maturity. 1990. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*. (41): 1-17.

Kobayashi Y., Suzuki M., Satsu H., Arai S., Hara Y., Suzuki K., Miyamoto Y., Shimizu M. Green tea polyphenols inhibit the sodium-dependent glucose transporter of intestinal epithelial cells by a competitive mechanism. 2000. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5618–5623.

Kris-Etherton P. M., Hecker K. D., Bonanome A., Coval S. M., Binkoski A. E., Hilpert K. F., Etherton T. D. Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. 2002. *Am. J. Med.* 113: 71–88.

Kühn H., Chan L. The role of 15-lipoxygenase in atherogenesis: pro- and antiatherogenic actions. 1997. *Curr Opin Lipidol*. (8): 111-7.

Kumar G. P., Khanum F. Neuroprotective potential of phytochemicals. 2012. *Pharmacognosy*. (6): 81-90.

Kumar G. P., Baojun X. Polyphenol-Rich Lentils and Their Health Promoting Effects. 2017. *International Journal of Molecular Sciences*. 18: 2390.

Kumar S., Pandey A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. 2013. *The Scientific World Journal*. Vol. 2013, Article ID 162750.

Kushi L.H., Meyer K. M., Jacobs D.R. Cereals, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. 1999. *Am J Clin Nutr*. (70): 451-458.

Larsen T. M., Dalskov S. M., van Baak M., Jebb S. A., Papadaki A., Pfeiffer A. F. H., Martinez J. A., Handjieva-Darlenska T., Kunešová T., Pihlsgård M., Stender S., Holst C., Saris W., Astrup A. Diets with High or Low Protein Content and Glycemic Index for Weight-Loss Maintenance. 2010. *N Engl J Med*. 363:2102-2113.

Lavin J. H., Read N. W. The effect of hunger and satiety of slowing the absorption of glucose: relationship with gastric emptying and post-prandial blood glucose and insulin responses. 1995. *Appetite*. 25(1): 89-96.

Lee J. M., Kwon H., Jeong H., Lee J. W., Lee S. Y., Baek S. J., Surh Y. J. Inhibition of lipid peroxidation and oxidative DNA damage by *Ganoderma lucidum*. 2001. *Phytotherapy Research*. (15) 245–249.

Levitan E. B., Mittleman M. A., Hakansson N., Wolk A. Dietary glycemic index, dietary glycemic load and cardiovascular disease in middle-aged and older Swedish men. 2007. *Am J Clin Nutr*. 85: 1521-1526.

Lewandowska U., Szewczyk K., Hrabec E., Janecka A., Gorlach S. Overview of metabolism and bioavailability enhancement of polyphenols. 2013. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (61): 12183–12199.

Li J. M., Che C. T., Lau C. B., Leung P. S., Cheng C. H. Inhibition of intestinal and renal Na⁺- glucose cotransporter by naringenin. 2006. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 38: 985–995.

Li M., Liu Y. Topoisomerase I in human disease pathogenesis and treatments. 2016. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 14:166–171.

Liu R. H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. 2003. *American Journal Clinical Nutrition*. (78):517-520.

Liu S., Willet W., Stampfer M. A prospective study of dietary glycemic load, carbohydrate intake and risk of coronary heart disease in US women. 2000. *Am J Clin Nutr*. 71: 1455-61.

Liu-Smith F., Meyskens F. L. Molecular mechanisms of flavonoids in melanin synthesis and the potential for the prevention and treatment of melanoma. 2016. *Molecular Nutrition and Food Research*. 60:1264–1274.

Livesey G., Taylor R., Hulshof T., Howlett J. Glycemic response and health- a systematic review and meta-analysis: relations between dietary glycemic properties and health outcomes. 2008. *Am J Clin Nutr*. 87: 258S-268S.

Liyana-Pathirana C.M., Shaidi F. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. 2006. *J Agric Food Chem*. 22;54(4):1256-64.

Llorent-Martínez E. J., Zengin G., Fernández-de Córdova M.L., Bender O., Atalay A., Ceylan R., Mollica A., Mocan A., Uysal S., Guler G. O., Aktumsek A. Traditionally Used Lathyrus Species: Phytochemical Composition, Antioxidant Activity, Enzyme Inhibitory Properties, Cytotoxic Effects, and in silico Studies of *L. czeczottianus* and *L. nissolia*. 2017. *Front Pharmacol*. (27): 8:83.

Lloyd-Jones D., Adams R., Carnethon M. Heart disease and stroke statistics-2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. 2009. *Circulation*. 119: e21-e181.

Luo Y., Xie W. Effect of soaking and sprouting on iron and zinc availability in green and white faba bean (*Vicia faba* L.). 2014. *Journal Food Science Technology*, (51): 3970–3976.

Luo Y., Xie W., Jin X., Tao B., Chen Q., Zhu W. Impact of sprouting pretreatment on phytic acid and polyphenol level of faba bean (*Vicia faba* L.) flour. 2013. *International Food Research Journal*. (20): 1133-1137.

Luzzatto L., Arese P. Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. 2018. *N Engl J Med.* 378(1):60-71.

Luzzatto L., Seneca E. G6PD deficiency: a classic example of pharmacogenetics with on-going clinical implications. 2014. *Br J Haematol.* 164(4): 469–480.

Madar Z., Stark A. H. New legume sources as therapeutic agents. *British Journal Nutrition.* 2002. (88): 287-292.

Magalhaes L. M., Segundo M. A., Reis S., Lima J. L. F. C. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. 2008. *Analytica Chimica Acta;* (613): 1-19.

Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. 2004. *Am J Clin Nutr.* (79): 727–747.

Marella S. Flavonoids-The Most Potent Poly-phenols as Antidiabetic Agents: An Overview. 2017. *Mod Appro Drug Des.* <http://www.crimsonpublishers.com>.

Mariangeli C. P., Kassis A. N., Jones P. J. Glycemic responses and sensory characteristics of whole yellow pea flour added to novel functional foods. 2009. *J Food Sci.* 74(9): 385-9.

Marín L., Miguélez E. M., Villar C. J., Lombó F. Bioavailability of Dietary Polyphenols and Gut Microbiota Metabolism: Antimicrobial Properties. 2015. *Bio Med Research International.* Vol. 2015. Article ID 905215.

Marnett L. J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. 1999. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 424 (1-2):83-95.

Martínez-Tomé M., Murcia M.A., Frega N., Ruggieri S., Jiménez A.M., Roses F., Parras P. Evaluation of antioxidant capacity of cereal brans. 2004. *J Agric Food Chem.* 28;52(15):4690-9.

Mastore M., Kohler L., Nappi A. J. Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidations of DOPA and dopamine. 2005. *The FEBS J.* (272): 2407-2417.

Mateo Anson N., Aura A. M., Selinheimo E., Mattila I., Poutanen K., van den Berg R., Havenaar R., Bast A., Haenen G. R. Bioprocessing of wheat bran in whole wheat bread increases the bioavailability of phenolic acids in men and exerts antiinflammatory effects ex vivo. 2011. *J Nutr.* 2011. 141(1):137-43.

Mayer J. Glucostatic mechanism of the regulation of food intake. 1953. *New England Journal of Medicine*; 249: 13-16.

Mazur W. M., Duke J. , Wähälä K., Rasku S., Herman Adlercreutz H. Isoflavonoids and Lignans in Legumes: Nutritional and Health Aspects in Humans. 1998. *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 9 (4): 193-200.

McCrory M. A., Hamaker B.R., Lovejoy J.C., Eichelsdoerfer P.E. Pulse consumption, satiety, and weight management. 2010. *Adv. Nutr. Int. Rev. J.* 1:17–30.

McDougall G. J., Kulkarni N. N., Stewart D. Current developments on the inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. 2008. *Biofactors.* 34(1):73-80.

Medina-Remón A., Estruch R., Tresserra-Rimbau A., Vallverdu-Queralt A., Lamuela-Raventos R. M. The effect of polyphenol consumption on blood pressure. 2013. *Mini Rev Med Chem.* (13): 1137-1149.

Mehran S.M., Golshani B. Simultaneous Determination of Levodopa and Carbidopa from Fava Bean, Green Peas and Green Beans by High Performance Liquid Gas Chromatography. 2013. *Journal Clinical Diagnosis Research.* (7): 1004–1007.

Meyer K. A., Kushi L. H., Jacobs D. R. Jr, Slavin J., Sellers T. A., Folsom A. R. Carbohydrates, dietary fiber and incident type 2 diabetes in older women. 2000. *Am J Clin Nutr.* 71: 921-930.

Michaud D. S., Liu S., Giovannucci E., Willet W. C., Colditz G. A., Fuchs C. S. Dietary sugar, glycemic load and pancreatic cancer risk in a prospective study. 2002. *J Natl Cancer Inst.* 94: 1293-1300.

Milbury P. E., Cao G. C., Prior R. L. Blumberg J. Bioavailability of elderberry anthocyanins. 2002. *Mechanism Ageing Develop.* (123): 997-1006.

Mollard R., Zykus A., Luhovyy B., Nunez M., Wong C., Anderson G. The acute effects of a pulse-containing meal on glycaemic responses and measures of satiety and satiation within and at a later meal. 2012. *Br. J. Nutr.* 108: 509–517.

Mulholland H. G., Murray L. J., Cardwell C. R., Cantwell M. M. Dietary glycemic index, glycemic load and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. 2008. *Br J Cancer*; 99: 1170-1175.

Nagao T., Komine Y., Soga S. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. 2005. *Am J Clin Nutr.* 81 (1): 122-9.

Becerra-Tomás N., Díaz-López A., Rosique-Esteban N., Ros E., Buil-Cosiales P., Corella D., Estruch R., Fitó M., Serra-Majem L., Arós F., Lamuela-Raventós R. M., Fiol M., Santos-Lozano J. M., Díez-Espino J., Portoles O., Salas-Salvadó J. Legume consumption is inversely associated with type 2 diabetes incidence in adults: A prospective assessment from the PREDIMED study. 2017. *Clinical Nutrition.* S0261-5614(17)30106-1.

Ness A. R., Powles J. W. Fruit and vegetables, and cardiovascular disease: A review. 1997. *International Journal of Epidemiology* (26): 1-13.

Nuttall F. Q., Mooradian A. D., Gannon M. C., Billington C., Krezowski P. Effect of protein ingestion on the glucose and insulin response to a standardized oral glucose load. 1984. *Diabetes Care.* 7: 465-70.

Okada Y., Okada M. Effects of methanolic extracts from edible plants on endogenous secretory receptor for advanced glycation end products induced by the high glucose incubation in human endothelial cells. 2015. *Journal of Pharmacy and Bio Allied Sciences.* 7: 145–150

Osorio-Díaz P., Agama-Acevedo E., Mendoza-Vinalay M., Tovar J., Bello-Perez L. A. Pasta added with chickpea flour: chemical composition, in vitro starch digestibility and predicted glycemic index. 2008. *Ciencia y Tecnología Alimentaria.* Volume 6 : Issue 1: 6-12.

Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview. 2016. *J Nutr Sci.* 5: e47.

Perez-Jimenez J., Saura C. Fulgenzio C. Literature Data May Underestimate the Actual Antioxidant Capacity of Cereals. 2005. *J. Agric. Food Chem.* (53): 5036-5040.

Petrussa E., Braidot E., Zancani M., Peresson C., Bertolini A., Patui S., Vianello A. Plant Flavonoids—Biosynthesis, Transport and Involvement in Stress Responses. 2013. *Int J Mol Sci.* 14(7): 14950–14973.

Pinto M., Robine-Leon S., Appay M., Kedinger M., Triadou N., Dussaulx E., Lacroix B., Simon-Assmann P., Haffen K., Fogh J., Zweibaum A. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. 1983. *Biol Cell.* 47:323–330.

Pittaway J. K., Ahuja K. D. K., Robertson I. K. Effects of a controlled diet supplemented with chickpea on serum lipids, glucose tolerance, satiety and bowel function. 2007. *J Am Coll Nut.* (26): 334-340.

Poitout V., Robertson R. P. Glucolipotoxicity: fuel excess and betacell dysfunction. 2008. *Endocr Rev.* 29(3):351e66.

Pradhan A. D., Manson J. E., Rifai N., Buring J. E., Ridker P. M. C-reactive protein, interleukin 6 and risk of developing type 2 diabetes mellitus. 2001. *JAMA*; 286: 327-334.

Pritchard P. J., Dryburgh E. A., Wilson B. J. Carbohydrates of spring and winter field beans. (*Vicia faba* L.). 1973. *Journal Science Food Agriculture.* (24): 663–668.

Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Pouységu L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. 2011. *Angew Chem Int Ed Engl.* 50(3):586-621.

Rabey J. M., Vered Y., Shabtai H., Graff E., Harsat A., Korczyn A.D. Broad bean (*Vicia faba*) consumption and Parkinson's disease. 1993. *Advances in Neurology.*, (60): 681-684.

Radulian G., Rusu E., Dragomir A., Posea M. Metabolic effects of low glycaemic index diets. 2009. *Nutr J.* 8: 5.

Ray K. S., Singhania P. R. Glycemic and insulinemic responses to carbohydrate rich whole foods. 2014. *J Food Sci Technol.* 51(2): 347–352.

Ridker P. M., Hennekens C. H., Buring J. E., Rifai N. *C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women*. 2000. *N Engl J Med*. 342: 836-843.

Rincón F., Martínez B., Ibáñez M. V. Proximate composition and antinutritive substances in chickpea (*Cicer arietinum* L.) as affected by the biotype factor. 1998. *J Sci Food Agric* (78): 382-388.

Rizkalla S. W., Bellisle F., Slama G. Health benefits of low glycaemic index foods, such as pulses, in diabetic patients and healthy individuals. 2002. *Br J Nutr*. 88 Suppl 3:255-62.

Rochfort S., Panozzo J. Phytochemicals for health, the role of pulses. 2007. *Journal Agriculture. Food Chemistry*. (55):7981-7994.

Rowland I. Optimal nutrition: fibre and phytochemicals. 1999. *Proc Nutr Soc*. 58:415-9.

Russell W. R., Labat A., Scobbie L., Duncan G. J., Duthie G. G. Phenolic acid content of fruits commonly consumed and locally produced in Scotland. 2009. *Food Chemistry*. 115 (1):100-104.

Sae-tan S., Grove K. A., Lambert J. D. Weight control and prevention of metabolic syndrome by green tea". 2011. *Pharmacol Res*. 64 (2): 146-54.

Salmeron J., Ascherio A., Rimm E., Colditz G. A., Spiegelman D., Jenkins D.J., Stampfer M. J., Wing A. L., Willett W. C. Dietary fiber, glycemic load and risk of NIDDM in men. 1997. *Diabetes Care*; 20: 545-50.

Sánchez-Moreno C., Plaza L., Elez-Martínez P., De Ancos B., Martín-Belloso O., Cano M. P. Impact of High Pressure and Pulsed Electric Fields on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Orange Juice in Comparison with Traditional Thermal Processing. 2005. *J. Agric. Food Chem*. (53): 4403–4409.

Sandberg A. S. Bioavailability of minerals in legumes. 2002. *British Journal of Nutrition*. 88:281-285.

Sarmiento A., Barros L., Fernandes A., Carvalho A. M., Ferreira I. CFR. Valorization of traditional foods: nutritional and bioactive properties of *Cicer arietinum* L. and *Lathyrus sativus* L. pulses. 2015. Journal of the Science of food and agriculture. 95: 179–185.

Sacks F. M., Carey V. J., Anderson C. A. M., Miller E. R., Copeland T., Charleston J., Harshfield B. J., Laranjo N., McCarron P., Swain J., White K., Yee K., Appel L. J. Effects of High vs Low Glycemic Index of Dietary Carbohydrate on Cardiovascular Disease Risk Factors and Insulin Sensitivity. 2014. JAMA. 312(23): 2531–2541.

Scalbert A., Manach C., Morand C., Remesy C. Dietary polyphenols and the prevention of diseases. 2005. Crit Rev Food Sci Nutr. 45:287–306.

Scalbert A., Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. 2000. J Nutr. 130:2073-85.

Scazzina F., Dall'Asta M., Pellegrini N., Brighenti F. Glycaemic index of some commercial gluten-free foods. 2015. Eur J Nutr. 54(6):1021-6.

Scazzina F., Dall'Asta M., Casiraghi M. C., Sieri S., Del Rio D., Pellegrini N., Brighenti F. Glycemic index and glycemic load of commercial Italian foods. 2016. Nutr Metab Cardiovasc Dis. 26(5):419-29.

Scazzina F., Dei Cas A., Del Rio D., Brighenti F., Bonadonna R. C. The β -cell burden index of food: A proposal. 2016. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases. 26(10):872-8.

Schroeter H., Heiss C., Spencer J. P. E., Keen C. L., Lupton J. R., Schmitz H. Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: Current knowledge and future needs. 2010, 31:546-557.

Schulze M. B., Liu S., Rimm E. B., Manson J. E., Willet W., Hu F. B. Glycemic index, glycemic load and dietary fiber intake and incidence of type 2 diabetes in younger and middle-aged women. 2004. Am J Clin Nutr; 80: 348-356.

Setchell K. D., Brown N. M., Lydeking-Olsen E. The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. 2002. J Nutr. 132:3577-84.

Shetty P., Atallah, M.T., Shetty K. Enhancement of total phenolic, L-Dopa and proline contents in germinating fava bean (*Vicia faba*) in response to bacterial elicitors. 2001. *Food Biotechnology*. (15): 47-67.

Shu Wang, Naima Moustaid-Moussa, Lixia Chen, Huanbiao Mo, Anuradha Shastri, Rui Su, Priyanka Bapat, In Sook Kwun, Chwan-Li Shen. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. 2014. *J Nutr Biochem*. 25: 1–18.

Siah S., Wood J. A., Agboola S., Konczak I., Blanchard C. L. Effects of soaking, boiling and autoclaving on the phenolic contents and antioxidant activities of faba beans (*Vicia faba* L.) differing in seed coat colours. 2014. *Food Chemistry*. 142:461–468.

Siah S., Konczak I., Wood J. A., Agboola S., Blanchard C. L. Effects of roasting on phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of Australian grown faba beans (*Vicia faba* L.). 2014. *Plant Foods Human Nutrition*. 69: 85-91.

Siah S. D., Konczak I., Agboola S., Wood J. A., Blanchard C. L. In vitro investigations of the potential health benefits of Australian-grown faba beans (*Vicia faba* L.): chemopreventative capacity and inhibitory effects on the angiotensin-converting enzyme, α -glucosidase and lipase. *British Journal of Nutrition*. 2012. (108):123–134.

Sieri S., Krogh V., Berrino F. Dietary glycemic load and index and risk of coronary heart disease in a large Italian cohort: the EPICOR study. 2010. *Arch Intern Med*; 170: 640-647.

Sies H. Polyphenols and health: update and perspectives. 2010. *Arch Biochem Biophys*. (501): 2-5.

Sievenpiper J. L., Kendall C. W., Esfahani A., Wong J. M., Carleton A. J., Jiang H. Y., Bazinet R. P., Vidgen E., Jenkins D. J. Effect of non-oil-seed pulses on glycemic control: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled experimental trials in people with and without diabetes. 2009. *Diabetologia*. 52: 1479-1495.

Sindu S. N., Vaibhavi K., Anshu M. In vitro studies on alpha amylase and alpha glucosidase inhibitory activities of selected plant extracts. 2013. *European Journal of Experimental Biology*. 3(1): 128-132.

Singh B., Singh J.P., Shevkani K., Singh N., Kaur A. Bioactive constituents in pulses and their health benefits. 2017. *J. Food Sci. Technol*. 54 (4): 858–870.

Singh U., Subrahmanyam N., Kumar J. Cooking quality and nutritional attributes of some newly developed cultivars of chickpea (*Cicer arietinum*). 1991. *J Sci Food Agric* 55:37–46.

Singleton V. L., Rossi J. A. J. Colorimetry of total phenolic with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. 1965. *American Journal of Enology and Viticulture*. (16) 3: 144- 158.

Slimestad R., Fossen T., Vågen I. M. Onions: a source of unique dietary flavonoids. 2007. *J Agric Food Chem*. 55(25):10067-80.

Sloth B., Krog-Mikkelsen I., Flint A., Tetens I., Björck I., Vinoy S., Elmståhl H., Astrup A., Lang V., Raben A. No difference in body weight decrease between a low-glycemic-index and a high-glycemic-index diet but reduced LDL cholesterol after 10-wk ad libitum intake of the low-glycemic-index diet. 2004. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(2):337–347.

Smirnova L. P., Pervykh L. N. Quantitative determination of the total content of flavonoids in the flowers of immortelle *Helichrysum arenarium*. 1998. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. (32) 6: 35-38.

Song J., Kwon O., Chen S., Daruwala R., Eck P., Park J. B., Levine M. Flavonoid inhibition of sodium-dependent vitamin C transporter 1 (SVCT1) and glucose transporter isoform 2 (GLUT2), intestinal transporters for vitamin C and Glucose. 2002. *J. Biol. Chem*. 277:15252–15260.

Souto A.H.A., Carneiro M.C., Seferin M., Senna M.J.H., Conz A., Gobbi K. Determination of trans-Resveratrol Concentrations in Brazilian Red Wines by HPLC. 2001. *Journal of food composition and analysis*. 14: 441-445.

Spanou C., Stagos D., Tousias L., Angelis A., Aligiannis N., Skaltsounis A. L., Kouretas D. Assessment of antioxidant activity of extracts from unique Greek varieties of Leguminosae plants using in vitro assays. *Anticancer Research*. 2007. (27): 3403–3410.

Spanou C., Veskoukis A. S., Kerasioti T., Kontou M., Angelis A., Aligiannis N., Skaltsounis A. L., Kouretas D. Flavonoid Glycosides Isolated from Unique Legume Plant Extracts as Novel Inhibitors of Xanthine Oxidase. 2012. Plos one. 7, 3.

Stratton I. M., Adler A. I., Neil H. A., Matthews D. R., Manley S. E., Cull C. A., Hadden D., Turner R. C., Holman R. R. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complication of type 2 diabetes: prospective observational study. 2000. BMJ. 321: 405-412.

Tako E., Reed S., Anandaraman A., Beebe S. E., Hart J.J., Glahn R.P. Studies of Cream Seeded Carioca Beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from a Rwandan Efficacy Trial: In Vitro and In Vivo Screening Tools Reflect Human Studies and Predict Beneficial Results from Iron Biofortified Beans. 2015. PLoS One. (10): 138479.

Tamburino R., Guida V., Pacifico S., Rocco M., Zarelli A., Parente A., Di Maro A. Nutritional values and radical scavenging capacities of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) seeds in Valle Agricola district, Italy. 2012. AJCS 6(1):149-156.

Tanaka S., Han L. K., Zheng Y. N., Okuda H. Effects of the flavonoid fraction from Ginkgo biloba extract on the postprandial blood glucose elevation in rats. 2004. Yakugaku Zasshi. 124: 605–611.

Tarek A. El-Adawy. Nutritional composition and antinutritional factors of chickpeas (*Cicer arietinum* L.) undergoing different cooking methods and germination. 2002. Plant foods for Human Nutrition. 57: 83-97.

Thom E. The effect of chlorogenic acid enriched coffee on glucose absorption in healthy volunteers and its effect on body mass when used long-term in overweight and obese people. 2007. J. Int. Med. Res.35: 900–908.

Thomas D., Elliott E. J. Low glycemic index or low glycemic load diets for diabetes mellitus. 2009. Cochrane Database Syst Rev CD006296.

Torronen R., Sarkkinen E., Tapola N., Hautaniemi E., Kilpi K., Niskanen L. Berries modify the postprandial plasma glucose response to sucrose in healthy subjects. 2009. Br. J. Nutr. E-pub ahead of a print.

Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*. 2010. (12):1231-46.

Turco I., Bacchetti T., Bender C., Oboh G., Zimmermann B., Ferretti G. Polyphenol content and glycemic load of pasta enriched with Faba bean flour. 2016. *Functional Foods in Health and Disease* 6(5): 291-305.

Turco I., Bacchetti T., Ferretti G. Review of the health benefits of Faba beans (*Vicia faba* L.) polyphenols. 2016. *Journal of Food and Nutrition Research*. 4: 283–293.

Van Dam R. M., Visscher A.W., Feskens E. J., Verhoef P., Kromhout D. Dietary glycemic index in relation to metabolic risk factors and incidence of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. 2000. *Eur J Clin Nutr*. 54: 726-731.

Van Der Maesen L. J. G. Origin, history and taxonomy of chickpea. 1987. *The chickpea*, edited by M. C. Saxena and K. B. Singh. 11-34.

Van Dijk A. E., Olthof M. R., Meeuse J. C., Seebus E., Heine R. J., van Dam R.M. Acute effects of decaffeinated coffee and the major coffee components chlorogenic acid and trigonelline on glucose tolerance. 2009. *Diabetes Care*. 32, 1023–102.

Veitch N. C., Grayer R. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. 2004. *Natural Product Reports*. 21:539–573.

Velderrain-Rodríguez G., Palafox-Carlos H., Wall-Medrano A., Ayala-zavala J., Chen C.O., Robles-Sánchez M. Phenolic compounds: their journey after intake. 2014. *Food Funct*. 5(2):189-97.

Viña J., Gimeno A., Sastre J., Desco C., Asensi M., Pallardó F.V., Cuesta A., Ferrero J.A., Terada L. S., Repine J.E. Mechanism of free radical production in exhaustive exercise in humans and rats; role of xanthine oxidase and protection by allopurinol. 2000. *IUBMB Life*. 49(6): 539-44.

Visuthranukul C., Sirimongkol P., Prachansuwan A., Pruksananonda C., Chomtho S. Low-glycemic index diet may improve insulin sensitivity in obese children. 2015. *Pediatric Research*. 78:567-573.

Walle T. Absorption and metabolism of flavonoids. 2004. *Free Radic Biol Med* 36(7):829-37.

Wang S., Moustaid Moussa N., Lixia Chen L., Mo H., Shastri A., RuiSu R., Bapat P., Kwun I. S., Shen C. L.. Novel insights of dietary polyphenols and obesity. **2014.** *The Journal of Nutritional Biochemistry.* 25(1): 1-18.

Welch I. M. L., Bruce C., Hill S. E., Read N. W. Duodenal and ileal lipid suppresses postprandial blood glucose and insulin responses in man: possible implications for the dietary management of diabetes mellitus. 1987. *Clin Sci;* 72: 209-16.

Welsch C. A., Lachance P. A., Wasserman B. P. Dietary phenolic compounds: Inhibition of Na⁺ - dependent D-glucose uptake in rat intestinal brush border membrane vesicles. 1989. *J. Nutr.* 119: 1698–1704.

Dahl W. J., Foster L. M., Tyler R. T. Review of the health benefits of peas (*Pisum sativum* L.). 2012. *British Journal of Nutrition.* 108: 3-10.

Willet W., Manson J. A., Liu S. Glycemic index, glycemic load and risk of type 2 diabetes. 2002. *Am J Clin Nutr.* 76: 274S-280S.

Williamson G. The use of flavonoid aglycones in in vitro systems to test biological activities: based on bioavailability data is this a valid approach? 2002. *Phytochem Rev* (1):215-22.

Win M. T. T., Yamamoto Y., Munesue S., Saito H., Han D., Motoyoshi S., Kamal T., Ohara T., Watanabe T., Yamamoto H. Regulation of RAGE for attenuating progression of diabetic vascular complications. 2012. *Experimental Diabetes Research.*

Wolever M. S. T., Jenkins D. J. A. The use of the glycemic index in predicting the blood glucose response to mixed meals. 1986. *Am J Clin Nutr.* 43: 167-172.

Wolever T. M., Brand-Miller J. C., Abernethy J., Astrup A., Atkinson F., Axelsen M., Björck I., Brighenti F., Brown R., Brynes A., Casiraghi M. C., Cazaubiel M., Dahlqvist L., Delport E., Denyer G. S., Erba D., Frost G., Granfeldt Y., Hampton S., Hart V. A., Hätönen K. A., Henry C. J., Hertzler S., Hull S., Jerling J., Johnston K. L., Lightowler H., Mann N., Morgan L., Panlasigui L. N., Pelkman C., Perry T., Pfeiffer A. F., Pieters M., Ramdath D. D., Ramsingh R. T., Robert S. D., Robinson C., Sarkkinen E., Scazzina F., Sison D. C., Sloth B., Staniforth J., Tapola N., Valsta L. M., Verkooijen I., Weickert M. O., Weseler A. R., Wilkie P., Zhang J. Measuring the glycemic index of foods: interlaboratory study. 2008. *Am J Clin Nutr.* 87(1):247-257.

Wu G., Johnson SK., Bornman J.F., Bennett S.J., Fang Z. Changes in whole grain polyphenols and antioxidant activity of six sorghum genotypes under different irrigation treatments. 2017. *Food Chem.* 214:199-207.

Xiao J. B., Högger P. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: current insights and future perspectives. 2015. *Curr Med Chem.* 22(1):23-38.

Xu B. J., Han L. K., Zheng Y. N., Lee J. H., Sung C. K. In vitro inhibitory effect of triterpenoidal saponins from *Platycodi Radix* on pancreatic lipase. 2005. *Arch. Pharmacol. Res.* 28: 180–185.

Yang Y., Zhou L., Gu Y. Dietary chickpea reverse visceral adiposity, dyslipidaemia and insulin resistance in rats induced by a chronic high-fat diet. 2007. *Br J Nutr* 98, 720-726.

Yao F., Sun C., Chang S. K. Lentil polyphenol extract prevents angiotensin II-induced hypertension, vascular remodelling and perivascular fibrosis. 2012. *Food Funct.* 3(2):127-33.

Yao Y., Cheng X., Wang L., Wang S., Ren G. Biological Potential of Sixteen Legumes in China. *International Journal Molecular Science.* 2011. (12): 7048-7058.

Yao L. H., Jiang Y. M., Shi J., Tomas-Barberan F. A., Datta N., Singanusong R., Chen S. S. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. 2004. *Plant Foods for Human Nutrition*. 59, 3: pp 113–122.

Yoshimura M. Structure elucidation of antioxidative polyphenols and their biological properties. 2014. *Yakugaku Zasshi*. 134(9):957-64.

Zanoni B. Oxidative heat damage of tomato halves as affected by drying. 1998. *Food Res Int*.31:395-9.

Zhang C., Liu S., Solomon C. G., Hu F. B. Dietary fiber, dietary glycemic load and the risk for gestational diabetes mellitus. 2006. *Diabetes Care*. 29: 2223-2230.