

Parole chiave

Sottoprodotti dell'orzo
derivanti dalla birrificazione
Glicemia postprandiale
Insulinemia postprandiale
Studio clinico

SALUTE
CARDIOVASCOLARE

Estratto ottenuto dai sottoprodotti dell'orzo derivanti dall'industria della birra

Effetto su glicemia e insulinemia postprandiali

AUTORI

Hammad Ullah¹

Alessandra Baldi¹

Roberto Piccinocchi²

Lorenza Francesca De Lellis¹

Alessandro Di Minno^{1,3}

Daniele Giuseppe Buccato¹

Gaetano Piccinocchi⁴

Roberto Sacchi⁵

Maria Daglia¹

¹Dipartimento di Farmacia, Università di Napoli Federico II, Napoli

²Dirigente Medico di Anestesia e Rianimazione di Livello 1, Azienda Ospedaliera Universitaria "Luigi Vanvitelli", Napoli

³CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli

⁴Comegen S.c.S., Società Cooperativa Sociale di Medici di Medicina Generale, Napoli

⁵Unità di Statistica Applicata, Dipartimento di Scienze della Terra e dell'Ambiente, Università di Pavia, Pavia

maria.daglia@unina.it

RIASSUNTO

È noto che la fibra alimentare eserciti effetti benefici sulla salute umana, riducendo alcuni fattori di rischio delle malattie metaboliche, quali l'iperglicemia e l'ipercolesterolemia. Lo scopo di questo studio è stato dimostrare l'efficacia di un integratore alimentare a base di un estratto commerciale ottenuto a partire dai sottoprodotti dell'orzo (*Hordeum vulgare* L.) derivanti dall'industria della birra, mediante un metodo estrattivo brevettato (JAXplus), nella riduzione della glicemia e dell'insulinemia postprandiali in soggetti normoglicemici caratterizzati da una lieve insulino-resistenza. L'estratto d'orzo è stato caratterizzato chimicamente, rivelando la presenza di amido resistente (14,64 g/100 g), arabinosilani (AX, 7,50 g/100 g), β -glucani (1,92 g/100 g) e altre fibre solubili (6,43 g/100 g) e di acido ferulico bioaccessibile (91,3 mg/100 g). Per lo studio clinico, 40 soggetti normoglicemici sono stati randomizzati in due gruppi (costituiti ognuno da 20 soggetti), che hanno ricevuto sia l'integratore alimentare a base di estratto d'orzo sia il placebo, secondo un disegno sperimentale cross-over. I valori di glicemia postprandiale sono risultati significativamente più bassi rispetto ai corrispondenti valori del gruppo placebo dopo 90 e 120 minuti, mentre al tempo t0 (ba-

sale) e nei primi 60 minuti le due curve glicemiche si sono sostanzialmente sovrapposte. Questo andamento della glicemia postprandiale è stato confermato da una significativa riduzione dell'insulinemia postprandiale. Nessuno dei soggetti ha riportato effetti avversi. Questo studio ha dimostrato che l'integratore alimentare oggetto di studio migliora il metabolismo del glucosio e la risposta insulinica in soggetti normoglicemici con una lieve resistenza insulinica.

INTRODUZIONE

Numerose evidenze suggeriscono che la fibra alimentare, in particolare quella solubile, eserciti effetti benefici sulla salute umana, in quanto può ridurre alcuni fattori di rischio di malattie cardiovascolari e metaboliche, tra cui il diabete e l'obesità, di disturbi gastrointestinali, cancro, oltre al miglioramento della salute mentale e di altre funzioni cognitive (1-4). Gli effetti della fibra alimentare possono essere esercitati sia direttamente, attraverso la riduzione dell'assorbimento di lipidi e glucosio, che a sua volta si traduce in una diminuzione dei lipidi e glucidi nel sangue, sia indirettamente attraverso il suo effetto prebiotico, che porta alla crescita di batteri eubiotici (es. *Blautia*, *Roseburia* e

Extract obtained from barley by-products deriving from the beer industry

Effect on postprandial blood glucose and insulin

Dietary fiber exerts beneficial effects on human health reducing the risk factors of metabolic related diseases such as hyperglycemia, insulin resistance, and hypercholesterolemia. The aim of this study is to demonstrate the efficacy of a food supplement based on brewer's spent grain (BSG) extract in the reduction of postprandial glycemia and insulinemia in normoglycemic subjects. BSG was chemically characterized, revealing the presence of resistant starch (14,64 g/100 g), arabinoxylans (7,50 g/100 g), β -glucans (1,92 g/100 g) and other soluble fibers (6,43 g/100 g), and bioaccessible ferulic acid (91,3 mg/100 g). For the clinical study, 40 normoglycemic subjects were randomized into two groups, 1 and 2 (n = 20), for a cross-over clinical design and received either BSG extract-based food supplement or placebo. Postprandial blood glucose values were significantly lower than corresponding values in the placebo group after 90 and 120 min, while at the baseline and in the first 60 min, the two glycemic curves overlapped substantially. This improved clinical outcome was corroborated by significant reductions in postprandial insulinemia. None of the subjects reported adverse effects. This study showed that the tested BSG extract-based food supplement improves glucose metabolism and insulinemic response in normoglycemic subjects with at most a mild insulin resistance.

Da: Ullah H, Esposito C, Piccinocchi R et al. Postprandial Glycemic and Insulinemic Response by a Brewer's Spent Grain Extract-Based Food Supplement in Subjects with Slightly Impaired Glucose Tolerance: A Monocentric, Randomized, Cross-Over, Double-Blind, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Nutrients*. 2022;14(19):3916.

Turcibacter) che producono acidi grassi a catena corta quali acido acetico, propionico e butirrico, che migliorano la permeabilità intestinale, la sensibilità all'insulina e alleviano l'infiammazione e l'intolleranza al glucosio (5).

Tra le varie categorie di fibre alimentari, gli arabinoxilani (AX) sono polisaccaridi non amidacei composti da uno scheletro centrale lineare carbonioso costituito da monomeri di xilosio legati con legame β -1,4 (D-xilopiranosio) e da catene laterali di arabinosio (L-arabinofuranosio), che possono presentare un acido ferulico legato sul quinto carbonio. Il legame covalente tra i residui di acido ferulico è il principale responsabile della formazione dei gel, che favorisce la riduzione dell'assorbimento intestinale di zuccheri semplici e lipidi (6). Le principali fonti di AX sono frumento, orzo, riso, segale, avena e sorgo (7).

Gli AX, in base alle loro proprietà strutturali e conformazionali, sono classificati in AX estraibili in acqua e AX non estraibili in acqua. Il rapporto tra i due tipi di composti varia a seconda della specie, della cultivar, del tipo di tessuto della cariosside (crusca o endosperma), dell'ambiente esterno e del processo di lavorazione o estrazione (8). Gli AX non possono essere degradati dagli enzimi dei mammiferi presenti nel tratto digestivo, ma vengono degradati dal microbiota intestinale in acidi grassi a corta

catena e altri prodotti (9). In un recente studio, è stato riportato che l'arabinoxilano solubile estratto dai sottoprodotti dell'orzo impiegato nella birrificazione ha mostrato effetti prebiotici, con un aumento compreso tra 2 e 3,5 volte rispetto ai livelli di lattobacilli e bifidogeni (10). Gli AX possiedono anche capacità antiossidanti, con un'attività antiossidante più elevata quando è legato l'acido ferulico (11,12).

In recenti studi, gli AX idrosolubili del grano sono risultati efficaci nel modulare il metabolismo del glucosio. I meccanismi d'azione che contribuiscono a ridurre l'assorbimento del glucosio ematico e ad attenuare la risposta glicemica postprandiale comprendono il ritardo del tempo di svuotamento gastrico, il rallentamento del transito intestinale, la riduzione della velocità di diffusione del glucosio nel lume intestinale, la diminuzione della disponibilità, l'inibizione dell'attività degli enzimi digestivi nel lume intestinale e l'effetto bifidogenico (13-16). Inoltre, le proprietà gelificanti degli AX ritardano la degradazione e, di conseguenza, l'assorbimento delle proteine, attenuando la risposta insulinemica dovuta agli aminoacidi insulinogenici (17). In considerazione di tali proprietà, gli AX dell'endosperma di grano hanno ottenuto un'indicazione salutistica europea per la riduzione della glicemia postprandiale (18).

Il crescente interesse per le fibre alimentari e in particolare per gli AX ha spinto la ricerca verso lo sviluppo di nuovi ingredienti da utilizzare nella produzione di alimenti funzionali e integratori alimentari, impiegando i sottoprodotti dell'industria agroalimentare per sviluppare prodotti più sostenibili dal punto di vista economico e ambientale. In quest'ottica, poiché i sottoprodotti dell'orzo derivanti dall'industria della birra sono ricchi di fibre insolubili (cioè cellulosa, emicellulosa e lignina) e di fibre solubili, in particolare di AX, tali sottoprodotti sono un candidato ideale per essere sfruttato come materia prima seconda da cui ottenere estratti ad alto contenuto di fibre (19). Oggigiorno, il 70% dei sottoprodotti dell'orzo derivanti dall'industria della birra vengono utilizzati come mangime per animali, il 10% per la produzione di biogas e il restante 20% viene smaltito come rifiuto (20). Considerando che in Europa e negli Stati Uniti si generano rispettivamente circa 3,4 e 4,5 milioni di tonnellate di sottoprodotti dell'orzo da birrificazione e che un birrificio di medie dimensioni ne produce circa 7-8 tonnellate a settimana, la valorizzazione di questi sottoprodotti per ottenere ingredienti alimentari ricchi di fibre per l'industria alimentare ad alto valore aggiunto è un'altra possibile modalità di riciclo di tali sottoprodotti (21).

Pertanto, lo scopo di questo studio è stato la valutazione della capacità di ridurre la glicemia postprandiale e di migliorare la risposta insulinemica di un integratore alimentare contenente un estratto ottenuto da sottoprodotti dell'orzo¹, caratterizzato chimicamente in termini di fibre totali, AX, β -glucani, amido resistente, polifenoli totali e acido ferulico, in soggetti sani normoglicemici, attraverso uno studio clinico randomizzato, cross-over, in doppio cieco e controllato con placebo.

MATERIALI E METODI

Integratore alimentare e placebo utilizzati nello studio clinico

L'integratore alimentare a base di un estratto ottenuto dai sottoprodotti dell'orzo derivante dall'industria della birra e il placebo sono stati prodotti da HEALLO (Milano), nel rispetto delle specifiche europee relative ai contaminanti e ai limiti microbiologici. L'integratore alimentare è stato notificato al Ministero della Salute italiano con il marchio "JAX Plus®" (numero di notifica: 141039). L'integratore alimentare, sotto forma di granulato solubile in confezioni monodose (5 g), contiene 4,25 g di estratto e 0,75 g (corrispondenti al 15%) di inulina utilizzata come agente di supporto.

Il placebo, nella stessa forma di dosaggio, era costituito da cellulosa microcristallina e dalla stessa quantità di inulina (15%). Il prodotto da forno (grissini) consumato dai soggetti reclutati nel presente studio clinico e utilizzato quale pasto standard fonte di carboidrati è stato precedentemente porzionato e confezionato (peso netto 65 g) in quantità tale da fornire 50 g di carboidra-

ti disponibili ed è stato caratterizzato in termini di nutrienti e valore calorico (**Tab. 1**).

Tabella 1 • Valori nutrizionali medi per 100 g di prodotto dei grissini impiegati come pasto standard	
Energia	1601 kJ-378 kcal
Grassi	2,5 g
di cui acidi grassi saturi	0,5 g
Carboidrati	74,5 g
di cui zuccheri	3,4 g
Fibre alimentari	4,8 g
Proteine	12,7 g
Sale	1,3 g

Caratterizzazione chimica dell'estratto di BSG

Determinazione della fibra alimentare totale

Il contenuto di fibra alimentare totale (TDF) è stato determinato utilizzando il *Total Dietary Fiber Assay Kit* (Neogen, Lansing, MI, USA) che rappresenta una versione semplificata del metodo ufficiale AOAC, seguendo il protocollo descritto dal produttore (**22-23**).

Determinazione di glucosio, arabinosio, xilosio, β -glucani totali, arabinosilani totali e amido-resistente

L'estratto ottenuto dai sottoprodotti dell'orzo e i residui secchi di fibra solubile ottenuti con il metodo descritto nel paragrafo precedente sono stati preparati secondo il protocollo del produttore, per effettuare la determinazione di (a) glucosio libero, (b) glucosio derivante da amido rapidamente digeribile e amido lentamente digeribile, (c) glucosio derivante da amido resistente, (d) arabinosio, (e) xilosio, (f) AX e (g) β -glucani utilizzando i kit disponibili in commercio per la misurazione di xilosio, arabinosio, glucosio e β -glucani a legume misto (Neogen, Lansing, MI, USA) (**24-25**).

Determinazione degli arabinosilani estraibili con acqua e alcali

L'isolamento degli AX estraibili con acqua (WEAX) e degli AX estraibili con alcali (AEAX) nell'estratto di sottoprodotti dell'orzo è stato eseguito utilizzando un metodo di Buksa et al. (**26**). Dopo l'isolamento, la quantificazione di WEAX e AEAX è stata eseguita secondo il metodo riportato nel paragrafo precedente.

Determinazione del contenuto totale di polifenoli e dell'acido ferulico dopo digestione oro-gastro-duodenale simulata in vitro

La digestione oro-gastro-duodenale simulata in vitro dell'estratto è stata eseguita seguendo il protocollo di Minekus et al. (**27**). Al termine del processo di digestione, il campione digerito è stato liofilizzato e mantenuto a 4 °C in attesa della determinazione del contenuto di polifenoli totali e dell'analisi RP-HUPLC-MS per la determinazione dell'acido ferulico.

Determinazione del contenuto di polifenoli totali

Il contenuto di polifenoli totali (TPC) dell'estratto e dei campioni digeriti e liofilizzati (1 mg) è stato determinato con il metodo Folin-Ciocalteu (**28**).

Analisi UHPLC-MS e quantificazione dell'acido ferulico dopo digestione

Le analisi HUPLC-MS/MS dell'estratto digerito per l'identificazione e la quantificazione dell'acido ferulico sono state eseguite su un sistema UHPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, Milano) composto da due pompe, un autocampionatore e un forno per colonne. Il sistema è stato accoppiato a uno spettrometro di massa a trappola ionica lineare LTQ XL (Thermo Fisher Scientific, Milano) dotato di una sorgente electrospray (ESI).

¹JAX Plus® prodotto e distribuito da HEALLO (Milano).

Progettazione dello studio clinico

Uno studio clinico monocentrico, randomizzato, controllato con placebo, in doppio cieco e cross-over è stato condotto da COMEGEN-Società Cooperativa Sociale (Napoli) per valutare gli effetti dell'integratore alimentare, a base di estratto ottenuto dai sottoprodotti dell'orzo derivanti dall'industria della birra, sulla riduzione della risposta glicemica postprandiale in soggetti normoglicemici. Lo studio era in doppio cieco, sia per il medico sperimentatore sia per i soggetti arruolati. A questo scopo, sia l'integratore alimentare sia il placebo sono stati resi irriconoscibili per forma, peso, colore e, per quanto possibile, gusto.

I partecipanti hanno ricevuto informazioni orali e scritte sullo studio prima di dare il loro consenso scritto. Il protocollo, la lettera di intenti e i documenti sinottici relativi allo studio sono stati approvati dal Comitato Etico Scientifico dell'A.S.L. Napoli 1 CENTRO (protocollo numero 222, 12 aprile 2021) e sono stati condotti in conformità alla Dichiarazione di Helsinki del 1964 (rivista nel 2000). Questo studio è elencato nel registro ISRCTN (www.isrctn.com) con il numero ID 9301859.

Il disegno dello studio prevedeva due gruppi sperimentali (20 soggetti per ciascun gruppo). I soggetti arruolati sono stati assegnati a ciascuno dei due gruppi in modo casuale e imprevedibile mediante una semplice randomizzazione (rapporto di assegnazione 1:1). In occasione della prima visita (t0) presso lo studio del medico di Medicina Generale, sono state raccolte informazioni sulle caratteristiche sociodemografiche, cliniche e biochimiche dei soggetti reclutati (indice di massa corporea (BMI), colesterolo totale (TC), colesterolo LDL (LDL-C), colesterolo HDL (HDL-C) e trigliceridi). Durante la prima visita (t0), i soggetti reclutati sono stati inizialmente sottoposti a un prelievo di sangue

a digiuno. Successivamente, i soggetti reclutati hanno consumato entro 15 minuti il pasto standard costituito da grissini con 500 mL di acqua oligominerale, e l'integratore alimentare a base di estratto di sottoprodotti dell'orzo (gruppo 1) o il pasto standard, l'acqua oligominerale e il placebo (gruppo 2). Successivamente, sono stati eseguiti prelievi di sangue a intervalli di tempo definiti per misurare la glicemia e l'insulinemia postprandiali (a 15 (t1), 30 (t2), 60 (t3), 90 (t4) e 120 (t5) minuti dopo l'assunzione di grissini, acqua e trattamento o placebo). Questa fase è stata seguita da un periodo di washout di cinque giorni (in cui i soggetti reclutati non hanno assunto alcun trattamento), prima del cross-over dei trattamenti. Dopo il periodo di washout di cinque giorni, ogni soggetto dei due gruppi è stato sottoposto a un nuovo prelievo di sangue (ai tempi indicati sopra) per la misurazione della glicemia e dell'insulina, prima e dopo l'ingestione del pasto standard, dell'acqua oligominerale e del placebo (gruppo 1) o del pasto standard, dell'acqua oligominerale e dell'integratore alimentare (gruppo 2), secondo il disegno sperimentale cross-over dello studio clinico.

Ai partecipanti è stato chiesto di ridurre l'assunzione di fibre nelle due settimane precedenti l'inizio dello studio fino alla fine dello stesso e di non modificare significativamente le loro abitudini alimentari per tutta la durata dello studio.

Popolazione dello studio

Quaranta soggetti di età compresa tra i 18 e i 65 anni, di entrambi i sessi, sono stati reclutati dai medici di Medicina Generale di Comegen nel settembre 2021. I criteri di inclusione prevedevano il reclutamento di soggetti sani (in base alla loro storia clinica), non fumatori e in grado di comprendere e firmare il consenso informato. Sono stati esclusi dallo studio i soggetti: con diabete di tipo 1 o 2; con glicemia a digiuno maggio-

re di 110 mg/dL; con valori di pressione arteriosa maggiore di 160/100 mmHg; con disturbi metabolici o alimentari; con disturbi che potevano interferire con i risultati dello studio (es. disturbi endocrini, cardiovascolari, polmonari, renali o gastrointestinali); sensibili, intolleranti o allergici agli ingredienti dell'integratore alimentare utilizzato nello studio clinico, donne in gravidanza o in allattamento; donatori di sangue nei tre mesi precedenti l'arruolamento; sottoposti a trattamenti farmacologici con farmaci che potevano interferire con lo studio (es. inibitori dell' α -glucosidasi, sulfoniluree, farmaci per la riduzione del colesterolo e qualsiasi altro farmaco che il medico non riteneva compatibile con lo studio); che assumono integratori alimentari che potevano interferire con lo studio (es. prodotti ad alto contenuto di vitamine e minerali >200% VNR, vitamine del gruppo B, vitamina C, calcio, zinco, rame, cromo, iodio, ferro, magnesio, manganese, fosforo, prodotti a base di acidi grassi essenziali, prodotti botanici e qualsiasi altro prodotto che il medico non riteneva compatibile con lo studio).

Outcome dello studio

L'outcome primario del presente studio clinico è stato quello di valutare il contributo dell'integratore alimentare in aggiunta a un pasto standard, nel promuovere la riduzione dell'aumento della glicemia postprandiale in soggetti normoglicemici. L'outcome secondario consisteva nella valutazione dell'impatto dell'integratore alimentare sulla risposta insulinemica postprandiale.

La raccolta dei dati è stata effettuata mediante una scheda appositamente messa a punto suddivisa in due sezioni principali. Una prima sezione riguardante i dati personali, l'anamnesi del soggetto, l'assunzione di eventuali farmaci concomitanti e il gruppo di trattamento, compilata al momento dell'arruolamento. La seconda sezione è stata

compilata con i risultati delle analisi effettuate sui campioni di sangue prelevati.

Sicurezza

L'estratto ottenuto dai sottoprodotti dell'orzo derivante dal processo di birrificazione è un ingrediente ammesso negli integratori alimentari. Sebbene non fossero previsti eventi avversi legati all'assunzione dell'integratore alimentare, i soggetti arruolati sono stati costantemente monitorati per verificare l'insorgenza di qualsiasi tipo di effetto avverso. I soggetti con sensibilità, intolleranza o allergia al glutine o all'orzo sono stati esclusi dallo studio.

Analisi statistica

Il calcolo della dimensione del campione è stato condotto utilizzando tre valori di potenza $1-\beta$ (0,80, 0,95 e 0,99), un valore di soglia di significatività α pari a 0,05 e tre valori di dimensione dell'effetto (f di Cohen = 0,20, 0,25 e 0,30, rispettivamente). La dimensione del campione è stata determinata in 40 partecipanti (20 per ogni gruppo).

L'effetto dei trattamenti sulle variabili risposta (glicemia e insulina) è stato valutato attraverso un modello lineare misto (LMM), in cui i gruppi di trattamento (gruppo A e gruppo B), i tempi di misurazione (cioè, subito dopo il pasto, t_0 , dopo 15 minuti, t_1 , dopo 30 minuti, t_2 , dopo 60 minuti, t_3 , dopo 90 minuti, t_4 , e dopo 120 minuti, t_5), l'ordine di trattamento (primo e secondo), l'età e il sesso dei soggetti sono stati inseriti nel modello come effetti fissi. Le interazioni misura \times trattamento e misura \times ordine di trattamento sono state incluse tra le variabili indipendenti. L'interazione misura \times trattamento è la variabile chiave per l'outcome primario, in quanto consente di verificare se l'andamento nel corso delle misurazioni differisce per i due trattamenti.

Per quanto riguarda l'interazione misura \times ordine di trattamento, essa viene

utilizzata per verificare se le tendenze durante il periodo di misurazione differiscono in base all'ordine di somministrazione dei trattamenti (prima o dopo il washout). L'identità del soggetto è stata valutata come un effetto casuale, che ha fornito un controllo per le differenze tra i soggetti arruolati.

Le analisi sono state eseguite utilizzando il software lme4 (29) R ver. 4.0.1 (30) (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) e, salvo diversa indicazione, i dati sono riportati come media \pm deviazione standard.

Per ciascun soggetto dei gruppi 1 e 2, sono state calcolate le aree incrementali delle curve del glucosio e dell'insulina (iAUC). Le iAUC sono state valutate statisticamente mediante un t-test.

Per valori di p inferiori a 0,05 le differenze tra le iAUC sono state considerate statisticamente significative.

RISULTATI

Caratterizzazione chimica dell'estratto

L'estratto utilizzato come ingrediente dell'integratore alimentare che è stato assunto nello studio clinico è stato prodotto a partire dai sottoprodotti dell'orzo derivanti dal processo di birrificazione. In primo luogo, è stata caratterizzata la fibra presente nell'estratto. Per determinare la fibra totale, solubile e insolubile, l'estratto è stato analizzato con un metodo gravimetrico che prevede l'eliminazione dell'amido e delle proteine in seguito al trattamento con α -amilasi, amiloglicosidasi e proteasi, rispettivamente. Dopo questo trattamento, l'estratto non ha mostrato alcun precipitato, indicando l'assenza di fibra insolubile. Per determinare la fibra solubile, il campione è stato quindi trattato con etanolo al 78% che provoca la precipitazione della fibra solubile ad alto peso molecolare che successivamente viene determinata per via gra-

vimetrica. La fibra solubile è risultata pari a 7,45 g/100 g di estratto. Poiché la fibra solubile a basso peso molecolare non precipita in etanolo al 78%, questa frazione di fibra non poteva essere determinata con questo saggio. Pertanto, gli AX e i β -glucani totali sono stati determinati idrolizzando i legami glicosidici con enzimi specifici e determinando le loro concentrazioni sulla base delle concentrazioni di arabinosio e xilosio, per gli AX, e di glucosio, per i β -glucani. I risultati hanno mostrato che gli AX totali e i β -glucani totali erano rispettivamente 7,50 e 1,92 g/100 g di estratto. Lo stesso metodo è stato applicato anche al residuo secco di fibra totale isolato con la precipitazione in etanolo al 78% per determinare il contenuto di AX e β -glucani ad alto peso molecolare isolati con il metodo precedente.

La concentrazione di AX del residuo secco ottenuto con il saggio della fibra totale è risultata pari a 0,45 g/100 g, mentre i β -glucani non sono risultati rilevabili. La concentrazione di AX a basso peso molecolare solubile in etanolo al 78%, e quindi non determinata con il metodo gravimetrico, è stata calcolata, quindi, per differenza ed è risultata pari a 7,05 g/100 g di estratto.

Le proprietà gelificanti degli AX sono attribuite principalmente al WEAX, mentre l'AEAX mostra una minore gelificazione e quindi è meno attivo nella modulazione dell'assorbimento del glucosio. Le concentrazioni di WEAX e AEAX sono risultate rispettivamente pari a 1,23 g/100 g (pari a circa il 16% degli AX totali) e 6,36 g/100 g (pari a circa l'84% degli AX totali).

Infine, nell'estratto, sono state determinate le concentrazioni di (a) glucosio libero, (b) glucosio derivato dall'amido rapidamente digeribile e dall'amido lentamente digeribile (incluso il glucosio libero) e (c) glucosio totale derivante dall'amido resistente (incluso il glucosio derivato dall'amido rapidamente digeribile, dall'amido lentamente dige-

ribile e dal glucosio libero). La concentrazione di glucosio derivante dall'amido resistente, calcolata dalla differenza tra la concentrazione di glucosio totale determinata dopo 4 ore di trattamento enzimatico e dopo 30 minuti di idrolisi enzimatica (corrispondente alla concentrazione di glucosio derivante dall'amido rapidamente digeribile, dall'amido lentamente digeribile e dal glucosio libero), è risultata pari a 14,64 g/100 g di estratto. Inoltre, il glucosio totale derivato dall'amido resistente è stato isolato dal residuo secco di fibra totale ed è risultato pari a 0,62 g/100 g di estratto. Pertanto, la concentrazione di amido resistente solubile in etanolo al 78%, e quindi non calcolata con il

metodo gravimetrico, è stata calcolata per differenza ed è risultata pari a 14,02 g/100 g di estratto (**Tab. 2**).

In totale, l'estratto è risultato contenere 30,40 g di fibra alimentare/100 g di estratto, rappresentati principalmente da amido resistente (14,64 g/100 g), AXs (7,50 g/100 g), β -glucani (1,92 g/100 g) e altre fibre solubili (6,38 g/100 g) isolate con la precipitazione in etanolo al 78%.

Dopo la determinazione della fibra alimentare contenuta nell'estratto oggetto di studio, è stato determinato il contenuto di polifenoli totali, prima e dopo digestione oro-gastro-duodenale simulata in vitro, che è risultato pari a $0,499 \pm 0,01$ e $1,16 \pm 0,03$ g GAE/100 g

di estratto, rispettivamente, suggerendo che durante la digestione i polifenoli vengono rilasciati dalla matrice alimentare e diventano bioaccessibili. Poiché il metodo spettrofotometrico impiegato per la determinazione del contenuto di polifenoli totali ha generalmente problemi di sovrastima del contenuto fenolico, in quanto il reagente di Folin-Ciocalteu interagisce con molecole non polifenoliche, quali per esempio gli zuccheri riducenti, il contenuto di acido ferulico, che è il polifenolo più rappresentato nell'orzo, è stato valutato mediante un metodo UHPLC-MS/MS validato, dopo digestione oro-gastro-duodenale simulata in vitro (31). La sua identificazione si è basata sullo spettro di massa ione con m/z 193 e sul suo pattern di frammentazione (**Fig. 1**). Il contenuto di acido ferulico bioaccessibile, cioè rilevabile dopo digestione oro-gastro-duodenale, è risultato pari a $64,8 \pm 0,06$ mg/100 g di estratto digerito, corrispondente a $91,3 \pm 0,07$ mg/100 g di estratto.

Studio clinico

Il diagramma di flusso dello studio clinico, realizzato in conformità alle linee guida CONSORT PRO (32), è riportato in **Figura 2**. Inizialmente, sono stati selezionati 42 soggetti. Successivamente, poiché due di questi soggetti non soddisfacevano i criteri di inclusione, il numero finale di soggetti reclutati è stato pari a 40, di cui 20 assegnati in modo casuale al gruppo 1, (che ha ricevuto prima l'integratore alimentare - trattamento A, e poi il placebo - trattamento B), oppure al gruppo 2 (che ha ricevuto prima il placebo e poi l'integratore alimentare). Il gruppo 1 era composto da 13 donne (65%) e 7 uomini (35%), mentre il gruppo 2 era composto da 12 donne (60%) e 8 uomini (40%). I partecipanti ai due gruppi avevano caratteristiche sociodemografiche e dati clinici simili, senza differenze significative a eccezione del valore di colesterolo HDL

Tabella 2 • Concentrazioni di glucosio libero, arabinosio e xilosio liberi, AX totali, WEAX e AEAX, β -glucani totali, glucosio da amido rapidamente e lentamente digeribile, e glucosio da amido resistente, nell'estratto ottenuto da sottoprodotti dell'orzo derivanti dall'industria della birra, e AX, β -glucani e amido resistente determinati nel residuo di fibra totale essiccata

Composto	Concentrazione (g/100g) ¹
Glucosio libero	5,53 \pm 0,01
Arabinosio libero	0,71 \pm 0,01
Xilosio libero	0,95 \pm 0,01
AX totali	7,50 \pm 0,05
WEAX - arabinosilani estraibili in acqua	1,23 \pm 0,02
AEAX - arabinosilani estraibili	6,36 \pm 0,03
AX insolubili in etanolo (78%) presenti nel residuo di fibra totale essiccata	0,45 \pm 0,01
AX solubili in etanolo (78%) ²	7,05 \pm 0,01
β -glucani totali	1,92 \pm 0,05
β -glucani insolubili in etanolo (78%) presenti nel residuo di fibra totale essiccata	ND ³
Glucosio dopo 30 min di idrolisi enzimatica ⁴	30,36 \pm 0,01
Glucosio dopo 4 ore di idrolisi enzimatica ⁵	45,00 \pm 0,06
Glucosio dopo 4 ore di idrolisi enzimatica presente nel residuo di fibra totale essiccata	0,62 \pm 0,01
Fibra alimentare totale	7,45 \pm 0,03

¹ Dati espressi come medie \pm DS (n = 3).
² Calcolati dalla differenza tra gli AX totali presenti nell'estratto BSG e gli AX presenti nel residuo totale di fibra essiccata.
³ ND non rilevabile.
⁴ Corrispondenti al glucosio da amido rapidamente e lentamente digeribile, compreso il glucosio libero.
⁵ Corrispondente al glucosio da amido resistente, compreso il glucosio da amido rapidamente e lentamente digeribile e glucosio libero.

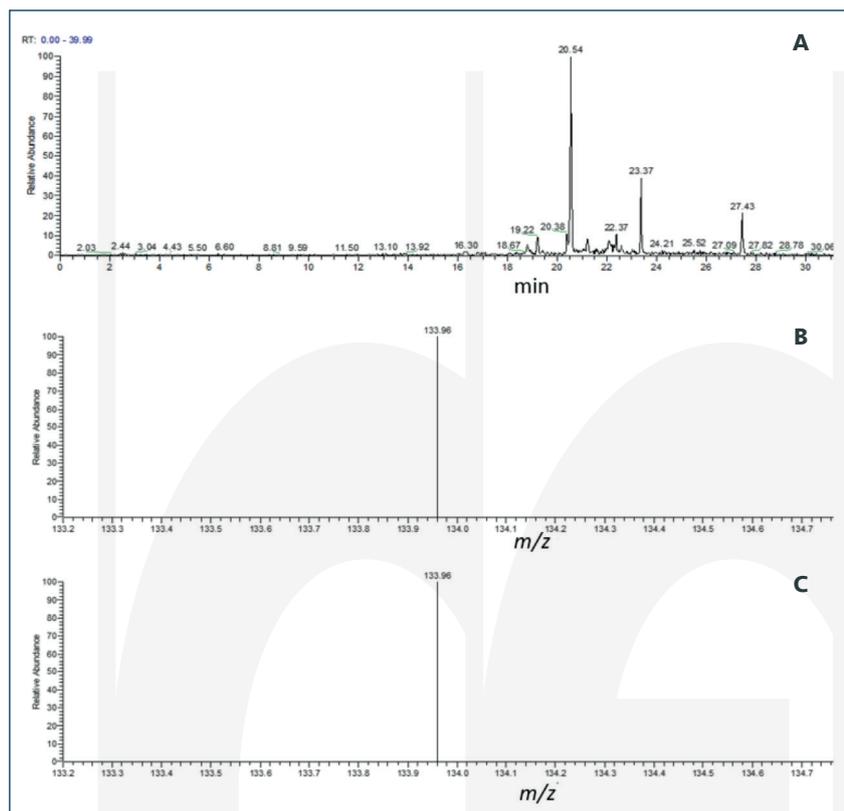


Figura 1 • (A) Cromatogramma ottenuto dall'analisi UHPLC-MS/MS dell'estratto sottoposto a digestione oro-gastro-duodenale simulata in vitro registrato alla lunghezza d'onda $\lambda = 320$. (B) Spettro di massa dello ione parent con m/z 193. (C) Spettro di massa dello ione derivante dalla frammentazione dello ione parent con m/z 133. I valori LOQ e LOD determinati per l'acido ferulico sono rispettivamente 0,062 e 0,016 $\mu\text{g/mL}$.

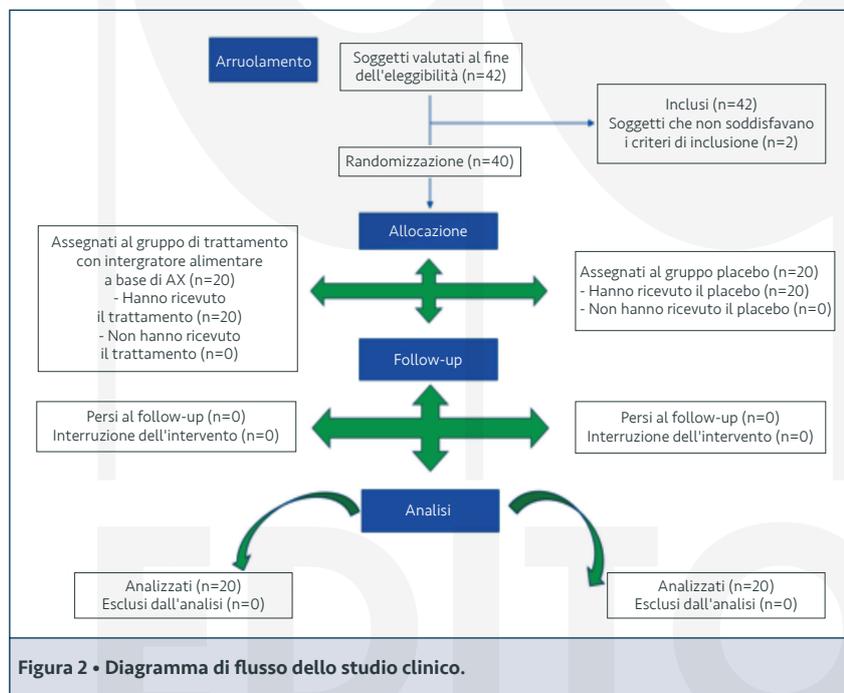


Figura 2 • Diagramma di flusso dello studio clinico.

riduzione dell'aumento della glicemia postprandiale in soggetti normoglicemici con una lieve insulino-resistenza, evidenziata da valori dell'indice HOMA-IR e dell'indice trigliceridi/glucosio (TyG) superiori a 2,5 e 4,5, rispettivamente, per la maggior parte dei soggetti reclutati (33-34) (**Tabb. 3 e 4**).

I livelli di glicemia e di insulina dei soggetti reclutati nei due gruppi 1 e 2, suddivisi in base al sesso maschile e femminile, sono riportati nella **Tabella 4**. Come previsto, i valori medi di glicemia postprandiale registrati dopo 15 e 30 minuti tendevano a crescere fino a raggiungere un picco a 60 minuti, indipendentemente dal sesso e dal trattamento. Dopo il picco registrato a 60 minuti, i valori medi della glicemia postprandiale registrati dopo 90 e 120 minuti tendevano a diminuire maggiormente nei soggetti che avevano assunto l'integratore alimentare rispetto a quelli che avevano assunto il placebo, indipendentemente dal sesso. Infatti, mentre da 0 a 60 minuti i valori di glicemia postprandiale dei soggetti (sia maschi sia femmine) che avevano assunto l'integratore alimentare e il placebo erano sovrapponibili, a 90 e 120 minuti i valori medi di glicemia postprandiale dei soggetti che avevano assunto l'integratore alimentare erano inferiori ai corrispondenti valori dei soggetti che avevano assunto il placebo.

Per quanto riguarda l'insulina ematica postprandiale, i valori medi di insulinemia registrati dopo 15 e 30 minuti tendevano a crescere fino a un picco di 60 minuti nel gruppo placebo più che nel gruppo che aveva assunto l'integratore alimentare, indipendentemente dal sesso. Dopo il picco registrato a 60 minuti, anche in questo caso, i valori medi di insulinemia registrati dopo 90 e 120 minuti tendevano a diminuire maggiormente nei soggetti che avevano assunto l'integratore alimentare rispetto a quelli che avevano assunto il placebo, indipendentemente dal sesso.

($p = 0,01$). Le caratteristiche basali dei soggetti di ciascun gruppo sono riassunte nella **Tabella 3**.

L'obiettivo primario dello studio era quello di valutare il contributo dell'integratore alimentare nel promuovere la

Tabella 3 • Caratteristiche della popolazione oggetto dello studio: dati demografici e clinici al basale (t0)

Caratteristiche	Gruppo 1 (n = 20)	Gruppo 2 (n = 20)
Età (anni)	53 ± 5	57 ± 7
Genere:		
Uomini	7	8
Donne	13	12
Etnicità: Europea	20	20
BMI (kg/m ²)	21,82 ± 2,05 - (18,6-24,7)	21,93 ± 2,32 - (18,5-24,8)
TC (mg/dL)	217,25 ± 17,89 - (180-245)	220,7 ± 17,71 - (180-246)
HDL-C (mg/dL)	48,55 ± 12,14 - (30-65)	54,9 ± 9,18 - (33-68)
LDL-C (mg/dL)	112,85 ± 17,78 - (83-153)	120,25 ± 23,42 - (82-160)
Trigliceridi (mg/dL)	131,55 ± 26,49 - (82-167)	125,6 ± 22,6 - (85-170)
Indice Homa-IR	3,39 ± 1,32 - (1,21-5,25)	4,58 ± 1,45 - (1,54-6,81)
Indice TyG	8,51 ± 0,24 (7,99-8,86)	8,61 ± 0,21 (8,19-8,99)

Il modello LMM per la glicemia (**Tab. 5**) ha individuato un effetto statisticamente significativo per la misurazione ($p < 0,001$), per il trattamento ($p < 0,001$) e anche per l'interazione misurazione x trattamento ($p < 0,001$). Inoltre, sono emersi effetti significativi anche per il sesso ($p = 0,014$) e per l'età ($p = 0,032$).

Infine, anche l'effetto dell'ordine di trattamento è risultato significativo ($p < 0,001$), mentre l'interazione misura x ordine di trattamento non lo è stato ($p = 0,99$). Questi risultati indicano che è stata registrata una differenza tra i trattamenti A e B per quanto riguarda la curva glicemica postprandiale dei pa-

zienti (**Fig. 3A**). In particolare, la glicemia non differiva tra i trattamenti, dalla misurazione iniziale (t0) fino al picco registrato a 60 minuti (t0: dB-A = 0,29 ± 1,21, t424 = 0,240, $p = 0,81$; t15: dB-A = 0,22 ± 1,21, t424 = 0,185, $p = 0,85$; t30: dB-A = 0,34 ± 1,21, t424 = 0,283, $p = 0,77$; t60: dB-A = 0,46 ± 1,21, t424 = 0,383, $p = 0,70$). Infatti, i valori della glicemia dei soggetti trattati con l'integratore alimentare (trattamento A) o con il placebo (trattamento B), registrati a t0, t1, t2 e t3, sono risultati sovrapponibili. Diversamente, i valori della glicemia registrati a t4 (90 min) e t5 (120 min) a seguito dell'assunzione da parte dei soggetti reclutati del trattamento A (integratore alimentare) erano significativamente più bassi rispetto ai corrispondenti valori registrati a durante il trattamento B (placebo) (dB-A = 2,67 ± 1,21, t424 = 2,199, $p = 0,028$ e dB-A = 6,55 ± 1,21, t424 = 5,397, $p < 0,001$). Inoltre, l'andamento della curva glicemica non era diverso prima e dopo il periodo di washout, come evidenziato dal fatto che l'interazione tra misura e ordine di

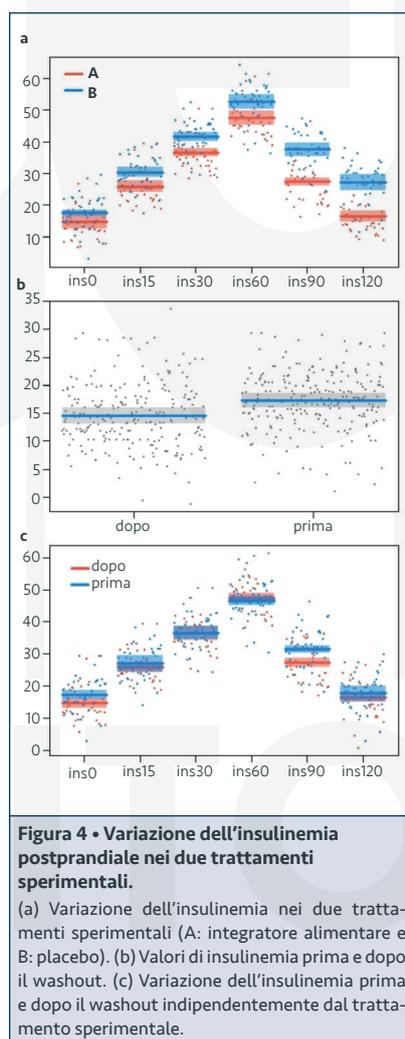
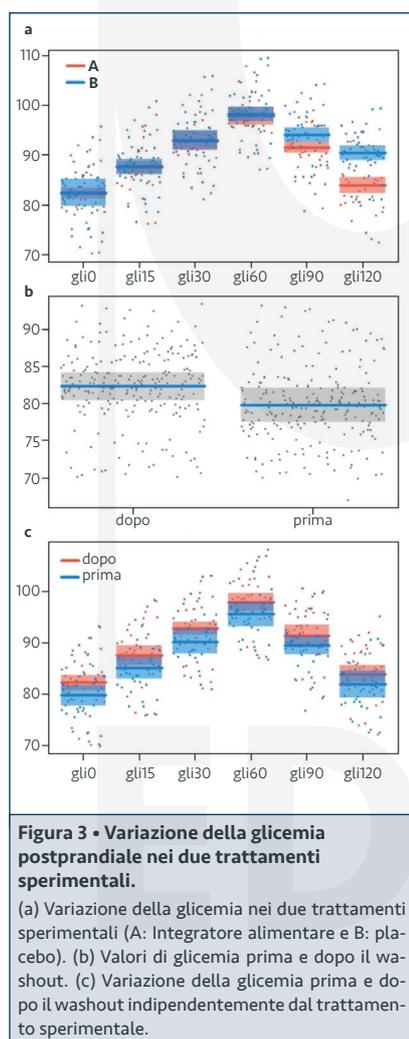
Tabella 4 • Variazione dei valori¹ di glicemia e insulina in uomini e donne sottoposti ai due trattamenti sperimentali

Variable		t0	t1	t2	t3	t4	t5
Glicemia (mg/dL)							
Donne	A	81,6 ± 7,7 (70-95)	86,9 ± 7,6 (75-100)	92,2 ± 7,8 (80-105)	97,5 ± 7,6 (85-110)	91,4 ± 7,3 (80-106)	83,3 ± 8,3 (72-101)
	B	81,5 ± 6,5 (70-94)	86,7 ± 6,4 (76-99)	91,8 ± 6,5 (81-104)	97,3 ± 6,6 (87-109)	93,2 ± 6,7 (82-105)	89,3 ± 6,5 (79-101)
Uomini	A	86 ± 8,1 (72-95)	91,3 ± 7,9 (77-100)	96,4 ± 7,8 (83-106)	101,4 ± 7,4 (88-110)	94,8 ± 8,1 (82-105)	88,3 ± 8 (74-96)
	B	84,3 ± 7,6 (74-94)	89,7 ± 7,4 (80-100)	95,3 ± 7,1 (86-105)	100,5 ± 6,7 (91-109)	96,5 ± 6,6 (85-104)	93,2 ± 6 (83-100)
Insulinemia (μU/mL)							
Donne	A	17,3 ± 7,2 (6-30)	27,7 ± 7,2 (17-41)	37,8 ± 7 (27-52)	48,3 ± 7 (38-62)	30,5 ± 9,6 (18-48)	18,5 ± 7,1 (8-34)
	B	17,9 ± 8,1 (6-30)	30,2 ± 7,5 (20-41)	40,6 ± 7,7 (28-53)	51,3 ± 8,5 (34-64)	38,1 ± 7,7 (25-51)	26,8 ± 8,8 (9-39)
Uomini	A	16,3 ± 6,4 (7-28)	26,9 ± 6,2 (18-39)	36,9 ± 6,5 (28-49)	47,4 ± 6,1 (39-58)	30,3 ± 6,8 (20-42)	17 ± 5,4 (9-27)
	B	21,6 ± 6 (10-30)	33,7 ± 6,7 (21-45)	44,8 ± 6,9 (32-58)	55,2 ± 7,9 (43-72)	43,2 ± 5,7 (33-51)	30,9 ± 5,8 (20-40)

¹Media ± deviazione standard, valori minimo e massimo.
A: Pasto standard e integratore alimentare.
B: Pasto standard e placebo.

Tabella 5 • Risultati del modello statistico LMM per glicemia e insulinemia postprandiale

	F	Df	P
Glicemia			
Misura	89,11	5, 423	<0,001
Trattamento	11,01	1, 427	<0,001
Sesso	6,63	1, 37	0,014
Età	4,96	1, 37	0,032
Ordine di elaborazione	22,83	1, 423	<0,001
Misura × Trattamento	4,69	5, 423	<0,001
Measurement × Ordine di trattamento	0,04	5, 423	0,99
Insulina			
Misura	324,06	5, 423	<0,001
Trattamento	138,95	1, 428	<0,001
Sesso	1,36	1, 37	0,25
Età	2,58	1, 37	0,12
Ordine di elaborazione	6,87	1, 423	0,0097
Misura × Trattamento	6,29	5, 423	<0,001
Measurement × Ordine di trattamento	1,86	5, 423	0,10



trattamento non era significativa (Tab. 5 e Fig. 3).

L'effetto del sesso indica che gli uomini selezionati nel campione avevano valori di glicemia superiori a quelli delle donne ($4,12 \pm 1,60$, $t_{36} = 2,575$, $p = 0,014$). Questa differenza, tuttavia, non ha alcuna rilevanza clinica, poiché i valori della glicemia dei soggetti a t0 erano in linea con i criteri di inclusione.

Infine, per quanto riguarda l'età dei soggetti reclutati, la glicemia tendeva ad aumentare con l'età ($0,26 \pm 0,11$, $t_{36} = 2,228$, $p = 0,032$) indipendentemente dal sesso. Anche in questo caso, questa differenza non ha alcuna rilevanza clinica, poiché i valori di glicemia dei soggetti al t0 erano in linea con i criteri di inclusione. Il modello LMM per l'insulina (Tab. 5) ha fornito risultati simili a quelli relativi alla glicemia. Gli effetti della misurazione ($p < 0,001$), del trattamento ($p < 0,001$) e dell'interazione misurazione x trattamento ($p < 0,001$) erano statisticamente significativi. Non vi è stato alcun effetto significativo per il sesso ($p = 0,25$) e l'età ($p = 0,12$).

Anche in questo caso, l'effetto dell'ordine di trattamento è risultato statisticamente significativo ($p = 0,009$), ma l'interazione tra misurazione x ordine di trattamento ($p = 0,10$) non lo era. Questi risultati indicano che esiste una differenza nella curva insulinica postprandiale nei pazienti sottoposti al trattamento A rispetto a quelli sottoposti al trattamento B (Fig. 4).

I valori di insulina differiscono tra i trattamenti, poiché la differenza tra i valori di insulinemia iniziale ($dB-A = 2,83 \pm 1,31$, $t_{424} = 2,169$, $p = 0,031$) è aumentata a 15 min ($dB-A = 4,51 \pm 1,31$, $t_{424} = 7,077$, $p < 0,001$) e gradualmente a 30 min ($dB-A = 5,02 \pm 1,31$, $t_{424} = 7,590$, $p < 0,001$) e 90 min ($dB-A = 10,16 \pm 1,31$, $t_{424} = 12,733$, $p < 0,001$), con una differenza massima a 120 min ($dB-A = 10,79 \pm 1,31$, $t_{424} = 13,336$, $p < 0,001$).

I risultati indicano che il valore dell'insulina dopo il washout è significativamente inferiore a quello osservato prima del washout ($-1,39 \pm 0,53$, $t_{423} = 2,612$, $p = 0,009$), indipendentemente dal trattamento sperimentale. Come per la glicemia, anche per l'insulinemia l'andamento della curva non è risultato diverso tra prima e dopo il periodo di washout, come dimostra il fatto che l'ordine di misurazione \times trattamento non è risultato significativo (**Tab. 5**).

DISCUSSIONE

In questo studio, un nuovo estratto ottenuto dai sottoprodotti dell'orzo derivanti dall'industria della birra è stato utilizzato come ingrediente bioattivo per la formulazione di un integratore alimentare testato per i suoi effetti sulla glicemia postprandiale e sulla risposta insulinemica in uno studio clinico monocentrico, randomizzato, cross-over, in doppio cieco, controllato con placebo.

Sebbene i dati della letteratura riportino che le principali famiglie di fibre presenti nei sottoprodotti dell'orzo siano fibre insolubili (cioè cellulosa, lignina ed emicellulosa) (**19**), l'estratto utilizzato in questo studio non contiene fibre insolubili. Questa composizione è probabilmente dovuta al metodo di estrazione enzimatica brevettato che permette di arricchire l'estratto con fibre solubili (**35**). In accordo con i dati della letteratura (**19**), questo estratto è costituito da amido resistente (14,6 g/100 g), seguito da AX (7,5 g/100 g) e da β -glucani (1,9 g/100 g).

Gli AX estraibili con acqua rappresentano circa il 16% e gli AX estraibili con alcali rappresentano circa l'84% del contenuto totale di AX. Le principali proprietà gelificanti, che a loro volta sono responsabili del minore e più lento assorbimento di glucosio dalla dieta, sono principalmente attribuite agli AX

idrosolubili ad alto peso molecolare. Sulla base dei risultati ottenuti riguardo la caratterizzazione degli AX presenti nell'estratto, l'effetto atteso dell'estratto sull'assorbimento del glucosio doveva risultare modesto, come effettivamente è stato dimostrato dai risultati dello studio clinico.

Sulla base dei risultati delle analisi dei diversi tipi di fibra dell'estratto, è risultato che esso contiene circa 31 g di fibra solubile per 100 g di estratto. Una dose dell'integratore alimentare contiene, pertanto, circa 1,5 g di fibre solubili e 0,75 g di inulina (circa il 7% del consumo di fibra raccomandato, pari a 25 g per le donne adulte e 38 g per gli uomini adulti, valori calcolati sulla base di studi epidemiologici che dimostrano la protezione contro le malattie cardiovascolari) (**36**).

La maggior parte dei composti fenolici presenti nei chicchi d'orzo si trova nella crusca e quindi l'estratto oggetto di studio rappresenta una ricca fonte di polifenoli. Il contenuto di polifenoli totali ottenuto dall'analisi dell'estratto prima del processo di digestione simulata in vitro è risultato pari a 0,49 g GAE/100 g. Questo valore è paragonabile a quelli riportati da Birsan et al. che hanno riscontrato che il contenuto di polifenoli totali dell'estratto grezzo da sottoprodotti dell'orzo variava da 0,28 a 0,38 g GAE/100 g, e da Meneses et al. che hanno riportato che il contenuto di polifenoli totali dei sottoprodotti dell'orzo derivanti dalla birrificazione estratti con acqua risultava essere di 0,39 g GAE/100 g (**37,38**). Dopo il processo di digestione simulata in vitro, il contenuto di polifenoli totali è risultato pari a 1,16 g GAE/100 g di estratto. Sebbene questo risultato rappresenti una sovrastima del contenuto di polifenoli, è comunque indicativo della presenza di polifenoli bioaccessibili che non vengono degradati dalla digestione e che possono svolgere i loro effetti benefici a livello intestinale.

L'acido ferulico è il principale polifenolo libero e legato presente nell'orzo, nel malto e nei sottoprodotti dell'orzo derivanti dalla birrificazione (**39**). È stato dimostrato che l'acido ferulico esercita effetti antidiabetici in molti studi in vitro e in vivo attraverso diversi meccanismi d'azione quali la riduzione dello stress ossidativo nelle isole pancreatiche, che a sua volta ne provoca la necrosi, con conseguente riduzione della secrezione di insulina e aumento delle attività degli enzimi antiossidanti superossido dismutasi e catalasi (**40**). Per valutare quanto acido ferulico rimane disponibile per esercitare i suoi benefici biologici dopo la digestione, è stato determinato il contenuto residuo di acido ferulico libero dopo la digestione oro-gastro-duodenale simulata in vitro. La concentrazione di acido ferulico è risultata essere di circa 90 mg/100 g di estratto di BSG. Il contenuto di acido ferulico dipende dalle varietà di orzo utilizzate, dai processi di maltazione e di produzione della birra e dal metodo di estrazione utilizzato per trattare il campione prima dell'analisi. Mussatto et al. hanno dimostrato che, applicando condizioni ottimizzate di idrolisi alcalina per l'estrazione dell'acido ferulico dai sottoprodotti dell'orzo derivanti dal processo di birrificazione, la sua concentrazione è risultata pari a 9,65 mg per grammo di lignina solubilizzata, corrispondente a 286 mg/100 g di estratto d'orzo (**41**). I risultati ottenuti dall'analisi condotta nella presente indagine hanno mostrato una concentrazione inferiore di acido ferulico rilasciato rispetto ai risultati ottenuti da Mussatto et al. Questo risultato può essere dovuto a variazioni nel trattamento dei campioni che portano a rese diverse nel rilascio di acido ferulico. Tuttavia, abbiamo deciso di applicare un processo di digestione simulata in vitro, poiché è più in linea con il processo digestivo umano e può fornire una visione più accurata della bioaccessibilità e biodisponibilità dell'acido ferulico.

Per quanto riguarda i risultati dello studio clinico sulla glicemia e l'insulinemia postprandiali, numerose evidenze suggeriscono che l'iperglicemia postprandiale è un fattore di rischio per l'insorgenza del diabete e delle malattie cardiovascolari (42,43).

I risultati di questo studio clinico hanno dimostrato che i valori di glicemia misurati dopo l'assunzione dell'integratore alimentare erano significativamente più bassi rispetto ai corrispondenti valori del gruppo placebo solo nella fase di discesa del picco del glucosio, rispettivamente dopo 90 e 120 minuti, mentre al basale (t0) e nei primi 60 minuti (t1-t3) le due curve glicemiche si sovrapponevano sostanzialmente. Giustificiamo l'assenza di un effetto dell'assunzione dell'integratore alimentare con il pasto standard sulla glicemia postprandiale registrata nei primi 60 minuti con il basso contenuto e le scarse proprietà gelificanti delle fibre solubili, in particolare degli AX, presenti nell'estratto, che non inducono una riduzione significativa dell'assorbimento di glucosio. Inoltre, le curve glicemiche dei soggetti che hanno assunto un placebo hanno andamenti tipici di quelle registrate dopo il consumo di un alimento amidaceo. Infatti, come riportato da Brand-Miller et al. (44), gli alimenti ricchi di amido forniscono più glucosio rispetto a quelli zuccherini (per esempio, bibite e succhi di frutta), e quindi hanno generalmente maggiori probabilità di produrre una curva che rimane al di sopra del valore basale a 120 minuti.

L'assunzione dell'integratore alimentare, pur non inibendo l'assorbimento del glucosio nei primi 60 minuti, probabilmente riduce e rallenta leggermente l'assorbimento del glucosio grazie al contenuto di fibre dello stesso. Le spiegazioni del modesto effetto registrato sulla glicemia postprandiale prodotto dall'integratore alimentare possono essere dovute, almeno in parte, alla presenza nell'estratto di zuccheri semplici,

che aumentano la glicemia, e al fatto che l'effetto dell'integratore alimentare è stato confrontato con il placebo che contiene il 15% di inulina, che è una fibra alimentare nota per i suoi effetti ipoglicemizzanti (45,46).

Tuttavia, poiché lo scopo dello studio clinico era quello di testare l'effetto dell'estratto di sottoprodotti dell'orzo, per escludere l'effetto dell'inulina utilizzata come agente di supporto, al placebo è stata aggiunta la stessa quantità di inulina presente nell'integratore alimentare. Sebbene modesta, l'assunzione dell'integratore alimentare ha prodotto un effetto benefico sulla glicemia, in quanto la curva glicemica postprandiale è tornata prima al valore basale.

Questo risultato clinico è stato corroborato da una significativa riduzione della risposta insulinemica postprandiale. In particolare, i valori di insulina nel sangue dei soggetti che hanno assunto l'integratore alimentare sono risultati significativamente più bassi fin dai primi 15 minuti, con differenze crescenti che hanno raggiunto la massima differenza a 120 minuti dal primo prelievo di sangue (t0). La iAUC media dell'insulina dei soggetti che hanno assunto l'integratore alimentare è risultata significativamente inferiore del 19,7% rispetto alla iAUC dei soggetti che hanno assunto il placebo ($p < 0,05$). Nel complesso, questi risultati significano che l'assunzione acuta dell'integratore alimentare oggetto di studio induce un miglioramento della risposta insulinemica postprandiale. Inoltre, occorre sottolineare che, sebbene i valori medi di glicemia, BMI e lipidi ematici dei soggetti reclutati siano normali, tuttavia, sulla base della glicemia a digiuno, dell'insulinemia e della trigliceridemia, la maggior parte dei soggetti ha mostrato una lieve insulino-resistenza, come evidenziato dai valori dell'indice HOMA e dell'indice trigliceridi/glucosio superiori a 2,5 e 4,5, rispettivamente.

Quindi, l'integratore alimentare testato, pur non determinando un abbassamento della curva glicemica postprandiale, ha migliorato la risposta insulinemica in soggetti con lieve insulino-resistenza.

Inoltre, in accordo con i dati della letteratura, abbiamo riscontrato che i valori di glicemia erano significativamente più alti negli uomini rispetto alle donne, indipendentemente dalle sei misure dei due trattamenti sperimentali, anche se queste differenze non hanno rilevanza clinica (47-50), e la glicemia tendeva ad aumentare con l'età, indipendentemente dal sesso.

È noto che l'invecchiamento è associato a un aumento della glicemia a digiuno, dovuto a una riduzione del rilascio di insulina indotto dal glucosio, e a un aumento dei marcatori di infiammazione che, a loro volta, aumentano l'insulino-resistenza nel tessuto muscolare e adiposo (51).

Questo lavoro presenta limiti e punti di forza. I limiti principali sono rappresentati dal fatto che, a causa della natura acuta di questo studio clinico, non è stato possibile determinare l'effetto dell'ingestione continua dell'estratto e l'influenza dei suoi prodotti di fermentazione sul metabolismo del glucosio, rendendo impossibile conoscere gli effetti a lungo termine di questa integrazione. In secondo luogo, non si conosce il suo effetto sui pazienti diabetici e pre-diabetici, poiché i soggetti di questo studio clinico erano limitati a soggetti normoglicemici che presentavano solo una lieve resistenza all'insulina. Infine, la presenza nell'integratore alimentare di zuccheri semplici, che insieme al pasto standard contribuiscono all'aumento della glicemia postprandiale, e l'assenza di un uguale contenuto di zuccheri semplici nel placebo probabilmente causano una sottostima delle effettive proprietà dell'integratore alimentare di ridurre l'aumento della glicemia postprandiale.

D'altra parte, il principale punto di forza di questo studio è che la composizione in fibre e polifenoli dell'integratore alimentare è nota, e quindi gli effetti rilevati sulla glicemia postprandiale e sulla risposta insulinemica possono essere collegati alla presenza simultanea di amido resistente, AX e β -glucani.

CONCLUSIONI

In conclusione, la riduzione dei livelli ematici di glucosio e insulina postprandiali è considerata una strategia corretta nella prevenzione di malattie metaboliche quali, per esempio, il diabete. Vi è inoltre un crescente interesse per lo sviluppo di nuovi prodotti alimentari sostenibili dal punto di vista ambientale ed economico, finalizzati a migliorare il metabolismo del glucosio. L'integratore alimentare testato in questo studio clinico, contenente fibra alimentare solubile e acido ferulico bioaccessibile, è risultato in grado di riportare a 120 minuti i valori di glucosio e insulina nel sangue ai valori registrati al t0, riducendo gli aumenti postprandiali di glucosio e insulina in soggetti normoglicemici che presentavano una lieve insulino-resistenza.

Sono necessari ulteriori studi per determinare se questi benefici acuti si traducono in miglioramenti a lungo termine del controllo glicemico e se l'assunzione di questo integratore alimentare nella dieta quotidiana sia un approccio utile per la gestione dei soggetti con lieve insulino-resistenza. Se questi risultati promettenti saranno confermati da studi a lungo termine, questo integratore alimentare potrebbe essere raccomandato alle persone anziane ad alto rischio di sviluppare la sindrome metabolica e il diabete (cioè soggetti con pre-diabete, in sovrappeso, di età superiore a 45 anni, con un genitore, un fratello o una sorella con diabete di tipo 2, con un'attività fisica inferiore a 3 volte

alla settimana) e alle donne in età fertile con fattori di rischio per lo sviluppo del diabete gestazionale durante la gravidanza.

Finanziamento: Questa ricerca non ha ricevuto finanziamenti esterni.

Ringraziamenti: Gli Autori desiderano esprimere la loro gratitudine ai medici: Bernardi Giuseppe, Boncompagni Salvatore, Caruso Ciro, Costantino Angelo, Garaffa Elio, Laringe Matteo, Mandaliti Vincenzo, Polistina Claudio e Santoro Rodolfo (Comegen S.c.S., Società Cooperativa Sociale di Medici di Medicina Generale, Napoli). I loro generosi contributi in termini di tempo e competenze sono molto apprezzati. Inoltre, gli Autori desiderano esprimere la loro gratitudine a Francesca Coppola per il suo prezioso contributo nella raccolta dei dati. Infine, gli Autori desiderano esprimere la loro gratitudine a Francesca Varvello (Heallo, Milano) per aver fornito i campioni analizzati in questa indagine.

Bibliografia

1. De Filippis A, Ullah H, Baldi A et al. Gastrointestinal Disorders and Metabolic Syndrome: Dysbiosis as a Key Link and Common Bioactive Dietary Components Useful for their Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020; 21(14):4929.
2. Kim C-S, Byeon S, Shin D-M. Sources of Dietary Fiber Are Differently Associated with Prevalence of Depression. *Nutrients*. 2020; 12(9):2813.
3. Xu H, Li S, Song X, Li Z, Zhang D. Exploration of the association between dietary fiber intake and depressive symptoms in adults. *Nutrition*. 2018;54:48-53.
4. Berding K, Carbia C, Cryan JF. Going with the grain: Fiber, cognition, and the microbiota-gut-brain-axis. *Exp Biol Med* (Maywood). 2021;246(7):796-811.
5. Pascale A, Marchesi N, Govoni S et al. The role of gut microbiota in obesity, diabetes

6. mellitus, and effect of metformin: New insights into old diseases. *Curr Opin Pharmacol*. 2019;49:1-5.
6. Chen Z, Li S, Fu Y et al. Arabinoxylan structural characteristics, interaction with gut microbiota and potential health functions. *J Funct Foods*. 2019;54:536-551.
7. Zhang S, Li W, Smith CJ, Musa H. Cereal-derived arabinoxylans as biological response modifiers: extraction, molecular features, and immune-stimulating properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2015;55(8):1035-1052.
8. Ain HBU, Saeed F, Ahmad N et al. Functional and health-endorsing properties of wheat and barley cell wall's non-starch polysaccharides. *Int J Food Prop*. 2018;21:1463-1480.
9. Ndeh D, Gilbert HJ. Biochemistry of complex glycan depolymerisation by the human gut microbiota. *FEMS Microbiol Rev*. 2018;42:146-164.
10. Lynch KM, Strain CR, Johnson C et al. Extraction and characterisation of arabinoxylan from brewers spent grain and investigation of microbiome modulation potential. *Eur J Nutr*. 2021;60:4393-4411.
11. Chen H, Chen Z, Fu Y et al. Structure, Antioxidant, and Hypoglycemic Activities of Arabinoxylans Extracted by Multiple Methods from Triticale. *Antioxidants* (Basel). 2019;8(12):584.
12. Yuwang P, Sulaeva I, Hell J et al. Phenolic compounds and antioxidant properties of arabinoxylan hydrolysates from defatted rice bran. *J Sci Food Agric*. 2018;98(1):140-146.
13. Lu ZX, Walker KZ, Muir JG, Mascara T, O'Dea K. Arabinoxylan fiber, a byproduct of wheat flour processing, reduces the postprandial glucose response in normoglycemic subjects. *Am J Clin Nutr*. 2000;71(5):1123-1128.
14. Lu ZX, Walker KZ, Muir JG, O'Dea K. Arabinoxylan fibre improves metabolic control in people with Type II diabetes. *Eur J Clin Nutr*. 2004;58(4):621-628.
15. Möhlig M, Koebnick C, Weickert MO et al. Arabinoxylan-enriched meal

- increases serum ghrelin levels in healthy humans. *Horm Metab Res.* 2005;37(5):303-308.
16. Venn BJ, Green TJ. Glycemic index and glycemic load: measurement issues and their effect on diet-disease relationships. *Eur J Clin Nutr.* 2007;61(Suppl 1):S122-S131.
 17. Christensen KL, Hedemann MS, Lærke HN et al. Concentrated Arabinoxylan but not Concentrated β -Glucan in Wheat Bread Has Similar Effects on Postprandial Insulin as Whole-Grain Rye in Porto-arterial Catheterized Pigs. *J Agric Food Chem.* 2013;61:7760-7768.
 18. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the Substantiation of Health Claims Related to Arabinoxylan Produced from Wheat Endosperm and Reduction of Post-prandial Glycaemic Responses (ID 830) Pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J.* 2011;9:2205.
 19. Jackowski M, Niedźwiecki Ł, Jagiełło K et al. Brewer's Spent Grains—Valuable Beer Industry By-Product. *Biomolecules.* 2020; 10(12):1669.
 20. Mitri S, Salameh S-J, Khelfa A et al. Valorization of Brewers' Spent Grains: Pretreatments and Fermentation, a Review. *Fermentation.* 2022;8(2):50.
 21. Buffington, J. The Economic Potential of Brewer's Spent Grain (BSC) as a Biomass Feedstock. *Adv Chem Eng Sci.* 2014;4:308-318.
 22. Megazyme Total Dietary Fiber. Available online: <https://www.megazyme.com/total-dietary-fiber-assay-kit> (accessed on 24 February 2022).
 23. Bonjoch NP, Tamayo PR. Protein content quantification by Bradford method. In *Handbook of Plant Ecophysiology Techniques*; Roger, M.J.R., Ed.; Springer: Dordrecht, Netherlands, 2001; pp. 283-295.
 24. Megazyme D-Xylose. Available online: <https://www.megazyme.com/d-xylose-assay-kit> (accessed on 1 February 2020).
 25. Megazyme L-Arabinose & D-Galactose. Available online: <https://www.megazyme.com/l-arabinose-d-galactose-assay-kit?Search=L-Arabinose%20&%20D-Galactose> (accessed on 1 February 2022).
 26. Buksa K, Praznik W, Loeppert R, Nowotna A. Characterization of water and alkali extractable arabinoxylan from wheat and rye under standardized conditions. *J Food Sci Technol.* 2016;53(3):1389-1398.
 27. Minekus M, Alminger M, Alvito P et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct.* 2014;5(6):1113-1124.
 28. Ullah H, Sommella E, Santarcangelo C et al. Hydroethanolic Extract of *Prunus domestica* L.: Metabolite Profiling and In Vitro Modulation of Molecular Mechanisms Associated to Cardiometabolic Diseases. *Nutrients.* 2022;14(2):340.
 29. Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Soft.* 2015;67:1-48.
 30. R Core Team R. A Language and Environment for Statistical Computing; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020. Available online: <http://www.r-project.org/index.html> (accessed on 3 April 2022).
 31. Escarpa A, González M. Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Anal Chim Acta.* 2001;427:119-127.
 32. Calvert M, Blazeby J, Altman DG et al. Reporting of patient-reported outcomes in randomized trials: the CONSORT PRO extension. *JAMA.* 2013;309(8):814-822.
 33. Simental-Mendía LE, Rodríguez-Morán M, Guerrero-Romero F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metab Syndr Relat Disord.* 2008;6(4):299-304.
 34. Baez-Duarte BG, Zamora-Gínez I, González-Duarte R et al. Triglyceride/high-density lipoprotein cholesterol (TG/HDL-C) index as a reference criterion of risk for metabolic syndrome (MetS) and low insulin sensitivity in apparently healthy subjects. Índice de triglicéridos/lipoproteína de alta densidad unida a colesterol (TG/HDL-C) como criterio de riesgo para síndrome metabólico (SMet) y baja sensibilidad a la insulina en sujetos aparentemente sanos. *Gac Med Mex.* 2017;153(2):152-158.
 35. Heallo Srl. Idrolizzato Di Fibra Vegetale E Suoi Usi Nell'alimentazione Umana Ed Animale. Italian Patent N. 10201900005588, 2 March 2021.
 36. Slavin JL. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc.* 2008;108(10):1716-1731.
 37. Birsan RI, Wilde P, Waldron KW, Rai DK. Recovery of Polyphenols from Brewer's Spent Grains. *Antioxidants.* 2019; 8(9):380.
 38. Meneses NGT, Martins S, Teixeira JA, Mussatto SI. Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Sep Purif Technol.* 2013;108:152-158.
 39. Carvalho DO, Guido LF. A review on the fate of phenolic compounds during malting and brewing: Technological strategies and beer styles. *Food Chem.* 2021;372:130193.
 40. Nankar R, Prabhakar P, Doble M. Hybrid drug combination: Combination of ferulic acid and metformin as anti-diabetic therapy. *Phytomedicine.* 2017;37:10-13.
 41. Mussatto SI, Dragone G, Roberto IC. Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain. *Ind Crop Prod.* 2007;25:231-237.
 42. Papakonstantinou E, Oikonomou C, Nychas G, Dimitriadis GD. Effects of Diet, Lifestyle, Chrononutrition and Alternative Dietary Interventions on Postprandial Glycemia and Insulin Resistance. *Nutrients.* 2022; 14(4):823.
 43. Dimitriadis GD, Maratou E, Kountouri A, Board M, Lambadiari V. Regulation of Postabsorptive and Postprandial Glucose

- Metabolism by Insulin-Dependent and Insulin-Independent Mechanisms: An Integrative Approach. *Nutrients*. 2021; 13(1):159.
44. Brand-Miller JC, Stockmann K, Atkinson F. Glycemic index, postprandial glycemia, and the shape of the curve in healthy subjects: Analysis of a database of more than 1000 foods. *Am J Clin Nutr*. 2009;89:97-105.
45. Lightowler H, Thondre S, Holz A, Theis S. Replacement of glycaemic carbohydrates by inulin-type fructans from chicory (oligofructose, inulin) reduces the postprandial blood glucose and insulin response to foods: report of two double-blind, randomized, controlled trials. *Eur J Nutr*. 2018;57(3):1259-1268.
46. Chambers ES, Byrne CS, Morrison DJ et al. Dietary supplementation with inulin-propionate ester or inulin improves insulin sensitivity in adults with overweight and obesity with distinct effects on the gut microbiota, plasma metabolome and systemic inflammatory responses: a randomised cross-over trial. *Gut*. 2019;68(8):1430-1438.
47. Mauvais-Jarvis F. Gender differences in glucose homeostasis and diabetes. *Physiol Behav*. 2018;187:20-23.
48. Lartey AH, Li X, Li Z et al. Age- and sex-specific profiles of temporal fasting plasma glucose variability in a population undergoing routine health screening. *BMC Public Health*. 2021;21(1):320.
49. Sicree RA, Zimmet PZ, Dunstan DW. Differences in height explain gender differences in the response to the oral glucose tolerance test- the AusDiab study. *Diabet Med*. 2008;25(3):296-302.
50. Basu R, Dalla Man C, Campioni M et al. Effects of age and sex on postprandial glucose metabolism: differences in glucose turnover, insulin secretion, insulin action, and hepatic insulin extraction. *Diabetes*. 2006;55(7):2001-2014.
51. Umpierrez GE, Pasquel FJ. Management of Inpatient Hyperglycemia and Diabetes in Older Adults. *Diabetes Care*. 2017;40(4):509-517.

EDITORE