

# **Effetti del consumo a breve termine di pane ottenuto da una vecchia varietà di frumento italiano sulle variabili lipidiche, infiammatorie ed emoreologiche: uno studio di intervento**

Francesco Sofi<sup>1,2,3,4</sup>, Lisetta Ghiselli<sup>4,5</sup>, Francesca Cesari<sup>1</sup>, Anna Maria Gori<sup>1,2</sup>, Lucia Mannini<sup>1</sup>, Alessandro Casini<sup>3,4</sup>, Concetta Vazzana<sup>4,5</sup>, Vincenzo Vecchio<sup>4,5</sup>, Gian Franco Gensini<sup>1,2</sup>, Rosanna Abbate<sup>1,4</sup> e Stefano Benedettelli<sup>4,5</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Area Critica Medico Chirurgica, Centro Trombosi, Università di Firenze, e <sup>3</sup>Agenzia Regionale per l'alimentazione, Ospedale universitario Careggi, Firenze; <sup>4</sup>Centro Multidisciplinare di Ricerca sulle scienze alimentari e <sup>5</sup>Dipartimento di Agronomia e gestione del territorio dell'Università di Firenze, Firenze; e <sup>2</sup>Fondazione Don Carlo Gnocchi, Impruneta, Firenze

**ABSTRACT:** Scopo di questo studio è valutare l'influenza del consumo alimentare a breve termine di pane ottenuto da una vecchia varietà selezionata di frumento che cresce in Toscana, Italia, su alcuni parametri relativi al processo aterosclerotico. Venti soggetti sani (età media 39,5 anni) hanno seguito per 10 settimane una dieta contenente il pane (150 gr al giorno) prodotto con il frumento testato (periodo di prova) e per lo stesso periodo una dieta contenente pane disponibile in commercio nella stessa quantità (periodo di controllo). I profili lipidici, infiammatori ed emoreologici sono stati valutati prima e dopo l'intervento alimentare. Il periodo di prova ha mostrato un significativo incremento ( $P < ,05$ ) del colesterolo totale (prima dell'intervento  $211,2 \pm 10,8$  mg/dL; dopo l'intervento  $196,5 \pm 9,8$  mg/dL) e dei livelli di colesterolo lipoproteico a bassa densità (prima dell'intervento  $137,5 \pm 8,1$  mg/dL; dopo l'intervento  $119,5 \pm 7,5$  mg/dL), mentre non sono stati osservati dei cambiamenti significativi nel periodo di controllo. Per quanto riguarda i parametri infiammatori ed emoreologici, il periodo di prova ha mostrato un significativo decremento di alcuni dei parametri oggetto d'indagine (interleuchina-8 [pre-intervento vs. post-intervento  $67,4 \pm 10,7$  vs.  $43,9 \pm 4,1$  pg/mL], viscosità del sangue umano a velocità di taglio alta [rispettivamente  $4,36 \pm 0,03$  vs.  $4,32 \pm 0,03$  mPa \*s] e bassa [rispettivamente  $26,1 \pm 0,4$  vs.  $24,8 \pm 0,5$  mPa \*s], e filtrazione degli eritrociti [rispettivamente  $8,4 \pm 0,7\%$  vs.  $9,1 \pm 0,6\%$ ]) relativi al periodo di controllo, che non ha mostrato significativi cambiamenti. Il consumo alimentare a breve termine di pane integrale ottenuto da una vecchia varietà di frumento sembra imporre condizioni ottimali per quanto riguarda i più bassi livelli correnti di markers aterosclerotici.

**PAROLE CHIAVE:** pane, carboidrati, disturbi cardiovascolari, cereali

## **INTRODUZIONE**

E' stato riferito che prodotti cerealicoli integrali hanno svariati effetti positivi sulla salute umana. Tutte le maggiori associazioni scientifiche forniscono raccomandazioni nutrizionali per prevenire le principali malattie inserendo i carboidrati al primo posto della piramide per un'alimentazione salutare. I benefici dei carboidrati sul rischio di disturbi cardiovascolari sono principalmente determinati dalla loro struttura e contenuto. Alimenti contenenti carboidrati hanno varie sostanze nutritive che possono ridurre i fattori di rischio per disturbi cardiovascolari come ad esempio alcuni acidi fenolici con proprietà antiossidanti, vitamina E, acido linoleico e fitoestrogeni. In realtà, il pane ottenuto da farina semi-integrale prodotta con mulino a pietra e acido lievificante (lievito) contiene un grande quantità di vitamina B<sub>6</sub> e acido folico, entrambi vitamine del gruppo B. I cereali, ed in particolare i prodotti con farina integrale, sono un

importante fonte di minerali e di piccole quantità di magnesio, ferro, zinco e rame. Questi elementi sono presenti principalmente nello strato **aleuronico** del pane di cereali integrali.

Recentemente è stato dimostrato che le diverse componenti benefiche dei cereali dipendono dalla produzione, dall'immagazzinamento, dal processamento e dalle condizioni climatiche dei cereali originari. Difatti, è stato riportato che differenti varietà di germe contengono differenti livelli di vitamine del gruppo B e antiossidanti. Perciò, l'identificazione di alcune particolari varietà di germe che determinano particolari tipi di cereali ricchi di questi supposti elementi benefici sembra essere di grande importanza per ottimizzare un'alimentazione che prevenga le più gravi malattie croniche. A questo proposito, vecchie varietà integrali sembrano avere una composizione più variabile di questi metaboliti secondari. Negli ultimi 50 anni le strategie di riproduzione si sono rivolte a migliorare la produzione dei raccolti, ad aumentare il contenuto proteico dei semi e ad adattare le piante integrali ad un'alta immissione di fertilizzanti chimici. Ciò ha condotto ad un progressivo abbandono delle vecchie varietà, che non sono adatte al sistema di coltivazione ad alta immissione. Comunque, le vecchie varietà possono essere trovate sia in raccolte germoplasma che in tagli della semente. In particolare, la vecchia varietà Verna è attualmente commercializzata in Toscana.

Lo scopo di questo studio di intervento alimentare trasversale è stato, perciò, quello di accertare i possibili effetti di un consumo a breve termine di una vecchia varietà di frumento selezionata su alcuni markers aterosclerotici come i profili lipidici, infiammatori e emoreologici.

#### **MATERIALI E METODI**

##### *Studio della popolazione*

Venti soggetti clinicamente sani (nove donne e 11 uomini) sono stati reclutati nell'ambito di un protocollo approvato dall'assemblea di controllo istituzionale, e tutti hanno dato il proprio consenso informato. Partecipanti sottoposti a trattamenti medici, che facevano uso di integratori alimentari o che seguivano una qualche dieta particolare, sono stati esclusi dallo studio. I partecipanti erano soggetti che riferivano di essere appassionati di prodotti cerealicoli e desiderosi di intraprendere un periodo di consumo di cereali. Allo scopo di identificare soggetti privi di sintomi ed escludere chi fosse sospettato di avere una qualsiasi forma di disturbo vascolare ed infiammatorio, è stata condotta una dettagliata intervista concernente la loro storia personale e familiare. Al momento dell'esame fisico è stata determinata anche la loro attuale posizione rispetto al fumo. L'indice di massa corporea (IMC) è stato calcolato in base a peso (kg)/altezza (m).

Il pane utilizzato per l'esperimento deriva dalla coltivazione della varietà Verna, una vecchia varietà commerciale di pane integrale italiano che cresce in colture organiche. Per la produzione del pane è stata adoperata farina prodotta dal mulino in pietra (semi-integrale). Questo pane è stato ottenuto da impasto acido cresciuto per 4-5 ore. La composizione chimica della farina Verna – in particolare, le proteine totali (analisi elementare CHN), i lipidi (metodo Soxhlet), polifenoli totali (cromatografia liquida ad alta prestazione) e flavonoidi totali (metodo colorimetrico) – è stata rilevata e confrontata con quella delle nuove varietà (sei) di pane integrale (Tabella 1). Sono state determinate le concentrazioni dei principali minerali, ovvero zinco, ferro, rame, magnesio, calcio, potassio, fosforo, manganese e sodio nella digestione dei cereali per mezzo di uno spettrometro a emissioni atomiche con plasma ad accoppiamento induttivo (Tabella 2). La farina Verna semi-integrale era caratterizzata da un contenuto di proteine totali, polifenoli e flavonoidi superiore a quello delle nuove varietà (Tabella 1). Inoltre, il contenuto di minerali – in particolare rame, ferro, magnesio, fosforo e zinco, che sono essenziali per l'alimentazione umana – è significativamente più alto nella varietà di farina Verna in confronto alle nuove (Tabella 2).

### *Progetto di studio*

Il progetto è stato quello di uno studio di intervento alimentare aperto e trasversale con trattamenti di due periodi di 10 settimane, sospesi da un periodo di interruzione di 10 settimane. Prima di iniziare, è stato condotto un periodo di prova per tutti i soggetti. Dopo questo periodo, i partecipanti sono stati individualmente istruiti a seguire un periodo di studio di 10 settimane (periodo di intervento) con il pane testato nella quantità di 150 gr al giorno. I soggetti sono stati incoraggiati ad attenersi alla loro dieta giornaliera abituale e ad includere tale quantità fissa di pane nel loro schema dietetico giornaliero. La quantità di pane da consumare è stata fornita tre volte a settimana a ciascun partecipante, in formati porzionati, pesati e del tutto gratuiti. Dopo il periodo di intervento, tutti i soggetti hanno seguito un periodo di interruzione di 10 settimane (periodo di interruzione). In seguito, per le successive 10 settimane (periodo di controllo), è stata data a tutti i soggetti una varietà di pane commercialmente disponibile nella stessa quantità e caratteristiche del pane usato per il test. Questo pane commerciale è ottenuto da farina derivata da un misto delle nuove varietà commerciali, tra cui le più usate sono Bilancia, Bolero, Eureka, Mieti, Nobel e Palesio.

Campioni di sangue a digiuno sono stati prelevati all'inizio e alla fine di ogni periodo.

### *Misurazioni di sangue*

Campioni di sangue venoso anticoagulato con 0,129 M di citrato di sodio (percentuale di volume 9:1) sono stati raccolti dalla vena antecubitale in provette di plastica a vuoto (Vacutainer, BD, Franklin Lakes, New Jersey, USA) dopo un digiuno di una notte. Sangue umano venoso è stato anche raccolto in provette senza anticoagulanti. Campioni di citrato e di siero sono stati centrifugati a 2000 giri per 10 minuti a 4° C e i supernatanti sono stati immagazzinati in aliquote a -80° fino alle analisi. Le variabili lipidiche sono state valutate tramite metodi convenzionali. L'interleuchina (IL)-6, IL-8, IL-10, IL-12, il fattore-x di necrosi tumorale e i livelli del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) sono stati determinati adoperando un saggio di citochine Bio-Plex (Laboratori Bio-Rad, Hercules, California, USA), secondo le istruzioni del produttore.

Per quanto riguarda le variabili emoreologiche, la viscosità del sangue umano (WBV) e la viscosità del plasma (PLV) è stata misurata adoperando un viscosimetro rotazionale LS 30 (Contraves, Zurigo, Svizzera), mentre la filtrazione degli eritrociti è stata misurata con un filtrometro modello MF4 supportato da un microcomputer (Myrenne GmbH, Roetgen, Germania). L'indice di deformazione degli eritrociti è stato stimato da una curva che indica la filtrazione degli eritrociti attraverso una registrazione di 10 minuti in modo da determinare le proprietà reologiche degli eritrociti, facendoli passare attraverso filtri di policarbonato con 5- $\mu$ m di micropore (Nucleopore, Pleasanton, California, USA). E' stata adoperata la percentuale di flusso iniziale ottenuta dalle curve generate dal microcomputer, per verificare l'indice di deformabilità degli eritrociti. La WBV è stata analizzata a percentuali di taglio di 0,512 secondi<sup>-1</sup> e 94,5 secondi<sup>-1</sup>.

### *Analisi statistiche*

Le analisi statistiche sono state condotte adoperando un software SPSS (Software di Statistica per le Scienze Sociali, Chicago, Illinois, USA) per Windows (versione 13.0). I risultati sono espressi sia sotto forma di media  $\pm$  SD, sia come mediana e portata, come più era opportuno. Le analisi sono state semplificate calcolando il cambiamento assoluto per ciascuna variabile testata (valore medio di riferimento sottratto al valore medio dopo l'intervento per ogni soggetto) con test indipendenti *t* a campione. Non è stato osservato nessun effetto conseguente. Perciò, tutti i dati sono stati trattati come campioni accoppiati di uno studio trasversale. I dati che non erano normalmente distribuiti, sono stati trasformati logaritmicamente o analizzati da test non parametrici dei segni per ranghi Wilcoxon. I dati sono stati analizzati usando test *t* accoppiati per

differenze significative tra i cambiamenti osservati durante i periodi di intervento di prova e di controllo. Inoltre, al fine di confrontare l'effetto del pane testato vs. il riferimento vs. il pane placebo, è stato adoperato un modello lineare generale per misure ripetute, dopo averlo adattato in base all'età e al sesso. È stato impiegato anche un fattore di aggiustamento Bonferroni per confronti multipli. Per indicare la rilevanza statistica è stato considerato un valore di  $P < 0,05$ .

### **RISULTATI**

Le caratteristiche di riferimento e demografiche dei soggetti coinvolti nello studio sono mostrate nella Tabella 3. L'età media della popolazione studiata era 39,5 anni (con un intervallo dai 21 ai 61 anni). Cinque soggetti erano al momento fumatori. Non sono state osservate significative differenze tra uomini e donne rispetto ad età, IMC, abitudini di fumo e storia familiare di disturbi cardiovascolari.

Al fine di valutare i possibili effetti degli interventi alimentari sui parametri oggetto d'indagine, abbiamo adoperato un modello lineare generale per misurazioni ripetute, dopo averlo adattato in base all'età, al sesso, e ai cambiamenti dell'IMC. La Tabella 4 mostra i valori medi adattati dei parametri lipidici, infiammatori ed emoreologici prima e dopo gli interventi alimentari con il pane oggetto del test e di controllo. Non sono stati osservati significativi cambiamenti nella pressione sanguigna e nell'IMC in nessuno dei due periodi.

Durante il periodo di intervento con il pane testato, sono stati registrati significativi decrementi del colesterolo totale e del colesterolo lipoproteico a bassa densità (LDL), ma non del colesterolo lipoproteico ad alta densità (HDL) e dei trigliceridi. Infatti, i partecipanti allo studio hanno riportato rispettivamente un 7,4% e un 13,1% di decremento nei livelli di colesterolo totale e colesterolo LDL nel periodo di prova. Per contro, non è stato osservato nessun cambiamento rilevante durante il periodo di intervento con il pane di controllo.

Per quanto riguarda gli schemi infiammatori, sono state misurate alcune citochine pro e anti-infiammatorie in tutti i partecipanti allo studio. Il periodo di prova, ma non il periodo di controllo, ha rivelato un cambiamento significativo solo per il livello IL-8 (-34,9%), mentre non ci sono state modificazioni rilevanti per tutte le altre citochine.

Inoltre, sono state analizzate variabili relative alle caratteristiche reologiche del sangue sulla base dei due differenti interventi alimentari. Dopo gli adattamenti sulla base di età, sesso e cambiamenti di IMC, la WBV è significativamente migliorata sia ad alte che a basse percentuali di taglio, mentre non sono stati osservati significativi cambiamenti durante il periodo di controllo. In aggiunta, i cambiamenti nella filtrabilità degli eritrociti durante il periodo di intervento erano significativamente differenti da quelli osservati durante il periodo di controllo. Si sono ottenute anche analisi correlate condotte tra i cambiamenti dei parametri osservati tra le fasi precedenti e successive all'intervento. Cambiamenti nei livelli di colesterolo e IL-8 sono stati messi in correlazione in maniera rilevante e diretta ( $r=0,61$ ;  $P=,0001$ ) durante il periodo di prova, mentre non sono state osservate correlazioni significative durante il periodo di controllo.

### **ANALISI**

In questo tentativo di alimentazione trasversale di 10 settimane in soggetti clinicamente sani, abbiamo rilevato che il consumo di pane semi-integrale ottenuto dalla varietà Verna, una vecchia varietà di pane integrale italiano, è in grado di migliorare i profili lipidici, infiammatori ed emoreologici. Per contro, un consumo della stessa durata di pane disponibile in commercio non ha mostrato tali significativi effetti sul profilo di rischio aterosclerotico di questi soggetti. Questo è uno dei pochi articoli che mostra che il pane prodotto dalla farina macinata con mulino a pietra da una vecchia varietà di frumento, produce effetti positivi su alcuni schemi relativi alle malattie aterosclerotiche.

L'importanza e i benefici sulla salute del consumo di cereali integrali per la prevenzione di disturbi cronici come malattie neoplastiche e cardiovascolari sono stati ampiamente documentati. Comunque, l'attenzione data al consumo di cereali è ben poca rispetto a quella rivolta ad altri cibi quali frutta e verdura, sebbene le linee guida nutrizionali mettano i cereali e in prodotti del grano alla base della piramide alimentare per sottolineare la loro importanza per una salute ottimale. Il consumo di carboidrati è tipico della popolazione Italiana, poiché l'Italia mostra il più alto consumo di carboidrati ottenuti da cereali raffinati. La principale risorsa di carboidrati per gli italiani è il pane e vari tipi di pasta, che raggiungono insieme il 40% del consumo totale di carboidrati.

Risalendo a svariati studi possibili, il consumo di prodotti cerealicoli con alto contenuto di farina integrale, macinata con tutti i componenti commestibili del frumento, è stato in maniera opposta associato alla mortalità e ad un'incidenza di diabete e disturbi cardiaci ischemici. Per contro, in questo studio il consumo di farina raffinata, formata principalmente da endosperma amidaceo, non è stata associata a diabete e disturbi cardiaci ischemici. È stato ipotizzato che i benefici sulla salute osservati grazie al consumo di cereali integrali possono essere attribuiti agli effetti sinergici delle fibre alimentari ed ai micronutrienti trovati negli alimenti integrali. Infatti, i componenti della crusca e del germe del grano integrale sono ricchi di fibre, vitamine, minerali e fitoestrogeni.

Il nostro studio mostra un evidente effetto benefico dell'assunzione di tale vecchia varietà di pane integrale sulle variabili lipidiche, infiammatorie ed emoreologiche, in un periodo di intervento alimentare di 10 settimane. Per completezza di informazione, questo è il primo rapporto su una possibile influenza di un intervento alimentare con questa varietà di pane sui profili emoreologici.

Studi epidemiologici hanno mostrato che l'incremento della viscosità nel sangue è associato a gravi fattori di rischio cardiovascolari così come a disturbi cardiovascolari prevalenti e incidenti. I meccanismi per cui l'aumento di fattori reologici possano promuovere eventi cardiovascolari sono differenti e includono aumenti nella pressione sanguigna, sforzo di taglio, ischemie e interazioni della parete dei vasi sanguigni. Tratto rilevante del flusso reologico è la morfologia degli eritrociti perché la deformabilità delle cellule circolatorie influenza ampiamente le proprietà reologiche del sangue, giocando così un ruolo chiave nel mantenere e regolare la microcircolazione. In condizioni patologiche, la deformabilità degli eritrociti è alterata, influenzando così l'ambiente reologico a livello microcircolatorio. Noi abbiamo preventivamente trovato un'influenza delle abitudini alimentari sui parametri emoreologici.

In questo studio è stato osservato un significativo miglioramento di tutti i parametri emoreologici dopo l'intervento alimentare con il pane test a confronto col pane placebo, migliorando così la deformabilità dei globuli rossi e delle caratteristiche reologiche del sangue.

I meccanismi per cui tale pane integrale possa contribuire a benefici sulla salute restano da spiegare in maniera completa. Si sa che i cereali integrali sono una ricca fonte di fibre, minerali (magnesio, potassio, fosforo, selenio, manganese, zinco e ferro), vitamine (gruppo B e vitamina E), e annessi antiossidanti. Tutti questi componenti possono avere importanti funzioni biologiche così che grazie ad essi, o grazie all'interazione con altre sostanze, ci possono essere importanti contributi nella riduzione di rischi cardiovascolari. Nel nostro studio, il consumo di pane "salutare" è stato inversamente associato a livelli correnti dei markers infiammatori. Sebbene altri studi osservativi sui cereali integrali non abbiano incluso misurazioni dell'infiammazione, svariati studi hanno stimato misurazioni della quantità di carboidrati in relazione ai markers infiammatori.

Degno di nota è che nel nostro studio, similmente a quanto osservato nello studio Framingham Offspring Cohort, abbiamo trovato un effetto benefico del consumo di pane sul colesterolo totale e LDL. D'altro canto, però, nel nostro studio non siamo stati in grado di

osservare alcuna influenza del pane testato sul colesterolo HDL e sui trigliceridi. Questi risultati sono in linea con alcuni studi ma in conflitto con altri. Le discrepanze osservate possono essere spiegate da numerosi fattori. Prima di tutto, il consumo di prodotti cerealicoli è stato stimato sulla base delle porzioni e non sulla quantità, cosa che rende difficoltoso il confronto fra i diversi risultati; inoltre, i cereali consumati in questi studi sono differenti dal pane consumato nel nostro studio di intervento, e analogamente essi presentano un differente contenuto di fibre, minerali e vitamine con un differente effetto sui trigliceridi.

Il nostro studio presenta anche delle importanti limitazioni. Una di esse è la ristretta ampiezza del campione di studio. C'è bisogno di ulteriori e più ampi studi prima di tracciare una qualsiasi conclusione certa sugli effetti di tali prodotti alimentari sulla salute umana. I risultati del presente studio sono semplicemente una base promettente per valutare in maniera più completa questo aspetto della nutrizione clinica.

Un altro limite è la mancanza di stabilità nelle abitudini alimentari e nell'attività fisica della popolazione presa in esame. Non può essere esclusa la possibilità che cambiamenti negli stili alimentari e di vita influenzino significativamente i parametri indagati, sebbene, prima del coinvolgimento, tutti i soggetti siano stati istruiti da medici ed esperti nutrizionisti in modo da mantenere il loro abituale stile di vita.

### **CONCLUSIONI**

L'assunzione a breve tempo di pane integrale ottenuto da una vecchia varietà di frumento sembra imponga condizioni ottimali dei più bassi livelli correnti di markers dell'aterosclerosi. Un consumo regolare di tale vecchia varietà di pane integrale può essere utile a ridurre la quantità di rischi cardiovascolari della popolazione in generale.

### **RICONOSCIMENTI**

Questo studio è stato finanziato dal Ministero italiano della Pubblica Istruzione MIUR, dalla Fondazione Monte dei Paschi di Siena e dall'Ente Cassa di Risparmio di Firenze. Desideriamo ringraziare i sig.ri Franco Petrini, Andrea Grifoni e Luciano Piazzetti per aver rispettivamente coltivato la varietà di grano Verna, macinato i chicchi e preparato il pane.

### **DICHIARAZIONI DELL'AUTORE**

Non esistono interessi finanziari concorrenti.