

Protocollo clinico per la valutazione degli effetti del consumo di Succo di Mela e Bergamotto (Succo Bermè®)

Responsabile dello studio clinico:

Prof. Antonino De Lorenzo, Sezione di Nutrizione clinica e nutrigenomica, Università degli studi di Roma Tor Vergata

e-mail: delorenzo@uniroma2.it

Referente e coordinatore dello studio clinico:

Prof.ssa Laura Di Renzo, Sezione di Nutrizione clinica e nutrigenomica, CIFAPPS (Centro Interdipartimentale per la Ricerca e la Formazione), Università degli studi di Roma Tor Vergata

e-mail: laura.di.renzo@uniroma2.it

Premessa:

La mela è uno dei frutti più prodotti al mondo con più di 69.5 milioni di tonnellate prodotte nel 2010 su un'area di 4.7 ettari (FAO, <http://faostat3.fao.org/>)

I principali costituenti della mela includono l'acido idrossicinnamico, diidrocalconi, flavonoli, catechine e procianidine come i triterpenoidi nella buccia e gli antociani nelle mele rosse. A questi costituenti è associato un ampio spettro di attività biologiche benefiche contro patologie cardiovascolari, asma e disfunzioni polmonari, diabete, obesità e cancro (Boyer and Liu, Nutr J 2004).

Il bergamotto (*Citrus bergamia* Risso), tipico della provincia di Reggio Calabria, è un agrume caratterizzato da una composizione unica di flavonoidi e glicosidi presenti nel succo e nell'albedo come neoeriocitrina, neoesperidina, naringina, rutina, neodesmina, roifolina e poncirina. Questo frutto differisce dagli altri agrumi non solo per la sua composizione in flavonoidi ma anche per le elevate concentrazioni. Tuttavia, è l'agrume meno commercializzato, utilizzato principalmente per il suo olio essenziale estratto dalla buccia.

Al contrario, il succo di bergamotto, ottenuto dall'endocarpo del frutto, è considerato solo un prodotto secondario e di scarto. Gli studi effettuati da Miceli et al. [Miceli et al., Hypolipidemic effects of *Citrus bergamia* Risso et Poiteau juice in rats fed a

hypercholesterolemic diet. Journal of Agricultural and Food Chemistry 55(26):10671–10677. 2007] hanno dimostrato che la somministrazione cronica del succo è efficace per impedire, nel ratto, l'iperlipidemia indotta da dieta, suggerendo una relazione tra l'effetto benefico e le sue proprietà antiossidanti. Inoltre, una ricerca clinica ha mostrato che la frazione polifenolica ottenuta dal bergamotto, somministrata per via orale in pazienti affetti da sindrome metabolica, produce significativa riduzione del colesterolo sierico, trigliceridi e glicemia iperlipidemici [Mollace et al., Hypolipemic and Hypoglycaemic Activity of Bergamot Polyphenols: From Animal Models to Human Studies. Fitoterapia, 82, 309-316. 2011], rafforzando la constatazione ottenuta nel modello animale.

Più recentemente, è stato dimostrato che il succo di bergamotto è anche in grado di inibire importanti percorsi molecolari legati al cancro-associato a fenotipo aggressivo, riducendo così la crescita, l'adesione e la migrazione sia in modelli in-vitro [Delle Monache et al. Mechanisms Underlying the Anti-Tumoral Effects of Citrus bergamia Juice. Plos One 8(4). 2013]. e in-vivo [Navarra et al., et al. Effect of Citrus bergamia juice on human neuroblastoma cells in vitro and in metastatic xenograft models. Fitoterapia 95: 83–92. 2014].

Infine, studi su una linea cellulare di cancro colon-rettale hanno evidenziato che l'effetto antiproliferativo del succo di bergamotto è dovuto alla sua frazione flavonoide che è in grado di agire attraverso meccanismi multipli a seconda della concentrazione somministrata [Visalli et al., Bergamot Juice Extract Inhibits Proliferation by Inducing Apoptosis in Human Colon Cancer Cells. Anticancer Agents Med Chem 14 (9). 2014].

Tra i diversi flavonoidi vi è la naringina, derivato glicosidico della naringenina che, a sua volta, assieme all'esperetina, possiede una struttura simile al substrato dell'enzima HMG-CoA reduttasi epatica, inibendolo mediante un'azione statin-like. Ne deriva una riduzione dei livelli di colesterolo totale e una inibizione dell'ossidazione di LDL, nonché una riduzione delle placche aterosclerotiche. Questi polifenoli riducono l'attività dell'enzima Acil CoA: colesterolo aciltransferasi (ACAT), inibendo l'assemblamento delle lipoproteine. Al tempo stesso è stata dimostrato anche un miglioramento dell'insulino-resistenza in quanto la naringenina determina un miglior assorbimento di glucosio ematico da parte dei recettori GLUT4, incrementando l'attività dell'AMP chinasi (AMPK) [Polyphenols in Human Health and Disease, Ronald Ross Watson, Victor R. Preedy, Sherma Zibadi, 2013].

Obiettivo generale

Il protocollo clinico ha lo scopo di valutare gli effetti dell'assunzione di 250 ml/die di Succo Bermè® per un periodo di 15 giorni sulla composizione corporea, sul profilo lipidico, glucidico e i suoi parametri infiammatori e di stress ossidativo in volontari sani.

-MATERIALI E METODI-

TIPO DI STUDIO: Studio sperimentale prospettico

Criteri di inclusione:

Ambo sessi; Età compresa tra i 18 e 65 anni; $19 < \text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$

Criteri di esclusione:

- patologie endocrine, metaboliche, epatiche, renali, infiammatorie, cardiovascolari, virali croniche, HIV, cancro;- Terapia cortisonica, antiinfiammatoria, antibiotica.

FASI DI STUDIO:

Al tempo T0 (Baseline), al tempo T1 (Acuto – dopo 2 ore dall'assunzione di 250 ml di Succo bermè), al tempo T2 (Cronico - dopo 15 giorni di assunzione di Succo Bermè) sono stati eseguiti un prelievo venoso e una completa valutazione dello stato nutrizionale di ciascun soggetto arruolato:

- Anamnesi familiare e individuale su stati fisiologici e/o patologici prossimi e/o remoti.
- Valutazione delle abitudini alimentari attraverso la compilazione di due diversi questionari validati.
- Valutazione della composizione corporea per mezzo di:
 - Misure antropometriche (peso, altezza, calcolo del BMI Kg/m^2)
 - Misure di circonferenza vita e fianchi e loro rapporto
 - Valutazione dell'acqua corporea mediante BIA (impedenza bioelettrica): determinazione della TWB (acqua totale corporea), acqua intracellulare (ICW) e extracellulare (ECW), determinazione della massa cellulare metabolicamente attiva e il suo relativo indice (BCM, BCMI), determinazione dello scambio Na/k e l'angolo di fase come indicatore dello stato nutrizionale
- Valutazione funzionale: Misurazione della pressione arteriosa e battiti cardiaci

- Handgrip: test di valutazione della forza contrattile dei muscoli flessori della mano usato per la valutazione dello stato nutrizionale, come indicatore della forza muscolare generale, come fattore prognostico nel decorso di malattie ad impatto metabolico, nonché strumento per scoprire la sarcopenia.
- Valutazione dei parametri bioumoralì:
 - * Emocromo con formula
 - * Transaminasi (GOT, GPT)
 - * Glicemia (mg/dl)
 - * Insulina (U/mL)
 - *VES (mm)
 - *Proteina C Reattiva (mg/dl)
 - * Trigliceridi (mg/dl)
 - * Colesterolo HDL (mg/dl)
 - * Colesterolo LDL (mg/dl)
 - * Colesterolo Totale (mg/dl)
 - * determinazione delle LDL ossidate (ng/ml) (metodica ELISA, Saggio Immuno-Assorbente legato ad un Enzima);

RISULTATI

I risultati riportati si riferiscono alla valutazione dello stato nutrizionale dei volontari sani ai tre tempi di studio, relativamente ai dati 1) di composizione corporea, ottenuta con metodiche antropoplicometriche e bioimpedenziometriche; 2) ai dati ematochimici del profilo lipidico e glucidico; 3) ai dati biochimici di analisi dello stress ossidativo, valutato con metodica immunoenzimatica (Test ELISA) per i livelli di ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (LDL).

La tabella n. 1 riporta il confronto dei valori di composizione corporea all'arruolamento (T0) e dopo 15 gg di somministrazione di succo Bermè® (T2).

Tabella n. 1

	Baseline (T0)	15 gg Bermè (T2)		
	Media (DS)	Media (DS)	<i>p</i>	$\Delta\%$
P.A sistolica ^a	110,91 (13,04)	110,00 (10,95)	0,78	
P.A diastolica ^a	69,09 (10,75)	69,36 (7,58)	0,90	

Peso ^b	60,74 (10,61)	60,21 (10,63)	0,11	-0,88
BMI ^b	21,77 (2,23)	21,83 (2,25)	0,11	
Circonf. Vita ^a	69,98 (7,01)	70,02 (7,18)	0,96	
Circonf. Fianchi ^a	94,19 (5,14)	94,41 (4,30)	0,74	
Rapporto Vita/Fianchi ^b	0,74 (0,04)	0,74 (0,05)	0,46	
FFM ^b	47,86 (8,87)	47,13 (9,32)	0,33	
TBW ^b	34,96 (6,58)	34,48 (6,85)	0,15	
ECW ^a	15,86 (2,92)	16,07 (3,16)	0,39	
BCM ^b	25,45 (5,49)	24,34 (5,63)	0,93	
FM ^a	13,03 (3,65)	13,01 (3,19)	0,97	
PA ^a	5,81 (0,73)	5,83 (0,69)	0,83	
Na/K ^a	1,09 (0,12)	1,10 (0,10)	0,76	
MM ^b	26,35 (5,87)	30,67 (6,64)	0,00*	16,40
BMR kcal ^b	1488,23 (159,25)	1471,28 (160,00)	0,72	
BCMI ^a	8,85 (1,29)	9,01 (1,32)	0,44	
Plica bicipite ^b	6,47 (4,14)	4,56 (2,36)	0,06	-23,20
Plica tricipite ^a	11,62 (8,22)	10,17 (8,55)	0,23	-12,30
Plica sottoscapolare ^b	13,27 (5,45)	13,67 (5,84)	0,40	
Plica sovrailiaca ^a	11,45 (4,67)	12,23 (4,72)	0,51	

* Differenza significativa. ^a Test t. ^b Test di Wilcoxon

- I risultati dell'esame di bioimpedenziometrico mostrano valori di massa magra, dopo somministrazione di succo Bermè, significativamente aumentati del 16,40%.
- Dai valori ottenuti si evidenzia dopo somministrazione di succo Bermè una riduzione della plica di grasso sottocutaneo sia tricipitale (-12,30%) che bicipitale (-23,20%).
- Il peso medio degli arruolati dopo Bermè è leggermente ridotto (-0,88%)

La tabella n. 2 riporta il confronto tra i parametri ematochimici all'arruolamento (T0) e dopo 2 ore dopo la somministrazione di succo Bermè® (T1).

Tabella n. 2.

	Baseline (T0)	Dopo Bermè (T1)	p	Δ%
	MEDIA ±DS	MEDIA± DS		
Colesterolo Totale^a	170,18 ± 29,35	172,45 ± 31,85	0,58	
HDL(mgdL)^a	63,55 ± 11,39	63,82 ± 11,40	0,70	0,43
LDL(mgdL)^a	94,09 ± 20,08	92,64 ± 19,86	0,29	-3,33
ColTOT/HDL^b	2,71±0,35	2,71±0,41	0,92	
TG(mgdL)^b	60,67±27,46	56,36±21,40	0,05*	-10,92
LDL/HDL^a	1,53 ± 0,36	1,48 ± 0,37	0,07	
ColTOT/LDL^a	1,87 ± 0,29	1,91 ± 0,25	0,70	
TGL/HDL^a	0,93 ± 0,60	0,84 ± 0,35	0,59	-18,71
GLICEMIA(mgdL)^a	78,91 ± 9,04	76,27 ± 5,42	0,21	-3,34
INSULINA(U/mL)^a	5,57 ± 1,31	5,49 ± 1,30	0,85	-1,47
HOMA^a	1,09 ± 0,29	1,04 ± 0,28	0,61	-4,57

* Differenza significativa. ^a Test t. ^b Test di Wilcoxon

Dopo 2 ore dall'assunzione di succo Bermè®, i dati mostrano:

- a) Una significativa riduzione dei trigliceridi (TG) del 10% e un aumento positivo delle lipoproteine ad alta densità (HDL) dello 0,43%,
- b) Una riduzione del 18,71% del rapporto TG/HDL
- c) Una riduzione positiva delle lipoproteine a bassa densità (LDL) del 3,33%.
- d) Una riduzione della glicemia del 3,34%, una riduzione di insulinemia del 1,47%, con una conseguente riduzione dell'indice di insulino-resistenza (HOMA-IR) del 4,57%.

La tabella n. 3 riporta il confronto tra i parametri ematochimici all'arruolamento (T0) e dopo 15 giorni di somministrazione di succo Bermè® 250 ml/die (T2).

Tabella n. 3

	Baseline(T0)	Dopo Bermè(T2)	<i>p</i>	$\Delta\%$
	MEDIA $\pm$ DS	MEDIA $\pm$ DS		
CoITot^a	169,45 $\pm$ 29,65	162,91 $\pm$ 25,27	0,20	-3,86
HDL(mg/dL)^a	63,36 $\pm$ 11,62	65,27 $\pm$ 10,36	0,39	3,01
LDL(mg/dL)^a	94,50 $\pm$ 19,98	89,00 $\pm$ 18,79	0,20	-4,49
CoITOT/HDL^b	2,74 $\pm$ 9,35	2,14 $\pm$ 2,73	0,00*	-20,91
LDL/HDL^a	1,53 $\pm$ 0,35	1,40 $\pm$ 0,30	0,08	-7,56
CoITOT/LDL^a	1,80 $\pm$ 0,20	1,84 $\pm$ 0,12	0,38	
GLICEMIA(mg/dL)^a	77,45 $\pm$ 7,94	78,18 $\pm$ 8,34	0,73	
INSULINA(U/mL)^a	5,70 $\pm$ 1,53	6,23 $\pm$ 1,62	0,36	
HOMA^a	1,08 $\pm$ 0,29	1,20 $\pm$ 0,32	0,34	

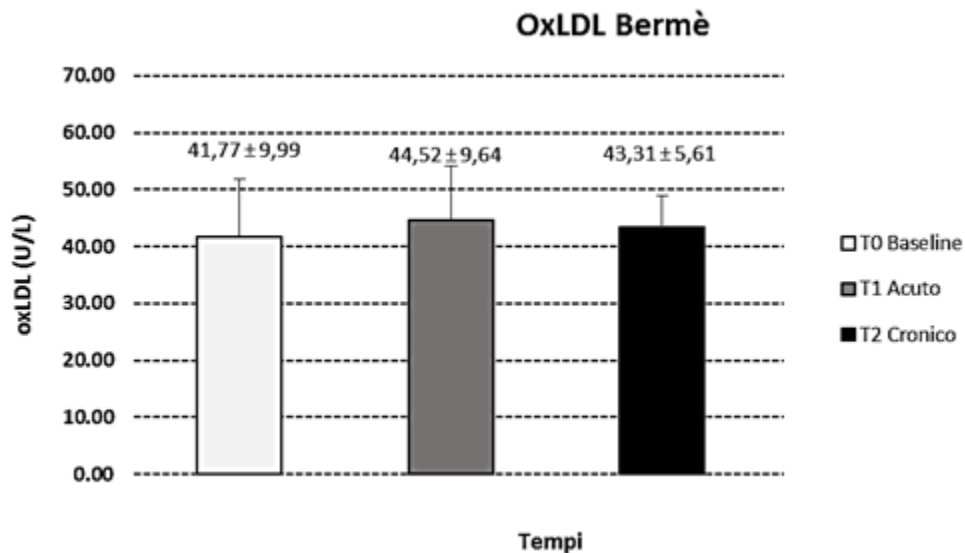
* Differenza significativa. ^a Test t. ^b Test di Wilcoxon

Dopo 15 giorni di assunzione giornaliera di 250ml di succo Bermè i dati mostrano:

- Una significativa riduzione del rapporto tra il colesterolo totale e le lipoproteine ad alta densità (HDL) CoITot/ HDL del 20% con un positivo, seppur non significativo, aumento delle HDL del 3%, con conseguente riduzione del rischio cardiovascolare.
- Una riduzione delle lipoproteine a bassa densità (LDL) del 4,49%.
- Una riduzione del colesterolo totale del 3,86%.
- Una riduzione del rapporto LDL/HDL del 7,56 %.
- Non si confermano le riduzioni dei parametri del profilo glucidico (glicemia, insulinemia e indice di insulino-resistenza).

La Figura n. 1 rappresenta il confronto tra i livelli di ossidazione delle lipoproteine a bassa densità (Ox-LDL) all'arruolamento (T0) e dopo assunzione di succo Bermè® 250 ml/die ai due tempi di analisi (T1,T2) .

Figura 1.



Variazione percentuale ($\Delta\%$)

	Baseline (T0)	Acuto (T1)	Cronico (T2)	$\Delta\%$ Baseline vs Acuto	$\Delta\%$ Baseline vs Cronico
MEDIE	41,77	44,52	43,31	8,42	16,68

I dati ottenuti dal test d'immunoprecipitazione (test ELISA) mostrano che non ci sono variazioni significative nel livello di ossidazione delle LDL prima e dopo il consumo di 250 ml/die di Succo Bermè. I livelli più alti di ox-LDL osservati dopo il consumo di succo sono dipendenti dalla fisiologica ossidazione postprandiale. Tale risultato potrebbe dipendere dalla necessità di un tempo maggiore di consumo, pari ad almeno un mese,

Dal momento che nei volontari sani i meccanismi di riparo dei processi ossidativi sono fisiologici e efficienti, rendendo difficile una valutazione di piccole variazioni, sarà necessario prolungare il tempo di assunzione dei 250 ml/die di Succo Bermè ad almeno un mese.