



UNIVERSITA' POLITECNICA DELLE MARCHE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE

Corso di Laurea Magistrale in Biologia Molecolare e Applicata

“EFFETTO DEL TE' ROOIBOS (*Aspalathus linearis*)

SULLA GLICEMIA POST-PRANDIALE”

“EFFECT OF ROOIBOS TEA (*Aspalathus linearis*) ON

POST-PRANDIAL GLYCEMIA”

Candidata: **Adrianapia Maria Lamedica**

Relatore: **Prof.ssa Elisabetta Damiani**

Correlatore: **Dott.ssa Luisa Bellachioma**

Sessione Straordinaria (Febbraio 2022)

Anno Accademico 2020/2021

Alla mia famiglia,
luce e guida del mio cammino.

INDICE

1. INTRODUZIONE	6
1.1 Caratteristiche e storia del Rooibos	6
1.2 Preparazione Rooibos verde e rosso	12
1.3 Raccolta delle foglie di <i>Aspalathus linearis</i>	14
1.4 Caratterizzazione in polifenoli	16
1.4.1 Aspalatina	17
1.4.2 Altri polifenoli del Rooibos	20
1.5 Caratteristiche sensoriali del Rooibos	21
1.6 Indice Glicemico	21
1.6.1 Come si valuta l'indice glicemico	22
1.6.2 Il carico glicemico	24
1.6.3 Fattori che influenzano l'indice glicemico di un alimento	25
1.7 Diabete	29
1.7.1 Sintomi del diabete	30
1.7.2 Classificazione del diabete	30
1.7.3 Diabete di tipo 1	31
1.7.4 Diabete di tipo 2	31
1.7.5 Diabete gestazionale	32
1.7.6 Diabete associato ad altre patologie	32

1.8 Sistema di monitoraggio continuo del glucosio (CGMS)	33
1.9 Metodi rapidi per la determinazione della glicemia	34
1.10 Valori glicemia	36
1.11 Scopo della tesi	39
2. MATERIALI E METODI	40
2.1 Infuso e pane	40
2.2 Misurazione della glicemia post-prandiale	43
2.3 Preparazione degli infusi di Green Rooibos	44
2.4 Preparazione del pane	46
2.4.1 Pane per il controllo	47
2.4.2 Pane con infuso di Rooibos	51
2.5 Analisi sensoriale	52
2.6 Metodi <i>in vitro</i> per la determinazione del potere antiossidante e il contenuto totale di polifenoli	53
2.6.1 ORAC Assay	53
2.6.2 Folin-Ciocalteu Assay	59

3. RISULTATI E DISCUSSIONE	63
3.1 Infusi e pani	63
3.1.1 Infusi	63
3.1.2 Pani	70
3.2 Analisi sensoriale	78
3.2.1 Analisi sensoriale del pane Controllo	78
3.2.2 Analisi sensoriale del pane Rooibos	79
3.2.3 Confronto tra le due analisi sensoriali	80
3.3 Analisi contenuto totale Polifenoli	81
3.4 Analisi capacità antiossidante	85
4. CONCLUSIONE	89
5. BIBLIOGRAFIA	92
6. SITOGRAFIA	107
RINGRAZIAMENTI	111

1. INTRODUZIONE

1.1 CARATTERISTICHE E STORIA DEL ROOIBOS

Aspalathus linearis (Figura 1) è un arbusto (comunemente noto come Rooibos), appartenente alla famiglia delle Fabaceae. Viene solitamente coltivato nel Cederberg, una piccola area montuosa nella regione della provincia del Capo Occidentale del Sud Africa (Figura 2). La maggior parte della produzione commerciale è concentrata principalmente nelle aree Clanwilliam e Citrusdal. La pianta del Rooibos, si trova naturalmente, oltre che coltivata, nella zona di Nieuwoudtville della provincia del Capo Settentrionale, in particolare nell'altopiano di Bokkeveld, al confine con il capo Occidentale (Figura 3). Il Clanwilliam e il Citrusdal, in media hanno temperature minime e massime giornaliere, più alte rispetto all'area di Nieuwoudtville (dati forniti da ARC Institute per Soil, Climate and Water, South Africa). Queste differenze, potrebbero influire sulla qualità del prodotto, in quanto la lavorazione avviene all'aperto, in condizioni non controllate (Joubert,1996). Inoltre, è stato dimostrato che la temperatura influisce sulla resa della biomassa e sui processi fisiologici (Hasanuzzaman et al., 2013), inclusa la biosintesi dei flavonoidi delle piante (Petruzza et al., 2013).

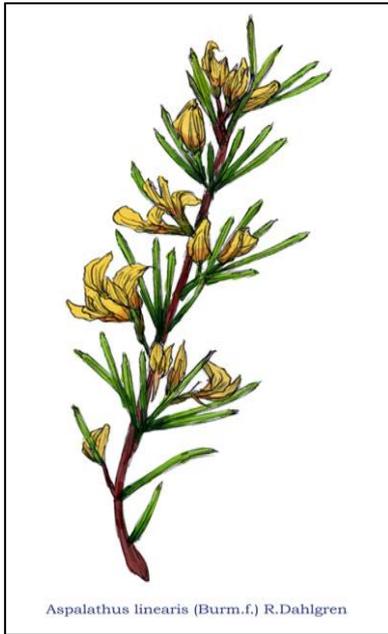


Figura 1: *Aspalathus linearis*
(Sud Africa)
(Fonte: antropocene.it).



Figura 2: Piantagione di *Aspalathus linearis*
(Fonte: stockfood.it).

Nel Cederberg, gli abitanti indigeni bevevano un'infusione di Rooibos già prima dell'arrivo degli Europei: raccoglievano i rami e battevano le foglie, simili ad aghi, con dei pestelli, in modo da sminuzzarle, quindi le facevano fermentare e seccare al sole (Joubert et al., 2006).

I primi coloni, scoperta questa bevanda, capirono che dal punto di vista economico era molto più conveniente bere l'infuso di Rooibos che farsi importare il tè nero dall'Europa (il quale tè nero era a sua volta importato dalla Cina). Perciò cominciarono a berlo, e certo non rimpiansero le vecchie abitudini della Madrepatria. Nel 1772, un naturalista svedese, Carl Peter

Thunberg, allievo di Carl Linnaeus, considerato il padre della Botanica Africana, riportò nel Vecchio Continente la notizia dell'esistenza della pianta del Rooibos e del suo utilizzo al posto del tè. Ma è solo nel 1904 che il pioniere russo, Benjamin Ginsberg, esploratore della regione del Capo di Buona Speranza, apprese dai Bushmen, gli indigeni, la preparazione dell'infuso e diventò il primo coltivatore ed esploratore del Rooibos in Europa; Ginsberg, del resto proveniva da una famiglia di mercanti di tè, perciò non gli fu difficile inserire il suo "nuovo prodotto" nelle vecchie vie commerciali. Da lì in avanti, Benjamin, e poi il figlio Charles, trasformarono la coltivazione per renderla sempre più produttiva, in modo da rispondere alle richieste di un mercato sempre più ampio (Joubert et al., 2006). Oggi il Rooibos è infatti molto diffuso e continuerà ad esserlo sempre di più.

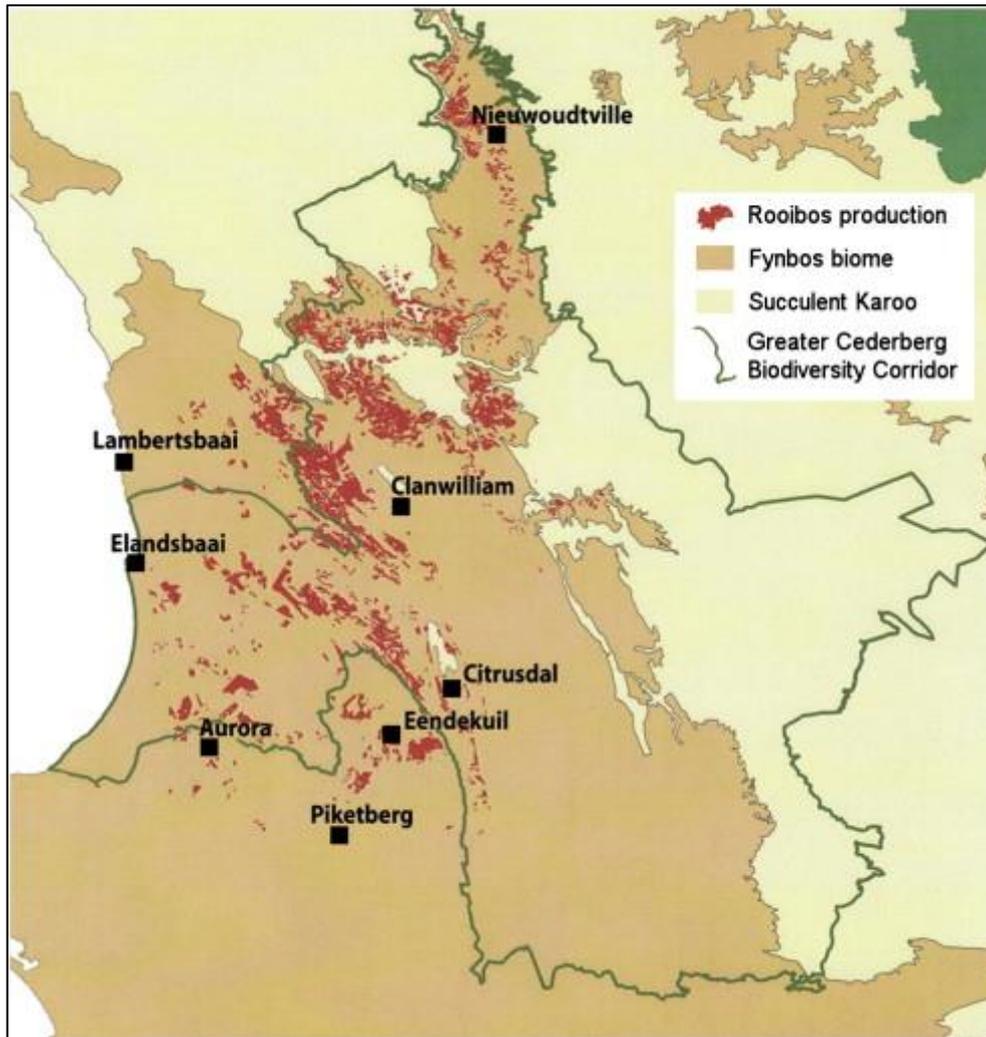


Figura 3: Aree di produzione dell'*Aspalathus linearis* nella regione del Cederberg (Joubert E. & de Beer D., 2011).

La caratteristica principale di questo infuso è quella di essere naturalmente dolce; inoltre, proprio per la sua dolcezza intrinseca, si presta ad essere aromatizzato con profumi ancora più zuccherosi o che tendono ad accentuare la piacevolezza dell'infusione, che è di color arancio-ambrato, tendente al rosso (Figura 4). Le foglie sono più simili ad aghi di pino sminuzzati; l'unico difetto

di questa bevanda è il fatto che gli aghi di Rooibos sono talmente piccoli e sottili, spesso da passare il colino e finire in tazza. Non essendo un tè, il Rooibos non contiene caffeina (López et al., 2022); per questo è particolarmente adatto a chi non vuole rinunciare alla sua tazza, pur dovendo tenere sotto controllo l'assunzione di caffeina. Inoltre, ha proprietà salutari, combatte i radicali liberi ed ha anche proprietà digestive (Joubert et al., 2011).



Figura 4: Infuso di Rooibos (Fonte: sorgentenatura.it)

Per gustare a pieno il Rooibos, bisognerebbe berlo senza zucchero. Inoltre, il suo contenuto di tannini è molto basso (Rusinek-Prystupa et al., 2016) e ciò permette alla bevanda di mantenere il proprio sapore dolce anche se non viene consumata immediatamente o se viene dimenticata in infusione.

Il Rooibos si caratterizza per la presenza di sostanze naturali importanti per l'organismo, come vitamina C, magnesio, fosforo, ferro, zinco e calcio (Piek et al., 2019).

Studi scientifici condotti dal CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria, Roma), hanno comprovato che il contenuto di sostanze antiossidanti di questo infuso è pari a quello del tè nero o del tè verde (Piek et al., 2019).

Ad un'ora dall'ingestione del Rooibos, si ha nel nostro organismo una crescita significativa delle sostanze atte ad agire contro la formazione dei radicali liberi. Ciò lo descrive come un elisir di lunga vita completamente naturale, adatto anche a chi è sensibile agli effetti collaterali della caffeina (Joubert et al., 2011).

Sono state inoltre recentemente scoperte le sue proprietà antivirali, che aiutano il sistema immunitario ad agire rapidamente per combattere le infezioni (Smith et al., 2018). Questa sua proprietà lo rende adatto anche ai bambini, che possono beneficiare dell'assunzione della bevanda in caso di nausea e disturbi allo stomaco e all'intestino, per via delle sue proprietà antispasmodiche e digestive (Canda et al., 2014). Il suo contenuto di calcio assicura la corretta formazione di denti e ossa nei più piccoli; lo zinco agisce invece rafforzando unghia e capelli (Mabuza et al., 2021).

Il Rooibos è considerato una bevanda adattogena, cioè in grado di aiutare l'organismo nei momenti in cui si trova a dover affrontare uno sforzo. Avrà quindi proprietà tonificanti se consumato al mattino o durante il giorno e rilassanti, se bevuto prima di andare a dormire; ciò lo rende adatto sia nel caso in cui si soffre di cali di energia, sia nei momenti in cui è necessario conciliare il sonno. Il Rooibos non contiene acido ossalico (Mabuza et al., 2021), può essere quindi consumato anche da chi soffre di calcoli. Sono stati dimostrati i suoi effetti positivi contro l'ipertensione ed il suo contenuto calorico è pressochè nullo (0.6 calorie per 100 mL di prodotto), qualità a favore di chi si trova a seguire un regime alimentare controllato (Joubert et al., 2017).

Il Rooibos può essere bevuto freddo; in estate costituirà quindi un'ottima bevanda dissetante. In commercio è possibile trovare questo infuso puro e aromatizzato, sfuso o in bustine. Se si acquista sfuso, basterà mettere in infusione un cucchiaino di foglie per ogni tazza che si desidera preparare (Ajuwon et al., 2018).

1.2 PREPARAZIONE ROOIBOS VERDE E ROSSO

Sono disponibili due forme di Rooibos: il Rooibos fermentato, di colore rosso e il non fermentato, di colore verde (Figura 5).



Figura 5: Rooibos verde e rosso (Fonte: vegolosi.it).

La preparazione tradizionale del Rooibos rosso avviene attraverso lo sminuzzamento delle foglie, che poi vengono poste al processo di fermentazione, che consiste nel favorire il contatto fra gli enzimi contenuti nei plastidi e i polifenoli contenuti nei vacuoli in presenza dell'ossigeno dell'aria. Durante il processo di fermentazione, si verifica l'ossidazione di composti fenolici, conferendo all'infuso un caratteristico aroma e colore rossastro (Carlioni P. et al., 2012; Manach C. M. et al., 2004).

La fermentazione dura circa 8 ore ed al termine il prodotto viene steso ad essiccare al sole ed all'aria su vaste spianate di cemento. Durante questa fase si sviluppa il tipico colore rosso-marrone della bevanda. Al termine dell'essiccazione il prodotto viene setacciato, pulito, se necessario aromatizzato e quindi confezionato.

il Rooibos è stato prodotto anche nella versione non fermentata (ovvero il Green) il quale viene preparato con una differente lavorazione che va a bloccare il processo di ossidazione, conferendo una maggior concentrazione di antiossidanti. La metodica utilizzata per ottenere un prodotto con tali caratteristiche prevede di far essiccare le foglie appena raccolte, sottovuoto e, solo in un secondo momento tritarle. Tale metodica permette l'inattivazione degli enzimi coinvolti nell'ossidazione prima di andare a macinare le foglie (Joubert et al., 2008). Infatti, sebbene gli estratti fermentati di Rooibos rosso contengano un'elevata quantità di composti fenolici, gli estratti verdi tuttavia ne contengono livelli circa tre volte superiori.

1.3 RACCOLTA DELLE FOGLIE DI *ASPALATHUS LINEARIS*

La raccolta delle foglie di questo arbusto avviene nei mesi estivi; le foglie vengono raccolte tramite una falce, vengono finemente triturate e quindi fatte fermentare in cumuli a temperatura ambiente; il materiale viene anche bagnato con dell'acqua per velocizzare la fermentazione, ed è proprio la triturazione che permette di far partire l'ossidazione che risulterà in un rapido imbrunimento del prodotto. Durante questo processo la temperatura del cumulo raggiunge i 38-42 °C. Il mucchio in fermentazione viene anche smosso più volte per garantire un'adeguata aereazione che favorirà una migliore ossidazione, e

quindi un miglior prodotto finale. Terminato questo processo, che può durare dalle 12 alle 24 ore in base alle caratteristiche di partenza, il materiale viene posto ad essiccare al sole per poi essere pastorizzato e quindi imballato (Joubert E. et al., 2008). Nel 2000, questa modalità di preparazione della tipologia tradizionale di Rooibos è stata “rivisitata” per andare incontro alle richieste del mercato: si arrivò a produrre quello che è definito “Green Rooibos”, una versione non fermentata della bevanda che rispondeva a una crescente richiesta di prodotti con un contenuto in antiossidanti maggiore. In questo caso il tipico processo ossidativo viene ridotto al minimo, cercando di mantenere la classica colorazione verde delle foglie. Le opzioni per ottenere un prodotto di questa qualità prevedono o di far essiccare il materiale sottovuoto da subito, oppure di far essiccare i germogli interi, e solo successivamente tritararli, in modo da inattivare gli enzimi prima della triturazione (Joubert E. et al., 2008).

Come già visto in altri studi sulla *Camellia sinensis* (Carloni P. et al., 2012), le differenze che caratterizzano un prodotto ossidato da una versione “green” dello stesso, riguardano principalmente il suo profilo antiossidante, più ricco nella versione green, non ossidata. Questo perché l’ossidazione che caratterizza la lavorazione del prodotto fermentato causa una diminuzione di antiossidanti a favore dello sviluppo di caratteristiche di tipo sensoriale (Obanda M. et al., 2004).

1.4 CARATTERIZZAZIONE IN POLIFENOLI

Il consumo di Rooibos (*Aspalathus linearis*), come tisana, sta crescendo in popolarità in tutto il mondo e le proprietà benefiche per la salute sono principalmente attribuite alla sua composizione fenolica, che può essere influenzata dalle condizioni di fermentazione utilizzate. Un aspetto fino ad ora trascurato, è l'impatto dell'infusione a freddo, rispetto alla produzione regolare e alla bollitura a microonde, sul profilo (poli)fenolico e sulla capacità antiossidante *in vitro* delle infusioni preparate da infusi rossi, fermentati e ossidati e verdi, non fermentati e non ossidati (Damiani et al., 2019).

Diversi studi hanno anche dimostrato, come la capacità e il contenuto di polifenoli del Rooibos siano influenzati da diversi tipi di infusione (1-10 minuti), temperature (65-100 °C), aggiunte di aromi domestici (zucchero, latte e miele) e tipo (sfuso o materiali vegetali in sacchi o estratti in polvere). Questo aspetto è particolarmente importante, considerando che il Rooibos sta diventando estremamente popolare in Oriente, soprattutto in Giappone, una delle nazioni con il più alto consumo di questo tè al mondo.

In Giappone, questa bevanda è preparata, sia calda, che fredda; l'infusione a freddo implica la disposizione del materiale vegetale in acqua a temperatura ambiente, seguita dal raffreddamento.

Le capacità antiossidanti attraverso i saggi ORAC e ABTS sono state confrontate tra Rooibos rossi e verdi, entrambi infusi a freddo o bolliti. Gli infusi di Rooibos rossi a freddo, e quelli di Rooibos verdi, bolliti, hanno fornito infusi con le più alte capacità antiossidanti e il più alto contenuto totale di polifenoli. Quest'ultimo è fortemente correlato con le capacità antiossidanti *in vitro*, in particolare per flavonoidi e acidi fenolici (Damiani et al., 2019).

I flavonoidi sono importanti metaboliti vegetali secondari, che offrono protezione contro l'ambiente, caratterizzato da fattori di stress come la siccità, l'irradiazione UVB e il calore (Ferreyra et al., 2012). Essi giocano un ruolo fondamentale nella qualità del prodotto, vista l'importanza dell'aspalatina, il principale polifenolo nel Rooibos, nello sviluppo del colore rosso-bruno del Rooibos fermentato (Joubert 1996; Henrich et al., 2012).

1.4.1 ASPALATINA

L'aspalatina (Figura 6) è il calcone principale delle foglie di Rooibos (*Aspalathus linearis*), nello specifico è un flavonoide C-glicoside, composto da due parti:

-una parte ossidica: glucosio;

-una parte di aglicone (o genina): un diidrocalcione.

Questo flavonoide è presente in quantità maggiori nei Rooibos verdi (non fermentati) ed è noto per le sue proprietà antiossidanti; viene ossidato durante la fermentazione del Rooibos in diidro-orientina e orientina. (Krafczyk et al., 2008).

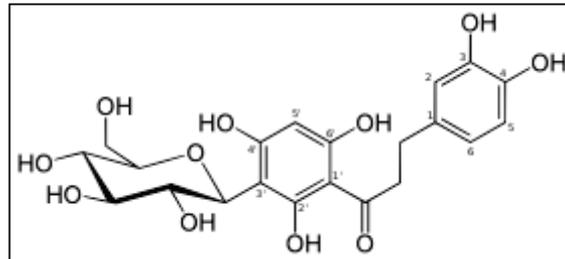


Figura 6: Aspalatina (Fonte: Wikipedia).

L'aspalatina, inoltre contribuisce alle proprietà antidiabetiche del Rooibos (Kawano et al., 2009; Muller et al., 2012; Son et al., 2013; Mazibuko, 2014).

Questo aspetto rende gli estratti di Rooibos interessanti non solo per l'attività antiossidante, ma essi sono richiesti anche per l'industria nutraceutica (Joubert & de Beer 2011).

L'aspalatina gioca un ruolo fondamentale, nel migliorare la sindrome metabolica, una condizione di malattia correlata allo stress ossidativo (Johnson et al., 2018). Sono stati effettuati studi *in vivo* e *in vitro* relativi all'attività metabolica dell'aspalatina e sono stati proposti meccanismi cellulari attraverso

i quali essa migliora il metabolismo del glucosio e dei lipidi (Sasaki et al., 2017).

Altri aspetti, che sono rilevanti in considerazione del presumibile uso di aspalatina come terapia aggiuntiva, includono la sua scarsa stabilità e biodisponibilità, nonché rilevanti interazioni avverse tra erbe e farmaci, in particolare l'interferenza con il metabolismo di alcuni, comunemente prescritti farmaci cronici per iperglicemia e dislipidemia (Johnson et al., 2018).

I livelli dell'aspalatina variano tra il tradizionale Rooibos fermentato (ossidato) di colore rosso-marrone e la variante meno popolare del Rooibos non fermentato (non ossidato), che è verde (Figura 5). È infatti ben noto, che durante il processo di fermentazione naturale, il contenuto di aspalatina diminuisce sostanzialmente a causa della conversione ossidativa in flavononi e flavoni, che influisce anche sul contenuto totale di polifenoli. Tuttavia, il tè fermentato è caratterizzato da un gusto leggermente dolce e da un sapore con note mielate, legnose ed erbacee-floreali, a differenza della versione non-fermentata, che ha un aroma o un sapore erbaceo predominante.

L'uso potenziale di questo composto, o estratti di Rooibos ricchi di aspalatina come nutraceutico, è ostacolato dalla fornitura limitata di Rooibos verde e bassi livelli in quello rosso fermentato, fornendo incentivi per la sua sintesi. (Damiani et al., 2019).

1.4.2 ALTRI POLIFENOLI DEL ROOIBOS

In uno studio precedente (Damiani et al., 2019), la composizione fenolica di infusi di Rooibos rosso e verde, è stata valutata utilizzando un approccio spettrometrico di massa UHPLC-QTOF. Ciò ha permesso l'annotazione putativa di alcuni composti, compresi flavonoidi, tirosoli, acidi fenolici, lignani e stilbeni. Alcuni dei flavonoidi maggiori e altri minori del Rooibos, incluso il diidrocalcone, aspalatina, i flavononi, naringenina 6-C glucoside ed emiflorina, i flavoni, luteolina 7-O glucoside (luteoloside), luteolina 8-C-glucoside (orientina) e luteolina 6-C glucoside (isorientina) e anche i flavonoli, la quercitina e i glicosidi della quercitina sono stati effettivamente riscontrati negli infusi. I campioni di Rooibos sono risultati ricchi di acidi fenolici, come caffeico, ferulico, p-cumarico e acidi p-idrossibenzoici, precedentemente identificati da Rabe et al. (Rabe et al., 1994). Inoltre, un approccio Tandem-MS ha permesso di confermare l'identità della vitexina (apigenina 8-C glucoside), quercitina 4-O glucoside, rutina e crisoeriololo. L'infuso bollito di Rooibos è caratterizzato da quantità maggiori di acido ferulico, matairesinolo, catechina e tirosolo, ma anche di luteolina e antocianina (Damiani et al., 2019).

Due polifenoli del Rooibos, la luteolina e l'aspalatina, intervengono sull'assorbimento e l'accumulo di grassi, smobilizzandoli dalle cellule epatiche e da quelle del tessuto adiposo e rendendoli infine disponibili per essere

eliminati dall'organismo (Beelders et al., 2012). In primavera, il consumo di Rooibos aiuta a controllare le tipiche sindromi allergiche, grazie all'azione di due importanti flavonoidi, la quercitina e la rutina, che svolgono attività antinfiammatorie. Inoltre, queste due sostanze agiscono come potenti agenti antiossidanti e proteggono la cellula del nostro organismo dall'azione nociva dei radicali liberi (Beelders et al., 2012).

1.5 CARATTERISTICHE SENSORIALI DEL ROOIBOS

Al Rooibos sono state attribuite caratteristiche sensoriali riguardanti l'aroma, il gusto, il retrogusto e la sensazione in bocca. I risultati dello studio hanno dimostrato che il Rooibos possiede le seguenti caratteristiche aromatiche: sapori di miele e caramello, è fruttato, legnoso e erbaceo-floreale; ha un gusto leggermente dolce, un retrogusto legnoso ed è astringente (Jolley et al., 2020).

1.6 INDICE GLICEMICO

L'indice glicemico, introdotto per la prima volta nel 1981 (Jenkins et al., 1981), è una misura dei carboidrati glicemici alimentari, che rappresenta la loro capacità di aumentare le concentrazioni di glucosio nel sangue. Esso si riferisce alla risposta glicemica post-prandiale (Susana Guerreiro et al., 2010), espressa

come percentuale della risposta ad un alimento di riferimento (glucosio o pane bianco) con lo stesso contenuto di carboidrati.

1.6.1 COME SI VALUTA L'INDICE GLICEMICO?

Misurazione in vivo:

-Si prendono 25 o 50 g di carboidrati presenti in un alimento da testare e in un alimento standard (soluzione di glucosio).

-Reclutamento volontari (10-15 soggetti sani, non devono avere alterazioni per quanto riguarda il metabolismo glicemico);

-Valutazione delle variazioni di glicemia nelle due ore successive all'assunzione di un alimento standard o da testare (intervalli di 15 min);

-Valutazione AUC (Area incrementale sotto la curva) dell'alimento standard (solitamente 50 g di glucosio) un giorno e AUC dell'alimento da testare allo stesso soggetto, sempre 50 g di carboidrati disponibili, un altro giorno.

$IG = \frac{\text{Area incrementale della risposta glicemica ad un determinato alimento (50 g di carboidrati)}}{\text{Area incrementale della risposta glicemica di un alimento standard (pane bianco) (50 g carboidrati)}} \times 100$ (Guerreiro et al., 2010).

Nell'IG si calcola l'area sotto lo standard della glicemia a digiuno (AUC, ossia l'area incrementale sopra la curva). Il calcolo deve essere fatto minimo per 8-10 soggetti e successivamente si effettua la media della popolazione (Figura 7).

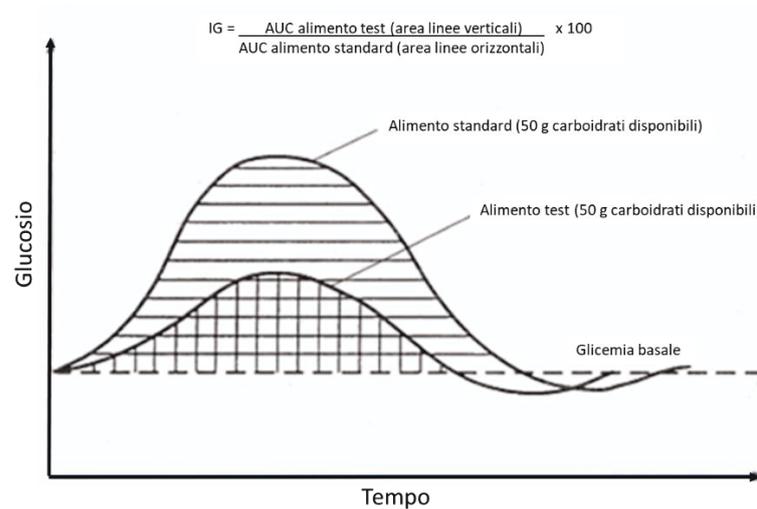


Figura 7: Indice glicemico (Fonte: La Somma e il Totale).

La classificazione (Figura 8) più comune permette di suddividere gli alimenti in:

- alimenti ad alto indice glicemico: IG maggiore di 70;
- alimenti a medio indice glicemico: IG compreso tra 55 e 69;
- alimenti a basso indice glicemico: IG minore di 55.

L'indice glicemico è un indicatore legato alla qualità dell'alimento e non alla quantità, infatti mentre viene effettuata la misurazione, si considera la stessa

quantità di carboidrati disponibili, uguale sia per l'alimento che per lo standard (50 g di alimento non corrispondono a 50 g di carboidrati disponibili).

Low Glycemic Foods List 0 - 55	Medium Glycemic Foods List 56 - 70	High Glycemic Foods List 70+
Most non starchy vegetable <15 Peanuts <15 Low-fat yogurt, no sugar<15 Tomatoes 15 Cherries 22 Peas 22 Plum 24 Grapefruit 25 Pearled barley 25 Peach 28 Can peaches, natural juice 30 Soy milk 30 Baby lima beans 32 Fat-free milk 32 Low-fat yogurt, with sugar 33 Apple 36 Pear 36 Whole wheat spaghetti 37 Tomato soup 38 Carrots, cooked 39 Apple juice 41 All-Bran 42 Canned chickpeas 42 Custard 43 Grapes 43 Orange 43 Canned lentil soup 44 Macaroni 45 Pineapple juice 46 Banana bread 47 Long-grain rice 47 Bulgur 48 Canned baked beans 48 Grapefruit juice 48 Green peas 48 Oat bran bread 48 Old-fashioned porridge 49	Canned kidney beans 52 Kiwifruit 52 Orange juice 52 Banana 53 Potato chips 54 Special K 54 Sweet potato 54 Brown Rice 54 Linguine 55 Oatmeal cookies 55 Popcorn 55 Sweet corn 55 Muesli 5 White rice 56 Pita bread 57 Blueberry muffin 59 Bran muffin 60 Hamburger bun 61 Ice cream 61 Canned apricots, light syrup 64 Macaroni and cheese 64 Raisins 64 Couscous 65 Quick-cooking porridge 65 Rye crisp-bread 65 Table sugar (sucrose) 65 Instant porridge 66 Pineapple 66 Taco shells 68 Whole wheat bread 68	Bagel 72 Corn chips 72 Watermelon 72 Honey 73 Mashed potatoes 73 Cheerios 74 Puffed wheat 74 Doughnuts 75 French fries 76 Vanilla wafers 77 White bread 79 Jelly beans 80 Pretzels 81 Rice cakes 82 Mashed potatoes, instant 83 Cornflakes 84 Baked potato 85 Rice, instant 91 French bread 95 Parsnips 97 Dates 100 Compiled by: www.LowGIHealth.com.au from various sources

Figura 8: Alimenti ad alto, medio e basso Indice Glicemico (Fonte: greenMe).

1.6.2 IL CARICO GLICEMICO

Per tenere conto sia dell'indice glicemico, e quindi della qualità dei carboidrati, sia della loro quantità, si può studiare anche il carico glicemico.

Il carico glicemico è dato dal prodotto dell'indice glicemico dell'alimento per la quantità dei carboidrati disponibili contenuti nell'alimento stesso.

Carico glicemico (CG) = (indice glicemico x grammi di carboidrati in una porzione) /100 (Guerreiro et al., 2010).

- Basso carico glicemico, 10 o meno
- Medio carico glicemico, 11-19
- Alto carico glicemico 20+

Il carico glicemico risulta essere fondamentale nel controllo della glicemia, nel momento in cui ci troviamo in presenza di soggetti diabetici.

1.6.3 FATTORI CHE INFLUENZANO L'INDICE GLICEMICO DI UN ALIMENTO

I fattori che influenzano l'indice glicemico di un alimento sono (Bjork et al., 1994):

- materie prime;
- composizione dei carboidrati (se è più ricco di carboidrati semplici l'indice glicemico è più elevato);
- struttura dell'amido (amilosio/amilopectina);
- amido resistente;
- altri fattori nutrizionali in grado di influenzare la digestione e l'assorbimento glucidico;

- presenza di grassi o proteine, presenza di sodio, acidità dell'alimento;
- contenuto e composizione in fibre vegetali: in un alimento possono essere presenti dei carboidrati non disponibili che possono interferire con i processi di digestione ed assorbimento;
- tecnologie impiegate durante la lavorazione;
- ogni trattamento idro-termico, industriale o culinario, provoca una trasformazione dell'alimento che gli conferisce delle proprietà e una digeribilità specifiche;
- cottura in acqua: fornisce le condizioni di temperatura ed umidità da permettere la gelatinizzazione dell'amido. Es. la pasta bollita 5 min ha un GI=34, la pasta bollita 10-12 min ha un GI=45;
- tecnologie industriali di processamento: per esempio con l'estrusione, l'amido viene alterato, l'indice glicemico si alza, in quanto esso viene più facilmente digerito;
- elevate fluttuazioni della risposta glicemica post-prandiale inducono picchi elevati di insulina. Questo porta ad una iperglicemia e iperinsulinemia post-prandiale che col passare del tempo può indurre ad alterazioni metaboliche. Quest'ultime sono (Stefano et al., 2016):
- infiammazione;

- stress ossidativo;
- formazione di prodotti di glicazione;
- attivazione dei fattori della coagulazione;
- alterazione della funzione endoteliale.

I processi elencati sopra, protratti nel tempo possono portare a una serie di patologie cardiovascolari e insorgenza di diabete.

Diversi studi (Thilagam et al., 2013) hanno dimostrato che il tasso ridotto di assorbimento e digestione dei carboidrati sono importanti strategie per sopprimere l'iperglicemia postprandiale, mediante l'inibizione degli enzimi digestivi dei glucidi, come l' α -amilasi pancreatica e l' α -glucosidasi intestinale.

È interessante notare che i composti bioattivi delle piante come i polifenoli e gli antociani, hanno dimostrato di inibire l'attività dell' α -amilasi e dell' α -glucosidasi (Chusak et al., 2018).

La ricerca sull'indice glicemico è stata ampia, con studi che hanno sottolineato il potere delle diete a basso indice glicemico, nel ridurre il rischio di alcune malattie croniche (Barclay et al., 2008). È stato dimostrato che gli alimenti a basso indice glicemico, sono più sazianti rispetto a quelli ad alto indice glicemico e aiutano a limitare la successiva assunzione di cibo (Warren et al., 2003).

Inoltre, studi recenti, hanno dimostrato che le persone in sovrappeso e obese possono perdere peso e aumentare la perdita del grasso corporeo, con diete a basso indice glicemico e allo stesso tempo di avere l'ulteriore vantaggio di migliorare i profili lipidici e ridurre il rischio cardiovascolare (McMillan Price et al., 2006; Thomas et al., 2007; Philippou et al., 2008).

Ricerche precedenti hanno dimostrato che la sostituzione del pane ad alto indice glicemico, con il pane a basso indice glicemico a colazione, pranzo e cena, può alterare favorevolmente il profilo del glucosio (Henry et al., 2006).

Dato l'elevato consumo di bevande nel Regno Unito (Swan, 2004), è stato condotto uno studio mirato a valutare l'impatto di consumare una bevanda contenente un dolcificante naturale a basso indice glicemico durante i pasti, rispetto a una bevanda a base di saccarosio, sul profilo glicemico nelle 24 ore. In questo studio, i soggetti sono stati selezionati in modo casuale, partecipando ad analisi sulla risposta glicemica a diversi alimenti. Ai volontari è stato chiesto di completare un questionario di screening, per valutare le condizioni di salute, compreso il metabolismo del glucosio clinicamente anormale e qualsiasi condizione medica, o farmaci, che potrebbero influenzare la regolazione del glucosio o l'appetito. I risultati ottenuti nel presente studio hanno dimostrato come la sostituzione di una bevanda a base di saccarosio, con una bevanda contenente un dolcificante naturale a basso indice glicemico, durante i pasti, ha

portato a una riduzione della risposta al glucosio. La bevanda a basso indice glicemico, è risultata utile per i soggetti che soffrono di diabete di tipo 2, mentre nei soggetti sani, questa bevanda mantenendo bassi i livelli di glucosio nel sangue, ha ridotto il rischio di sviluppare insulino-resistenza, che è un importante contributo al diabete di tipo 2 (Henry et al., 2009).

1.7 DIABETE

Il diabete mellito (DM) è una malattia metabolica cronica, caratterizzata da iperglicemia, ovvero un'elevata concentrazione di glucosio nel sangue, causata da un difetto di secrezione o di sensibilità insulinica o di entrambe le condizioni. L'iperglicemia cronica può associarsi a complicanze a lungo termine, disfunzione ed insufficienza di diversi organi, in particolare gli occhi, i reni, i nervi, il cuore ed i vasi sanguigni (Karaa et al., 2015).

La prevalenza del diabete mellito nel mondo è aumentata dal 4,7 % nel 1980 all'8,5 % nel 2014. Tra il 2000 e il 2016, si è registrato un aumento del 5 % della mortalità prematura per diabete. Nel 2019, il diabete è stata la nona causa di morte, con una stima di 1,5 milioni di decessi (Global report on diabetes. World Health Organization, Geneva, 2021).

1.7.1 SINTOMI DEL DIABETE

I più comuni sintomi del diabete sono (Makaryus et al., 2006):

- aumento della sete (polidipsia) e aumento della fame;
- eccessiva minzione (poliuria);
- perdita di peso;
- visione sfuocata, lenta cicatrizzazione di ferite;
- stanchezza, disfunzioni sessuali;
- chetoacidosi (carenza grave di insulina, manifestazioni acute).

1.7.2 CLASSIFICAZIONE DEL DIABETE

Il diabete mellito (DM) può essere classificato in 4 forme clinicamente diverse (Kerner et al., 2014):

- Diabete mellito insulino-dipendente (tipo I);
- Diabete mellito non insulino-dipendente (tipo II);
- Diabete mellito gestazionale (GDM);
- Diabete associato ad altre patologie.

1.7.3 DIABETE DI TIPO 1

Il diabete mellito insulino dipendente (tipo 1), è presente in circa il 15 % dei diabetici e può insorgere a qualsiasi età, ma più frequentemente in età giovanile, tra i 9 e i 14 anni. Può essere causato da (Li et al., 2017):

- incapacità del pancreas a produrre quantità sufficienti di insulina;
- dalla produzione pancreatica di una forma anomala di insulina;
- da alterazione nei recettori periferici dell'insulina;
- dalla presenza in circolo di fattori antagonisti che accelerano l'inibizione dell'insulina;
- dalla presenza in circolo di anticorpi anti-cellule insulinogene.

1.7.4 DIABETE DI TIPO 2

Il diabete mellito non insulino dipendente (tipo 2) (Reyes-García et al., 2019) è presente in circa l'85% dei diabetici e può insorgere ad ogni età; è molto frequente tra i 40 e gli 80 anni. È caratterizzato da un'insorgenza lenta e colpisce soggetti frequentemente obesi; in questa condizione c'è una resistenza dei tessuti periferici all'azione dell'insulina, e quindi il livello di quest'ultima può essere normale o addirittura elevato, ma lo scarso numero di recettori ne

riduce l'azione. L'insorgenza è favorita da un'eccessiva alimentazione, per cui si associa a obesità.

1.7.5 DIABETE GESTAZIONALE

Il diabete gestazionale (Kulshrestha et al., 2016) è un disordine metabolico, caratterizzato da una ridotta tolleranza al glucosio, che insorge o viene diagnosticato per la prima volta durante la gravidanza. Gli sconvolgimenti ormonali legati alla gravidanza aumentano la resistenza all'insulina, rendendo le cellule meno sensibili alla sua azione. Il pancreas non sempre riesce a compensare tale deficit attraverso un proporzionale aumento della sintesi e del rilascio di insulina. Il diabete gestazionale è quindi un fenomeno per certi aspetti fisiologico, e come tale, non comporta normalmente gravi pericoli per la madre e il nascituro. È risaputo infatti, che il periodo più a rischio di malformazioni fetali congenite, è quello compreso tra il concepimento e la decima settimana di gravidanza, mentre il diabete gestazionale tende classicamente a presentarsi dopo la ventiquattresima settimana, quando lo sviluppo di organi ed apparati è ormai completato.

1.7.6 DIABETE ASSOCIATO AD ALTRE PATOLOGIE

Il diabete può essere associato ad altre patologie (Reyes-García et al., 2019), in effetti i soggetti diabetici hanno una probabilità 5 volte più alta di sviluppare

malattie cardiovascolari, quali ad esempio l'ictus, rispetto alle persone che non sono affette da patologia.

Altre problematiche sono legate a:

-deterioramento e insufficienza renale (nefropatia diabetica);

-danni all'occhio e alla retina (nefropatia diabetica);

-disfunzione a carico del sistema nervoso e nervi periferici (neuropatia diabetica).

1.8 SISTEMA DI MONITORAGGIO CONTINUO DEL GLUCOSIO (CGMS)



Figura 9: CGMS (Fonte: <https://totall.in/wp-content/uploads/2020/11/cgms2.jpg>)

Il sistema di monitoraggio continuo del glucosio (CGMS, figura 9) è uno strumento innovativo che registra i livelli di glucosio interstiziale ogni 5 minuti, fornendo una versione dettagliata del profilo del glucosio, per mostrare potenzialmente quando e in che misura un intervento alimentare influisce sulle escursioni glicemiche. L'altro principale vantaggio di questa nuova tecnologia è che il monitor può essere indossato in modo discreto, consentendo al soggetto di continuare la sua vita quotidiana. Questo dà una visione unica di come la dieta influisce sul profilo glicemico in diversi momenti della giornata.

1.9 METODI RAPIDI PER LA DETERMINAZIONE DELLA GLICEMIA

La glicemia può essere misurata mediante un normale prelievo di sangue venoso dal braccio oppure con automonitoraggio grazie all'aiuto di uno strumento chiamato glucometro (Klatman et al., 2019).

Il glucometro è uno strumento di semplice utilizzo per la misurazione della glicemia, ovvero della concentrazione di glucosio nel sangue ed è utilizzato soprattutto dai pazienti affetti da diabete mellito. Il sangue per la misurazione viene solitamente prelevato dal circolo capillare, attraverso un piccolo foro

praticato sulla punta del dito del paziente tramite un pungidito o lancette pungidito e depositato sulla striscia reattiva (Figura 10). La misurazione del tasso glicemico avviene tramite la quantificazione della reazione enzimatica di ossidazione del glucosio, proporzionale alla sua concentrazione nel sangue ed operata dall'enzima glucosio ossidasi. Nel metodo riflettometrico, che caratterizza i riflettometri, viene misurata l'intensità del colore del cromogeno generato dalla reazione, mentre nel metodo impedenziometrico dei glucometri viene misurata la conduttività elettrica del sangue stesso, indotta dalla corrente generata dalla reazione di ossidoriduzione stessa. Mediamente i glucometri moderni impiegano tra i 5 e i 10 secondi ad analizzare il campione di sangue prelevato, mentre i primi modelli impiegavano circa 30 secondi. Le strisce, su cui posizionare le gocce di sangue devono essere, a seconda dei modelli, inserite manualmente o in automatico: in quest'ultime, è sufficiente inserire un rullino o un dischetto, accendere l'apparecchio e attendere che la striscia esca (Ruiz et al., 2020).



Figura 10: Goccia di sangue entra per capillarità nella striscia reattiva inserita nel glucometro.

1.10 VALORI GLICEMIA

I valori di riferimento della glicemia (Fonte Medscape) sono:

A digiuno:

- Soggetti sani hanno valori compresi tra 70 e 99 mg/dL;
- Un valore compreso tra 100 e 125 mg/dL è indicativo di alterata glicemia a digiuno (pre-diabete);
- Un valore pari a 126 mg/dL o superiore, nella maggior parte dei casi è segno di diabete.

Due ore dopo il pasto

- Soggetti sani hanno valori inferiori a 140 mg/dL;
- Soggetti con intolleranza glucidica hanno valori tra 140 e 200 mg/dL;
- Soggetti diabetici hanno valori più alti di 200 mg/dL.

In un momento qualsiasi della giornata, un valore di glicemia che supera i 200 mg/dL è considerato segno di malattia diabetica.

Risultati superiori ai 400 mg/dL sono considerati pericolosi e richiedono attenzione medica immediata e urgente.

È infine considerata ipoglicemia (valori bassi) un esito inferiore a 60 mg/dL.

1.11 CURVA DA CARICO ORALE DEL GLUCOSIO

In molti casi un disturbo del metabolismo glucidico non è rilevabile con la semplice determinazione della glicemia a digiuno, o perché è troppo lieve o perché è ancora in fase iniziale della sua evoluzione. A questo scopo risulta molto indicativo il comportamento del tasso di glucosio ematico sotto particolari stimoli in grado di impegnare in modo pronunciato i meccanismi della regolazione glicemica, mettendone in evidenza eventuali limitazioni funzionali.

Con i cosiddetti “test di tolleranza al glucosio” (Oral glucose tolerance test = OGTT) si cerca di stabilire l’intensità con cui un individuo risente di un apporto adeguato di glucosio (o di una dose di farmaci ipoglicemizzanti) ed il tempo che egli impiega a recuperare l’equilibrio fisiologico (Bonongwe et al., 2015).

La curva da carico orale del glucosio è utile per stabilire la diagnosi di diabete mellito, ancora quando le alterazioni metaboliche sono di lieve entità e per lo studio del diabete in gravidanza. La curva da carico orale del glucosio misura le variazioni nel tempo della glicemia, dopo la somministrazione di glucosio per via orale (o endovenosa). Si pratica facendo ingerire in un tempo di 5 minuti, una dose orale di 75 g di glucosio, sciolto in circa 300 mL di acqua. Si prelevano poi campioni di sangue ad intervalli di 30, 60, 120 e 150 minuti e si

esegue su di essi la glicemia; si esamina anche l'urina. I risultati riportati in grafico, costituiscono la cosiddetta "curva glicemica" (Bonongwe et al., 2015).

-I soggetti non-diabetici non hanno glucosio nell'urina e mostrano il livello glicemico più elevato dopo 30-60 minuti, e successivamente i livelli si abbassano e tornano normali.

-Nei diabetici gravi la glicemia raggiunge il picco dopo 30-60 minuti, e poi i livelli restano elevati.

Il test post-prandiale (Farhat et al., 2019) serve per lo studio del diabete; si preleva un campione di sangue a due ore dalla fine del pasto di mezzogiorno.

Una glicemia post-prandiale inferiore a 120 mg/dL è normale, mentre i soggetti con valori superiori devono essere avviati all'esecuzione di una completa curva da carico glucidico (Figura 11).

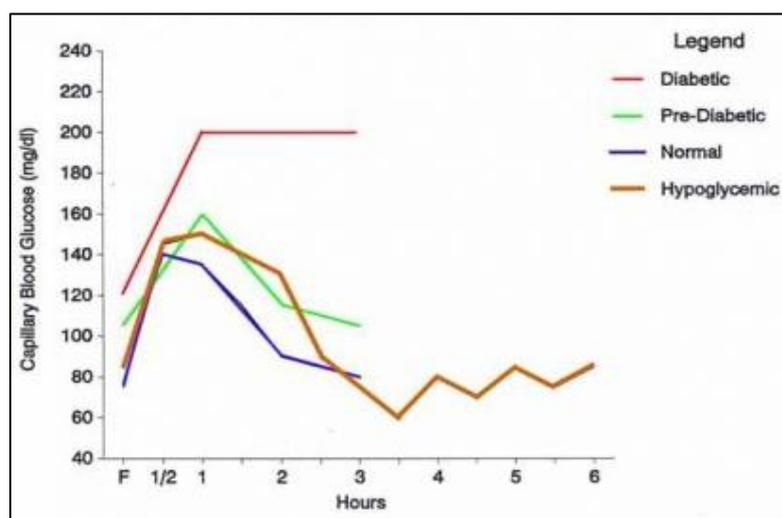


Figura 11: Curva da carico orale del glucosio (Fonte: salutarmente.it).

1.12 SCOPO DELLA TESI

Il lavoro di questa tesi riguarda uno studio pilota tipo ‘Proof-of-Concept’, per dimostrare il possibile utilizzo del tè Rooibos, sia assunto come bevanda, sia assunto attraverso un alimento come il pane, nel ridurre la glicemia post-prandiale. In particolare, lo studio è stato rivolto ad indagare se la consumazione di un infuso a caldo di Rooibos verde (non fermentato), o di pane in cui viene utilizzato un infuso di Rooibos verde per l’impasto invece di solo acqua, può contribuire ad abbassare la glicemia post-prandiale in persone sane. Inoltre, sono stati determinati i polifenoli totali e la capacità antiossidante nelle seguenti matrici: 1) nell’infuso di Rooibos utilizzato per la preparazione del pane; 2) nel pane stesso preparato con l’infuso di Rooibos; 3) nel pane di Controllo preparato con solo acqua.

I risultati ottenuti potranno prestarsi ad incrementare le conoscenze sul potere ipoglicemico di questa bevanda e di proporla come coadiuvante naturale per diete ipoglicemiche.

2. MATERIALI E METODI

2.1 INFUSO E PANE (CONTROLLO E ROOIBOS)

Le prove sperimentali sono state svolte *in vivo*, reclutando dei volontari, che sono stati sottoposti prima al controllo della glicemia, utile per confrontare in seguito, i risultati ottenuti dopo l'assunzione dell'infuso o pane al Rooibos. Per gli infusi, il Controllo consisteva nel mangiare 100 g di pane bianco a fette (marca Mulino Bianco) equivalente a 50 g di carboidrati secondo l'etichetta nutrizionale (corrispondente a 5 fette), seguito da un bicchiere di acqua (250 mL). La prova glicemica con il Rooibos, invece, consisteva nel mangiare sempre 5 fette dello stesso pane bianco, seguito da un bicchiere contenente 250 mL dell'infuso Rooibos (3.1 g di Rooibos in 250 mL di acqua).

Per il pane, i volontari hanno eseguito prima il Controllo, che consisteva nel mangiare 100 g di pane (corrispondente a 50 g di carboidrati), preparato in laboratorio con 300 ml di acqua. La prova glicemica con il Rooibos consisteva nel mangiare 100 g di pane, preparato con l'infuso Rooibos (15 g di Rooibos in 300 mL acqua).

Per determinare la quantità di carboidrati nel pane, è stato preso in considerazione i g di carboidrati nella farina e nello zucchero, riportati sulle etichette nutrizionali (Farina = 69 g carboidrati/100 g; Zucchero = 100 g

carboidrati/100 g) e impostando le proporzioni sulla base della quantità di farina (300 g) e zucchero (7 g) usati per preparare il pane, si calcolano i g di carboidrati presenti nei due ingredienti. Quindi vengono sommati i g di carboidrati presenti nel pane ed in base al peso ottenuto del pane, si effettua una proporzione per ricavare la quantità di pane corrispondente a 50 g di carboidrati, da servire ai volontari.

I volontari, che per la prova con l'infuso (Controllo e Rooibos) erano 10, mentre per il pane (Controllo e Rooibos) erano 9, hanno misurato la glicemia con il glucometro a digiuno, ed in seguito dopo aver assunto gli infusi o i pani, ad intervalli di 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minuti. La misurazione della glicemia con il glucometro (Figura 12) consisteva nell'effettuare un prelievo di una goccia di sangue con il pungidito sulla punta del dito della mano, per poi depositarla sulla striscia reattiva. Quest'ultima doveva essere già inserita nel glucometro, in modo tale da leggere dopo qualche secondo il valore glicemico. Successivamente, dopo aver fatto entrambe le analisi, sono state costruite le curve glicemiche di tutti i volontari, in modo tale da poter confrontare il Controllo, rispetto alla prova con l'infuso di Rooibos.



Figura 12: Glucometro utilizzato dai volontari (Marca Contour XT).

Ai reclutanti, durante le prove sono stati affidati dei questionari (Figura 13), utili per attribuire, considerando la scala della sazietà (Figura 14), un giudizio numerico soggettivo (da 1 a 10), relativo al desiderio di mangiare il cibo preferito, allo stato di pienezza o alla sensazione di malessere. Il questionario doveva essere compilato a digiuno e dopo aver consumato le pietanze, ad ogni singolo intervallo, con l'accuratezza di riportare anche il valore glicemico, ottenuto dopo la misurazione con il glucometro. Nella prima parte del questionario, i volontari hanno fornito informazioni su peso, altezza, BMI (Body Mass Index), sul quadro clinico, sull'assunzione di farmaci o integratori, sull'attività sportiva e se erano o meno fumatori. Il BMI O IMC (Indice di Massa Corporea), si calcola dividendo il peso corporeo (kg), per l'altezza (cm) al quadrato (Zemestani et al., 2016).

<p>QUESTIONARIO DI VALUTAZIONE:</p> <p>Progetto: Infuso Rooibos e Pane Rooibos</p> <p>DATI GENERALI:</p> <p>Sesso:</p> <p>Peso:</p> <p>Altezza:</p> <p>BMI:</p> <p>Quadro Clinico:</p> <p>Assunzione farmaci o integratori:</p> <p>Attività sportiva:</p> <p>Fumatore:</p>	<p>DOMANDE (risposte da 1 a 10)</p> <p>1) Quanto hai fame? Intervalli: 0 15 30 45 60 90 120</p> <p>2) Quanto è forte il tuo desiderio di mangiare il tuo cibo preferito in questo momento? Intervalli: 0 15 30 45 60 90 120</p> <p>3) Quanto ti senti pieno adesso? Intervalli: 0 15 30 45 60 90 120</p> <p>4) Quanto ti senti male adesso? Intervalli: 0 15 30 45 60 90 120</p> <p>5) Quanto ti senti stressato? Intervalli: 0 15 30 45 60 90 120</p> <p>6) Quanto fortemente credi di averne avuto abbastanza? Intervalli: 0 15 30 45 60 90 120</p>
--	---

Figura 13: Esempio del questionario compilato dai volontari.

2.2 MISURAZIONE DELLA GLICEMIA POST-PRANDIALE

La rilevazione della glicemia dopo 2 ore dal pasto è stata eseguita sui volontari che hanno partecipato a questo studio; il tutto è stato svolto prendendo come punto di riferimento un lavoro precedente (Faqih et al., 2006).

Considerando le analisi riguardanti il profilo glicemico, secondo la letteratura (Chusak et al., 2018) la consumazione del pane bianco più acqua o infuso e del pane Controllo o del pane Rooibos, doveva avvenire entro 5 minuti.

Come in un lavoro svolto precedentemente (Medgal et al., 2010) prima di eseguire entrambe le prove (pane e infuso), i volontari hanno effettuato un digiuno notturno pari a 12 ore. Tutti i soggetti erano in buone condizioni di salute, senza disturbi metabolici identificati.

2.3 PREPARAZIONE DEGLI INFUSI DI GREEN ROOIBOS

MATERIALE OCCORRENTE:

- Green Rooibos;
- navicella;
- bilancia analitica;
- spatole;
- bollitore;
- acqua naturale Frasassi;
- tazze;
- colino;
- microonde.

PROCEDIMENTO

Di volta in volta, sono stati preparati infusi per tre persone.

La bevanda è stata preparata, in base alla seguente procedura:

-il Green Rooibos è stato posto su una navicella e la quantità pari a 3.1 g è stata pesata con l'aiuto di una bilancia analitica. Naturalmente, dovendo preparare infusi per tre persone, sono stati pesati 9.3 g di Rooibos.

-In seguito, è stato trasferito da una navicella ad una tazza grande.

-Contemporaneamente, 1 L di acqua minerale naturale (Frasassi, sorgente Piagge del Prete, Marche) è stata riscaldata in un bollitore e 750 mL (pari a 3 tazze da 250 mL) sono stati versati in una teiera pyrex contenente il Rooibos.

-La teiera (Figura 15) è stata subito posta in un microonde a potenza 100 W, per continuare l'ebollizione ulteriori 5 minuti. Questa procedura consente la massima estrazione di polifenoli e capacità antiossidante, come riportato in letteratura (Damiani et al., 2019).



Figura 15: Teiera, contenente infuso di Green Rooibos.

-Infine, l'infuso ottenuto è stato filtrato con un colino dalla teiera a tre tazze piccole (Figura 16) ed un volume di infuso pari a 250 mL è stato servito ai volontari, che naturalmente hanno potuto degustare la bevanda dopo averla fatta raffreddare per qualche minuto, dato che la temperatura prima di bere il tè era pari a 30-40 °C.

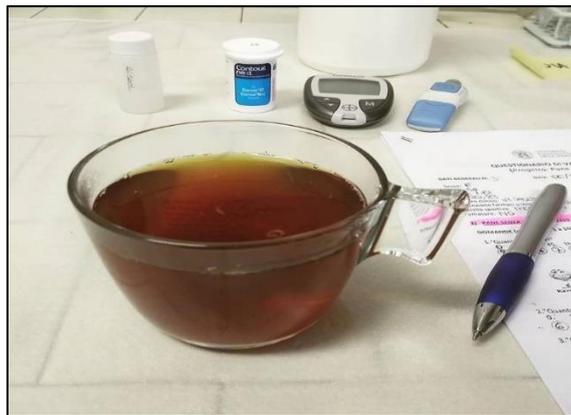


Figura 16: Tazza con infuso di Green Rooibos.

2.4 PREPARAZIONE DEL PANE

Per eseguire le prove glicemiche post-prandiali sul pane di Controllo e su quello con il Rooibos, il pane è stato preparato in laboratorio tramite un'apposita macchina per il pane (Silver Crest SBB 850 E1, TARGA GmbH, Germania) (Figura 17).



Figura 17: Macchina per il pane.

Questa macchina è costituita da un recipiente di cottura in cui vengono inseriti gli ingredienti per impastare, lievitare e cuocere il pane.

2.4.1 PANE PER IL CONTROLLO

Per il pane di controllo (Figura 18), sono stati utilizzati:

- 200 mL di acqua minerale naturale (Frasassi, sorgente Piagge del Prete, Serra San Quirico (AN));
- 300 g di farina tipo 1, bianca (Farina delle Marche, Molino Spadoni);
- 7 g di zucchero bianco (Eridania);
- 3 g di sale fino iodato (Italkali);

-3.5 g di lievito di birra liofilizzato (MastroFornaio, PaneAngeli).

Per la preparazione, dovevano essere rispettate le seguenti fasi presenti nel libretto di istruzioni della macchina.

-Estrarre il recipiente di cottura dalla macchina per il pane, sfilandolo verso l'alto.

-Inserire i due ganci per impastare, sfalsati di 180° sui perni; in questo modo è possibile perfezionare il risultato dell'impasto.

-Aggiungere gli ingredienti al recipiente di cottura; di solito si introducono prima quelli liquidi, in questo caso l'acqua, seguita da farina, zucchero e sale e alla fine si aggiunge il lievito, per evitare che entri in contatto con l'acqua.

-Si reinserte il recipiente di cottura nella macchina per il pane;

-Si chiude il coperchio e si collega la presa elettrica e si accende l'interruttore principale. In seguito, si avverte un segnale acustico e sul display appare il tasto A con il numero del programma. In questo caso è stato scelto il programma 1, con la durata del ciclo corrispondente per la preparazione del (preriscaldamento, impasto, lievitazione, cottura e mantenimento del calore), pari a 3 ore;

- E' stato selezionato il peso del pane con il tasto B e il tasto di doratura con il tasto C; in questo caso è stata scelta una doratura media;

-Premendo il tasto START si avviava il programma desiderato e le singole fasi si susseguono automaticamente.

Dopo 1 ora e 30 minuti, durante la seconda fase di lievitazione, sul display appare la funzione RMV, (Remove). Essa permette di rimpicciolire l'alveolatura presente nel pane, una volta pronto, poiché è determinata solo dai ganci sottili. Al momento dell'estrazione, il pane non viene più lacerato dai ganci per impastare e può essere prelevato più facilmente.

Quindi, appena compare sul display il tasto RMV, occorre premere il tasto start/stop, per interrompere l'esecuzione del programma per 10 minuti; si apre il coperchio e si estrae il recipiente di cottura, si preleva l'impasto con le mani infarinate, si rimuovono i ganci e si rimette il preparato nel recipiente di cottura. Si posiziona l'impasto al centro del recipiente di cottura, per poi distribuirlo in modo uniforme e in questo modo, si otterranno dei risultati di cottura ottimali. In seguito, si reinsertisce il recipiente di cottura nella macchina per il pane, si chiude il coperchio e si preme il tasto START, per continuare l'esecuzione del programma. Alla fine della cottura, ovvero dopo 55 minuti, la macchina passa in una fase di mantenimento del calore. Il pane è stato lasciato per altri 30 minuti, per cuocersi meglio (Figura 19).

Successivamente il pane viene estratto dal recipiente di cottura e lasciato raffreddare per 30 minuti, prima di degustarlo.



Figure 18: Pane Controllo.



Figura 19: Pane lasciato raffreddare nel recipiente di cottura.

2.4.2 PANE CON INFUSO DI ROOIBOS

Il pane preparato con infuso di Rooibos (Figura 20) è stato preparato seguendo lo stesso protocollo usato per il pane per il Controllo, ma utilizzando l'infuso con il Rooibos invece di acqua. L'infuso è stato preparato come descritto nella sezione 2.4, utilizzando 15 g di Rooibos verde in 300 mL di acqua.



Figura 20: Pane con Rooibos

2.5 ANALISI SENSORIALE

Durante le prove glicemiche post-prandiali a ciascun volontario, è stato affidato un questionario (Figura 21), relativo all'analisi sensoriale, effettuata sia per il pane Controllo, sia per il pane preparato con l'infuso di Rooibos. Il compito di ciascun volontario è stato quello di attribuire un valore numerico soggettivo, da 0 a 4, alle voci di ciascuna caratteristica del pane, riguardanti l'apparenza, il profumo, il sapore, la texture e il retrogusto, come riportato nell'esempio sottostante.

	Giudizio da 0 a 4
Apparenza	
Grado di scurità della crosta	
Grado di scurità della mollica	
Porosità	
Maculato	
Scorrevolezza della crosta	
Profumo	
Lievito	
Farinoso	
Farina di frumento	
Ammuffito	
Maltato	
Nocciola	
Dolce	
Tostato	
Sapore	
Dolce	
Salato	
Acido	
Amaro	
Burroso	
Oleoso	
Semi	
Texture	

Durezza	
Adesività	
Rugosità	
Secchezza	
Grasso	
Retrogusto	
Amaro	
Tostato	
Acido	
Dolce	

Figura 21: Esempio di questionario relativo all'analisi sensoriale del pane.

2.6 METODI *IN VITRO* PER LA DETERMINAZIONE DELLA CAPACITA' ANTIOSSIDANTE E DEL CONTENUTO TOTALE DEI POLIFENOLI.

Per determinare la capacità antiossidante *in vitro* e il contenuto totale dei polifenoli negli infusi e nei pani, sono stati utilizzati i saggi ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) ed il saggio di Folin-Ciocalteu rispettivamente, poiché questi sono i saggi più comunemente usati per l'analisi di questi parametri negli alimenti, bevande e matrici biologiche.

2.6.1 ORAC ASSAY

La capacità di assorbimento dei radicali dell'ossigeno (ORAC), è un metodo per misurare le capacità antiossidanti in campioni biologici *in vitro*. Il saggio misura la degradazione ossidativa della molecola fluorescente (beta-

ficoeritrina o fluoresceina), indotta da generatori di radicali liberi, come i composti azo-iniziatori (Gunawardena et al., 2019).

Questi ultimi sono termolabili, quindi si decompongono a determinate temperature, generando in maniera costante il radicale perossilico. Questo radicale è responsabile dell'ossidazione della molecola fluorescente, con conseguente perdita di fluorescenza. In presenza di composti antiossidanti, il radicale perossile viene neutralizzato, risparmiando quindi l'ossidazione della molecola fluorescente e la conseguente perdita della sua fluorescenza (Gunawardena et al., 2019). La sonda normalmente utilizzata è la fluoresceina e la reazione viene seguita spettrofotometricamente con un lettore di piastre.

L'intensità della fluorescenza della fluoresceina diminuisce con il procedere della degenerazione ossidativa e la reazione viene tipicamente monitorata per 3 ore, dopo l'aggiunta dell'azo-iniziatore. La decomposizione della fluoresceina (Figura 22) viene misurata in presenza ed in assenza di composti antiossidanti, dove la presenza di quest'ultimi comporta un rallentamento nel decadimento di fluorescenza. I dati sono rappresentati da curve di decadimento, le quali rappresentano l'intensità di fluorescenza in funzione del tempo e i risultati vengono calcolati, come variazione di area sottesa alla curva (AUC), ottenuta in presenza ed in assenza di antiossidanti (Ou et al., 2013).

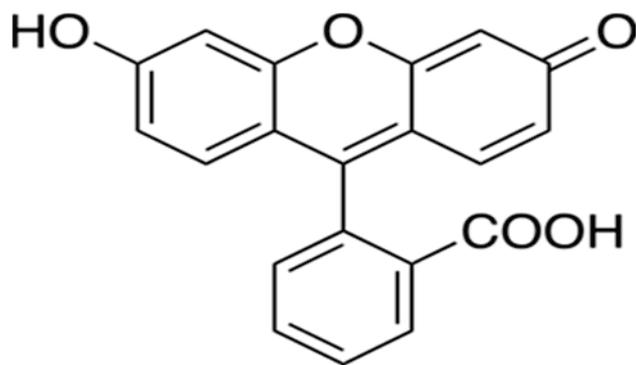


Figura 22: Fluoresceina (Fonte: chimicaonline.it).

La capacità antiossidante del composto di interesse viene poi calcolata confrontando l'AUC ottenuta in presenza dell'antiossidante con una retta standard, ottenuta utilizzando diverse concentrazioni di Trolox (un analogo idrosolubile della vitamina E con nota attività antiossidante). I risultati dei campioni di interesse vengono espressi come “equivalenti di Trolox” o TE, come riportato in letteratura (Bacchetti et al., 2020).

Un vantaggio dell'utilizzo del metodo ORAC per valutare le capacità antiossidanti delle sostanze, è che tiene conto dei campioni con e senza fasi di ritardo delle loro capacità antiossidanti. Ciò è particolarmente utile quando si misurano alimenti e integratori che contengono ingredienti complessi con vari antiossidanti ad azione sia lenta che rapida, nonché ingredienti con effetti combinati che non possono essere calcolati in anticipo (Bacchetti et al., 2020).

Questo saggio è uno dei più completi per indagare i meccanismi antiossidanti, poiché si basa su elettrone donazione, idrogeno donazione e quenching da parte delle molecole antiossidanti (Brugè et al., 2012). Questo è un vantaggio, ma è anche un limite, perché ci sono dei meccanismi antiossidanti che non vengono analizzati, come ad esempio la chelazione dei metalli. Ogni saggio di attività antiossidante ha dei limiti, tuttavia l'ORAC è considerata la metodica più completa. Infatti, normalmente si combinano diversi saggi antiossidanti *in vitro* per valutare la capacità antiossidante totale di un campione (Brugè et al., 2012).

Gli svantaggi del metodo ORAC sono:

- viene misurata solo l'attività antiossidante contro radicali (probabilmente principalmente perossilici); tuttavia, la formazione di radicali perossilici non è mai stata dimostrata.

- la natura della reazione dannosa non è caratterizzata.

- non ci sono prove che i radicali liberi siano coinvolti in questa reazione.

- non ci sono prove che i valori ORAC abbiano un significato biologico dopo il consumo di qualsiasi alimento (Bacchetti et al., 2020).

MATERIALI E REAGENTI:

- Tampone Fosfato salino PBS, 75 mM;

-Fluoresceina, 0.008 mM (in PBS);

-Trolox, 10 mM (in metanolo);

-AAPH, 148 mM (in PBS);

-Piastrine multi-well da 96 pozzetti e nere per fluorescenza.

Utilizzando il metodo descritto in letteratura (Bacchetti et al., 2020) è stato effettuato il saggio ORAC, per determinare la capacità antiossidante *in vitro*, degli estratti di pane (Controllo e Rooibos) e dell'infuso di Rooibos.

PANI:

Gli estratti dei pani sono stati preparati nel seguente modo: il pane è stato tritato manualmente con un coltello e 1.5 g sono stati messi in 7 mL di acqua in una Falcon da 50 mL. La Falcon è stata posta sotto agitazione su un oscillatore a 140 rpm, tutta la notte in camera fredda a 4 °C. Successivamente è stata effettuata una centrifuga a 2000 g/20 min e sul sovrnatante sono state effettuate le seguenti diluizioni:

-per la diluizione 1:50 vengono diluiti 20 µL con 98 µL di acqua;

-per la diluizione 1:100 vengono diluiti 100 µL della diluizione 1:50 con 100 µL di acqua;

-per la diluizione 1:200 vengono diluiti 50 μL della diluizione 1:100 con 50 μL di acqua.

INFUSI:

-per la diluizione 1:100 vengono diluiti 10 μL di campione con 990 μL di acqua;

-per la diluizione 1:200 vengono diluiti 100 μL della diluizione 1:100 con 100 μL di acqua;

-per la diluizione 1:500, vengono diluiti 20 μL della diluizione 1:100 con 80 μL di acqua.

Dalla soluzione 200 μM di Trolox, sono state effettuate una serie di diluizioni seriali 1:2, quindi sono state ottenute le seguenti concentrazioni decrescenti: 200, 100, 50, 25, 12.5 e 6.25 μM , realizzando quindi una retta standard di Trolox, con un range da 6.25 a 200 μM .

Lo stock di fluoresceina 4.2 mM è stato diluito in PBS per ottenere una concentrazione intermedia di 42 μM , la quale è stata utilizzata per creare una working solution di 0.08 μM .

La concentrazione finale della fluoresceina è 0.08 μM in PBS, mentre la concentrazione finale di AAPH è 18.5 mM.

È stato utilizzato una micropiastra da 96 pozzetti (Figura 23); per quanto riguarda i volumi presenti in ciascun pozzetto, in ognuno sono stati inseriti 25 μ L di campione o Trolox o PBS (per il bianco), 150 μ L di fluoresceina e 25 μ L di AAPH; l'AAPH è stato inserito per ultimo, in quanto avvia la reazione.



Figura 23: Plate da 96 pozzetti (Fonte: Fischer Scientific).

La diminuzione della fluorescenza è stata monitorata per 3 ore mediante un lettore di micropiastre (Biotek), con letture ogni 4 minuti, utilizzando lunghezze d'onda a 485 nm (eccitazione) e 530 nm (emissione). La capacità antiossidante dei campioni è stata valutata in base alla differenza tra le aree della curva di decadimento (AUC) della fluoresceina e quella del campione. Gli esperimenti sono stati condotti in triplicato per 3 volte e i risultati sono espressi come mM di Trolox equivalenti (mM TE).

2.6.2 FOLIN-CIOCALTEAU ASSAY

Il saggio di Folin-Ciocalteu (FC) (Figura 24), sfrutta la capacità del reattivo di FC di reagire con i fenoli presenti nel campione di interesse, ossidandoli, con conseguente formazione di prodotti cromofori che mostrano un picco di

assorbimento a 765 nm (Abderrahim et al., 2016). Il reattivo di Folin è una miscela in soluzione acquosa di fosfomolibdato e fosfotungstato, utilizzata in chimica analitica per la determinazione dei fenoli e dei polifenoli. Nello specifico, in ambiente basico si ha la deprotonazione dell'anello fenolico con formazione dell'anione fenolato, ione in grado di ridurre il FC che, una volta ridotto, presenta un picco di assorbimento a 750 nm (Singleton et al., 1965). L'incremento dell'assorbanza a 750 nm è quindi proporzionale alla concentrazione totale di composti fenolici negli estratti di interesse. La concentrazione di polifenoli viene poi espressa come equivalenti di acido gallico (GAE mM). L'acido gallico (Figura 25) è un polifenolo appartenente alla sottoclasse degli acidi fenolici ed esso viene utilizzato per realizzare una retta standard, che servirà per la quantificazione dei polifenoli (Carrieri et al., 2016). Il reattivo è comunque non specifico, in quanto reagisce anche con altre specie riducenti, tant'è che viene utilizzato anche per altri analiti: proteine (saggi di Folin-Lowry) e composti contenenti azoto (Magalhaes et al., 2008).

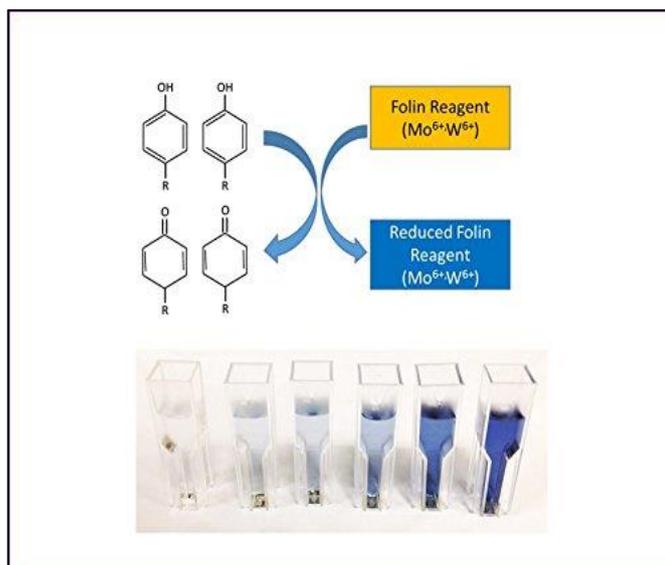


Figura 24: Metodo di Folin-Ciocalteu (Fonte: en.wikipedia.org).

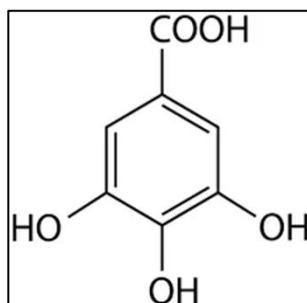


Figura 25: Acido gallico (Fonte: Chimicamo.org).

Per l'analisi dei polifenoli è stata eseguita la procedura descritta in letteratura (Bacchetti et al., 2020), che prevede:

- 1) SOLUZIONE STOCK STANDARD: Acido Gallico esaidrato (0.0068 g Acido Gallico + 2 mL di acqua).

In seguito, è stata costruita la curva standard, con le seguenti concentrazioni: 8, 5, 2.5, 1.25 e 0.625 mM.

2) SOLUZIONE DI CARBONATO DI SODIO Na_2CO_3 (20% p/v).

Per i campioni di infuso di Rooibos e pane (Controllo e Rooibos), è stata effettuata una diluizione di 1:5. Per i pani, prima di procedere alla diluizione, è stata eseguita la procedura descritta per il saggio ORAC nella sezione 2.7.1.

Successivamente, 20 μL di campione diluito o acido gallico o acqua sono stati aggiunti a 100 μL di Folin e 1580 μL di H_2O in una eppendorf.

Infine, sono stati aggiunti 300 μL di Na_2CO_3 (20%).

Poi tutti i campioni sono stati:

- vortexati per qualche secondo;
- incubati in bagnetto termostato per 30 minuti a 40 °C (la soluzione assume un colore blu-viola);
- sottoposti a lettura dell'assorbanza allo spettrofotometro a 765 nm, utilizzando macrocuvette.

I polifenoli totali presenti nei campioni vengono espressi, utilizzando la retta standard, come g di acido gallico equivalente (GAE)/L di estratto.

I risultati ottenuti sono la media di tre esperimenti eseguiti in triplicato.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 INFUSI E PANI

I dati ottenuti sia delle prove glicemiche post-prandiali sui pani che sull'infuso, sono stati elaborati seguendo le indicazioni riportate in letteratura (Camps et al., 2017).

Sono stati riportati i valori glicemici che i volontari hanno segnato sui questionari a digiuno e dopo l'assunzione di infuso o pani, ad intervalli di 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minuti, e per ciascun volontario è stata costruita la curva glicemica.

3.1.1 INFUSI

I volontari erano 8 donne e 2 uomini, con un'età media compresa tra 24 e 35 anni, normopeso, in quanto la media del BMI (Body Mass Index) dei soggetti è pari a 21 ± 2 kg/m² (Tabella 1). Per gli infusi è stata calcolata la media e la deviazione standard dei valori glicemici dei reclutati a digiuno, sommando i risultati ottenuti durante la prova per il controllo e la prova con l'infuso Rooibos; il valore ottenuto era pari a 84 ± 7 mg/dL. Considerando che a digiuno i soggetti sani hanno valori compresi tra 70 e 99 mg/dL (Fonte: Medscape), osservando i risultati in tabella (Tabella 2) e la media ottenuta, è possibile constatare che i volontari erano normo-glicemici.

Volontario	Sesso	BMI (kg/m²)
1	Femmina	19
2	Femmina	23
3	Femmina	19
4	Femmina	23
5	Maschio	19
6	Maschio	22
7	Femmina	24
8	Femmina	20
9	Femmina	21
10	Femmina	22
Media±DS		21±2

Tabella 1: Sesso e BMI dei volontari.

Volontario	Glicemia a digiuno mg/dL	
	Controllo	Rooibos
1	94	87
2	86	81
3	89	91
4	79	72
5	90	95
6	88	90
7	72	89
8	80	72
9	81	76
10	84	89
Media±DS	84±7	

Tabella 2: Valori Glicemici dei volontari a digiuno.

Sono stati riportati in tabella 3, i risultati relativi al picco glicemico (PG) del Controllo e della prova con il Rooibos per ciascun volontario. Dalle curve glicemiche dei volontari (non riportati), è stato osservato che il PG viene

raggiunto in tempi diversi da ogni volontario in entrambi i gruppi, mediamente a 45 min e dall'analisi statistica (t-test), non risultano differenze tra i due gruppi. La media e la deviazione standard del Controllo era pari a 138±14 mg/dL, mentre quella con l'infuso era pari a 141±13 mg/dL. Dai risultati riportati in tabella si può evincere che per 6 volontari il PG dopo aver bevuto l'infuso, è risultato più elevato rispetto al Controllo, per 3 reclutanti, è risultato più basso rispetto al Controllo e solamente per 1 soggetto il PG è rimasto invariato per entrambe le prove. Tuttavia, l'analisi statistica (t-test) tra i due gruppi non ha messo in evidenza alcuna differenza (p=0.47), indicando che l'assunzione dell'infuso Rooibos non provoca una variazione del picco glicemico (Cmax) e non modifica il tempo impiegato a raggiungere questo picco (Tmax).

Volontario	Cmax Controllo mg/dL	Tmax Rooibos mg/dL
1	136	120
2	145	150
3	161	154
4	126	142
5	139	150
6	125	146
7	113	124
8	139	125
9	142	142
10	152	154
Media±DS	138±14	141±13

Tabella 3: Picco Glicemico (Controllo e Rooibos) dei volontari.

Sono stati raccolti in tabella 4 i dati relativi all'AUC del controllo e del Rooibos (AUC = area incrementale sotto la curva); è stato calcolato il rapporto tra le due aree espresso in percentuale: $(\text{AUC Rooibos})/(\text{AUC controllo}) \times 100$. In seguito, considerando che l'IG dell'alimento standard (pane bianco usato per il Controllo) è uguale a 100, sottraendo per ciascun volontario a questo valore il rapporto tra le due aree calcolato in precedenza, è stata espressa la percentuale di inibizione. Quest'ultimo dato consente di rilevare se il Rooibos contribuisce ad abbassare o meno la glicemia post-prandiale nei volontari. Come si può notare nella tabella 4, con l'infuso solo in due casi il Rooibos ha contribuito ad abbassare la glicemia post-prandiale (volontari 3 e 7). In quest'ultimi si è verificata una riduzione rispettivamente del 24 e 22 %, rispetto agli altri reclutanti in cui si è verificato un aumento della glicemia dopo aver assunto l'infuso. L'analisi statistica (t-test) effettuata sui due gruppi risulta non significativa ($p=0.125$), tuttavia escludendo i volontari 3 e 7, le differenze tra i due gruppi sono nettamente significativi ($p=0.003$). Quindi, escludendo i due responders, l'assunzione di una tazza di Rooibos verde, bollita, significativamente aumentava la glicemia post-prandiale. Questo dato è in contrasto con quanto riportato in letteratura, sebbene tutti gli studi fatti fino ad ora per dimostrare il potere ipoglicemizzante *in-vivo* del Rooibos sono stati effettuati su modelli murini o primati non-umani diabetici o pre-diabetici, e

utilizzando un trattamento lungo con estratti di Rooibos verde arricchiti in Aspalatina (Afrplex GRT) (Patel et al., 2021; Omolaoye et al., 2021; Orlando et al., 2019). Gli estratti di Rooibos verde arricchiti in polifenoli sono stati utilizzati anche in numerosi studi *in-vitro*, dove sono riportati il potere ipoglicemizzante del Rooibos (Kamakura et al., 2015; Muller et al., 2013).

Al meglio delle nostre conoscenze, questo piccolo studio pilota è il primo effettuato su soggetti umani per determinare il possibile effetto ipoglicemizzante del Rooibos a supporto dei dati *in-vivo* e *in-vitro* presenti in letteratura. Tuttavia, dai risultati preliminari ottenuti in questo numero limitato di soggetti, si evince che l'assunzione in acuto di una tazza di questa bevanda naturalmente dolciastra in soggetti normo-glicemici, sembra avere un effetto nell'immediato sull'organismo, iper-glicemizzante, nonostante che il picco glicemico ed il tempo necessario per raggiungere tale picco non venga modificato. Non è tuttavia da escludere che il Rooibos possa comunque avere un effetto ipo-glicemizzante ma solo a lungo termine, dopo assunzione cronica, e solo in soggetti che hanno una glicemia alterata o compromessa come nei pre-diabetici e diabetici, in analogia con gli studi riportati in letteratura. Per chiarire questi aspetti sarebbero necessari ulteriori studi *in-vivo* che prevedano il coinvolgimento di un numero di soggetti più elevato.

Volontario	AUC Controllo mmol/L	AUC Rooibos mmol/L	% Inibizione
1	139	146	5
2	116	204	76
3	378	287	-24
4	211	299	42
5	160	183	15
6	174	237	46
7	84	65	-22
8	152	182	20
9	253	280	11
10	230	313	36
Media±DS	190±84	220±77	

Tabella 4: AUC dei Controlli e dell'infuso Rooibos ottenuti dalle curve glicemiche dei volontari, e percentuale di inibizione dell'infuso.

I dati riportati in tabella 4 sono stati ottenuti dalle curve glicemiche di tutti i soggetti, come riportato negli esempi relativi a due volontari (Figura 26-27). Per ottenere delle curve che partono dallo stesso punto in modo da poter calcolare l'AUC, il valore di glicemia al tempo 0 è stato sottratto dai valori ottenuti ad ogni intervallo.

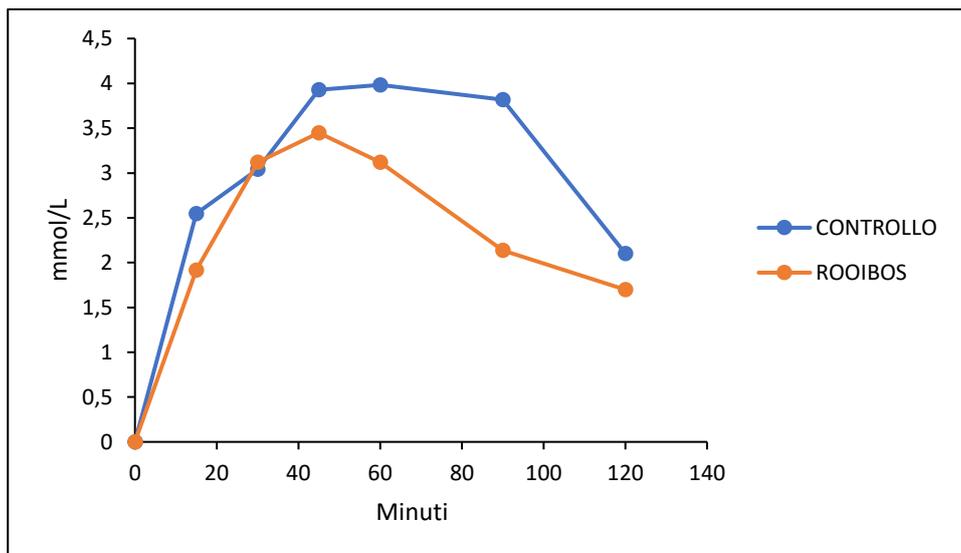


Figura 26: Curva Glicemica del volontario 3.

Osservando la curva glicemica del volontario 3 (Figura 26), si può notare l'effetto ipoglicemizzante del Rooibos sulla glicemia post-prandiale, in quanto sia la curva glicemica che il PG si abbassano rispetto al Controllo. Inoltre, con l'infuso la glicemia si è avvicinata maggiormente dopo 2 ore dall'assunzione della bevanda ed in maniera graduale, al valore ottenuto dopo 15 min rispetto al Controllo. E' interessante notare che il soggetto 3 è quello che ha l'AUC nella prova controllo più alto (378 mmol/L), ed è anche il soggetto che risponde maggiormente ad un abbassamento della glicemia (-24%). Questo potrebbe rafforzare quanto riportato precedentemente, ovvero, che il Rooibos potrebbe essere di beneficio soprattutto in soggetti con una glicemia alterata.

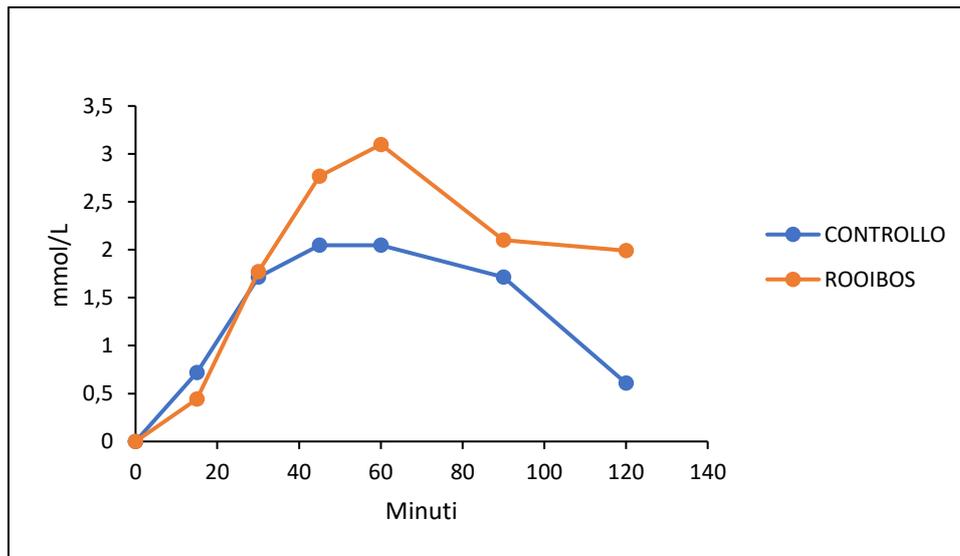


Figura 27: Curva Glicemica del volontario 6.

Osservando la curva glicemica del volontario 6 (Figura 27), si può notare come in questo caso il Rooibos abbia avuto un effetto iperglicemizzante, in quanto la glicemia di questo volontario è aumentata rispetto al Controllo, dopo aver assunto l'infuso. In particolare, sia il PG, che la glicemia dopo 2 ore dall'assunzione della bevanda, sono risultati più elevati rispetto al Controllo.

3.1.2 PANI

I volontari erano 7 donne e 2 uomini, con un'età media compresa tra 24 e 35 anni, normopeso, in quanto la media del BMI (Body Mass Index) dei soggetti era pari a $21 \pm 2 \text{ kg/m}^2$ (Tabella 5). Nel caso dell'indagine condotta dopo l'assunzione di pani è stata calcolata la media e la deviazione standard dei valori

glicemici dei volontari a digiuno, sommando i risultati ottenuti durante la prova con il pane Controllo e la prova con il pane Rooibos; il valore ottenuto era pari a 84 ± 5 mg/dL. Considerando che a digiuno i soggetti sani hanno valori compresi tra 70 e 99 mg/dL (Fonte: Medscape), osservando i risultati in tabella 6 e la media ottenuta, è possibile constatare che i volontari erano normoglicemici.

Volontario	Sesso	BMI Kg/m²
1	Femmina	19
2	Femmina	20
3	Femmina	19
4	Maschio	22
5	Femmina	23
6	Femmina	21
7	Femmina	22
8	Maschio	19
9	Femmina	20
Media\pmDS		21\pm2

Tabella 5: Sesso e BMI dei volontari.

Volontario	Glicemia a digiuno	
	Controllo	Rooibos
1	89	90
2	79	83
3	84	96
4	90	89
5	81	77
6	79	87
7	86	82
8	81	81
9	83	78
Media±DS	84±5	

Tabella 6: Valori Glicemici dei volontari a digiuno.

Sono stati riportati in tabella 7 i risultati relativi al PG del “pane Controllo” e della prova con il “pane Rooibos” per ciascun volontario. La media e la deviazione standard del “pane Controllo” era pari a 136 ± 18 mg/dL, mentre quella con il “pane Rooibos” era pari a 132 ± 10 mg/dL. Da questi risultati, è possibile notare come il PG della prova con il “pane Rooibos” sia risultato più basso rispetto al Controllo per 6 volontari e più alto per gli altri 3 volontari. L’analisi statistica (t-test) effettuata tra i due gruppi non evidenzia differenze significative sia nel valore di PG ($p=0.489$), sia nel tempo impiegato per arrivare al PG, mediamente 60 min ($p=0.437$).

Volontario	Cmax Controllo mg/dL	Cmax Rooibos mg/dL
1	131	128
2	135	132
3	162	139
4	137	139
5	125	115
6	126	137
7	110	134
8	130	120
9	167	147
Media±DS	136±18	132±10

Tabella 7: Picco Glicemico (Controllo e Rooibos) dei volontari.

Sono stati raccolti in tabella 8 i dati relativi all’AUC del pane Controllo e del pane Rooibos (AUC = area incrementale sotto la curva); è stato calcolato il rapporto tra le due aree espresso in percentuale: $(AUC \text{ pane Rooibos}) / (AUC \text{ pane controllo}) \times 100$. In seguito, considerando che l’IG dell’alimento standard (pane bianco) è uguale a 100, sottraendo per ciascun volontario a questo valore, si ottiene la percentuale di inibizione. Quest’ultimo dato consente di valutare se il “pane Rooibos” possa contribuire ad abbassare la glicemia post-prandiale nei volontari rispetto al “pane Controllo”. Su 9 volontari è possibile notare come il pane Rooibos ha ridotto la glicemia post-prandiale in 7. Nei primi 2 si è verificata una riduzione del 17% rispetto al Controllo, nel 3 del 60%, nel 5 del 36%, nel 6 del 30%, nel 8 del 35% e nel 9 del 14%. Si sono verificati solo due riscontri negativi, ovvero nei volontari 4 e 7, in cui la glicemia post-

prandiale è aumentata rispettivamente del 27% e del 56% rispetto al pane Controllo. L'analisi statistica (t-test) effettuata sui due gruppi nella loro totalità risulta non significativa ($p=0.102$), tuttavia escludendo i volontari 4 e 7, le differenze tra i due gruppi risultano altamente significative ($p=0.01$).

Volontario	AUC Controllo mmol/L	AUC Rooibos mmol/L	% Inhibition
1	158	130	-17
2	241	200	-17
3	349	141	-60
4	182	232	27
5	219	140	-36
6	199	139	-30
7	94	147	56
8	229	149	-35
9	255	219	-14
Media±DS	214±70	166±39	

Tabella 8: AUC del pane Controllo e del pane Rooibos ottenuti dalle curve glicemiche dei volontari, e percentuale di inibizione del pane Rooibos.

Questo dato in cui i non-responders sono stati esclusi, sembra indicare che l'assunzione di Rooibos attraverso un alimento quale il pane possa portare a dei benefici salutari in quanto comporta un effetto ipoglicemizzante rispetto ad un pane normale preparato con acqua. Questo potrebbe essere particolarmente indicato per soggetti diabetici e pre-diabetici.

Questi risultati ottenuti sul pane, a differenza di quelli ottenuti con l'infuso, supportano dei dati presenti in letteratura, sebbene al momento non sia chiaro il motivo per cui l'assunzione dei principi attivi del Rooibos sotto forma di infuso rispetto alla loro incorporazione in un alimento possa influire sulla glicemia post-prandiale in direzioni opposte. Probabilmente, la risposta risiede nella diversa forma 'fisica', liquido vs solido con cui il Rooibos arriva al tubo digerente e da qui, in circolo. Da un calcolo effettuato, la quantità di Rooibos verde presente in una tazza da 250 mL di infuso (=2.5 g) ed in 100 g di pane Rooibos (~3.3 g) non sono molto diversi tra loro, quindi è improbabile che le differenze osservate siano dovute a differenze relative alla quantità di Rooibos, ma piuttosto nella forma in cui viene assunta che in qualche modo sembra influire sui processi digestivi. Questi sono aspetti che esulano dallo scopo di questa tesi ma che sicuramente meritano ulteriori approfondimenti per cercare di chiarire quali siano i meccanismi coinvolti responsabili per gli effetti osservati.

I dati riportati in tabella 8 sono stati ottenuti dalle curve glicemiche di tutti i soggetti, come riportato negli esempi relativi a due volontari (Figura 28-29). Per ottenere delle curve che partono dallo stesso punto in modo da poter calcolare l'AUC, il valore di glicemia a tempo 0 è stato sottratto dai valori ottenuti ad ogni intervallo.

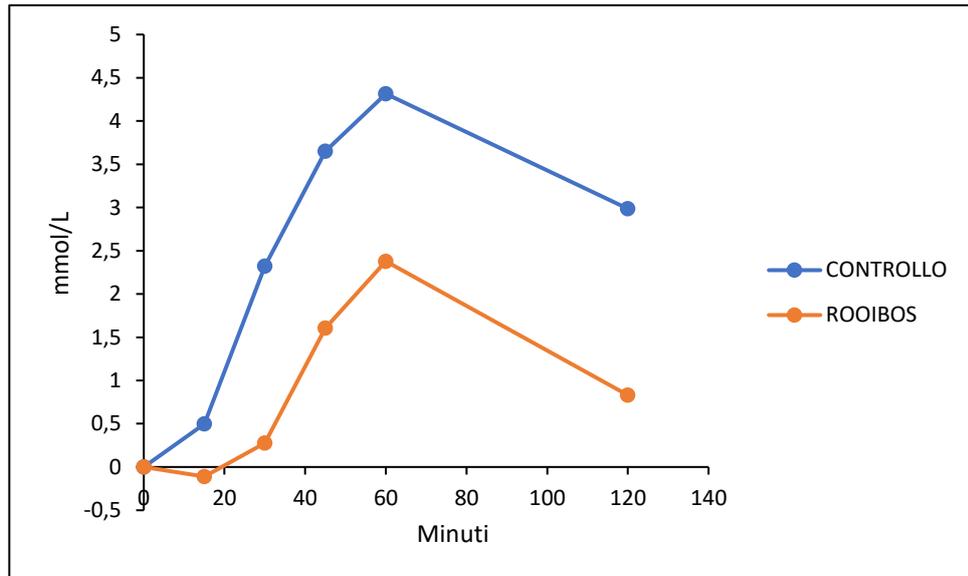


Figura 28: Curva Glicemica del volontario 3.

E' importante sottolineare che la curva glicemica riportata in figura 28 è dello stesso volontario 3 commentato nella sezione precedente sull'infuso Rooibos, la quale è risultata un forte responder in entrambi i casi (Figura 28). L'AUC di questo soggetto si abbassa del 60% dopo assunzione del "pane Rooibos" rafforzando l'ipotesi che il Rooibos possa avere un effetto benevolo in soggetti con glicemia alterata, e soprattutto quando assunto attraverso un alimento come il pane.

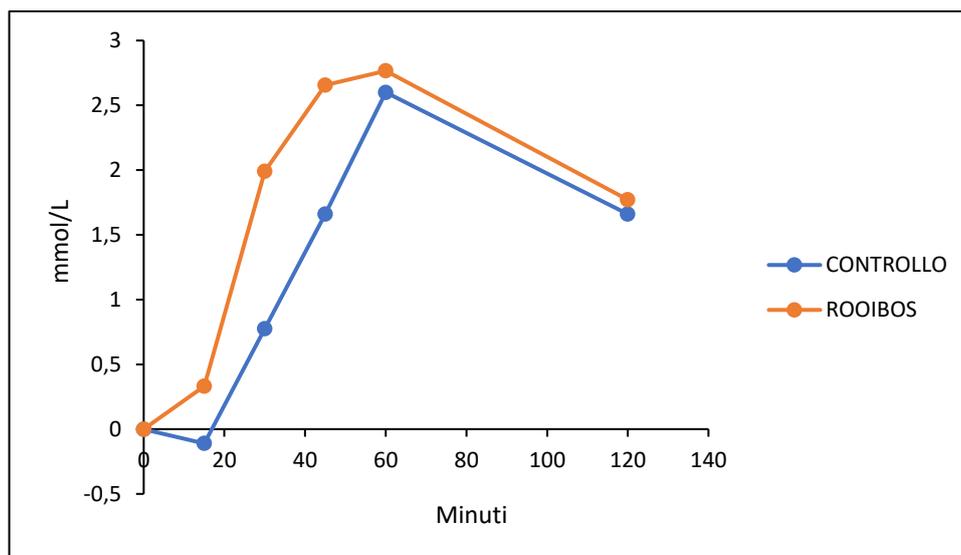


Figura 29: Curva Glicemica del volontario 4.

Osservando la curva glicemica del volontario 4 (Figura 29), che è risultato un non-responder, è possibile notare come in questo caso il “pane Rooibos” ha avuto un effetto iperglicemizzante in quanto la curva si innalza molto più precocemente rispetto alla curva ottenuta con il pane Controllo nei primi 45 minuti, nonostante che il PG venga raggiunto allo stesso tempo e con valori simili in entrambi i casi, come sono pure simili i valori di glicemia post-prandiale ottenuti a 2 ore.

3.2 ANALISI SENSORIALE

3.2.1 ANALISI SENSORIALE DEL PANE CONTROLLO

È stato costruito un grafico, dopo aver fatto la media dei giudizi per ogni caratteristica che i volontari hanno attribuito al “pane Controllo”. Come è possibile osservare dalla figura sottostante (Figura 30), la maggior parte dei volontari hanno notato che la crosta del pane era scorrevole e più scura della mollica e che il pane era maculato. Hanno avvertito un profumo dolce e odore di farina, mentre per quanto riguarda il gusto e il retrogusto, hanno attribuito un giudizio dolce al pane; per la texture hanno riscontrato adesività.

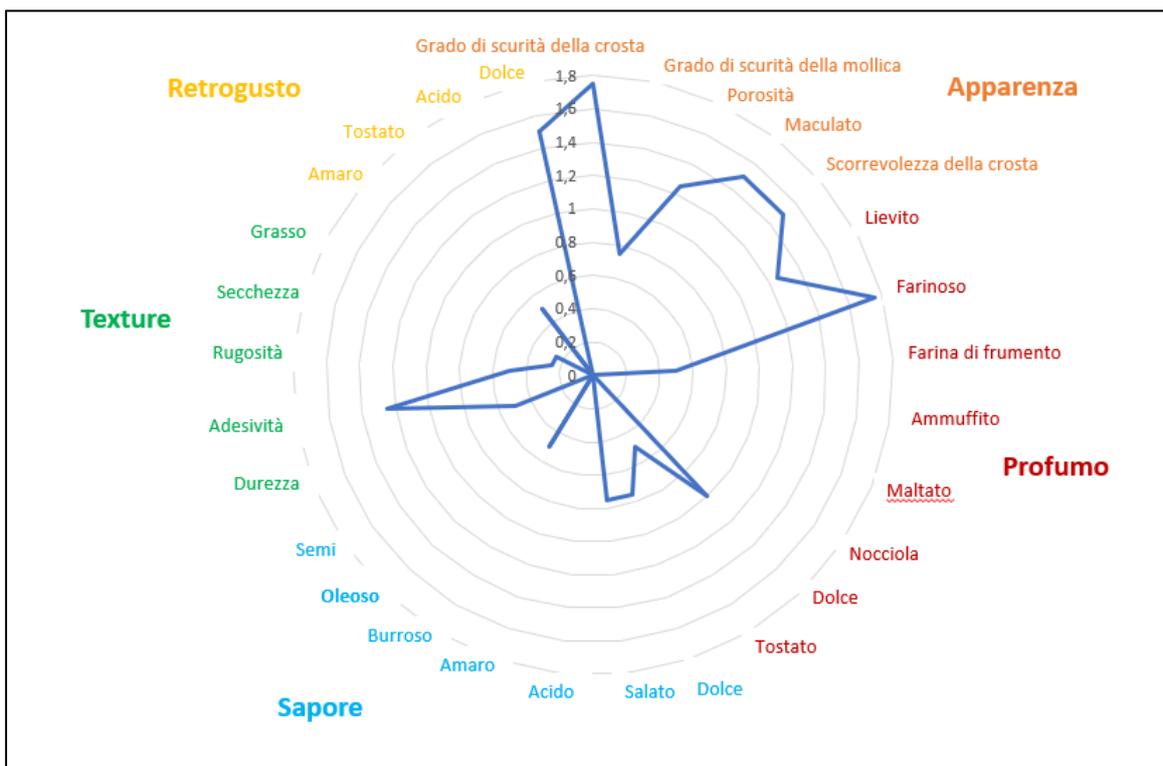


Figura 30: Grafico che racchiude la media dei giudizi che i volontari hanno attribuito al pane Controllo.

3.2.2 ANALISI SENSORIALE DEL PANE CONTENENTE L'INFUSO DI ROOIBOS

È stato costruito un grafico dopo aver fatto la media dei giudizi che i volontari hanno attribuito al pane preparato con l'infuso di Rooibos. Come è possibile osservare dalla figura sottostante (Figura 31), la maggior parte dei volontari hanno notato che la crosta del pane era scorrevole e più chiara rispetto alla mollica; hanno attribuito al pane un profumo, un sapore e un retrogusto dolce e per quanto riguarda la texture, hanno riscontrato adesività.

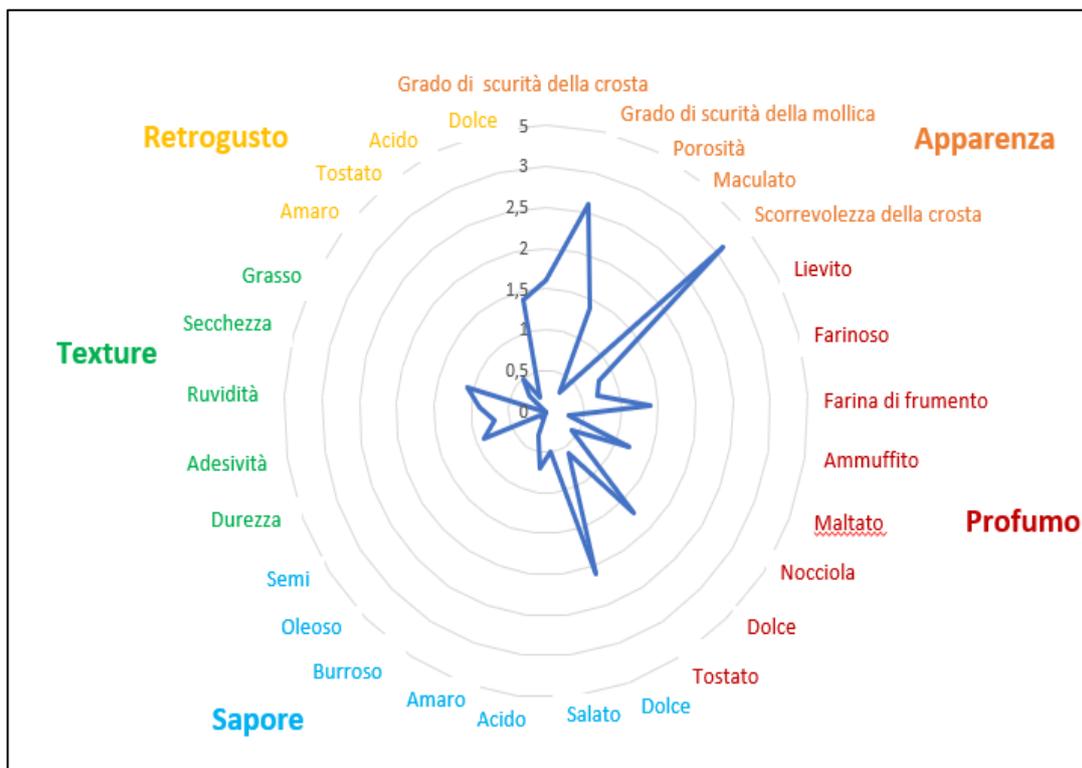


Figura 31: Grafico che racchiude la media dei giudizi che i volontari hanno attribuito al pane Rooibos.

3.2.3 CONFRONTO TRA LE DUE ANALISI SENSORALI

Analizzando i questionari compilati dai volontari (Figura 21) e osservando i due grafici sovrastanti (Figure 30 e 31), è stato possibile riscontrare le differenze dei giudizi che i volontari hanno attribuito al “pane Controllo” e al “pane Rooibos” (Figura 32). I soggetti hanno notato che la crosta del pane Controllo era più scura rispetto al pane Rooibos, mentre la mollica del primo pane era più chiara rispetto al secondo. La crosta del pane con l’infuso era più scorrevole rispetto al “pane Controllo”; in quest’ultimo si percepiva in misura maggiore l’odore di farina. “Il pane Rooibos” aveva un profumo e un sapore più dolce rispetto al “pane Controllo”; per quanto riguarda la texture, nel “pane Controllo” è stata riscontrata una maggiore adesività ed esso possedeva un retrogusto più dolce rispetto al pane preparato con l’infuso.

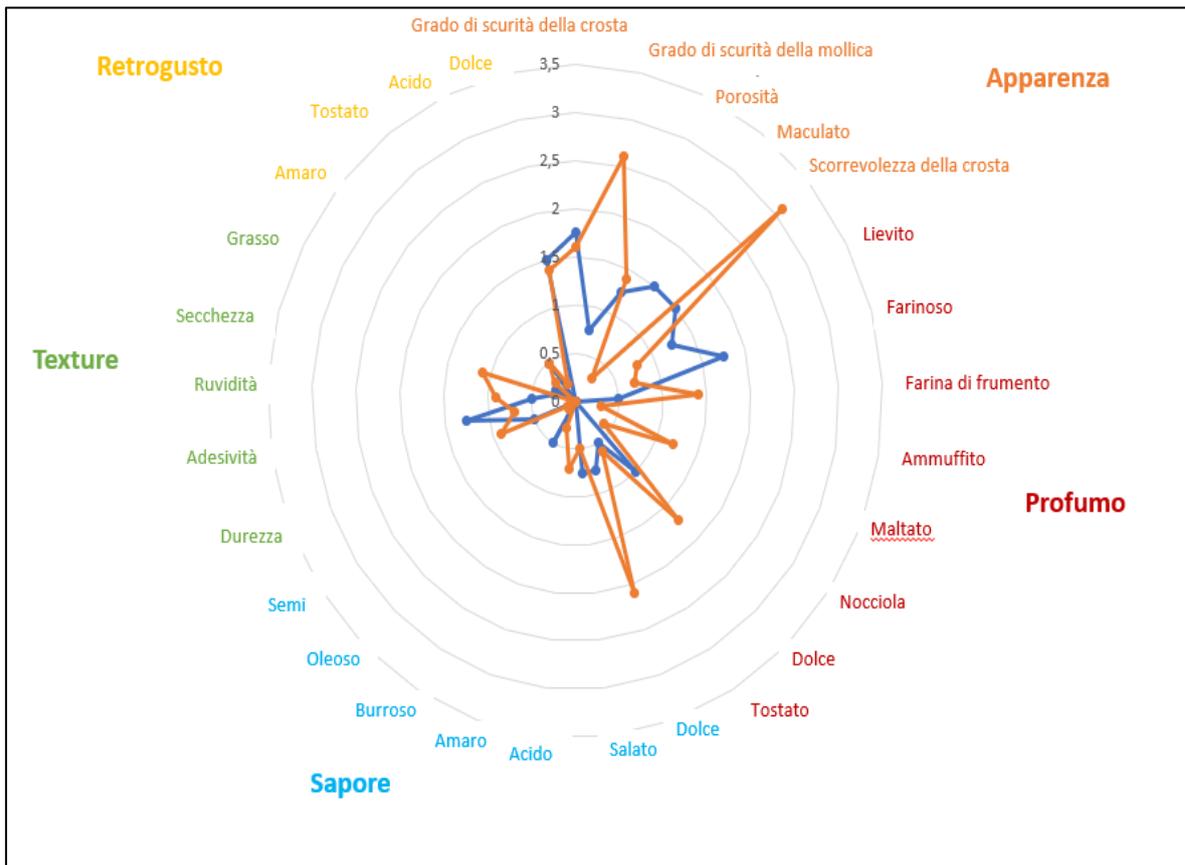


Figura 32: Confronto analisi sensoriali dei pani Controllo (blu) e Rooibos (arancione).

3.3 ANALISI CONTENUTO TOTALE POLIFENOLI

In questo studio sono stati determinati i polifenoli totali nell'infuso Rooibos preparato prima di essere utilizzato come ingrediente per la preparazione del "pane Rooibos", ed i polifenoli totali presenti nel "pane Controllo".

-Polifenoli totali presenti nell'infuso di Rooibos usato per il pane: 3.79 g GAE/L \pm 0.41;

-Polifenoli presenti nel pane Rooibos: 0.13 g GAE/L \pm 0.02;

-Polifenoli presenti nel pane Controllo: 0.08 g GAE/L \pm 0.01.

I risultati ottenuti per i due pani sono stati rapportati a 100 g di pane, ovvero alla quantità di pane che i volontari hanno assunto durante le prove glicemiche. Nel grafico sottostante (Figura 33) è possibile notare come il pane con l'infuso, contiene una maggiore quantità di polifenoli rispetto al pane Controllo.

-Polifenoli presenti nel pane preparato con l'infuso di Rooibos: 0.0607 g GAE/100 g \pm 0.0112;

-Polifenoli presenti nel pane utilizzato per il Controllo: 0.0330 g GAE/100 g \pm 0.004.

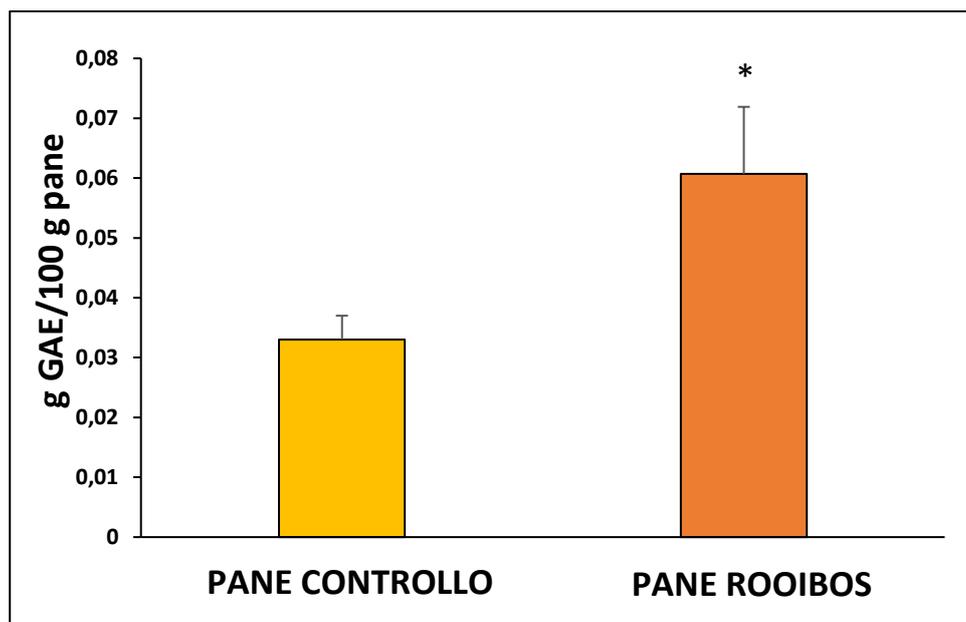


Figura 33: Confronto polifenoli totali tra pane Controllo e pane Rooibos

($p \geq 0.05$).

Questo dato suggerisce che esiste la possibilità di arricchire il contenuto di polifenoli in un pane tradizionale attraverso l'utilizzo dell'infuso di Rooibos, in quanto a parità di peso, il contenuto di polifenoli è quasi raddoppiato. L'utilizzo di un alimento, quale il pane per veicolare polifenoli presenti in natura, è un aspetto interessante soprattutto con il crescente interesse da parte di consumatori verso l'utilizzo di cibi funzionali con proprietà salutari.

I polifenoli totali ottenuti relativi all'infuso di Rooibos utilizzato per la preparazione del pane sono stati espressi in 300 mL (quantità totale di infuso)

mentre quelli presenti nel pane preparato con lo stesso infuso sono stati espressi in 500 g di pane (peso medio del pane). Nel grafico sottostante (Figura 34) è possibile notare come l'infuso di Rooibos preparato prima di essere introdotto nel pane ha una quantità di polifenoli totali maggiore rispetto al pane preparato con lo stesso infuso.

-Polifenoli presenti nell'infuso di Rooibos preparato prima di essere utilizzato per la preparazione del pane: 1.13 g GAE/300 mL \pm 0.124.

-Polifenoli presenti nel pane Rooibos: 0.3 g GAE/500 g \pm 0.05.

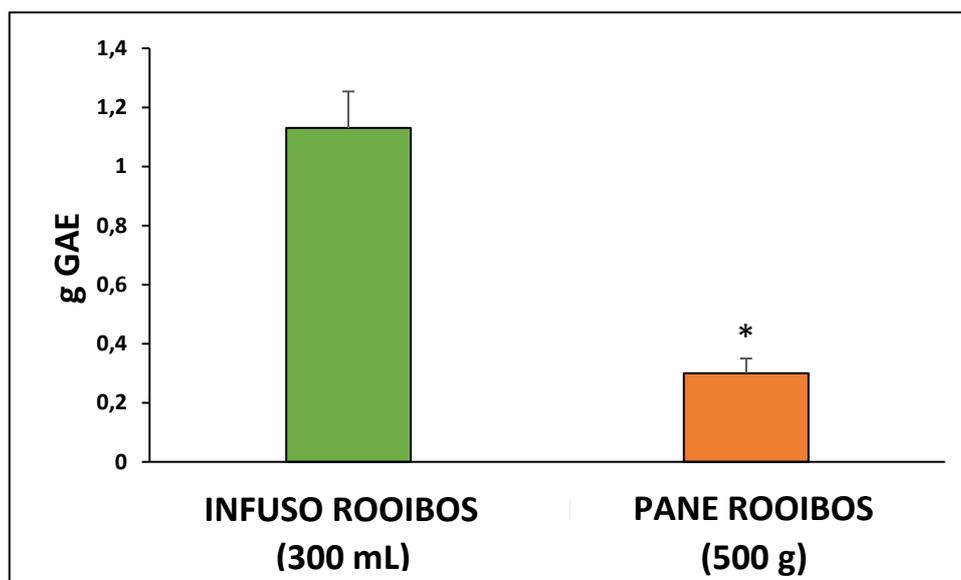


Figura 34: Confronto polifenoli totali tra l'infuso di Rooibos preparato prima di essere utilizzato nel pane ed il pane Rooibos ($p \geq 0.05$).

L'abbassamento del contenuto di polifenoli totali nel pane rispetto a quelli presenti nell'infuso prima dell'utilizzo nell'impasto, potrebbe essere dovuta ad una estrazione non adeguata e incompleta dei polifenoli dalla matrice del pane dopo cottura, prima di effettuare il saggio dei polifenoli totali.

3.4 ANALISI CAPACITA' ANTIOSSIDANTE

In questo studio è stata determinata la capacità antiossidante dell'infuso di Rooibos utilizzato per la preparazione del pane, del "pane Rooibos" e del "pane Controllo".

-Capacità antiossidante dell'infuso Rooibos usato per preparare il pane: 61.44 mM TE \pm 0.64;

-Capacità antiossidante del "pane Rooibos": 2.608 mM TE \pm 0.26;

-Capacità antiossidante del "pane Controllo": 0.75 mM TE \pm 0.1.

I risultati relativi alla capacità antiossidante del pane preparato con l'infuso Rooibos e del pane Controllo sono stati rapportati a 100 g di pane (quantità che i volontari hanno assunto durante la misura dell'indice glicemico). Osservando la figura sottostante (Figura 35), è possibile notare come il pane preparato con l'infuso possedeva una capacità antiossidante maggiore rispetto al pane Controllo.

-Capacità antiossidante del pane preparato con l'infuso di Rooibos: 1.21 mM TE/100 g \pm 0.121;

-Capacità antiossidante del pane utilizzato per il Controllo: 0.350 mM TE/100 g \pm 0.0467.

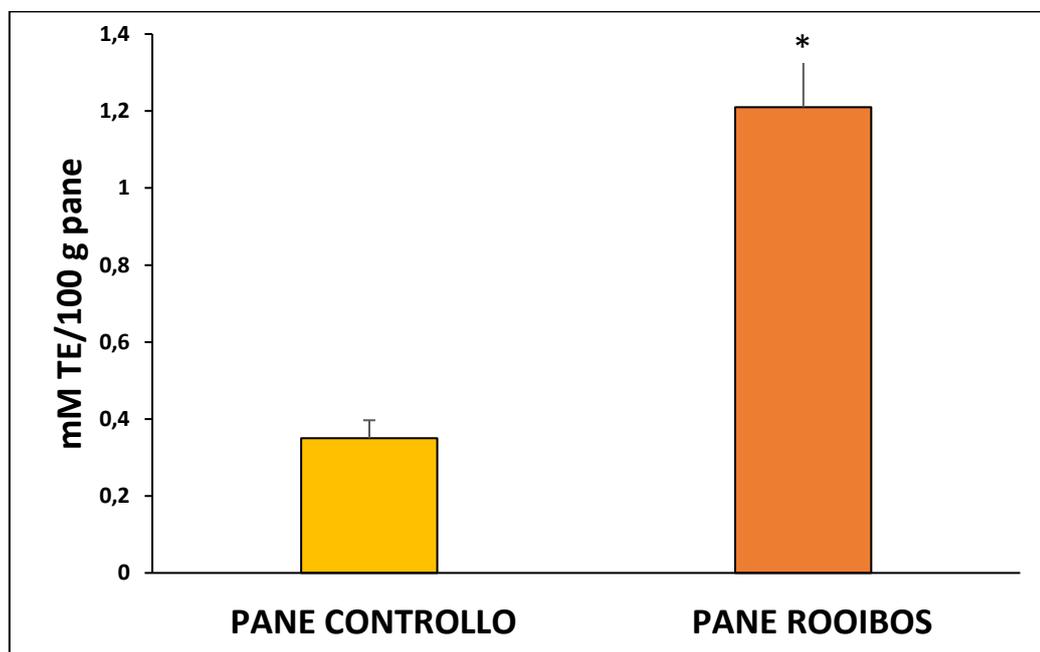


Figura 35: Confronto capacità antiossidante tra il pane Controllo e pane Rooibos ($p \geq 0.05$).

Anche in questo caso, i dati suggeriscono che esiste la possibilità di arricchire la capacità antiossidante di un pane tradizionale attraverso l'utilizzo dell'infuso di Rooibos, in quanto a parità di peso, la capacità antiossidante viene quasi triplicata. I polifenoli presenti nel Rooibos sono maggiormente responsabili

della capacità antiossidante di questa bevanda (Damiani et al., 2019) e l'utilizzo del pane per veicolare questi polifenoli aumentandone la sua capacità antiossidante è attraente dal punto di vista della preparazione di cibi funzionali con proprietà salutari.

I risultati ottenuti relativi alla capacità antiossidante presente nell'infuso utilizzato per la preparazione del pane sono stati espressi in 300 mL (quantità totale di infuso utilizzato per il pane) mentre quelli del pane preparato con lo stesso infuso, sono stati rapportati a 500 g di pane (peso medio del pane). Osservando il grafico sottostante (Figura 36), è possibile notare come il pane Rooibos risulta avere una capacità antiossidante minore, rispetto all'infuso utilizzato per la sua preparazione.

-Capacità antiossidante dell'infuso di Rooibos utilizzato per la preparazione del pane: $4.58 \text{ mM TE}/300 \text{ mL} \pm 0.02$.

-Capacità antiossidante del pane Rooibos: $1.518 \text{ mM TE}/500 \text{ g} \pm 0.607$.

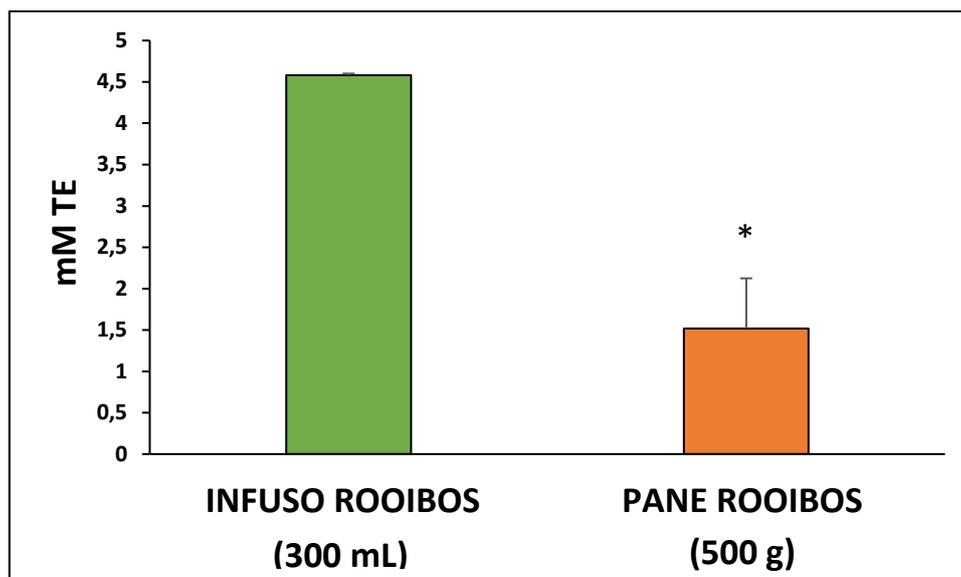


Figura 36: Confronto capacità antiossidante tra l'infuso di Rooibos utilizzato per la preparazione del pane e pane Rooibos ($p \geq 0.05$).

Anche in questo caso, la riduzione nella capacità antiossidante del pane Rooibos rispetto all'infuso utilizzato per la sua preparazione potrebbe essere dovuta ad una estrazione non adeguata e incompleta dei polifenoli ma anche di altri composti antiossidanti dalla matrice del pane dopo cottura, prima di effettuare il saggio ORAC. Quindi l'abbassamento del potere antiossidante è proporzionale alla diminuzione del contenuto di polifenoli.

4. CONCLUSIONE

In letteratura, numerosi sono gli studi effettuati *in-vivo* su roditori ed in primati non-umani diabetici e pre-diabetici che indicano l'effetto anti-diabetico dei polifenoli del Rooibos ed i suoi estratti (Patel et al., 2021; Omolaoye et al., 2021; Orlando et al, 2019). Come esempio, in uno studio effettuato su topi diabetici (Kawano et al., 2009), l'aspatina, ovvero il diidrocalcone presente in quantità circa 50 volte superiori nel Green Rooibos, rispetto al Red Rooibos, contribuisce notevolmente a ridurre la glicemia post-prandiale, ha effetti benefici sull'omeostasi del glucosio nel diabete di tipo 2, stimolando l'assorbimento del glucosio nei tessuti muscolari e la secrezione di insulina dalle cellule β del pancreas.

Tuttavia, al meglio delle nostre conoscenze, non esistono dati sull'uomo che supportano i dati ottenuti sui modelli animali. Dai risultati ottenuti in questo lavoro di tesi, dove una forte limitazione è la bassa numerosità dei soggetti reclutati, i risultati ottenuti sembrano indicare che inaspettatamente, l'assunzione dell'infuso di Rooibos non sembra avere un effetto ipoglicemizzante. Anzi, escludendo i pochi responders, relativamente all'effetto atteso, nella maggior parte dei casi, la glicemia post-prandiale risulta essere più elevata rispetto al controllo (acqua). Invece, le misure della glicemia post-prandiale effettuate con il pane contenente l'infuso di Rooibos hanno dato

risultati in linea con l'ipotesi sperimentale con un effetto ipoglicemizzante nella maggior parte dei volontari. Risulta difficile dare una spiegazione soddisfacente a questi risultati divergenti, soprattutto vista la bassa numerosità del campione testato.

Tuttavia, osservando il comportamento di un singolo soggetto (volontario 3) caratterizzato da una curva glicemica anomala rispetto ai restanti soggetti, l'effetto ipoglicemizzante del Rooibos, sia assunto come infuso ma ancora di più con il "pane Rooibos", risulta particolarmente evidente. Ciò potrebbe indicare che effettivamente, il Rooibos potrebbe avere un effetto ipoglicemizzante soprattutto in soggetti pre-diabetici o diabetici o comunque con ridotta tolleranza al glucosio. Studi futuri, con un numero di soggetti più elevati, e prendendo in considerazione sottogruppi con volontari normali e pre-diabetici o comunque con una curva glicemica anomala, saranno necessari per confermare i dati preliminari di questa tesi.

Per quanto riguarda i risultati relativi al contenuto in polifenoli e capacità antiossidante del "pane Rooibos" rispetto al "pane Controllo", si può confermare che il pane arricchito con Rooibos verde ha un contenuto in polifenoli, e di conseguenza capacità antiossidante, maggiore rispetto al pane tradizionale in cui viene usato solo acqua come liquido per l'impasto. Inoltre, attraverso l'analisi sensoriale e gustativa dei pani, si è riscontrato che il "pane

Rooibos” risulta essere appetibile ed al quanto gradevole da parte dei consumatori. Ciò apre nuove prospettive per la produzione di alimenti funzionali contenenti Rooibos, rivolti sia ai soggetti con ridotta tolleranza al glucosio, ma anche a tutti coloro che vogliono o devono seguire un regime alimentare controllato, con l’aiuto di alimenti ipoglicemici.

BIBLIOGRAFIA:

Abderrahim, M., Arribas, S.M., Condezo-Hoyos, L. A novel high-throughput image based rapid Folin-Ciocalteu assay for assessment of reducing capacity in foods, *Talanta*. 152, 82-9 (2016).

Ajuwon, O.R., Ayeleso, A. O., Adefolaju, G.A. The Potential of South African Herbal Tisanes, Rooibos and Honeybush in the Management of Type 2 Diabetes Mellitus, *Molecules*. 23, 320-7 (2018).

Bacchetti, T., Morresi, C., Bellachioma, L., Ferretti, G. Antioxidant and Pro-Oxidant Properties of *Carthamus Tinctorius*, Hydroxy Safflor Yellow A, and Safflor Yellow A, *Antioxidants (Basel)*. 202, 119 (2020).

Barclay, A.W., Petocz, P., McMillan-Price, J., Flood, V.M., Prvan, T., Mitchell, P., Brand-Miller, J.C. Glycemic index, glycemic load, and chronic disease risk, a meta-analysis of observational studies, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 87, 627–637 (2008).

Beelders, T., O.Sigge, G.O., Joubert, E., de Beer, D., Villiers, A. Kinetic optimisation of the reversed phase liquid chromatographic separation of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) phenolics on conventional high performance liquid chromatographic instrumentation, *Journal of Chromatography A*. 1219, 128-139 (2012).

Björck, I., Granfeldt, Y., Liljeberg, H., Tovar, J., Asp, N.G. Food properties affecting the digestion and absorption of carbohydrates, *The American Journal of Clinical Nutrition*. 59, 699–705 (1994).

Bonongwe, P., Lindow, S.W., Coetzee, E.J. Reproducibility of a 75G oral glucose tolerance test in pregnant women, *J Perinat Med*. 43, 333-8 (2015).

Brugè, F., Bacchetti, T., Principi, F., Scarpa, E.S, Littarru, G.P., Tiano, L. Olive oil supplemented with Coenzyme Q(10): effect on plasma and lipoprotein oxidative status, *Biofactors*. 38, 249-56 (2012).

Cabeza, M.B., Pérez Rivas, F.J., Zamora Sarabia, A.L., de las Heras Mosteiro, J., Rojas, B.B., Rodriguez Barrientos, R. Control del paciente diabético en Atención Primaria: influencia de cartera de servicios y otros factores, *Aten Primaria*. 52, 617-626 (2020).

Camps, S.G., Kaur, B., Chin Quek, R.Y. Jeyakumar Henry C.J. Does the ingestion of a 24 hour low glycaemic index Asian mixed meal diet improve glycaemic response and promote fat oxidation? A controlled, randomized cross-over study, *Nutr J*. 12, 43 (2017).

Canda, B.D., Oguntibeju, O., Marnewick, J.L. Effects of consumption of rooibos (*Aspalathus linearis*) and a rooibos-derived commercial supplement on

hepatic tissue injury by tert-butyl hydroperoxide in Wistar rats, *Oxid Med Cell Longev.* 71, 68-32 (2014).

Carlioni, P., Tiano, L., Padella, L., Bacchetti, T., Customu, C., Kay A., Damiani, E. Antioxidant activity of white, green and black tea obtained from the same tea cultivar, *Food Research International.* 53, 900-908 (2012).

Carrieri, M., Scapellato, M.L., Salamon, F., Gori, G., Trevisan, A., Battista Bartolucci, G. Assessment of exposure to oak wood dust using gallic acid as a chemical marker, *Int Arch Occup Environ Health.* 89, 115-21 (2016).

Chusak, C., Thilavech, T., Henry, C.J., Adisakwattana, S. Acute effect of Clitoria ternatea flower beverage on glycemic response and antioxidant capacity in healthy subjects: a randomized crossover trial, *BMC Complement Altern Med.* 18, 6 (2018).

Clark, C.A., Gardiner, J., McBurney, M.I., Anderson, S., Weatherspoon, L.J., Henry D. N., & Hord, N.G. Effects of breakfast meal composition on second meal metabolic responses in adults with type 2 diabetes mellitus, *European Journal of Clinical Nutrition.* 60, 1122-1129 (2006).

Cristine Silva, K.C., Nobre, L.N., de Castro Ferreira Vicente, S.E., Moreira, L.L., do Carmo Lessa, A., Lamounier, J.A. Influência do índice glicêmico e

carga glicêmica da dieta sobre o risco de sobrepeso e adiposidade na infância, *Revista Paulista de Pediatria*. 34, 3, 293-300 (2016).

Damiani, E., Carloni P., Rocchetti, G., Senizza, B., Tiano, L., Joubert, E., de Beer D., Lucini, L. Impact of Cold versus Hot Brewing on the Phenolic Profile and Antioxidant Capacity of Rooibos (*Aspalathus linearis*) Herbal Tea; *Antioxidants (Basel)*. 8, 499 (2019).

Dávalos, A., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay, *J Agric Food Chem*. 14, 48-54 (2004).

Dludla, P.V., Gabuza, K.B., Muller, C.J.F., Joubert, E., Louw, J., R Johnso, R. Aspalathin, a C-glucosyl dihydrochalcone from rooibos improves the hypoglycemic potential of metformin in type 2 diabetic (db/db) mice, *Physiol Res*. 67, 813-818 (2018).

Dludla, P.V., Joubert, E., Muller, C.F.J., Louw, J., Johnson, R. Hyperglycemia-induced oxidative stress and heart disease-cardioprotective effects of rooibos flavonoids and phenylpyruvic acid-2- O- β -D-glucoside, *Nutr Metab (Lond)*. 14, 45 (2017).

Falcone Ferreyra, M.L., Rius, S.P., Casati, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications, *Front Plant Sci.* 3, 222 (2012).

Faqih, A.M., Faten, Y.A-N. Immediate glyceemic response to four herbal teas in healthy adults, *Jordan Medical Journal.* 40, 266-275 (2006).

Farhat, G., Berset, V., Moore, L. Effects of Stevia Extract on Postprandial Glucose Response, Satiety and Energy Intake: A Three-Arm Crossover Trial, *Nutrients.* 11, 30-36 (2019).

Guerreiro, S., Alcada, M., Azevedo, I. Bebidas açucaradas e glicémia, *Acta Med Port.* 23, 567-578 (2010).

Gunawardena, H., Ranasinghe, S.P. Human plasma dynamically quenches the fluorescein at the initial point of oxygen radical absorption capacity (ORAC) assay, *BMC Res Notes.* 12, 809 (2019).

Han, Z., Achilonu, M.C., Kendrekar, P.S., Joubert, E., Ferreira, D., Bonnet, S.L., van der Westhuizen, J.H. Concise and scalable synthesis of aspalathin, a powerful plasma sugar-lowering natural product, *J Nat Prod.* 28, 583-8 (2014).

Hasanuzzaman, M., Nahar, K., Md. Alam, M.M., Roychowdhury, R., Fujita, M. Physiological, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Heat Stress Tolerance in Plants, *Int. J. Mol. Sci.* 14, 9643-9684 (2013).

Henry, C.J.K., Newens, K.J., Low, H.J. Glycaemic index sweetener-based beverages reduce 24-h glucose profiles in healthy adults, *J Hum Nutr Diet.* 22, 77-80 (2009).

Jenkins, D.J., Wolever, T.M., Taylor, R.H., Barker, H., Fielden, H., Baldwin, J.M., Bowling, A.C., Newman H.C., Jenkins, A.L., Goff D.V. Glycemic index of foods: a physiological basis for carbohydrate exchange, *The American Journal of Clinical Nutrition.* 34, March, 362–366 (1981).

Johnson, R., de Beer, D., Dlodla, P.V., Ferreira, D., Muller, C.J.F., Joubert, E. Aspalathin from Rooibos (*Aspalathus linearis*): A Bioactive C-glucosyl Dihydrochalcone with Potential to Target the Metabolic Syndrome, *Planta Med.* 84, 568-583 (2018).

Joubert, E. HPLC quantification of the dihydrochalcones, aspalathin and nothofagin in rooibos tea (*Aspalathus linearis*) as affected by processing, *Food Chemistry.* 55, 403-411 (1996).

Joubert, E., de Beer, D. Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical, *South African Journal of Botany.* 77, 869-886 (2011).

Joubert, E., Gelderblom, W. C. A., Louw, A., De Beer, D. South African herbal teas: *Aspalathus linearis*, *Cyclopia* spp. and *Athrixia phylicoides*--A review, *J Ethnopharmacol.* 28, 376-412 (2008).

Joubert, E., Jolley, B., Koch, I.S., Muller, M., Van der Rijst, M., de Beer, D. Major production areas of rooibos (*Aspalathus linearis*) deliver herbal tea of similar phenolic and phenylpropenoic acid glucoside content, *South African Journal of Botany.* 103, 162–169 (2016).

Joubert, E., Schulz, H. Production and quality aspects of rooibos tea and related products, *Journal of Applied Botany and Food Quality.* 80, 138-144 (2006).

Kamakura, R., Son, M.J., de Beer, D., Joubert, E., Miura, Y., Yagasaki, K. Antidiabetic effect of green rooibos (*Aspalathus linearis*) extract in cultured cells and type 2 diabetic model KK-A(y) mice, *Cytotechnology.* 67, 699-710 (2015).

Karaa, A., Goldstein A. The spectrum of clinical presentation, diagnosis, and management of mitochondrial forms of diabetes, *Pediatr Diabetes.* 16, 1-9 (2015).

Kawano, A., Nakamura, H., Hata, S., Minakawa, M., Miura, Y., Yagasaki, K. Hypoglycemic effect of aspalathin, a rooibos tea component from *Aspalathus*

linearis, in type 2 diabetic model db/db mice, *Phytomedicine*. 16, 437-443 (2009).

W.Kerner, W., J. Brückel, J. German Diabetes Association; Definition, Classification and Diagnosis of Diabetes Mellitus,; *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2014 Jul;122, (7):384-6 (2014).

Klatman, E.L., Jenkins, A.J., Ahmedani, M.Y., Ogle, G.D. Blood glucose meters and test strips: global market and challenges to access in low-resource settings, *Lancet Diabetes Endocrinol*. 7, 150-160 (2019).

Krafczyk, N., Glomb, M. A. Characterization of Phenolic Compounds in Rooibos Tea, *J. Agric. Food Chem*. 56, 3368-3376 (2008).

Kulshrestha, V., Agarwal, N. Maternal complications in pregnancy with diabetes, *J Pak Med Assoc*. 66, 74-7 (2016).

Li, W., Huang, E., Gao, S. Type 1 Diabetes Mellitus and Cognitive Impairments: A Systematic Review, *J Alzheimers Dis*. 57, 29-36 (2017).

López, V., Cásedas, G., Petersen-Ross, K., Powrie, Y., Smith, C. Neuroprotective and anxiolytic potential of green rooibos (*Aspalathus linearis*) polyphenolic extract, *Food Funct*. 13, 91-101(2022).

Mabuza, N., Kiefe, H.H., Godeto, T.W., Ambushe, A.A. Estimated Contributions of Rooibos Tea to the Daily Manganese and Zinc Intakes

Determined in Tea Leaves and Tea Infusions by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry, *Biol Trace Elem Res.* 199, 1145-1152 (2021).

Magalhaes, L., Segundo, M., Reis, S., Lima, J. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Anal Chim Acta.* 14, 6131-19 (2008).

Makaryus, A.N., McFarlane, S.I. Diabetes insipidus: diagnosis and treatment of a complex disease, *Cleve Clin J Med.* 73, 65-71 (2006).

Malongane, F., McGaw L.J., Debusho, L.K., Mudau, F.N. Sensory Characteristics and Volatile Compounds of Herbal Teas and Mixtures of Bush Tea with Other Selected Herbal Teas of South Africa, *Foods.* 14, 94-96 (2020).

Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jiménez, L. Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition,* 79, 727–747 (2004)

Marais, C., van Rensburg, W.J., Ferreira, D., Steenkamp, J.A. (S)- and (R)-Eriodictyol-6-C- β -D-glucopyranoside, novel keys to the fermentation of rooibos (*Aspalathus linearis*), *Phytochemistry.* 55, 43-49 (2000).

Mazibuko S., Eunice S.; In vitro and in vivo effect of *aspalathus linearis* and its major polyphenols on carbohydrate and lipid metabolism in insulin resistant

models, Faculty of Biochemistry and Microbiology, University of Zululand, South Africa (2014).

McMillan-Price, J., Petocz, P., Atkinson, F., O'Neill, K., Samman, S., Steinbeck, K., Caterson, I., Brand-Miller, J. Comparison of 4 Diets of Varying Glycemic Load on Weight Loss and Cardiovascular Risk Reduction in Overweight and Obese Young Adults. A Randomized Controlled Trial, *Arch Intern Med.* 166, 1466-1475 (2006).

Miller, N., Rice-Evans, C., Davies, M., Gopinathan V., Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science (London)*. 84, 4 407-412 (1993).

Muller, C.J.F., Joubert, E., Pheiffer, C., Ghoor, S., Sanderson, M., Chellan, N., Fey, S.J., Louw, J. Z-2-(β -D-glucopyranosyloxy)-3-phenylpropenoic acid, an α -hydroxy acid from rooibos (*Aspalathus linearis*) with hypoglycemic activity, *Mol Nutr Food Res.* 57, 2216-22 (2013).

Muller, J.F., Joubert, E., de Beer, D., Sanderson, M., Malherbe, C.J., Fey, S.J., Louw, J. Acute assessment of an aspalathin-enriched green rooibos (*Aspalathus linearis*) extract with hypoglycemic potential, *Phytomedicine.* 20, 32-39 (2012).

Obanda M., Owuor P.O., Mang’oka R., Kavoi M.M. Changes in thearubigin fractions and theaflavin levels due to variations in processing conditions and their influence on black tea liquor brightness and total colour, *Food Chemistry* 85, 163-173 (2004).

Omolaoye, T.S., Windvogel, S.L., Stefan S Du Plessis, S.S.; The Effect of Rooibos (*Aspalathus linearis*), Honeybush (*Cyclopia intermedia*) and Sutherlandia (*Lessertia frutescens*) on Testicular Insulin Signalling in Streptozotocin-Induced Diabetes in Wistar Rats, *Diabetes Metab Syndr Obes.* 19, 1267-1280 (2021).

Orlando, P., Nireskhi Chellan, N., Louw, J., Tiano, L., Cirilli, I., Dlodla, P., Joubert, E., Muller, C.J.F. Aspalathin-Rich Green Rooibos Extract Lowers LDL-Cholesterol and Oxidative Status in High-Fat Diet-Induced Diabetic Vervet Monkeys, *Molecules.* 2, 1713 (2019).

Ou, B., Chang, T., Huang, D., Prior, R.L. Determination of total antioxidant capacity by oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using fluorescein as the fluorescence probe: First Action 2012.23, *J AOAC Int.* 96, 1372-6 (2013).

Patel, O., Muller, C.J.F., Joubert, E., Rosenkranz, B., Louw, J., Awortwe, C. Therapeutic effects of an aspalathin-rich green rooibos extract, pioglitazone

and atorvastatin combination therapy in diabetic db/db mice, PLoS One. 16, (2021).

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

Philippou, McGowan B.M.C., Brynes, A.E., Dornhorst, A., Leeds, A.R., Frost, G.S. The effect of a 12-week low glycaemic index diet on heart disease risk factors and 24 h glycaemic response in healthy middle-aged volunteers at risk of heart disease: a pilot study, European Journal of Clinical Nutrition. 62, 145-149 (2008).

Piek, H., Venter, I., Rautenbach, F., Marnewick, J.L. Rooibos herbal tea: An optimal cup and its consumers, Health SA. 24, 10-90 (2019).

Rabe, C., Steenkamp, J.A., Joubert, E., Hamburger, J.F.W., Ferreira, D. Phenolic metabolites from rooibos tea (*Aspalathus linearis*), Phytochemistry. 35, 1559-1565 (2007).

Ranawana, D.V., Henry, C.J.K., Lightowler, H., Wang, D. Glycaemic index of some commercially available rice and rice products in Great Britain, International Journal of Food Sciences and Nutrition. 60, 4 (2009).

Rebeca Reyes-García, R., Moreno-Pérez, O., Tejera-Pérez, C., Fernández-García, D., Bellido-Castañeda, V., de la Torre Casares, M.L., Rozas-Moreno, P., Fernández-García, J.C., Martínez, A., Escalada-San Martín, J., Gargallo-Fernández, M., Botana-López, M., López-Fernández, J., González-Clemente, J.M., Jódar-Gimeno, E., Mezquita-Raya, P. Een representación del Grupo de trabajo de Diabetes-SEEN; Document on a comprehensive approach to type 2 diabetes mellitus, *Endocrinología, Diabetes y Nutrición*. 66, 443-458 (2019).

Ruiz, N.M., Gracia, S.R., García Íñiguez, J.P., Samper Villagrasa, M.P. Survey on hypoglycaemia diagnosis and glucometer use-which is the most widely used glucometer in Spanish neonatology units?, *Nutr Hosp*. 21, 909-917 (2020).

Rusinek-Prystupa, E., Marzec, Z., Sembratowicz, I., Samolińska, W., Kiczorowska, B., Kwiecień, M. Content of Selected Minerals and Active Ingredients in Teas Containing Yerba Mate and Rooibos, *Biol Trace Elem Res*. 172, 266-275 (2016).

Sasaki, N.N., Nishida, M., Shimada, M. A beneficial role of rooibos in diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis,; *Molecules*. 2018;23, (4):839 (2018).

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

Smit, S.E., Manirafasha, C., Marais, E., Johnson, R., Huisamen, B. Cardioprotective Function of Green Rooibos (*Aspalathus linearis*) Extract Supplementation in Ex Vivo Ischemic Prediabetic Rat Hearts, *Planta Med*. 88, 62-78 (2022).

Smith, C., Swart, A. *Aspalathus linearis* (Rooibos) - a functional food targeting cardiovascular disease, *Food Funct*. 9, 5041-5058 (2018).

Son, M.J., Minakawa, M., Miura, Y., Yagasaki, K. Aspalathin improves hyperglycemia and glucose intolerance in obese diabetic ob/ob mice, *European Journal of Nutrition*. 52, 1607-1619 (2013).

Stefano, G.B., Challenger, S., Kream, R.M. Hyperglycemia-associated alterations in cellular signaling and dysregulated mitochondrial bioenergetics in human metabolic disorders, *Eur J Nutr*. 55, 2339-2345 (2016).

Swan, G. Findings from the latest National Diet and Nutrition Survey, *Proceedings of the Nutrition Society*. 63, 505-512 (2004).

Thilagam, E., Parimaladevi, B., Kumarappan, C., Mandal, S.C. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activity of *Senna surattensis*, *J Acupunct Meridian Stud.* 6, 24-30 (2013).

Thomas, E.S., L. Gomez, H.L., Li, R.K., Chung H.C., Fein, L.E., Chan, V.F., Jassem, J., Pivot, X.B., Klimovsky, J.V., de Mendoza, F.H., Xu, B., Campone, M., Lerzo, G.L., Peck, R.A., Mukhopadhyay, P., Vahdat, L.T., Roché H.H. Ixabepilone Plus Capecitabine for Metastatic Breast Cancer Progressing After Anthracycline and Taxane Treatment, *Journal of Clinical Oncology.* 25, 33 (2007).

Vilela, A. Sensory and Volatile Flavor Analysis of Beverages, *Foods.* 10, 177 (2021).

Warren, J.M., Henry, C.J.K, Lightowler, H.J., Bradshaw, S.M., Perwaiz, S. Evaluation of a pilot school programme aimed at the prevention of obesity in children, *Health Promotion International.* 18, 287–296 (2003).

Zemestani, M.Sc., Rafraf, M., Asghari-Jafarabadi, M. Chamomile tea improves glycemic indices and antioxidants status in patients with type 2 diabetes mellitus, *Nutrition.* 32, 66-72 (2016).

SITOGRAFIA

Figura 1 pg 6

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fantropocene.it%2Fen%2F2020%2F05%2F19%2Faspalathus-linearis%2F&psig=AOvVaw0bZhNTzWZCFcbA90ym1ZhF&ust=1641735878499000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoTCNjf8PCkovUCFQAAAAAdAAAAABAL>

Figura 2 pg 6

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.stockfood.it%2Ffotografia%2F00283436-Rooibos-plantation-South-Africa&psig=AOvVaw1OG5-t7_7jR2mYSJ6VS91p&ust=1641736044573000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoTCKiwksClovUCFQAAAAAdAAAAABAF

Figura 4 pg 10

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fsorgentenatura.it%2Fspeciali%2Frooibos-il-te-alleato-della-salute&psig=AOvVaw3B9W7Q_zXJ5Zga4oND50cF&ust=1641736199158000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoTCKC39YmmovUCFQAAAAAdAAAAABAF

Figura 5 pg 13

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.vegolosi.it%2Fveg-blogger%2Frooibos-il-te-rosso-che-non-e-un-te%2F&psig=AOvVaw2D4V16YCK6oDZKltCjAQT5&ust=1641736280599000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoTCNC9zLCmovUCFQAAAAAdAAAAABAL>

Figura 6 pg 18

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FAspalathin&psig=AOvVaw0ga2axakL-m_szpfQtZsv6&ust=1641736466468000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoTCNj3i4mnovUCFQAAAAAdAAAAABAE

Figura 7 pg 23

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.gabrielebernardini.it%2Flindice-glicemico-del-pane-tostato-e-piu-basso-rispetto-a-quello-del-pane-fresco-ma-soprattutto-ci-interessa-qualcosa%2F&psig=AOvVaw2zE64Vw29m0fdn3VR2RQLa&ust=1641736568097000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoTCIDf67mnovUCFQAAAAAdAAAAABAE>

Figura 8 pg 24

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.greenme.it%2Fmangiare%2Falimentazione-a-salute%2Findice-glicemico-alimenti%2F&psig=AOvVaw2CeOgAyzOopdeLAW3zwZ2W&ust=1641736664534000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoTCKDs5OenovUCFQAAAAAdAAAAABAE>

Figura 11 pg 38

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.salutarmente.it%2Fanalisi-del-sangue%2Fcurva-glicemi>

Figura 22 pg 55

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.chimica-online.it%2Fcomposti-organici%2Ffluoresceina.htm&psig=AOvVaw03Teqc4fxiuLRrFfy8fSKD&ust=1641737176301000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoTCMDN4dupovUCFQAAAAAdAAAAABAK>

Figura 24 pg 61

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fen.wikipedia.org%2Fwiki%2FFolin%25E2%2580%2593Ciocalteu_reagent&psig=AOvVaw2O

H_TiXuRvPcipsEARLJQ5&ust=1644480076588000&source=images&cd=vf
e&ved=0CAsQjRxqFwoTCID3yfKT8vUCFQAAAAAdAAAAABAV

Figura 25 pg 61

https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.chimicamo.o
rg%2Fchimica-
organica%2Facidogallico%2F&psig=AOvVaw1WkOdpaaHrEkbVGueP1DPj
&ust=1641738873154000&source=images&cd=vfe&ved=0CAgQjRxqFwoT
CPjs0YWwovUCFQAAAAAdAAAAABAD

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio la professoressa Elisabetta Damiani e la dottoressa Luisa Bellachioma, che mi hanno seguita costantemente, dandomi preziosi consigli, sia durante la parte sperimentale, che durante la stesura della mia tesi.

A me stessa per aver affrontato questo percorso con costanza, passione, impegno e dedizione.

Ai miei genitori, dico infinitamente grazie, per avermi sostenuta non solo economicamente, ma anche emotivamente in questo percorso di studio.

A mio fratello, da cui apprendo ogni giorno la determinazione, l'ambizione e la forza di affrontare giorno dopo giorno, ciò che la vita mi offre.

Ai mie nonni simbolo di saggezza, sostegno e amore.

A Federica, il mio punto di riferimento durante questi ultimi 5 anni, per avermi dato preziosi consigli su come gestire il mio percorso universitario, per avermi consolata nei momenti di sconforto e per aver condiviso momenti di gioia e soddisfazione.

Ad Elena, per il continuo supporto datomi in questi anni, per la sua personalità solida, determinata e matura che mi ha trasmesso sicurezza durante questo percorso universitario.

A Violetta, Silvana, Michela, Vissia, Concetta, Silvia, Chiara, Ludovica, Sofia, Roberta e Marica dico grazie per i momenti di spensieratezza, per le lunghe passeggiate, per le serate alternative e per aver condiviso momenti allegri o di sconforto.

A Silvia, Alessia e Ilaria, il mio supporto durante la parte sperimentale della mia tesi.

Ad Ilaria, Francesca, Angela, Rosaria, Egizia e a tutti gli amici del gruppo Giovani “Maria Santissima della Fontana”, nonostante la distanza e i pochi momenti trascorsi insieme in questi ultimi anni, la nostra amicizia non è mai tramontata, è rimasta sempre solida.

