

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biologia



ELABORATO DI LAUREA

**Gli antociani del mirtillo (*Vaccinium* sp.):
proprietà ed impatto sulla regolazione del
microbiota intestinale nell'obesità**

**Tutor: Prof.ssa Elide Formentin
Dipartimento di Biologia**

Laureando: Paolo Passuello

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

1. Introduzione	2
1.1 Classificazione e distribuzione di <i>Vaccinium</i> sp.	2
1.2 Composizione chimica del frutto di <i>Vaccinium</i> sp.	2
1.3 Molecole bioattive presenti	3
1.4 Antociani	4
1.5 Conservazione commerciale di <i>Vaccinium</i> sp.	5
2. Proprietà biologiche	7
2.1 Capacità antiossidante	7
2.2 Attività antitumorale	7
2.3 Attività antiinfiammatoria	8
2.4 Prevenzione cardiovascolare	8
2.5 Attività antidiabetica	9
2.6 Attività antimicrobica	10
3. Scopo della tesi	11
4. Studi a supporto dell'attività regolatrice di <i>Vaccinium</i> sp. sul microbiota intestinale nell'obesità	11
4.1 Gli antociani di <i>Vaccinium corymbosum</i> L. influenzano il microbiota degli umani obesi	12
4.2 La supplementazione di mirtillo (<i>Vaccinium</i> sp.) influenza il microbiota di ratti alimentati con una dieta ricca di grassi	16
5. Discussione, criticità e punti di forza	20
6. Conclusione	23
7. Bibliografia	24

1. Introduzione

Mirtillo è una parola comunemente utilizzata per indicare le piccole bacche blu di piante appartenenti al genere *Vaccinium* L. La pianta di mirtillo è un arbusto a foglia caduca, i cui frutti sono utilizzati in cucina per il loro sapore e per i loro presunti benefici sulla salute umana. In questo elaborato esploreremo le proprietà e i potenziali benefici per la salute del mirtillo, focalizzando la discussione sull'effetto degli antociani nella regolazione del microbiota intestinale nell'obesità.

1.1 Classificazione e distribuzione di *Vaccinium* sp.

Con il termine mirtillo si è soliti indicare il frutto di piante appartenenti al genere *Vaccinium* L., un insieme di piante facente parte della famiglia delle Ericacee, inclusa nella classe delle Magnoliopsida. Si stima che il numero di specie appartenenti al genere *Vaccinium* L. sia di 450 e che queste siano più distribuite nelle regioni subtropicali, temperate e boreali dell'emisfero settentrionale (Austin et al., 1991). Secondo *Food and Agriculture Organization of the United Nations* i principali produttori e consumatori di mirtilli al mondo sono gli Stati Uniti e Canada; negli ultimi anni la specie più coltivata e consumata – sia per la resistenza alle condizioni climatiche sia per l'elevata qualità dei frutti – è *Vaccinium corymbosum* L., comunemente chiamato Highbush blueberry (Rashidinejad, 2020). Con *Vaccinium* sp. vengono indicati piccoli arbusti perenni che producono false bacche, le quali costituiscono la parte commestibile e commercialmente rilevante. I frutti possono essere messi in vendita interi ma da essi vengono prodotti anche succhi, estratti, integratori alimentari in capsule ed in polvere. Il frutto edibile di *Vaccinium* sp., ovvero il mirtillo, è conosciuto per essere un superalimento, che Treccani (2018) definisce come “*prodotto alimentare considerato ricco di nutrienti e capace di apportare benefici alla salute se integrato in una dieta bilanciata*”. Tradizionalmente i mirtilli erano usati come trattamento per problemi digestivi, come rilassante muscolare durante il parto e come sciroppo lenitivo per il mal di gola; al giorno d'oggi sono studiati per le loro promettenti proprietà salutari (“Food and its uses: blueberries”, M. Sheldon, 2023).

1.2 Composizione chimica del frutto di *Vaccinium* sp.

Il frutto di *Vaccinium* sp. è di forma sferica, presenta una colorazione blu-nera e possiede uno strato di epidermide all'interno del quale è presente una polpa giallo-verde (Costa et al., 2013). La composizione percentuale di macronutrienti e micronutrienti della finta bacca della pianta di *Vaccinium* è: 84% acqua, 9,7% carboidrati, 0,6% proteine, 0,4% grassi e 3% fibre; inoltre, 100 grammi di frutto di

mirtillo consumato fresco forniscono un quantitativo energetico pari a circa 46 chilocalorie (Michalska e Łysiak, 2015). Nutrizionalmente, il frutto di *Vaccinium* sp. è in prevalenza composto da acqua e zuccheri, dei quali glucosio e fruttosio sono i principali; le pectine rappresentano le fibre più presenti nel frutto di *Vaccinium* sp. (Mattivi et al., 2012). Grassi e proteine costituiscono una percentuale poco rilevante per il conteggio calorico totale dell'alimento ("Blueberries, raw", 2018). Secondo USDA (United States Department of Agriculture), in una porzione di 100g di mirtillo fresco sono presenti microelementi come sodio, zinco, potassio, fosforo, ferro, rame e magnesio, tutti con concentrazioni massime di 77mg/100g ("Blueberries, raw", 2018).

La letteratura scientifica sostiene da decenni che i mirtilli posseggano importanti attività antiossidanti e che tali proprietà possano essere associate alla presenza di polifenoli nel frutto. I composti polifenolici – soprattutto gli antociani – si trovano sotto l'epidermide del frutto; quest'ultima è ricoperta da una cuticola ed una cera epicuticolare, necessarie al mantenimento del turgore del frutto e per evitare la disidratazione di quest'ultimo (Costa et al., 2013).

1.3 Molecole bioattive presenti

Fin dai primi studi fatti sulla bacca di *Vaccinium* sp. si è osservata una buona quantità di composti bioattivi presenti. Quelli maggiormente abbondanti sono gli antociani, secondariamente sono presenti anche flavonoli, acidi fenolici, tannini, vitamina C, vitamina B6, beta-carotene, procianidine, acidi idrossibenzoici e stilbeni (Rashidinejad, 2020). Si ritiene che, mediamente, possano esserci dai 48 mg/100g ai 304 mg/100g di composti polifenolici nel frutto fresco di Blueberry (Ehlenfeldt e Prior, 2001). Le ampie variazioni in contenuto polifenolico sono influenzate dallo stato di maturazione del frutto, dalle condizioni di crescita della pianta e dalle metodologie di determinazione della quantità di composti bioattivi nella finta bacca (Ehlenfeldt e Prior, 2001).

In numerosi studi (Barnes et al. 2009, Routray e Orsat 2011) effettuati con l'obiettivo di individuare gli antociani presenti nel frutto di *Vaccinium* sp., sono stati trovati fino a quindici diversi antociani; solo cinque sono i principali: cianidina, delphinidina, malvidina, peonidina e petunidina (**Fig. 1B**) (Silva et al., 2020). La composizione fenolica del frutto di *Vaccinium* sp., quella che verrà principalmente analizzata in questo elaborato, è data in gran parte da flavonoli ed antociani; entrambe le categorie di composti bioattivi si trovano legati ad uno zucchero sottoforma di glicosidi, ossia posseggono una struttura divisa in una parte gliconica ed in una parte non gliconica (Sochor et al., 2015).

Uno dei composti bioattivi di maggior interesse presente nel frutto di *Vaccinium* sp. è l'acido ascorbico, di cui sono note le proprietà antiossidanti; 100 grammi di mirtilli forniscono circa 10mg di vitamina C che, secondo *EFSA*, corrispondono ad un nono del fabbisogno medio giornaliero di un maschio adulto in salute (Krewer et al., 1998).

I mirtilli sono frutti nutrienti, sono fonti ricche di vitamine, di minerali, di fibre ed i potenziali benefici per la salute umana deriverebbero proprio dall'abbondanza di componenti bioattivi presenti (Xiao et al., 2017).

Nella seguente relazione il focus sarà incentrato sugli antociani e le loro proprietà piuttosto che su altri composti bioattivi presenti nel frutto di *Vaccinium* sp.

1.4 Antociani

Gli antociani sono un gruppo di pigmenti idrosolubili facenti parte della classe dei flavonoidi e possiedono colorazioni che, andando dal rosso al blu, sono stati storicamente impiegati come coloranti naturali e come coloranti alimentari. Gli antociani sono costituiti da 15 atomi di carbonio con una peculiare struttura C6-C3-C6 in cui sono presenti due anelli aromatici e, come sostituenti, numerosi gruppi ossidrilici (Chen e Stephen, 2019).

La principale via di biosintesi degli antociani avviene a partire da una molecola di fenilalanina prodotta attraverso la via dello shikimato (Diaconeasa et al., 2022). In seguito, la fenilalanina è trasformata in acido *trans*-cinnamico (Diaconeasa et al., 2022). L'acido *trans*-cinnamico è idrossilato a *p*-cumaril-CoA, il quale interagisce con tre molecole di malonil-CoA (reazione catalizzata dall'enzima chiave calcione sintasi) per generare una molecola di calcione (Diaconeasa et al., 2022) (**Fig. 1A**). Il prodotto finale di questa via di biosintesi è l'antocianina-3-O-acetilglucoside (Chen e Stephen, 2019). Generalmente, gli antociani si trovano - in ordine decrescente di abbondanza - nei fiori, nei frutti, nelle foglie e negli steli e si accumulano, a livello cellulare, nei vacuoli (Andersen et al., 2006).

Uno degli aspetti più studiati relativo agli antociani riguarda la loro stabilità *in vivo*. Di fatto, gli antociani sono altamente instabili: pH, solventi, temperatura, ossigeno, ioni metallici e luce sono i fattori abiotici che più ne influenzano la stabilità, mentre enzimi, proteine e flavonoli sono i fattori biotici maggiormente influenzanti la stabilità (Fujii et al., 2002).

1.5 Conservazione commerciale di *Vaccinium sp.*

Di grande rilevanza commerciale, economica ed ecologica è la modalità di conservazione del frutto di *Vaccinium sp.*, in quanto è sempre più importante fornire al consumatore finale un prodotto di bell'aspetto, che mantenga per un lungo periodo eventuali proprietà salutari presenti, che non presenti muffe e che abbia un costo ragionevole. Nella vendita al dettaglio i mirtilli sono conservati in frigorifero (con temperatura compresa tra 0°C e i 4°C) in contenitori traspiranti in PVC; è possibile anche la congelazione domestica per un periodo medio di 12 mesi.

Balawejder et al. (2020) hanno dimostrato che il trattamento di *Vaccinium corymbosum* L. con 15 ppm di ozono per 30 minuti (ogni 12 ore per 28 giorni di conservazione a 4°C) garantiva una maggiore attività degli enzimi antiossidanti rispetto alla frutta non ozonizzata durante i primi 21 giorni di conservazione a basse temperature. La proprietà antiossidante di *Vaccinium corymbosum* L. – importante perché una delle responsabili degli effetti benefici del mirtillo sulla salute – era maggiore nella frutta ozonizzata. Essi hanno osservato che gli enzimi superossido dismutasi e glutatione perossidasi presentavano una maggiore attività durante le prime tre settimane di conservazione a basse temperature e, allo stesso tempo, la quantità del radicale anione superossido e di perossido di idrogeno era nettamente minore nella frutta trattata piuttosto che in quella non trattata (Balawejder et al., 2020).

Romani et al. (2017) hanno dimostrato – parallelamente allo studio di Balawejder et al. (2020) – che un rivestimento commestibile applicato sull'epidermide del mirtillo ne migliora la consistenza, ne riduce la crescita di lieviti, di batteri aerobici mesofilli e presenta una tonalità blu più intensa rispetto al mirtillo non rivestito. Romani et al. (2017) hanno studiato gli effetti di un rivestimento di pectina e di alginato di sodio e hanno osservato che esso era il responsabile delle migliorie qualitativo-visive e della riduzione della crescita microbica durante le due settimane di conservazione a basse temperature (4°C).

Come detto, nell'ultimo decennio l'attenzione del consumatore è incentrata sulla qualità del prodotto e sulla sua durata di conservazione; Romani et al. (2017) e Balawejder et al. (2020) hanno dimostrato come sia possibile aumentare l'efficacia temporale degli effetti benefici dei composti bioattivi presenti nella falsa bacca di *Vaccinium sp.*, anche se applicazioni su scala industriale sono lontane. Riuscire ad applicare in larga scala gli studi compiuti sulla conservazione dei frutti di *Vaccinium sp.* potrebbe migliorare sensibilmente la quantità delle molecole bioattive nel tempo, garantendo al consumatore finale un prodotto salutare nel lungo periodo.

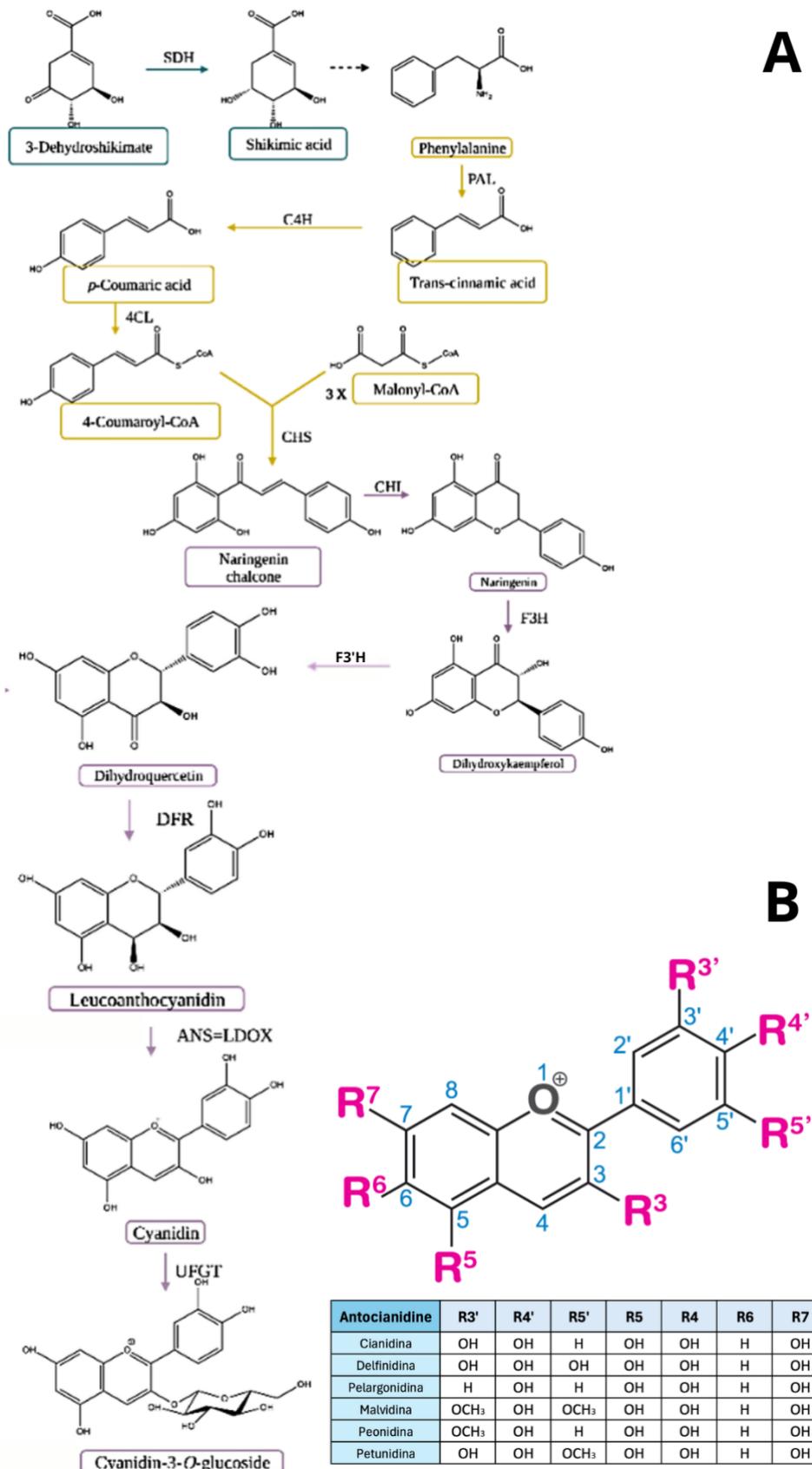


Figura 1. Via di biosintesi e struttura degli antociani.
 A) Via di biosintesi dell'antocianina-3-O-acetilglucoside.
 B) Struttura generale di un antociano con sostituenti principali.
 (Diaconeasa et al., 2022; modificato)

2. Proprietà biologiche

2.1 Capacità antiossidante

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS), come l'anione superossido o il radicale ossidrilico, sono composti altamente reattivi e potenzialmente responsabili di alterazioni biologiche e disequilibri omeostatici. Il controllo del livello di ROS può contenere lo stress ossidativo dell'individuo: il consumo di mirtilli – di cui è noto il potere antiossidante - può evitare un'eccessiva presenza di ROS (Silva et al., 2020). La capacità antiossidante (AOC) misura la capacità di un composto di ridurre un radicale e tiene in considerazione la somma di tutti i contributi delle varie molecole con attività antiossidante. Gli antiossidanti sono molecole capaci di proteggere i substrati organici dall'attività dei radicali liberi.

In decine di esperimenti è stata dimostrata l'attività antiossidante del frutto di *Vaccinium* sp., tra cui quello condotto da Ehlenfeldt et al. (2001), in cui sono state misurate la capacità antiossidante, il contenuto fenolico totale e le concentrazioni degli antociani nei frutti e nei tessuti fogliari di 87 diverse cultivar di Highbush Blueberry: la capacità antiossidante media di tutti i campioni era di 15,9 unità di ORAC nel frutto (Vander Kloet et al., 2001). Il valore medio di equivalenti di acido gallico era di 1,79 mg/g nel caso dei fenoli e degli antociani presenti nei campioni di frutta (Vander Kloet et al., 2001).

Grazie alle rilevanti proprietà antiossidanti di *Vaccinium* sp., il mirtillo è conosciuto per essere il “re dei frutti antiossidanti” (Rashidinejad, 2020). Altri studi hanno dimostrato come non ci sia alcuna correlazione tra la dimensione dei mirtilli ed il contenuto di antociani che, come visto, è influenzata da altri fattori, tra cui la disponibilità d'acqua e l'intensità luminosa (Vander Kloet et al., 2001).

2.2 Attività antitumorale

Ad oggi, secondo l'OMS (*Organizzazione Mondiale della Sanità*), il cancro è la seconda causa di morte più diffusa mondialmente e si prevede che nel 2050 saranno 35 milioni i nuovi casi di tumore. Numerosi studi, tra cui quelli di Seeram et al. (2006) e Diaconeasa et al. (2015), hanno dimostrato che gli estratti di mirtillo inibivano, *in vitro*, la proliferazione di linee cellulari tumorali del colon, della prostata, del seno, della bocca, delle ovaie e della pelle (Silva et al., 2020). Anche gli studi di Kou et al. (2016) e Ouzounova et al. (2016) hanno dimostrato che gli estratti di mirtillo riducevano la vitalità cellulare – *in vitro* – di cellule di cancro al seno, sia MDA-MB-231 che MCF-7. Ouzounova et al. (2016) hanno ipotizzato che i responsabili della modulazione dei regolatori associati alla trasformazione cellulare ed all'infiammazione fossero i polifenoli contenuti nell'estratto di mirtillo;

tuttavia, non ci sono ancora prove scientifiche definitive a supporto di questa ipotesi.

Nell'insieme, l'effetto anticancerogeno di *Vaccinium* sp. è attribuito per la maggior parte all'attività antiossidante dei mirtilli (Rashidinejad, 2020). Alcuni esperimenti – sia *in vivo* che *in vitro* – riportano come l'attività antiinfiammatoria di *Vaccinium* sp. possa modulare la proliferazione delle cellule tumorali, promuoverne l'apoptosi e controllare l'angiogenesi tumorale, anche se non ci sono dimostrazioni rilevanti derivate da studi clinici (Seeram, 2008).

2.3 Attività antiinfiammatoria

L'infiammazione è un fattore coinvolto nell'insorgenza di malattie croniche come il diabete, l'artrite e l'osteoporosi (Libby, 2007). Svariati studi hanno svolto analisi sull'azione antiinfiammatoria del mirtillo. Torri et al. (2007) hanno trovato una diminuzione dell'edema delle zampe e della formazione di tessuto granulomatoso in topi alimentati con un estratto grezzo di mirtillo (Silva et al., 2020). Anche Ebenezer et al. (2016) hanno dimostrato che l'integrazione di polvere di mirtillo nella dieta di un modello di ratto – affetto da disturbo da stress post-traumatico – abbia portato ad una riduzione dell'infiammazione (Silva et al., 2020). Srivastava et al. (2007) hanno segnalato che gli antociani, grazie alla loro azione antiossidante, esercitano anche un indiretto effetto antiinfiammatorio. Infine, Mykkänen et al. (2014) hanno dimostrato che il consumo di mirtilli interi per tre mesi nella dieta di topi (10% del totale) abbia attenuato le risposte pro-infiammatorie che venivano indotte dalla dieta ad alto contenuto di grassi con cui i topi erano alimentati.

Sul fronte della salute umana, Jaques et al. (2015) hanno effettuato un'analisi su 2375 adulti statunitensi che assumevano flavonoli – tra cui antociani – nella loro dieta. Utilizzando un punteggio di infiammazione che integrava 12 biomarcatori infiammatori individuali, lo studio ha dimostrato che l'assunzione di antociani era inversamente associata a tutti i sottogruppi di biomarcatori per l'infiammazione, evidenziando l'effetto antiinfiammatorio di antociani e flavonoli (Jaques et al., 2015). I numerosi risultati ottenuti *in vitro*, su modelli di topo e su umani adulti confermano l'attività antiinfiammatoria di *Vaccinium* sp., indicando come l'attività antiossidante sia la responsabile principale degli effetti antiinfiammatori del mirtillo.

2.4 Prevenzione cardiovascolare

Secondo l'OMS le malattie cardiovascolari sono la prima causa di morte a livello globale. L'OMS sostiene che una dieta ricca di grassi sia uno dei fattori di rischio più diffusi nella popolazione occidentale per l'insorgenza di malattie

cardiovascolari. Cassidy et al. (2016) hanno correlato, nei loro studi, una riduzione del rischio di infarto al miocardio nelle donne che integravano mirtilli nella loro dieta quotidiana (Silva et al., 2020). Negli studi di Cassidy et al. (2016) si suggerisce che l'assunzione di alcuni frutti specifici, tra cui i mirtilli, potrebbe essere più efficace nella gestione delle malattie cardiovascolari, dato che i flavonoidi sono stati associati ad un miglioramento del flusso sanguigno e della funzione endoteliale (Silva et al., 2020).

Nello studiare la sindrome metabolica e l'infiammazione in 48 adulti obesi, Basu et al. (2010) hanno osservato che l'integrazione di mirtilli liofilizzati nella dieta riduceva la pressione sanguigna sistolica e diastolica rispettivamente del 6% e del 4% (Rashidinejad, 2020). Nonostante le numerose ricerche effettuate sull'attività di prevenzione cardiovascolare del mirtillo, ad oggi non è possibile stabilire con certezza quali siano i metaboliti responsabili delle proprietà benefiche contro le malattie cardiovascolari (Rashidinejad, 2020). Tra gli effetti benefici, i mirtilli hanno la capacità di: abbassare la pressione sanguigna, migliorare le funzioni endoteliali, ridurre il livello di lipidi nel sangue, modulare l'infiammazione e migliorare la rigidità arteriosa (Aluko et al., 2023). Le prove a supporto dell'effetto protettivo e preventivo del mirtillo contro le malattie cardiovascolari non chiariscono i meccanismi retrostanti e gli studi effettuati sono spesso ritenuti imperfetti data la mancanza di gruppi di controllo e di un'estensione temporale adeguata dello studio condotto (Aluko et al., 2023).

2.5 Attività antidiabetica

Come visto al *sottoparagrafo 2.3*, l'infiammazione è anche uno tra i fattori scatenanti il diabete, termine con cui l'OMS indica un "*disordine metabolico caratterizzato da iperglicemia cronica con alterazioni del metabolismo derivanti da difetti legati all'insulina*" ("Relazione al Parlamento 2021 sul diabete mellito", 2021). È stato dimostrato che gli estratti ricchi di antociani aumentano la sensibilità all'insulina negli esseri umani e normalizzano i marcatori del metabolismo del glucosio nei ratti obesi (Silva et al., 2020). Dimostrazioni scientifiche evidenziano come l'assunzione di antociani provenienti da mirtilli sia correlata ad un minor rischio di contrarre diabete mellito (Cassidy et al., 2014).

In uno studio condotto su adulti obesi ed insulino-resistenti, dopo sei settimane di assunzione giornaliera di mirtilli la sensibilità insulinica era maggiore rispetto ai soggetti che non assumevano mirtilli nella loro dieta (Cefalù et al., 2010). In un altro studio condotto da Istek e Gurbuz (2017) per 12 settimane su 54 giovani adulti in sovrappeso (BMI > 25) la sostituzione di 50g di carboidrati con 50g di mirtilli al

giorno ha portato ad una riduzione favorevole del peso corporeo e ad un miglioramento della sensibilità all'insulina.

I principali risultati ottenuti nella ricerca scientifica forniscono prove del miglioramento della sensibilità insulinica *in vitro* in seguito all'assorbimento dei composti bioattivi del mirtillo. Non sono ancora chiari i risultati *in vivo*. Non ci sono sufficienti prove per sostenere che il frutto di *Vaccinium* sp. prevenga o ritardi il diabete mellito (Stull, 2016). Sono necessari studi più a lungo termine, randomizzati e controllati con placebo per comprendere il ruolo dei mirtilli (Stull, 2016).

2.6 Attività antimicrobica

Diversi autori hanno segnalato la capacità degli estratti di mirtillo di inibire – *in vitro* – la crescita di agenti patologici come *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Silva et al., 2020). Silva et al. (2020) ritengono che, sebbene le concentrazioni assumibili *in vivo* siano inferiori rispetto a quelle utilizzate *in vitro*, gli estratti di mirtillo possano comunque influenzare negativamente il metabolismo batterico, anche se non in grado di inibire la crescita batterica.

Shimamoto et al. (2015) hanno valutato l'attività antimicrobica *in vitro* di estratti acquosi di mirtillo. I risultati da loro ottenuti evidenziano come l'estratto di *Vaccinium myrtillus* fosse il miglior inibitore – tra gli estratti utilizzati – dei ceppi *Vibrio* e *Listeria*, che risultavano essere i più sensibili all'effetto antimicrobico del mirtillo. Si suggerisce che l'estratto acquoso del frutto di *Vaccinium myrtillus* eserciti un potente effetto antimicrobico, inibendo l'espressione dei fattori di virulenza di *Vibrio cholerae* (Shimamoto et al., 2015).

In uno studio parallelo condotto da Wu et al. (2014) sono stati utilizzati estratti di quattro cultivar di *Vaccinium corymbosum* L. per verificare la loro attività antimicrobica contro la crescita di ceppi batterici di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enteritidis*. Lo studio ha dimostrato che gli estratti delle quattro cultivar di mirtillo erano inibitori della crescita di entrambi i ceppi batterici, evidenziando ulteriormente l'effetto antimicrobico degli estratti di *Vaccinium* sp. (Vivian et al., 2014).

I risultati riportati mettono in risalto l'attività antimicrobica *in vitro* degli estratti di *Vaccinium* sp., tuttavia saranno necessari ulteriori studi atti ad approfondire l'applicazione pratica di questi risultati sulla sicurezza alimentare e sulla salute umana (Vivian et al., 2014).

3. Scopo della tesi

L'obiettivo dell'elaborato è proporre una serie di risultati e di ricerche scientifiche che dimostrino il ruolo degli antociani di *Vaccinium* sp. ed in particolare di *Vaccinium corymbosum* L. nell'influenzare il microbiota intestinale di umani e ratti obesi. Attraverso i dati raccolti, si vogliono evidenziare gli effetti nella regolazione del microbiota intestinale di soggetti obesi da parte di antociani presenti nel frutto di *Vaccinium corymbosum* L.

4. Studi a supporto dell'attività regolatrice di *Vaccinium* sp. sul microbiota intestinale nell'obesità

L'OMS definisce l'obesità come “*una condizione patologica caratterizzata da un eccessivo peso corporeo dato da un accumulo di tessuto adiposo in misura tale da influire negativamente lo stato di salute*”. Dal 2017 l'obesità è riconosciuta come una patologia (“Obesity and overweight”, 2024). Dal 2022, una persona su otto vive in una condizione di obesità (Body Mass Index maggiore di 30) (“Obesity and overweight”, 2024). Si stima che, nel 2030, ci saranno oltre un miliardo di persone obese, dato che rappresenterebbe il doppio della stima fatta sul numero di persone obese nel 2010 (“Obesity and overweight”, 2024).

Trovare alimenti capaci di dare benefici a soggetti obesi o capaci di prevenire l'obesità rappresenta una sfida che si è intensificata negli ultimi due decenni. Il frutto di *Vaccinium* sp. è un alimento che, se consumato quotidianamente, potrebbe portare importanti benefici alla salute del soggetto obeso. La regolazione del microbiota intestinale ne rappresenta uno dei punti chiave. Il microbiota intestinale è definito come l'insieme di batteri, Archea ed eucarioti che colonizzano il tratto gastrointestinale e che mostrano un'associazione simbiotica con l'ospite, intervenendo in processi legati alla nutrizione, al metabolismo energetico e alla regolazione del sistema immunitario (Thursby e Juge, 2017). Un altro dei principali fattori correlati alla salute intestinale è da ricercare negli acidi grassi a catena corta (SCFA) (Blaak et al., 2015). Gli SCFA derivano dalla fermentazione microbica intestinale di alimenti digeriti e sono la fonte principale di energia delle cellule del colon, rendendoli fondamentali per la salute gastrointestinale (Blaak et al., 2015). Un alimento in grado di influenzare la composizione del microbiota intestinale umano sarebbe un sicuro alleato per la ricerca medica futura.

4.1 Gli antociani di *Vaccinium corymbosum* L. influenzano il microbiota degli umani obesi

L'obesità è molto spesso collegata ad un'inflammatione generalizzata e ad una serie di disturbi metabolici. L'inflammatione è associata ad una disbiosi intestinale e ad uno squilibrio del microbiota intestinale (Pisani et al., 2017). Huang et al. (2024) hanno condotto uno studio per esplorare l'impatto degli antociani del mirtillo sul microbiota intestinale di esseri umani obesi. Il loro studio prende in esame la possibile azione benefica dell'estratto di *Vaccinium corymbosum* L. (Southern highbush blueberry) sul microbiota intestinale umano nella condizione di obesità patologica.

È già stato riportato (Pisani et al., 2017) che gli antociani hanno un effetto antiobesità, dato che prevengono la resistenza insulinica e l'inflammatione, regolano il metabolismo lipidico e contribuiscono alla sensazione di sazietà. La problematica principale riguarda la biodisponibilità degli antociani: solo il 5% raggiunge il colon ed interagisce con il microbiota intestinale (Huang et al., 2024). La FDA (*Food and Drug Administration*) definisce la biodisponibilità come “*la velocità e la misura con cui un principio attivo o la sua frazione viene assorbito e diventa disponibile nel sito d'azione*” ed è dimostrato che la biodisponibilità degli antociani nell'essere umano sia molto bassa (Yang et al. 2011, sostengono che meno dell'1% degli antociani è generalmente assorbito) (Chun et al., 2011).

Huang et al. (2024) hanno studiato la relazione tra estratti di antociani di *Vaccinium corymbosum* L., microbiota intestinale ed acidi grassi a catena corta (SCFA), fornendo nuove informazioni sull'interazione benefica tra mirtillo e microbiota intestinale negli esseri umani obesi.

Nella letteratura scientifica è noto come le comunità microbiche di soggetti obesi differiscano rispetto a quelle di soggetti normopeso, sia in termini di abbondanza che in termini di diversità (Huang et al., 2024). Nello specifico, è presente un rapporto più elevato di Firmicutes/*Bacteroidetes* nei soggetti obesi e ciò conferma l'ipotesi che batteri specifici siano coinvolti nella modulazione del metabolismo del glucosio, dell'omeostasi energetica e del bilancio energetico (Pisani et al., 2017).

Gli antociani hanno la capacità di regolare la composizione del microbiota intestinale, migliorandone la diversità e l'abbondanza, stimolando la produzione di SCFA (Huang et al., 2024). Sembra essere verosimile l'ipotesi che alterare il microbiota intestinale di un soggetto obeso tramite assunzione di antociani possa portare a benefici salutari (Huang et al., 2024).

Per verificare l'attività degli antociani di *Vaccinium corymbosum* L., Huang et al. (2024) hanno proceduto con l'analisi di campioni fecali forniti da nove volontari obesi (tra i 24 e i 32 anni). Successivamente i campioni sono stati fatti fermentare

in vitro per 24 ore e sono stati iniettati cinque millilitri di tampone fosfato contenente un estratto acquoso di *Vaccinium corymbosum* L. I campioni ottenuti sono stati raccolti ad intervalli di sei ore (per 24 ore in totale) ed analizzati (Huang et al., 2024). Le analisi hanno permesso di quantificare l'estratto di mirtillo, misurare gli SCFA e caratterizzare il microbiota intestinale dopo la fermentazione *in vitro* (Huang et al., 2024). Preliminarmente è stata analizzata la composizione chimica del campione fermentato con l'estratto di mirtillo; malvidina e delphinidina sono risultati essere i due antociani più rappresentati.

Un primo risultato ottenuto sul microbiota intestinale di esseri umani obesi studiando il campione in cui era avvenuta la fermentazione dell'estratto di mirtillo riguarda la diversità di specie batteriche presenti (Huang et al., 2024). L'aggiunta di estratto di mirtillo ha migliorato il numero di OTU (operational taxonomic unit) e il numero di OTU unici: nel gruppo di controllo si riscontravano 75 OTU mentre nel campione in cui era avvenuta la fermentazione con l'estratto di mirtillo si riscontravano 790 OTU (Huang et al., 2024) (**Fig. 2A**). Il risultato ottenuto suggerisce che l'estratto di mirtillo potrebbe migliorare la diversità delle specie batteriche presenti nel microbiota intestinale (Huang et al., 2024).

Un secondo risultato ottenuto sembra confermare il risultato appena riportato: l'indice Chao1, l'indice di Shannon e l'indice di Simpson (i quali riflettono la ricchezza e la diversità della comunità batterica) sono tutti più alti nel campione in cui era avvenuta la fermentazione con l'estratto di mirtillo piuttosto che nel campione di controllo (Huang et al., 2024) (**Fig. 2B**). Risulta evidente come la fermentazione con l'estratto di mirtillo abbia influenzato in maniera significativa il microbiota intestinale modificandone la composizione.

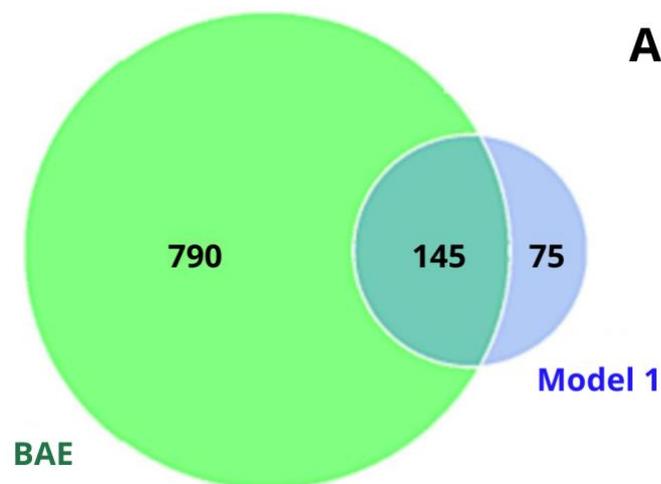


Figura 2. Risultati dell'abbondanza nella composizione microbionica. I risultati sono espressi come numero intero senza deviazione standard (dato ottenuto sperimentalmente).
A) Numero di OTUs analizzate con diagramma di Venn. In model 1 (controllo) si riscontrano 75 OTU mentre in BAE (estratto di mirtillo) si riscontrano 790 OTU.
(Huang et al., 2024; modificato)

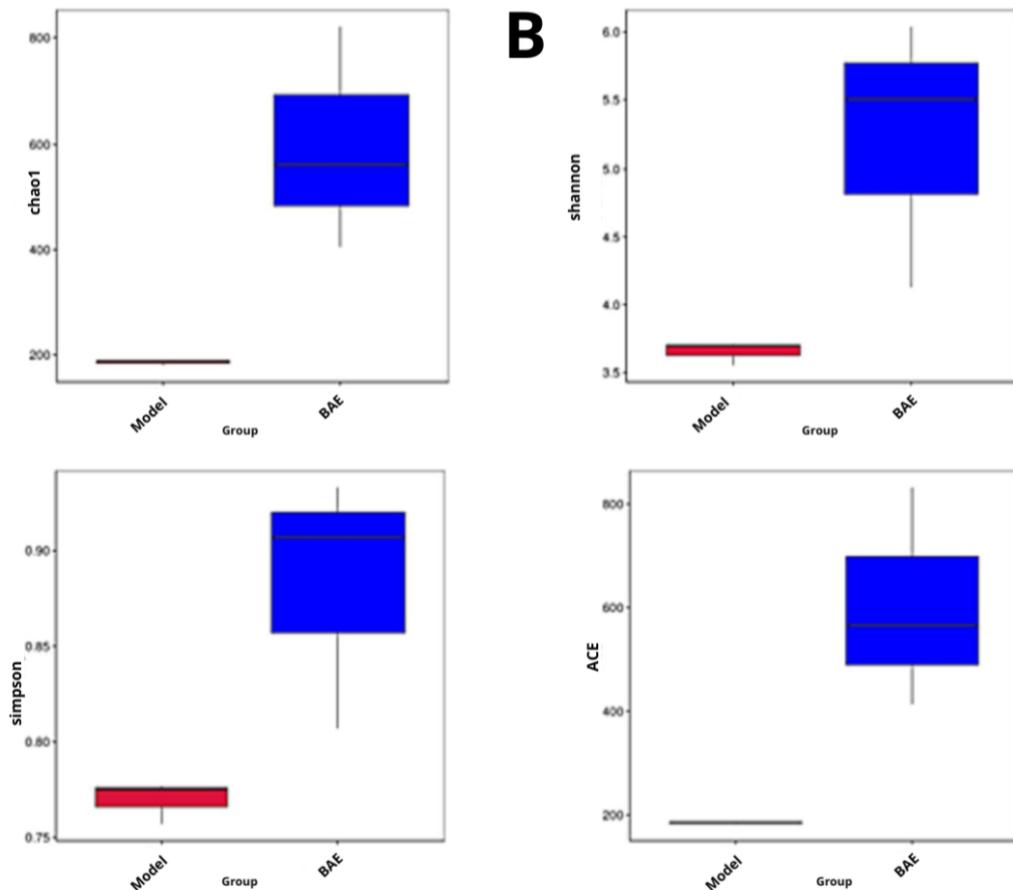


Figura 2. Risultati dell'abbondanza nella composizione microbionica. I risultati sono espressi come media \pm deviazione standard (SD) e con un livello di significatività fissato a $p < 0,05$. B) Analisi della diversità del microbiota. Model (controllo) mostra indici sempre più bassi di BAE (estratto di mirtillo) con l'indice Chao1, l'indice di Shannon, l'indice di Simpson e ACE. (Huang et al., 2024; modificato)

Secondo Pisani et al. (2017), *Bacteroidetes* e Firmicutes sono dominanti in individui sani. Ciò che ci si aspetta è che il microbiota fecale di soggetti obesi sia alterato: i risultati di Huang et al. (2024) hanno trovato che il microbiota dei nove soggetti volontari era – per oltre il 90% - composto da *Proteobacteria* e Firmicutes, confermando una situazione alterata rispetto al microbiota tipico di un individuo sano. I risultati ottenuti in seguito alla fermentazione con l'estratto di mirtillo hanno mostrato una diminuzione del 17,14% dell'abbondanza dei *Proteobacteria* e, al contempo, l'abbondanza di *Bacteroidetes* e Firmicutes è aumentata rispettivamente di 1,22 e 1,9 volte (Huang et al., 2024). Anche questo terzo risultato conferma come l'estratto di mirtillo abbia ridotto l'abbondanza di *Proteobacteria* (associata ad un microbiota di un individuo obeso, dunque patologico) ed aumentato l'abbondanza di *Bacteroidetes* e Firmicutes nel microbiota dei pazienti obesi, riportando la composizione microbionica ad una situazione più tipica di un soggetto sano.

Il trattamento con l'estratto di mirtillo ha recuperato le composizioni del microbiota intestinale dei soggetti obesi portandoli ad una condizione più simile a quella del

microbiota intestinale di un soggetto sano. In particolare, i gruppi *Escherichia-Shigella* e *Clostridium_sensu_stricto_1* diminuivano la loro concentrazione almeno del 10,5% nei campioni in cui era avvenuta la fermentazione con l'estratto di mirtillo (Huang et al., 2024). Contrariamente ai risultati finora ottenuti, Huang et al. (2024) hanno notato un aumento della concentrazione del 4,7% di *Lachnospiraceae_UCG_004* nei campioni trattati con l'estratto di mirtillo, dato in controtendenza con quelli fino ad ora registrati. Il ruolo di *Lachnospiraceae* sulla salute del microbiota intestinale umano resta tutt'ora ambiguo (De Angelis et al., 2020).

A conferma dei risultati ottenuti da Huang et al. (2024) viene ora riportato uno studio in aperto condotto su 51 volontari maschi e femmine con BMI > 30 a cui è stata somministrata un'integrazione giornaliera di antociani (215 mg, di cui 144 mg di estratto di *Vaccinium myrtillus*) e di prebiotici (Diaconeasa et al., 2022). Dopo 8 settimane, è stato osservato un aumento del 20,7% di *Bacteroidetes* e un calo statisticamente rilevante del rapporto Firmicutes/*Bacteroidetes* (dal 14,2 a 9,3), calo associato in altri studi ad una composizione batterica più tipica di un soggetto non obeso (Diaconeasa et al., 2022).

Secondariamente, Huang et al. (2024) hanno misurato la quantità degli acidi grassi a catena corta presente nel gruppo di controllo e in quello trattato con l'estratto di mirtillo. Sempre più abbondanti sono le prove a sostegno dell'importanza degli SCFA nel mantenimento di una situazione salutare del microbiota intestinale (Verbeke et al., 2020). Gli SCFA sono essenziali per l'integrità dell'intestino regolando il pH del lume intestinale, regolando la produzione di muco e fornendo un effetto di protezione immunitaria della mucosa (Verbeke et al., 2020). I dati a disposizione e gli studi sull'essere umano suggeriscono fortemente che l'aumento della produzione di SCFA potrebbe essere una strategia preziosa nella prevenzione della disfunzione gastrointestinale, dell'obesità e del diabete mellito di tipo 2 (Verbeke et al., 2020).

Nello studio di Huang et al. (2024), la concentrazione totale di SCFA è passata da $41,66 \pm 1,02$ mM del gruppo di controllo a $78,06 \pm 1,26$ mM nel gruppo fermentato con l'estratto di mirtillo. In un lavoro sulla determinazione della concentrazione degli SCFA nell'intestino umano, Hardt et al. (2012) hanno osservato una concentrazione media di $84,6 \pm 22,9$ mM di SCFA totali nelle feci di un totale di 98 volontari sani. Il dato di Hardt et al. (2012) supporta i risultati ottenuti da Huang et al. (2024), anche se il range di concentrazione degli SCFA intestinali non è ad oggi noto con esattezza, a causa dell'importante varianza data dalle differenze individuali del microbiota intestinale.

Acetato, propionato e *n*-butirrato sono acidi grassi a catena corta, sono prodotti dalla fermentazione microbica di carboidrati indigeribili e sembrano essere mediatori chiave degli effetti benefici suscitati dal microbioma intestinale (Verbeke et al., 2020). Dopo 24 ore di fermentazione, il contenuto di acetato del gruppo con l'estratto di mirtillo era 1,46 volte superiore al gruppo di controllo; allo stesso tempo, il contenuto di *n*-butirrato del gruppo con l'estratto di mirtillo era 1,66 volte superiore al gruppo di controllo (Huang et al., 2024).

Huang et al. (2024), infine, hanno voluto mettere in evidenza la relazione tra antociani del mirtillo, microbiota intestinale e SCFA. L'antociano più abbondante – come visto – era la malvidina, che altri studi (Yu e Han, 2022) hanno dimostrato avere l'effetto di aumentare l'abbondanza di ceppi batterici benefici nel microbiota intestinale (Huang et al., 2024). L'aumento di *Bacteroides* e di phylum come i Firmicutes è associato ad un aumento del livello di produzione degli SCFA, che sono connessi ad un buono stato di salute del microbiota intestinale (Huang et al., 2024). In sintesi, l'aumento di ceppi batterici – soprattutto Firmicutes – dovuto inequivocabilmente alla fermentazione con l'estratto di mirtillo, ha portato ad una sintesi maggiorata di butirrato, che è considerato l'acido grasso a catena corta più importante per il benessere del microbiota intestinale umano (Huang et al., 2024).

4.2 La supplementazione di mirtillo (Vaccinium sp.) influenza il microbiota di ratti alimentati con una dieta ricca di grassi.

de La Serre et al. (2018) hanno condotto uno studio utilizzando un modello murino a cui veniva somministrata un'integrazione a base di mirtilli. Per la prima volta essi hanno dimostrato che il mirtillo (*Vaccinium sp.*) riduce l'infiammazione, riduce la resistenza insulinica in ratti alimentati con una dieta ricca di grassi e causa concomitanti cambiamenti nella composizione del loro microbiota intestinale (de La Serre et al., 2018).

La letteratura scientifica ha già dimostrato come l'obesità sia associata ad uno stato infiammatorio sistemico di basso grado ed esistono prove scientifiche che associano l'obesità ad un'infiammazione del tratto gastrointestinale (Jaques et al., 2015). Inoltre, è stato verificato come una dieta ricca di grassi provochi nei ratti variazioni nel microbiota intestinale (Raybould et al., 2015). de La Serre et al. (2018) hanno voluto verificare l'ipotesi che il consumo di mirtillo da parte di ratti alimentati con una dieta ricca di grassi alterasse la composizione microbica e riducesse l'infiammazione e la resistenza insulinica.

24 ratti maschi sono stati divisi in tre gruppi (da 8 ratti ciascuno) e alimentati per 8 settimane con una dieta differente. Il primo gruppo (HF, high fat diet) si è nutrito con una dieta composta di grassi per il 45% delle kilocalorie totali, il secondo

gruppo (LF, low fat diet) con una dieta a basso contenuto di grassi ed il terzo gruppo (HF_BB, high fat diet with blueberries) con una dieta ad alto contenuto di grassi e con un'integrazione di polvere di mirtillo liofilizzati (Highbush Blueberry) di 10g/100g di dieta (de La Serre et al., 2018).

A differenza del gruppo di controllo (LF) o del gruppo alimentato solo con dieta ricca di grassi (HF), l'integrazione della polvere di mirtillo ha cambiato la composizione del microbiota intestinale dei ratti alimentati con dieta ricca di grassi ed integrazione di mirtillo (HF_BB), diminuendo la concentrazione di *Bacteroidetes* e Firmicutes ed aumentando la concentrazione di Proteobacteria (de La Serre et al., 2018). Gli autori hanno riscontrato una correlazione positiva tra la quantità di acetato presente e l'aumento di concentrazione di Proteobacteria (de La Serre et al., 2018).

L'integrazione della polvere di mirtillo ha portato ad un miglioramento della sensibilità insulinica nei roditori HF_BB, i quali richiedevano una quantità minore di insulina per eliminare il glucosio circolante (de La Serre et al., 2018) (**Fig. 3C**). de La Serre et al. (2018) hanno ipotizzato che il miglioramento della sensibilità insulinica potesse essere dovuto ad una diminuzione della concentrazione epatica di fosfo-IRS1, un marcatore di alterata segnalazione dell'insulina nel fegato. Nello specifico, è stato osservato un aumento nella fosforilazione di IRS1 (substrato 1 del recettore dell'insulina) nei ratti alimentati con una dieta ricca di grassi (HF), mentre nel gruppo di ratti alimentati con un'integrazione di mirtillo (HF_BB) sono stati trovati normali livelli di fosfo-IRS1 (de La Serre et al., 2018). IRS1 è un substrato che svolge un ruolo chiave nella trasmissione dei segnali legati all'insulina ed una sua alterazione può portare ad insulino-resistenza cellulare (de La Serre et al., 2018). Seguendo l'ipotesi di de La Serre et al. (2018), osservare una diminuzione della presenza di fosfo-IRS1 nei ratti HF_BB indica che l'integrazione di mirtillo ha portato ad un effetto benefico nel controllo della sensibilità insulinica.

Concentrandosi sull'infiammazione causata dalla dieta ricca di grassi, de La Serre et al. (2018) hanno notato un aumento di LPS (lipopolisaccaridi) circolanti, i quali sono noti induttori della trascrizione di citochine pro-infiammatorie. I risultati ottenuti mostravano concentrazioni di LBP sierico (ovvero un marcatore di LPS circolanti) significativamente più basse nel gruppo HF_BB, dimostrando l'effetto antiinfiammatorio dell'estratto di mirtillo nei ratti (de La Serre et al., 2018).

Infine, de La Serre et al. (2018) hanno dimostrato che l'integrazione di mirtillo porta a cambiamenti di concentrazione di acidi grassi a catena corta (SCFA) nei ratti HF_BB. I risultati mostravano un aumento di concentrazione di acetato rispetto al gruppo di controllo (LF) e ai topi alimentati con una dieta ricca di grassi (HF) ed un aumento di propionato rispetto al gruppo di controllo (LF), mentre mostravano

una diminuzione consistente di concentrazione di butirrato nei ratti HF_BB (de La Serre et al., 2018) rispetto al gruppo di controllo (LF) (**Fig. 3E**).

Gli autori hanno poi osservato che la dieta ricca di grassi riduceva la lunghezza dei villi intestinali rispetto al gruppo di controllo ma l'integrazione di mirtillo ripristinava lo stato dei villi intestinali, riportandoli ad una lunghezza simile a quella del gruppo di controllo (LF) (de La Serre et al., 2018) (**Fig. 3F**). Un risultato simile era già stato riportato in Nyman et al. (2002) dove gli autori avevano dimostrato che un'adeguata presenza di SCFA contribuisce anche all'aumento dell'altezza dei villi intestinali ed alla proliferazione delle cellule mucipare caliciformi, portandole ad uno stato tipico di un soggetto sano.

I risultati ottenuti da de La Serre et al. (2018) su ratti alimentati con una dieta ricca di grassi sono supportati anche da altri studi affini focalizzati sul dimostrare gli effetti benefici del mirtillo nella regolazione del microbiota intestinale. Holm et al. (2019) hanno dimostrato che arricchire con mirtillo (*Vaccinium myrtillus*) la dieta ad alto contenuto di grassi dei topi protegge dall'infiammazione intestinale e regola positivamente la composizione del loro microbiota intestinale (Holm et al., 2019). Marette et al. (2020) hanno eseguito un altro studio che conferma e rafforza i risultati di de La Serre et al. (2018), dimostrando come topi alimentati con una dieta ricca di grassi e ricca di zuccheri mostrano miglioramenti alla sensibilità dell'insulina quando trattati con un estratto ricco di antociani e proantocianidine. Marette et al. (2020), integrando della polvere di mirtillo interi liofilizzati (miscela di *Vaccinium ashei* e *Vaccinium corymbosum* L.) alla dieta dei ratti, hanno dimostrato una migliore omeostasi del glucosio in topi alimentati con una dieta ricca di grassi e zuccheri. Gli autori spiegano almeno parte dei risultati ottenuti sulla base del fatto che gli antociani e le proantocianidine modulano il microbiota intestinale, anche se non vengono spiegate le modalità d'azione di questi ultimi (Marette et al., 2020).

de La Serre et al. (2018) non hanno riscontrato particolari differenze di peso nei tre gruppi oggetto di studio (**Fig. 3A**) e non hanno evidenziato alcuna diminuzione della quantità di massa grassa nei ratti HF_BB rispetto al controllo (LF) e ai ratti HF (**Fig. 3B**).

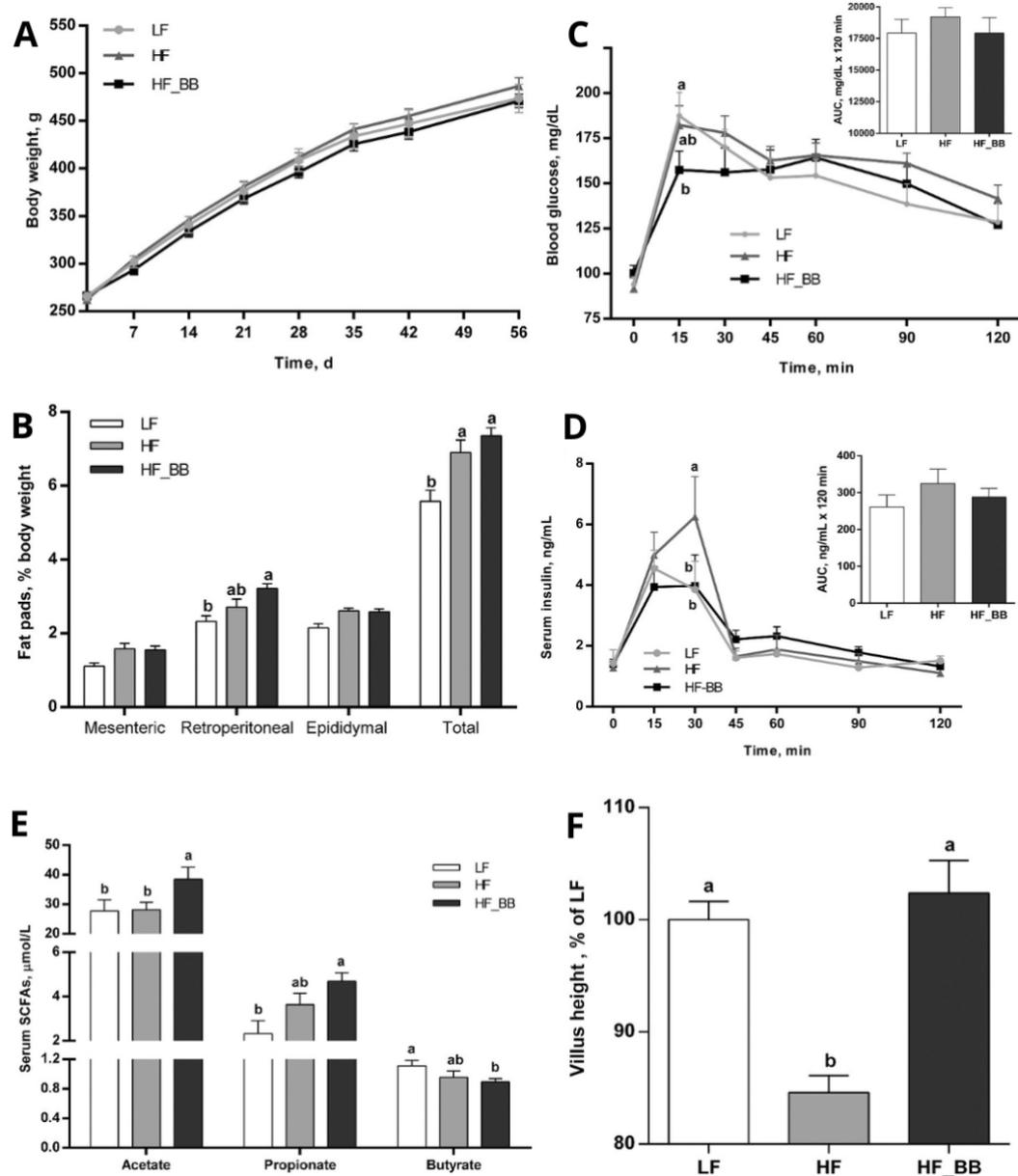


Figura 3. LF (controllo), HF (dieta ricca di grassi), HF_BB (dieta ricca di grassi integrata con estratto di mirtillo). I dati sono espressi come media \pm errore standard con un livello di significatività fissato a $p < 0,05$ (numerosità di 8 ratti per ciascun gruppo).

A) Peso corporeo dei ratti LF, HF e HF_BB.

B) Indice di massa grassa percentuale mesenterica, retroperitoneale, epididimale e totale.

C) Glicemia ematica dei ratti LF, HF e HF_BB.

D) Insulina sierica. I ratti HF_BB presentano una minor concentrazione di insulina sierica rispetto ai ratti HF, ma comunque più alta dei ratti LF.

E) Acidi grassi a catena corta (SCFA) sierici nei tre gruppi di ratti. Acetato e propionato sono più abbondanti nei ratti HF_BB, mentre butirato è meno presente rispetto a LF e HF.

F) Lunghezza dei villi intestinali. Nei ratti HF_BB la lunghezza è simile a quella dei villi dei ratti LF, mentre nei ratti HF la lunghezza dei villi è nettamente minore.

(de La Serre et al., 2018; modificato)

5. Discussione, criticità e punti di forza

Nel redigere l'elaborato, sono state consultati decine di articoli aventi come oggetto di studio il microbiota intestinale e l'influenza che gli antociani del mirtillo hanno su di esso ed è stato riscontrato che gli studi effettuati sul microbiota intestinale umano sono ancora pochi. Lo studio condotto da Huang et al. (2024) è stato pubblicato nel gennaio del 2024 sulla rivista *Food Research international* (impact factor di 8.1 nel 2022) e rappresenta uno studio potenzialmente avanguardistico, i cui risultati potranno essere confermati da altre ricerche effettuate nei prossimi anni. Sebbene supportati da altri studi affini, i risultati ottenuti da Huang et al. (2024) non possono essere considerati come assoluti. Sono numerose le ricerche che indagano l'effetto degli antociani sul microbiota di animali (in particolare ratti) e svariati studi *in vitro*, ma sono pochissimi gli studi effettuati *in vivo* su soggetti obesi. Anche lo studio di Huang et al. (2024) non può essere considerato un'indagine condotta *in vivo*, perché l'esperimento ha previsto la fermentazione *in vitro*, bypassando così la problematica della biodisponibilità degli antociani che sono assimilati ed assorbiti nel lume intestinale *in vivo*.

In secondo luogo, lo studio di Huang et al. (2024) utilizza campioni fecali di sole nove persone obese, tutte di nazionalità cinese e di un'età compresa tra i 24 e i 32 anni; perciò, i risultati ottenuti non possono essere rappresentativi di un campione statistico sufficientemente ampio. Avere un campione statistico maggiore, in termini numerici, di nazionalità e d'età, porterebbe a risultati che potrebbero essere ritenuti maggiormente generali. Analizzare il microbiota intestinale di umani obesi in età evolutiva, per esempio, amplierebbe ed eventualmente rafforzerebbe i risultati ottenuti da Huang et al. (2024), confermandoli o confutandoli.

La problematica principale già accennata in precedenza riguarda la biodisponibilità *in vivo* degli antociani del mirtillo, che è – nel migliore dei casi – del 5% (Huang et al., 2024). Huang et al. (2024) hanno ottenuto i risultati riportati tramite la fermentazione *in vitro* e non ci sono ancora studi *in vivo* che confermino i risultati ottenuti, somministrando direttamente al soggetto obeso un integratore contenente antociani derivanti da mirtilli.

Di fatto, i risultati ottenuti da Huang et al. (2024) sono positivi e spesso in accordo con la letteratura scientifica corrente riguardo alla composizione batterica del microbiota intestinale umano. Ma, per assurdo, i dati ottenuti potrebbero essere eccessivamente positivi e non mostrare il reale effetto antiobesità dell'estratto di *Vaccinium corymbosum* L., proprio perché il campione di umani obesi analizzato è ridotto a sole nove persone.

Durante l'analisi della composizione del microbiota intestinale, Huang et al. (2024) hanno riscontrato un aumento del 4,7% della concentrazione di *Lachnospiraceae_UCG_004* nei campioni trattati con l'estratto di mirtillo, in totale controtendenza con i risultati precedentemente registrati. Sebbene *Lachnospiraceae* sia un taxa di batteri ritenuto tra i principali produttori di SCFA, diversi taxa di *Lachnospiraceae* sono stati associati a malattie intestinali. Non risulta chiaro se i risultati di Huang et al. (2024) mostrino un effetto benefico dell'estratto di mirtillo sul microbiota intestinale. Ad oggi la conoscenza sul microbiota umano è limitata e non c'è certezza scientifica sul ruolo che svolgono i microorganismi simbiotici dell'intestino.

Un'ulteriore considerazione può essere fatta ragionando sullo scopo di questo elaborato. È possibile rispondere alla domanda: gli antociani del mirtillo hanno un impatto sulla regolazione del microbiota intestinale nell'obesità? Nel complesso, è possibile dire che un impatto (senza specificare se benefico o dannoso) sicuramente c'è. I risultati fin qui ottenuti portano ad ipotizzare che gli effetti degli antociani del mirtillo sono positivi e che causano, nel complesso, un miglioramento del microbiota intestinale nell'obesità.

Risulta evidente, in ogni caso, come siano fondamentali ulteriori ricerche per capire quale sia la dose di antociani da somministrare per ottenere il miglior beneficio possibile sul microbiota intestinale. Nel futuro, sarà importante comprendere quale sia la dose ottimale da somministrare al paziente obeso e, successivamente, capire se la dose ottimale vari in base al soggetto obeso, ad esempio in base allo stadio di obesità, alla presenza di altre patologie ed all'età.

Anche i risultati ottenuti da de La Serre et al. (2018) sono ben supportati dalla letteratura scientifica e ci sono numerosi altri studi affini che confermano le conclusioni ottenute. de La Serre et al. (2018) hanno dimostrato che il consumo di polvere di mirtillo da parte di ratti alimentati con una dieta ricca di grassi altera la composizione microbica, riducendo l'infiammazione e la resistenza insulinica. Sebbene promettenti e solidi, i risultati ottenuti risultano essere poco applicabili all'essere umano. I modelli murini sono utili per una comprensione della composizione del microbiota intestinale generale dei mammiferi (Raes et al., 2015). È però importante sottolineare che il ratto e l'essere umano presentano dissomiglianze (genetiche e microbiche) che rendono non sempre trasferibili le conclusioni ottenute sul modello murino all'essere umano (Raes et al., 2015). Nello specifico, solo il 4% dei geni batterici condivide una notevole identità tra il ratto e l'uomo e che l'allevamento e il background genico dei topi sperimentali hanno un forte impatto sulla composizione microbica di questi ultimi (Hugenholtz e de Vos,

2018). Pertanto, è importante prestare attenzione quando si confrontano risultati ottenuti su modelli murini con possibili effetti analoghi nell'uomo (Hugenholtz e de Vos, 2018). Insomma, sebbene i risultati di La Serre et al. (2018) dimostrino di avere effetti benefici sul ratto non è in alcun modo possibile affermare che i suddetti risultati siano altrettanto validi nell'uomo.

Un'ultima criticità generale riguarda la conoscenza dei meccanismi tramite i quali gli antociani di *Vaccinium* sp. agiscono per portare i benefici antiinfiammatori, antidiabetici, antimicrobici e di antiobesità che abbiamo visto. A tutt'oggi non si conoscono gli esatti meccanismi d'azione e non si conosce il metabolismo degli antociani nel tratto gastrointestinale. Comprendere quale sia la giusta dose di antociani da somministrare al paziente obeso, in quale momento della giornata sia più corretto assumere l'integrazione e con quale modalità farlo (in estratto liofilizzato, come mirtilli freschi, in polvere) potrebbe rappresentare il focus delle future ricerche sull'argomento.

Nel futuro prossimo sarà di grande utilità dimostrare quali sono i metodi migliori per aumentare la biodisponibilità degli antociani *in vivo* nell'uomo. Sapendo che la problematica principale riguarda la biodisponibilità degli antociani nel microbiota intestinale, negli ultimi anni sono state svolte ricerche per comprendere se ci siano metodologie di conservazione o di trattamento dei mirtilli per rendere gli antociani in essi presenti maggiormente biodisponibili.

Secondo una ricerca svolta da Huang et al. (2021), l'utilizzo di nanoparticelle, microcapsule e complessi proteici che proteggano gli antociani del mirtillo durante l'ingestione e la digestione è un sistema efficace per migliorarne la biodisponibilità mediante un rapido rilascio nel tratto intestinale. Huang et al. (2021) sostengono che – su tutti – i sistemi di nanoparticelle di antociani del mirtillo sono il miglior metodo per aumentare la biodisponibilità degli antociani nel tratto gastrointestinale. Diversi autori hanno studiato la stabilità *in vitro* di nanocomplessi caricati di antociani e preparati con chitosano, osservando che la biodisponibilità degli antociani incapsulati si alzava del 22,9% rispetto a quelli non incapsulati (Huang et al., 2021). La rilevanza dei risultati riportati da Huang et al. (2021) deve ancora essere dimostrata *in vivo*. Una delle maggiori sfide, come riportato, sarà quella di applicare i risultati della ricerca scientifica ai prodotti di largo consumo, fornendo ai consumatori finale un prodotto con comprovati effetti salutari (Huang et al., 2021).

6. Conclusione

Nell'elaborato sono stati riportate le principali proprietà note del mirtillo (*Vaccinium* sp.), tra cui quelle antidiabetica ed antiinfiammatoria, che sono risultate le più importanti nell'affrontare il tema dell'obesità. Mostrando gli ultimi risultati ottenuti sull'impatto degli antociani del mirtillo nella regolazione del microbiota intestinale, si è giunti alla conclusione che:

- *in vitro*, vi è inequivocabile evidenza che gli antociani del mirtillo influenzano il microbiota intestinale, migliorano la sensibilità insulinica e diminuiscono l'infiammazione nei soggetti obesi (umani ed animali);
- *in vivo* non ci sono risultati sufficienti che permettano di dimostrare un reale effetto benefico degli antociani del mirtillo nell'uomo ed i risultati ottenuti su modelli murini non possono essere applicati all'uomo a causa delle grandi differenze genetiche e microbiotiche presenti;
- la mancanza di conoscenza dei meccanismi d'azione degli antociani *in vivo* e del metabolismo di questi ultimi nel tratto gastrointestinale rappresenta un ostacolo che la ricerca scientifica futura dovrà cercare di risolvere;
- riuscire a risolvere la problematica legata alla biodisponibilità degli antociani nel microbiota intestinale potrebbe portare ad importanti risvolti nell'utilizzo commerciale del mirtillo come fonte di antociani aventi importanti effetti benefici sulla salute del soggetto obeso.

7. Bibliografia

- [1] Luby J.J., Ballington J.R., Draper A.D., Pliszka K. and Austin M.E. (1991). Blueberries and cranberries (*Vaccinium*). *Acta Horticulturae*; 290, pp. 393-458
- [2] Ali Rashidinejad (2020). Nutritional Composition and Antioxidant Properties of Fruits and Vegetables. *Academic Press*; Chapter 29 - Blueberries, pp. 467-482
- [3] Michalska A., Łysiak G. (2015). Bioactive Compounds of Blueberries: Post-Harvest Factors Influencing the Nutritional Value of Products. *International Journal of Molecular Sciences*; 16, pp. 18642-18663
- [4] Vrhovsek U., Masuero D., Palmieri L., Mattivi F. (2012). Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*; Volume 25, Issue 1, 2012, pp. 9-16
- [5] Ehlenfeldt M.K., Prior R.L. (2001). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49(5), pp. 2222-2227
- [6] Silva S., Costa E. M., Veiga M., Morais R.M. Calhau C. and Pintado M. (2020). Health promoting properties of blueberries: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 60(2), pp. 181–200
- [7] Skrovankova S., Sumczynski D., Mlcek J., Jurikova T., Sochor J. (2015). Bioactive Compounds and Antioxidant Activity in Different Types of Berries. *International Journal of Molecular Sciences*; 16(10), pp. 24673-24706
- [8] Giongo L., Poncetta P., Loretto P., Costa F. (2013). Texture profiling of blueberries (*Vaccinium* spp.) during fruit development, ripening and storage. *Postharvest Biology and Technology*. Volume 76, pp. 34-39
- [9] Prior R.L., Cao G., Martin A., Sofic E., McEwen J., O'Brien C., Lischner N., Ehlenfeldt M., Kalt W., Krewer G., and Mainland C.M. (1998). Biochemical Evaluation of Some Fruit Characteristics of Blueberry Progenies Obtained from 'Simultan × Duke'. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 46 (7), pp. 2686-2693
- [10] Piechowiak T., Skóra B. and Balawejder M. (2020). Ozone Treatment Induces Changes in Antioxidative Defense System in Blueberry Fruit During Storage. *Food Bioprocess Technol* 13, pp. 1240–1245
- [11] Mannozi C., Cecchini J.P., Tylewicz U., Siroli L., Patrignani F., Lanciotti R., Rocculi P., Dalla Rosa M., Romani S. (2017). Study on the efficacy of edible coatings on quality of blueberry fruits during shelf-life, *LWT - Food Science and Technology*. Volume 85, Part B, pp. 440-444
- [12] "Blueberries, raw"
<https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/171711/nutrients>
consultato il 24 aprile 2024

- [13] Chen B.H., Stephen I.B. (2019). Nanoemulsion and Nanoliposome Based Strategies for Improving Anthocyanin Stability and Bioavailability. *Nutrients*. 11(5):1052
- [14] Andersen O.M. and Jordheim M. (2006). The Anthocyanins. In: Andersen, O.M. and Markham, K.R., Eds., *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton, pp. 471-551
- [15] Shi M., Loftus H., McAinch A.J., Xiao Q. Su (2017). Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation. *Journal of Functional Foods*. Volume 30, pp. 16-29
- [16] Kalt W., Ryan D.A., Duy J.C., Prior R.L., Ehlenfeldt M.K., Vander Kloet S.P. (2001). Interspecific variation in anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity among genotypes of highbush and lowbush blueberries (*Vaccinium* section *cyanococcus* spp.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 49(10); pp.4761-4767
- [17] Seeram N. P. (2008a). Berry fruits for cancer prevention: Current status and future prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, pp. 630-635. Seeram, N.P. (2008) Berry Fruits: Compositional Elements, Biochemical Activities, and the Impact of Their Intake on Human Health, Performance, and Disease. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 56, pp. 627- 629
- [18] “Relazione al Parlamento 2021 sul diabete mellito”
<https://www.salute.gov.it/portale/stiliVita/dettaglioNotizieStiliVita.jsp?lingua=italiano&menu=notizie&p=dalministero&id=5900> sito consultato il 24 aprile 2024
- [19] Jennings A., Welch A.A., Spector T., Macgregor A., Cassidy A. (2014). Intakes of anthocyanins and flavones are associated with biomarkers of insulin resistance and inflammation in women. *The Journal of Nutrition*; 144(2), pp. 202-208
- [20] Mykkänen O.T., Huotari A., Herzig K.H., Dunlop T.W., Mykkänen H., et al. (2014). Wild Blueberries (*Vaccinium myrtillus*) Alleviate Inflammation and Hypertension Associated with Developing Obesity in Mice Fed with a High-Fat Diet. *Plos One* 9(12): e114790
- [21] Stull A.J., Cash K.C., Johnson W.D., Champagne C.M., Cefalu W.T. (2010). Bioactives in blueberries improve insulin sensitivity in obese, insulin-resistant men and women. *The Journal of Nutrition*; 140(10), pp. 1764-1768
- [22] Istek N., Gurbuz O. (2017). Investigation of the impact of blueberries on metabolic factors influencing health. *Journal of Functional Foods*. Volume 38, pp. 298-307
- [23] “Food and its uses: blueberries”. Marissa Sheldon, 26.09.2023
<https://foodmedcenter.org/food-and-its-uses-blueberries/#:~:text=History%20of%20use%20as%20medicine,cloth%2C%20and%20for%20medicinal%20purposes.> Consultato il 25 aprile 2024
- [24] Khalifa H.O., Kamimoto M., Shimamoto T., Shimamoto T. (2015). Antimicrobial Effects of Blueberry, Raspberry, and Strawberry Aqueous Extracts and their Effects on Virulence Gene Expression in *Vibrio cholerae*. *Phytotherapy Research*;29(11):1791-7

- [25] Shen X., Sun X., Xie Q., Liu H., Zhao Y., Pan Y., Hwang C., Wu V.C.H. (2014). Antimicrobial effect of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) extracts against the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis*. *Food Control*. Volume 35, Issue 1, 2014, pp. 159-165
- [26] Cassidy A., Rogers G., Peterson J.J., Dwyer J.T., Lin H., Jacques P.F. (2015). Higher dietary anthocyanin and flavonol intakes are associated with anti-inflammatory effects in a population of US adults¹. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Volume 102, Issue 1, pp. 172-181
- [27] Stull A.J. (2016). Blueberries' Impact on Insulin Resistance and Glucose Intolerance. *Antioxidants* (Basel); 5(4):44
- [28] Onuh, J.O., Dawkins, N.L. and Aluko, R.E. (2023). Cardiovascular disease protective properties of blueberry polyphenols (*Vaccinium corymbosum*): a concise review. *Food Production, Processing and Nutrition*; 5, 27
- [29] “Obesity and overweight”, 01.03.2024 <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> Sito consultato il 25 aprile 2024
- [30] Jamar G., Estadella D. and Pisani L.P. (2017). Contribution of anthocyanin-rich foods in obesity control through gut microbiota interactions. *BioFactors*, 43: pp. 507-516
- [31] Xu L., Tang Z., Herrera-Balandrano D.D., Qiu Z., Li B., Yang Y., Huang W. (2024). In vitro fermentation characteristics of blueberry anthocyanins and their impacts on gut microbiota from obese human. *Food Research International*. Volume 176, 113761
- [32] Thursby E., Juge N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*; 474(11): pp. 1823-1836
- [33] Canfora E., Jocken J. and Blaak E. (2015). Short-chain fatty acids in control of body weight and insulin sensitivity. *Nature Reviews Endocrinology*; 11, pp. 577–579
- [34] Blaak E.E., Canfora E.E., Theis S., Frost G., Groen A.K., Mithieux G., Nauta A., Scott K., Stahl B., van Harsselaar J., van Tol R., Vaughan E.E. and Verbeke K. (2020). Short chain fatty acids in human gut and metabolic health. *Beneficial Microbes*, 11(5), pp. 411-455
- [35] Vacca M., Celano G., Calabrese F.M., Portincasa P., Gobbetti M., De Angelis M. (2020). The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. *Microorganisms*. 8(4):573
- [36] Ayvaz H., Cabaroglu T., Akyildiz A., Pala C.U., Temizkan R., Ağçam E., Ayvaz Z., Durazzo A., Lucarini M., Direito R., Diaconeasa Z. (2022). Anthocyanins: Metabolic Digestion, Bioavailability, Therapeutic Effects, Current Pharmaceutical/Industrial Use, and Innovation Potential. *Antioxidants* (Basel); 12(1):48

- [37] Yang M., Koo S.I., Song W.O., Chun O.K. (2011) Food matrix affecting anthocyanin bioavailability: review. *Current Medicinal Chemistry*; 18(2), pp. 291-300
- [38] Nguyen T.L., Vieira-Silva S., Liston A., Raes J. (2015). How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Disease Models & Mechanisms*; 8(1), pp. 1-16
- [39] Hugenholtz F., de Vos W.M. (2018) Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation. *Cellular and Molecular Life Sciences*; 75(1), pp. 149-160.
- [40] Lee S., Keirse K.I., Kirkland R., Grunewald Z., Fischer J.G., de La Serre C.B. (2018). Blueberry Supplementation Influences the Gut Microbiota, Inflammation, and Insulin Resistance in High-Fat-Diet-Fed Rats¹. *The Journal of Nutrition*; Volume 148, Issue 2, pp. 209-219
- [41] Hamilton M.K., Boudry G., Lemay D.G., Raybould H.E. (2015). Changes in intestinal barrier function and gut microbiota in high-fat diet-fed rats are dynamic and region dependent. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*; 308(10), pp. G840-851
- [42] Henningsson A.M., Björck I.M., Nyman E.M. (2002). Combinations of indigestible carbohydrates affect short-chain fatty acid formation in the hindgut of rats. *The journal of Nutrition*; 132(10), pp. 3098-3104
- [43] Liu H.Y., Walden T.B., Ahl D., Nyman M., Bertilsson S., Phillipson M., Holm L. (2019). High-Fat Diet Enriched with Bilberry Modifies Colonic Mucus Dynamics and Restores Marked Alterations of Gut Microbiome in Rats. *Molecular Nutrition & Food Research*; 63(20): e1900117
- [44] Morissette A., Kropp C., Songpadith J.P., Junges Moreira R., Costa J., Mariné-Casadó R., Pilon G., Varin T.V., Dudonné S., Boutekrabb L., St-Pierre P., Levy E., Roy D., Desjardins Y., Raymond F., Houde V.P., Marette A. (2020). Blueberry proanthocyanidins and anthocyanins improve metabolic health through a gut microbiota-dependent mechanism in diet-induced obese mice. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*; 318(6), pp. E965-E980
- [45] Herrera-Balandrano D.D., Chai Z., Beta T., Feng J., Huang W. (2021). Blueberry anthocyanins: An updated review on approaches to enhancing their bioavailability. *Trends in Food Science & Technology*; Volume 118, Part B, pp. 808-821
- [46] Vuong T., Mallet JF., Ouzounova M. *et al.* (2016). Role of a polyphenol-enriched preparation on chemoprevention of mammary carcinoma through cancer stem cells and inflammatory pathways modulation. *Journal of Translational Medicine*; 14, 13
- [47] Peter Libby (2007). Inflammatory Mechanisms: the Molecular Basis of Inflammation and Disease. *Nutrition Reviews*; Volume 65, suppl_3, pp. S140–S146