

**Associazione Italiana di Scienza e
TECnologia dei Cereali**



Atti dell'11° Convegno AISTEC

**I CEREALI per un sistema
agroalimentare di qualità**

Roma, 22-24 Novembre 2017



A cura di:

R. Acquistucci, M. Blandino, M. Carcea, M.G. D'Egidio, E. Marconi, A. Marti,

M.A. Pagani, G. Panfili, G.G. Pinnavaia, R. Redaelli

Cereali pigmentati: proprietà funzionali della componente polifenolica

P. Abbasi Parizad^{1*}, J. Capraro¹, A. Scarafoni¹, F. Bonomi¹, M. Blandino², D. Giordano², A. Carpen¹, S. Iametti¹

¹DeFENS, Università degli Studi di Milano, via G. Celoria 2, 20133 Milano.

²DiSAFA, Università degli Studi di Torino, via G. Verdi 8, 10124 Torino.

*E-mail: parisa.abbasi@unimi.it

Abstract

Colored cereal grains are rich sources of anthocyanins and phenolic compounds that may be useful for preventing or lowering risks in cardiovascular disease, diabetes and cancer. Our objective here was to investigate the anti-inflammatory activities of anthocyanin-rich extracts from different varieties of blue corn and purple wheat by using a Caco-2 cell model, and to analyze their inhibitory activities against enzymes involved in glucose release. Results indicated that the debranned fraction from purple wheat had the highest content in anthocyanins amongst all grain samples. HPLC profiling indicated cyanidine and delphinidin as the predominant anthocyanins in purple wheat and in blue corn. The immune response of transfected Caco-2 cells decreased significantly in a dose-responsive manner for all grains extracts. Purple wheat and blue corn extracts also displayed significant inhibition of alpha-amylase and of alpha-glucosidase activity. These promising results pave the way to the incorporation of pigmented cereals into cereal-based foods having functional properties.

Riassunto

Numerosi studi hanno evidenziato che la componente polifenolica presente nel pericarpo di cereali pigmentati presenta attività antinfiammatoria e antidiabetica. Questo studio si è proposto di indagare gli effetti delle antocianine e dei composti fenolici presenti in differenti varietà di cereali pigmentati sull'espressione di specifici marcatori di infiammazione in sistemi cellulari modello (Caco-2), e sull'attività di enzimi pancreatici e intestinali. La quantità di antocianine è risultata massima nella frazione ottenuta dalla decorticazione di frumento viola. Il profilo polifenolico, indagato mediante RP-HPLC, indica che cianidina e delphinidina sono le principali antocianine presenti in frumento viola e in mais blu. Le antocianine isolate dai cereali considerati hanno evidenziato attività antinfiammatoria dose-dipendente e sono risultate efficaci nell'inibire l'attività di alfa-amilasi e di alfa-glucosidasi. Le proprietà bioattive dei composti fenolici presenti nei cereali pigmentati risultano molto promettenti alla luce di un loro impiego nella preparazione di alimenti funzionali.

Introduzione

I cereali pigmentati presentano un contenuto in acidi fenolici ed in flavonoidi sensibilmente più elevato rispetto ai cereali tradizionali (Liu *et al.*, 2010). Le antocianine sono composti idrosolubili appartenenti al gruppo dei flavonoidi, e sono responsabili della colorazione blu, viola o rossa delle cariossidi delle varietà pigmentate di grano e di mais. Questi composti sono presenti principalmente nelle parti esterne della cariosside. Il colore viola della cariosside è legato alla presenza di cianidina-3-O-glucoside nel pericarpo, mentre l'accumulo di delphinidina nello strato aleuronico è responsabile della colorazione blu. Alte concentrazioni di pelargonidina e di catechina conferiscono, invece, una tonalità rossa alla cariosside (Abdel-Aal *et al.*, 2006).

Numerosi studi – condotti sia *in vitro* sia *in vivo* – hanno evidenziato l'attività antiossidante dei polifenoli dei cereali e la loro efficacia nella prevenzione di diverse malattie connesse con lo stress ossidativo (Masisi *et al.*, 2016). I composti fenolici presenti nei cereali risultano anche efficaci nell'inibire l'attività di due classi di enzimi coinvolte nel catabolismo dei carboidrati, e che determinano la liberazione di zuccheri semplici, quali alfa-amilasi e alfa-glucosidasi (Yao *et al.*, 2010).

Lo stato di infiammazione è correlato a varie tipologie di malattie croniche tra cui cancro, diabete, obesità, malattie cardiovascolari e artrite. Per contrastare tale stato, in alternativa alle tradizionali terapie farmacologiche, viene spesso consigliato il consumo di alimenti ricchi in antocianine e polifenoli, per i quali è stato dimostrato un notevole effetto antinfiammatorio (Yoon e Baek, 2005). Le antocianine ed i loro metaboliti sono in grado, infatti, di modulare i segnali di specifiche proteine coinvolte nella risposta adattativa antinfiammatoria e di inibire l'attivazione del pathway di NF- κ B, una delle molecole più rilevanti tra le molte coinvolte nel processo infiammatorio (Vendrame e Klimis-Zacas, 2015).

Materiali e metodi

In questo studio sono state prese in esame l'intera cariossida di tre varietà di mais (due varietà blu (T, MF) ed una rossa (Rostrato)) e la frazione ottenuta dalla decorticazione abrasiva di due varietà di frumento (una viola, Purple Wheat; ed una blu, Skorpion).

In questo studio, le determinazioni sono state condotte su estratti alcolici dei diversi campioni (65-35 v/v, 0,01% HCl). Il contenuto totale di antocianine (TAC) è stato determinato mediante metodo spettrofotometrico (Abdel-Aal *et al.*, 2006). Il contenuto totale di polifenoli (TPC) è stato misurato mediante il metodo Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Le proprietà antiossidanti sono state studiate mediante il saggio FRAP (Benzie e Strain, 1996). Il profilo polifenolico è stato indagato mediante HPLC (Hosseinian *et al.*, 2008). L'inibizione enzimatica di alfa-amilasi e di alfa-glucosidasi è stata misurata secondo Lavelli *et al.* (2016). Dopo rimozione dell'etanolo, l'attività immunomodulatoria dei composti fenolici negli estratti è stata valutata su cellule Caco-2 transfettate con il plasmide pNifty2-Luc, che co-esprime attività luciferasica se stimolato con interleuchina 1 β (Taverniti *et al.*, 2014).

Risultati e discussione

Caratterizzazione chimica dei composti fenolici

Il contenuto totale di antocianine (TAC) degli estratti alcolici è risultato significativamente differente tra i diversi campioni ($P < 0,001$) (Tab. 1). Il contenuto più elevato di antocianine, misurate come equivalenti di cianidina-3-O-glucoside, è stato rilevato nel caso del frumento viola (0,69 mg/g) e della varietà T di mais blu (0,66 mg/g).

Tabella 1. Caratterizzazione chimica dei cereali pigmentati.

	Frumento viola (Purple Wheat)	Frumento blu (Skorpion)	Mais blu (T)	Mais blu (MF)	Mais rosso (Rostrato)
TAC (mg Cyn-3-Glc/g)	0,69 \pm 0,02	0,17 \pm 0,01	0,66 \pm 0,06	0,53 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01
TPC (mg GAE/g)	73,6 \pm 0,4	33,0 \pm 0,2	30,9 \pm 0,7	33,7 \pm 0,5	63,7 \pm 0,8
FRAP (μ molFe(II)/g)	47,5 \pm 10,3	17,9 \pm 1,7	22,1 \pm 2,8	18,9 \pm 1,8	47,2 \pm 3,3

Gli estratti alcolici in esame hanno presentato un contenuto di polifenoli totali (TPC) compreso fra 30,9-73,6 mg di acido gallico per grammo di sfarinato. Come mostrato in Tabella 1, i valori più elevati di questo indice sono stati registrati per il frumento viola e il mais rosso (Rostrato), che presentano altresì la maggiore capacità antiossidante, misurata come capacità riducente nei confronti degli ioni ferro (FRAP). Il profilo polifenolico di questi campioni, indagato mediante HPLC, ha mostrato contenuti di rutina ed epicatechina sensibilmente più elevati rispetto alle altre varietà. Le indagini cromatografiche hanno inoltre evidenziato che la varietà MF di mais blu ha il contenuto più elevato di cloruro di cianidina, cloruro di delphinidina e di cianidina-3-O-glucoside fra tutti i campioni considerati. Il cloruro di cianidina costituisce oltre il 90% delle antocianine del frumento viola, e solo il 59% per il frumento blu. Il contenuto maggiore di quercetina è stato rilevato in frumento viola, mentre il frumento blu mostra le quantità più elevate di catechina. L'acido ferulico è presente in tutte le varietà, con il contenuto maggiore nella varietà MF di mais blu (115 µg/g) (dati non mostrati).

Valutazione delle proprietà bioattive dei cereali pigmentati

I composti fenolici e le antocianine presenti nei cereali pigmentati mostrano interessanti proprietà bioattive. Tra queste bisogna sottolineare sia la capacità di inibire l'attività di enzimi connessi al catabolismo dei carboidrati (Yao *et al.*, 2010), sia l'attività immunomodulatoria ed antinfiammatoria (Yoon e Baek, 2005).

In questo studio, l'inibizione dell'attività dell'alfa-glucosidasi da parte dei composti fenolici è stata confermata per tutte le varietà in esame. Come mostrato in Tabella 2, gli estratti ottenuti da mais rosso (Rostrato) presentano una capacità inibitoria nei confronti di alfa-glucosidasi molto elevata, ed addirittura maggiore rispetto all'inibitore di riferimento (acarbiosio, dati non mostrati). Per quanto riguarda le prove effettuate con l'enzima alfa-amilasi, l'estratto di frumento blu è risultato il più efficace nell'inibire l'attività enzimatica, sebbene nessuno dei campioni mostri proprietà inibitorie superiori all'acarbiosio, a parità di concentrazione.

Tabella 2. Proprietà bioattive dei cereali pigmentati.

	Frumento viola (Purple Wheat)	Frumento blu (Skorpion)	Mais blu (T)	Mais blu (MF)	Mais rosso (Rostrato)
Inibizione α -glucosidasi	+	+	+	+	+++
Inibizione α -amilasi	+++	+	+	+++	+++
Attività anti-infiammatoria	+++	+++	+++	++	+++

Le proprietà antinfiammatorie dei composti fenolici sono state indagate misurando la quantità di NF- κ B prodotto in seguito a stimolazione con interleuchina 1 β (IL-1 β) da cellule Caco-2 modificate, messe a contatto con diverse concentrazioni dei composti fenolici estratti dai cereali pigmentati in esame. Quando tali cellule vengono incubate con sostanze ad attività antinfiammatoria, la stimolazione con IL-1 β determina una minore produzione di NF- κ B, noto marcatore di infiammazione. Come mostrato in Tabella 2, tutti i campioni sono in grado di ridurre in modo efficace la risposta infiammatoria delle cellule modello secondo una modalità dose-dipendente. In particolare, alle concentrazioni più basse di composti fenolici si rilevano differenze fra i vari campioni in termini di attività antinfiammatoria, ma, aumentando la concentrazione di composti bioattivi, l'effetto delle diverse varietà sull'espressione di NF- κ B diventa paragonabile. A tale proposito, si può ipotizzare che i composti bioattivi presenti nelle varietà di cereali in esame (cianidina, acido ferulico, rutina) esercitino un effetto

sinergico, e che le proprietà antinfiammatorie dei cereali pigmentati non siano unicamente attribuibili alle antocianine, ma richiedano la compresenza di componenti fenoliche.

Conclusioni

L'approccio multidisciplinare applicato in questo progetto ha consentito di riconoscere ed individuare le antocianine e i composti fenolici presenti in diverse varietà di cereali pigmentati, e di descriverne altresì gli interessanti effetti fisiologici e funzionali. Oltre all'attività antiossidante, sono state evidenziate la capacità di inibire enzimi coinvolti nel metabolismo dei carboidrati e l'abilità di modulare i segnali di specifiche proteine coinvolte nel processo infiammatorio.

I risultati ottenuti in questo studio risultano molto promettenti alla luce di un impiego dei cereali pigmentati nella preparazione di alimenti ricchi in composti bioattivi. Lo sviluppo di alimenti funzionali preparati con cereali pigmentati necessita, tuttavia, di ulteriori approfondimenti per indagare *in vivo* la biodisponibilità dei composti bioattivi e i loro effetti sul consumatore, con particolare attenzione alla modulazione del microbiota intestinale.

Bibliografia

- Abdel-Aal E.S.M., Young J.C., Rabalski I. 2006. Anthocyanin composition in black, blue, pink, purple, and red cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 4696-4704.
- Benzie I.F., Strain J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239: 70-76.
- Hosseini F., Li W., Beta T. 2008. Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat. *Food Chemistry*, 109: 916-924.
- Lavelli V., Sri Harsha P.S., Ferranti P., Scarafoni A., Iametti S. 2016. Grape skin phenolics as inhibitors of mammalian α -glucosidase and α -amylase – effect of food matrix and processing on efficacy. *Food & Function*, 7: 1655-1663.
- Liu Q., Qiu Y., Beta T. 2010. Comparison of antioxidant activities of different colored wheat grains and analysis of phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 9235-9241.
- Masisi K., Beta T., Moghadasian M.H. 2016. Antioxidant properties of diverse cereal grains: A review on *in vitro* and *in vivo* studies. *Food Chemistry*, 196: 90-97.
- Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventós R.M. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299: 152-178.
- Taverniti V., Fracassetti D., Del Bo' C., Lanti C., Minuzzo M., Klimis-Zacas D., Riso P., Guglielmetti S. 2014. Immunomodulatory effect of a wild blueberry anthocyanin-rich extract in human Caco-2 intestinal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62: 8346-8351.
- Vendrame S., Klimis-Zacas D. 2015. Anti-inflammatory effect of anthocyanins via modulation of nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase signalling cascades. *Nutrition Reviews*, 73: 348-358.
- Yao Y., Sang W., Zhou M., Ren G. 2010. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activity of colored grains in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 770-774.
- Yoon J.H., Baek S.J. 2005. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. *Yonsei Medical Journal*, 46: 585-596.