

S. TULIPANI<sup>1</sup>, S. ROMANDINI<sup>1</sup>,  
J. ALVAREZ SUAREZ<sup>2</sup>,  
F. BUSCO<sup>3</sup>, B. MEZZETTI<sup>4</sup>,  
M. BATTINO<sup>1</sup>

## Effetto del consumo di fragole sullo status antiossidante di soggetti sani

PROGRESS IN NUTRITION  
VOL. 11, N. 3, 178-182, 2009

### TITLE

Strawberry consumption and antioxidant status in healthy human subjects

### KEY WORDS

Strawberry, human study, plasma antioxidant capacity, vitamin C, folate, erythrocyte membrane resistance

### PAROLE CHIAVE

Fragola, studio umano, capacità antiossidante, vitamina C, folati, resistenza di membrana eritrocitaria

<sup>1</sup>Istituto di Biochimica, Facoltà di Medicina

<sup>2</sup>Dipartimento di Agricoltura, Centro Universitario di Sancti Spiritus, Cuba

<sup>3</sup>Laboratorio Analisi, Ospedale Regionale Torrette-Umberto I, Ancona

<sup>4</sup>SAPROV, Facoltà di Agraria, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italia

Indirizzo per corrispondenza:

Dr. Maurizio Battino

Istituto di Biochimica, Facoltà di Medicina

Università Politecnica delle Marche

E-mail: m.a.battino@univpm.it

### Summary

A growing body of epidemiological studies suggests a consistent association between the consumption of diets rich in fruits and vegetables and a lower incidence of several chronic diseases. Strawberry (*Fragaria x ananassa*, Duch.) is among the most popularly consumed berries, both in fresh and processed forms, and its nutritional value has been exhaustively proved<sup>1</sup> and correlated to the high content of micronutrients (vitamin C, folate) and the relevant concentration and variety of phenolic constituents. For these reasons, the impact of strawberry consumption on human health is currently receiving ample attention. However, the majority of the scientific research is still focused to obtain *in vitro* instead of *in vivo* evidence of the potential bioactivities of strawberry. In our work, to the phytochemical and nutritional characterization of strawberry fruits<sup>2</sup> we combined the evaluation of the effects of strawberry consumption on human subjects, by evaluating both plasma and cellular markers of antioxidant status. Sequential feeding studies were carried out, inviting volunteers to an acute and prolonged consumption of relevant amount of strawberries. The potential changes in the plasma TAC, in the concentrations of the main hydrophilic and lipophilic serum antioxidants, and in blood cells resistance to induced oxidative stress were measured. The preliminary results obtained in this work suggest that further investigations on the impact of strawberry on human health and disease are required, and future specific dietary studies in human subjects are strongly hoped.

### Riassunto

Numerosi studi epidemiologici confermano la correlazione tra un alto consumo di frutta e verdura e una ridotta incidenza di numerose patologie croniche. Negli ultimi anni è emerso il crescente interesse sui potenziali effetti benefici legati al consumo di fragola (*Fragaria x ananassa*, Duch.), che insieme ad altri piccoli frutti a bacca rossa possiede un alto contenuto di sostanze ad azione antiossidante, sia micronutrienti che composti fitochimici. Nel nostro studio abbiamo valutato l'effetto di un consumo acuto e prolungato di fragole sui principali biomarcatori dello status antiossidante, in soggetti sani. Nel corso della sperimentazione,

sono stati valutati gli eventuali cambiamenti nella capacità antiossidante totale plasmatica, nei livelli serici dei principali antiossidanti idrofili e lipofili, e nella resistenza della membrana eritrocitaria a uno stimolo ossidativo di diversa intensità, indotto *ex vivo*. I risultati preliminari ottenuti con questo lavoro suggeriscono la necessità di ulteriori approfondimenti sul possibile impatto del consumo di fragole sulla salute umana. Studi *in vivo* focalizzati su soggetti iperuremici e con carenze accertate di folato sono inoltre fortemente auspicati.

## Introduzione

Un crescente numero di studi epidemiologici suggerisce una forte correlazione tra il consumo di diete ricche in frutta e verdura e una ridotta incidenza di numerose patologie croniche. Gli effetti benefici di tali alimenti sembrano spaziare dall'attività antiossidante a quella antiproliferativa, antinfiammatoria e antidegenerativa

La fragola (*Fragaria x ananassa*, Duch.) è il piccolo frutto a bacca rossa (*berry*) di maggior consumo sia come frutto fresco che processato, e il suo valore nutrizionale, ormai ampiamente riconosciuto (1), è stato correlato all'alto contenuto di micronutrienti (vitamina C e folati) e alla notevole ricchezza e varietà di composti fenolici. L'impatto del consumo di fragole sulla salute umana sta pertanto ricevendo un'attenzione crescente. Tuttavia, buona parte della ricerca scientifica impegnata nello studio delle potenzialità biologiche dei

composti contenuti nel frutto resta tuttora concentrata ad ottenere evidenze *in vitro* piuttosto che *in vivo*.

Nel presente studio, parallelamente alla caratterizzazione fitochimica e nutrizionale di fragole di genotipi selezionati (2), abbiamo valutato gli effetti di un consumo acuto e prolungato dei frutti in soggetti umani sani, valutando alcuni dei principali parametri indicatori dello status antiossidante, sia plasmatico che cellulare.

## Disegno sperimentale

Nel maggio 2006, cinque varietà commerciali di fragola (Alba, Irma, Patty, Adria, Sveva) e una selezione avanzata (AN99.78.51) sono state scelte sulla base dei valori di capacità antiossidante totale (TAC) e contenuto di fenoli (TPC) ottenuti nei due anni precedenti allo studio (3), e utilizzate per un test di consumo acuto da

parte di 8 individui volontari sani. Tutti i frutti provenivano da piante coltivate presso il campo sperimentale di miglioramento varietale dell'Azienda Agraria Didattico Sperimentale "P. Rosati", dell'Università Politecnica delle Marche. Nel corso di tre sessioni corrispondenti alle epoche di maturazione dei genotipi in studio (precoce: Alba, AN99.78.51; intermedia: Irma, Patty; tardiva: Adria, Sveva), un kg di frutti maturi appena raccolti è stato consegnato a ciascun gruppo di soggetti, e consumato nell'arco di dieci minuti di mattina a stomaco vuoto. I soggetti sono stati sottoposti a prelievo di sangue venoso prima del consumo di fragole (tempo base) e a una, due e tre ore dal consumo (tempo 1-3), astenendosi dall'assunzione di qualsiasi cibo per tutta la durata del test. Sui campioni di plasma eparinato è stata valutata la variazione di capacità antiossidante totale (TAC) plasmatica, misurata mediante i saggi FRAP (*Ferric*

*Reducing Antioxidant Power*, secondo Cao e Prior, 1998) (4) e TEAC (*Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*), abbinato ad un sistema di iniezione a flusso secondo quanto descritto da Bompadre et al, 2004 (5). Sui campioni di siero è stato poi determinato il contenuto di acido ascorbico e acido urico, mediante analisi in RP-HPLC e rilevazione con detector elettrochimico.

La varietà commerciale Sveva è stata confermata nei due anni successivi (cicli produttivi 2007-2008), come oggetto di studi sugli effetti di un consumo prolungato di fragole. Nel maggio 2007, 12 volontari sani non fumatori sono stati invitati a consumare 500 g di fragole al giorno (valore medio sottoposto a lievi variazioni sulla base del peso corporeo dei singoli individui) per 16 giorni, preferibilmente lontano dai pasti principali. Durante il test i soggetti sono stati invitati a mantenere le loro consuete abitudini alimentari e ad aggiornare quotidianamente un diario alimentare precedentemente distribuito. Prelievi di sangue venoso sono stati effettuati di mattina a digiuno, in corrispondenza di due momenti prima dell'inizio del test (tempi base A e B), ogni 4 giorni dall'inizio del test (tempi 1-4) e a un mese dalla fine della sperimentazione ("washout"). Oltre alle analisi svolte su plasma e siero come nel precedente test acuto

(vedi sopra), sul siero dei soggetti è stato valutato il contenuto dei principali antiossidanti lipofili (vitamina E e coenzima Q10 in forma ossidata e ridotta), mediante analisi in RP-HPLC e rilevazione mediante detector elettrochimico.

Entro due ore da ogni prelievo di sangue, gli eritrociti di ciascun individuo sono stati poi isolati, lavati e incubati in tampone fosfato (PBS, pH 7.4) (controllo) e parallelamente in una soluzione 12.5 mM dell'azo-composto 2,2'-Azobis-(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), in agitazione e a 37°C. La percentuale di emolisi, le concentrazioni di ossiemoglobina (oxyHb), deossiemoglobina (deoxyHb) e metemoglobina (metHb), e la percentuale di metHb sul totale sono state calcolate dopo una, tre e cinque ore di incubazione.

Infine, nel maggio 2008, 18 volontari sani sono stati coinvolti in un test dal disegno sperimentale simile, ma con un solo prelievo di sangue prima del test (tempo base) e un prelievo dopo 14 giorni di consumo di fragole (tempo finale). Alle valutazioni dell'anno precedente, seppur con lievi modificazioni, si sono aggiunti ulteriori approfondimenti, tra cui la valutazione del grado di perossidazione lipidica delle membrane eritrocitarie (ghost) a seguito di incubazione per tre ore in PBS (controllo) e in una soluzione 400 mM di

AAPH, in agitazione e a 37°C. Il contenuto di idroperossidi lipidici (HP) è stato valutato mediante saggio FOX (*Ferrous Oxidation Xilenol Orange assay*), modificato secondo quanto descritto da Jiang et al., 1992 (6).

La valutazione statistica dei dati è stata effettuata mediante analisi della varianza con test ANOVA (Statistica, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Valori di  $p < 0.05$  sono stati considerati indicativi di significatività statistica.

## Risultati e discussione

I principali obiettivi dei nostri studi includevano la valutazione del potenziale impatto del consumo di fragole sullo status antiossidante di soggetti sani, sia a livello plasmatico che di cellule eritrocitarie. Tra gli antiossidanti plasmatici idrofili, abbiamo focalizzato l'attenzione sui livelli di vitamina C, al fine di verificare quanto l'assunzione di frutti tanto ricchi di acido ascorbico potesse effettivamente influenzare i livelli serici della vitamina. La determinazione dei livelli di acido urico è stata considerata un dato altrettanto informativo, sia per il rilevante contributo del metabolita alla TAC plasmatica, sia per l'attuale scarsità d'informazioni sui possibili effetti iperuremici o ipoureemici di un regolare consumo di fragole.

**Tabella 1** - Capacità antiossidante plasmatica totale (misurata mediante saggi FRAP e TEAC), e livelli serici di acido ascorbico (vitamina C), acido urico, vitamina E, ubiquinolo e ubiquinone (coenzima Q10 in forma ridotta e ossidata) in soggetti sani durante studi di consumo acuto e prolungato di fragole (Valori medi  $\pm$  SEM)

Parametri	Tempo base	Consumo acuto					Consumo prolungato				
		Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo base A	Tempo base B	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo di "washout"
FRAP $\mu$ mol TE/L	34.8 $\pm$ 3	40.0 $\pm$ 2*	42.9 $\pm$ 3*	42.0 $\pm$ 3*	44.4 $\pm$ 2	44.7 $\pm$ 3	48.0 $\pm$ 2*	48.2 $\pm$ 2*	48.0 $\pm$ 3*	49.6 $\pm$ 3*	50.6 $\pm$ 3*
TEAC mmoli TE/L	3.2 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1	5.3 $\pm$ 0.2	5.2 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.2	5.4 $\pm$ 0.2	5.3 $\pm$ 0.2	5.6 $\pm$ 0.1
Acido ascorbico $\mu$ M	28.8 $\pm$ 1	49.5 $\pm$ 1*	55.9 $\pm$ 2*	55.8 $\pm$ 2*	62.3 $\pm$ 3	65.1 $\pm$ 4	75.4 $\pm$ 4*	77.1 $\pm$ 5*	79.3 $\pm$ 4*	82.7 $\pm$ 5*	65.8 $\pm$ 5
Acido urico $\mu$ M	124.4 $\pm$ 13	124.5 $\pm$ 13	124.9 $\pm$ 14	124.6 $\pm$ 14	230.8 $\pm$ 15	228.6 $\pm$ 19	229.4 $\pm$ 16	226.0 $\pm$ 12	230.5 $\pm$ 16	233.1 $\pm$ 14	243.3 $\pm$ 12
Vitamina E mg/ml	-	-	-	-	17.4 $\pm$ 1.3	9.1 $\pm$ 1.1	-	20.5 $\pm$ 1.2	18.8 $\pm$ 1.7	18.8 $\pm$ 1.8	18.6 $\pm$ 1.6
Ubichinolo mg/ml	-	-	-	-	1.2 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.5	-	1.5 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.4
Ubichinone mg/ml	-	-	-	-	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	-	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0

\* Significativamente differenti dai valori osservati nei tempi base,  $P < 0.05$

Un aumento medio significativo della capacità antiossidante totale (TAC) plasmatica ( $p < 0.01$ ), misurato mediante saggio FRAP, e un altrettanto significativo aumento medio dei livelli serici di vitamina C, sono stati osservati sia immediatamente dopo consumo acuto di fragole, che nel corso dell'assunzione prolungata dei frutti (Tab. 1). Nel corso del test acuto, l'aumento più alto è stato registrato in corrispondenza dell'assunzione di fragole della varietà Sveva, seguita dalla varietà Adria e dalla selezione AN99.78.51 (dati non mostrati). Il dato correla con il più alto potere antiossidante dei frutti di Sveva rispetto agli altri cloni in studio (2), e ha inciso sulla

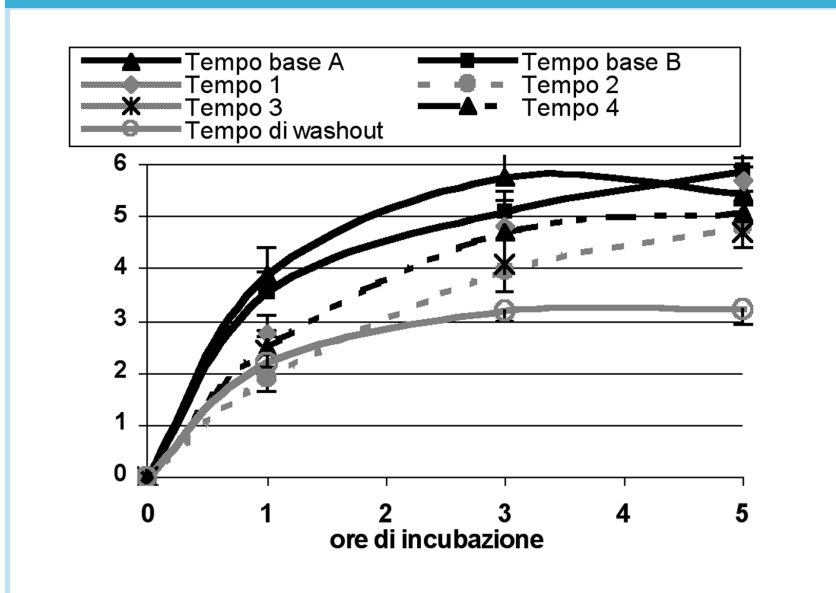
scelta di tale varietà confermata anche negli studi successivi. Nessuna variazione media significativa è stata rilevata nei livelli serici di acido urico (Tab. 1). Ciò testimonierebbe come l'aumento del potere antiossidante plasmatico possa essere in larga parte collegato all'assorbimento di antiossidanti alimentari piuttosto che ad una iperproduzione di tale metabolita endogeno (7). Tuttavia, la forte variabilità inter-individuale in risposta al consumo di fragole, unita agli effetti ipoureimici recentemente documentati per altri frutti del gruppo dei *berries* (8), suggeriscono la necessità di ulteriori approfondimenti. Tra gli antiossidanti lipofili misurati, i livelli serici di

vitamina E non sembrano essere influenzati dal consumo di fragole (Tab. 1), mentre l'osservazione di una curiosa variazione nel rapporto coenzima Q10 Ox/Red in favore della forma ridotta, richiederà futuri approfondimenti e successive conferme dell'andamento osservato.

Recenti lavori hanno ipotizzato che i polifenoli alimentari possano svolgere un'azione di potenziamento delle resistenze della membrana eritrocitaria ad uno stress ossidativo indotto, e hanno suggerito il doppio strato lipidico della membrana eritrocitaria come una delle possibili localizzazioni preferenziali di tali composti fitochimici (9), una volta assorbiti e meta-

bolizzati. Il nostro interesse a valutare la resistenza della membrana eritrocitaria ad uno stress ossidativo indotto, e di conseguenza la scelta dell'uso dell'AAPH come agente ossidante, deriva dal desiderio di rimanere in linea con gli studi precedenti e avvalorarli con valutazioni *in vivo*. Da questo lavoro è emerso che la resistenza della membrana eritrocitaria all'emolisi, sia spontanea che indotta da AAPH, sembra effettivamente migliorare nel periodo di consumo di fragole e fino a un mese dopo la fine del test. Nessuna variazione statisticamente significativa è stata invece osservata sui livelli di idroperossidi generati da "ghost" eritrocitari incubati in presenza dello stesso agente ossidante. Nel loro complesso, i risultati suggeriscono un possibile effetto protettivo degli antiossidanti contenuti nella fragole e prontamente assorbiti dall'organismo, ma i meccanismi biochimici che conducono a tale miglioramento restano da chiarire. Il lavoro qui presentato è senz'altro uno studio preliminare, ma i risultati fanno auspicare e suggeriscono futuri approfondimenti. Ad esempio, dato l'alto contenuto di folati nelle fragole confermato di recente da un nostro lavoro (2), uno degli obiettivi che ci riproponiamo in un prossimo futuro consiste nel verificare se un consumo regolare di fragole può portare a un aumento delle riserve circolanti

**Figura 1** - Emolisi spontanea (%) di eritrociti umani durante uno studio sul consumo prolungato di fragole (vedi testo). I risultati sono espressi come valori medi  $\pm$  SEM (n=12)



di folati e ad una riduzione delle concentrazioni plasmatiche di omocisteina, soprattutto in soggetti con livelli basali elevati.

### Bibliografia

1. Hannum SM. Potential impact of strawberries on human health: a review of the science. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 2004; 44 (1): 1-17.
2. Tulipani S, Mezzetti B, Capocasa F, et al. Antioxidants, phenolic compounds and nutritional quality in different strawberry genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* published on web 01/03/2008
3. Scalzo J, Politi A, Pellegrini N, Mezzetti B, Battino M. Plant genotype affects total antioxidant capacity and phenolic contents in fruit. *Nutrition* 2005; 21: 207-13.
4. Cao G, Prior RL. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human se-

rum. *Clinical Chemistry* 1998; 44 (6): 1309-15.

5. Bompadre S, Leone L, Politi A, Battino M. Improved FIA-ABTS Method for antioxidant capacity determination in different biological samples. *Free Rad Res* 2004, 0: 1-8.
6. Jiang Z-Y, et al. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. *Anal Biochem* 1992; 202: 384-9.
7. Lotito SB, Frei B. The increase in human plasma antioxidant capacity after apple consumption is due to the metabolic effect of fructose on urate, not apple-derived antioxidant flavonoids. *Free Rad Biol Med* 2004; 37 (2): 251-8.
8. Jacob RA, Spinuzzi GM, Simon VA, et al. Consumption of cherries lowers plasma urate in healthy women. *Human Nutrition and Metabolism Research Communication* 2003; 133: 1826-9.
8. Cesquini, M, Torsoni MA, Stoppa GR, Ogo SH. t-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomed & Pharmacother* 2003; 57: 124-9.