

S. TULIPANI¹, B. MEZZETTI²,
F. CAPOCASA², S. BOMPADRE³,
M. BATTINO¹

Antiossidanti nella fragola: dal genotipo alla composizione del frutto

PROGRESS IN NUTRITION
VOL. 10, N. 4, 224-229, 2008

TITLE

Antioxidants in strawberry:
from the genotype to the fruit
composition

KEY WORDS

Strawberry, nutritional quality,
antioxidant capacity, phytochemical
profiling, plasma antioxidants

PAROLE CHIAVE

Fragola, qualità nutrizionale,
capacità antiossidante, profilo
fitochimico, antiossidanti
plasmatici

¹Istituto di Biochimica,

²Dipartimento di Scienze
Ambientali e Produzioni Vegetali
(SAPROV), Facoltà di Agraria,

³Istituto di Microbiologia e Scienze
Biomediche, Facoltà di Medicina
Università Politecnica delle Marche,
Ancona

Indirizzo per la corrispondenza:

Dott. Maurizio Battino
Istituto di Biochimica
Facoltà di Medicina
Università Politecnica delle Marche
60100 Ancona - Italia
Tel: +39 071 2204646
Fax: +39 071 2204398
E-mail: m.a.battino@univpm.it

Summary

Strawberry fruit contains high levels of micronutrients and phytochemical compounds, which are important for both the organoleptic-sensorial quality and the nutritional attributes of the fruit. The first goal of the present work was to better characterize the phytochemical and the antioxidant profiles of the fruits of nine different genotypes of strawberry, in order to measure the effects of genotype on the nutritional quality of the fruits. Together with the assessment of the folate and vitamin C contents, we measured the Total Antioxidant Capacity (TAC) of the extracts; in addition, the individual contribution of the main antioxidant compounds was assessed by HPLC separation coupled to an on-line postcolumn antioxidant detection system. The second goal of our study was the assessment of the effects on plasma antioxidant capacity and serum ascorbate and urate levels in human healthy volunteers after consumption of strawberry fruits. Results: This study showed the important role played by genetic background on the chemical and antioxidant profile of strawberry fruits. Furthermore, the plasma TAC of the human volunteers showed a significant increase after the consumption of strawberries, as measured by the FRAP assay. In keeping with previous findings, the significant increase in the ascorbate concentration in serum seems to strongly contribute to the plasma TAC variation, whereas the serum uric acid levels maintained surprisingly unmodified.

Riassunto

Le fragole contengono elevati livelli di micronutrienti e composti fitochimici, essenziali tanto per la qualità organolettico-sensoriale quanto per gli attributi nutrizionali dei frutti. Il primo obiettivo del nostro studio è stato quello di caratterizzare il profilo fitochimico e antiossidante dei frutti provenienti da nove genotipi di fragola, al fine di valutare gli effetti del genotipo sui principali attributi nutrizionali dei frutti. Oltre alla valutazione del contenuto di folati e di vitamina C, è stata misurata la capacità antiossidante totale degli estratti (TAC); inoltre, dei singoli antiossidanti di maggior rilievo è stato determinato il contributo individuale percentuale alla TAC dei frutti, mediante separazione in HPLC seguita da un sistema post-colonna di analisi antiossidante. Il secondo obiettivo delle indagini è

stato quello di valutare l'effetto del consumo di fragole provenienti da cultivar differenti, sulla capacità antiossidante plasmatica e sui livelli serici di acido ascorbico e acido urico di individui volontari sani. Lo studio ha mostrato l'importante ruolo giocato dal patrimonio genetico sul profilo fitochimico e antiossidante dei singoli cloni di fragola. La capacità antiossidante plasmatica degli individui volontari ha inoltre mostrato un aumento significativo mediante il saggio FRAP, a cui potrebbe contribuire il netto aumento dei livelli di vitamina C serica, ma non di acido urico.

Introduzione

Da tempo è ormai riconosciuto l'importante ruolo della dieta sia nell'accelerare che nel prevenire lo sviluppo di patologie, e numerosi studi epidemiologici confermano l'esistenza di una relazione inversa tra il consumo abbondante e regolare di frutta e verdura e l'incidenza di molte patologie croniche, quali malattie cardiovascolari, proliferative e degenerative.

Tra i piccoli frutti a bacca rossa (berries), la fragola (*Fragaria x ananassa*, Duch.) rappresenta la specie di maggior consumo, ed è considerata un'ottima fonte alimentare di fibre, micronutrienti e composti fitochimici. Rispetto ad altri frutti di interesse commerciale per la produzione frutticola nazionale, la fragola risulta estremamente ricca di vitamina C, e rappresenta una delle fonti alimentari naturali più ricche di folati. La fragola costituisce inoltre una buona fonte di composti fitochimici, tra cui un posto di rilievo è rivestito dai composti fenolici, metaboliti secondari che contribuiscono sia agli attributi organolettico-sensoriali del frutto, sia al

suo valore nutrizionale. I principali fenoli nella fragola sono rappresentati dai flavonoidi (1-3) (antocianine, flavonoli, flavanoli e proantocianidine), acidi fenolici (4) (in particolare idrossicinnamati) e derivati dell'acido ellagico (5). Molti dei composti suddetti esprimono, almeno in vitro, notevoli proprietà antiossidanti, tant'è che, dato il ben noto coinvolgimento di un'eccessiva produzione di radicali liberi nell'eziologia delle principali patologie croniche, alcuni dei benefici effetti del consumo dei berries sono stati in passato attribuiti alle proprietà antiossidanti delle sostanze in essi contenute.

A tutt'oggi, i meccanismi attraverso cui i composti fitochimici rinvenuti nella fragola esercitano i loro effetti benefici per la salute umana sono ancora per molti versi oscuri.

Ad ogni modo, i frutti di fragola rivelano una capacità antiossidante complessiva (TAC, Total Antioxidant Capacity) nettamente superiore rispetto alla maggioranza di frutti di comune consumo (es. mela, pesca, pera, uva, arancia e kiwi) (6), e la valutazione in vitro del potere antiossi-

dante degli estratti dei frutti resta un parametro utile e immediato nella valutazione della qualità nutrizionale di diversi genotipi di fragola.

Svariati fattori pre e post-raccolta sembrano incidere sulla composizione fitochimica e la qualità nutrizionale della fragola; in particolare, un crescente numero di studi testimonia che i fattori genetici possono giocare un forte ruolo sull'accumulo dei metaboliti nella fragola (7). Pertanto, l'attuale tendenza della ricerca agronomica è quella di dare un grande rilievo alla valutazione dell'effetto del genotipo sulla qualità nutrizionale del frutto, in modo da orientare in modo razionale e consapevole i programmi di incrocio per il miglioramento varietale della fragola.

Scopi dello studio e materiali e metodi

Il primo obiettivo del nostro studio è stata la valutazione dell'effetto del patrimonio genetico sul profilo fitochimico e antiossidante dei frutti di nove distinti genotipi di fragola

(cinque varietà e quattro selezioni), tutti coltivati presso il campo sperimentale per il miglioramento genetico e la valutazione varietale, realizzato presso l'Azienda Agraria Didattico Sperimentale dell'Università Politecnica delle Marche. Tra i parametri analizzati nello studio si annoverano il contenuto di micronutrienti, quali i folati (quantificati mediante saggio microbiologico) (8), e la vitamina C, determinata mediante RP-HPLC e rivelazione con DAD (9). La capacità antiossidante totale degli estratti idroalcolici dei frutti è stata valutata mediante due distinti saggi colorimetrici (TEAC e FRAP), basati rispettivamente sulla valutazione della capacità antiradicalica (reazione di idrogeno-donazione) e riducente (reazione di elettrone-donazione) dei composti in esame. Il metodo TEAC è stato condotto combinandolo ad un sistema di analisi con iniezione a flusso (FIA), secondo le modifiche recentemente apportate al saggio dal nostro gruppo di lavoro (10). Alla generica valutazione della TAC dei frutti è stata abbinata l'identificazione dei principali composti fenolici e la simultanea determinazione del loro contributo individuale sulla TAC degli estratti. L'analisi è stata condotta mediante separazione cromatografia dei composti di interesse (RP-HPLC), accoppiata ad un sistema post-colonna di rivelazione dell'attività antiossidante delle singole sostanze eluite (11).

Il secondo obiettivo delle indagini è stato quello di valutare l'effetto del consumo di fragole provenienti da cultivar differenti, sulla capacità antiossidante plasmatica e sui livelli serici di acido ascorbico e acido urico di individui volontari sani. L'analisi degli antiossidanti serici è stata svolta mediante separazione RP-HPLC e rivelazione con detector elettrochimico, utilizzando tetrabutylammonio solfato come agente accoppiante (12). L'analisi statistica dei dati è stata condotta utilizzando STATISTICA (Statsoft Inc. Tulsa, OK, USA), secondo l'HSD Tukey's multiple range test.

Risultati e discussione

I cloni coinvolti in questo studio, tutti aventi un patrimonio genetico noto e appartenenti al programma nazionale di incrocio della fragola, sono stati selezionati sulla base di studi preliminari (in stampa) che ne avevano evidenziato differenze nel contenuto di fenoli totali e nella TAC dei frutti. I nove genotipi sono rappresentati da cinque varietà già inserite nel sistema di produzione nazionale e caratterizzate da differenti tempi di maturazione, e quattro selezioni avanzate del programma di incrocio dell'Università Politecnica delle Marche, finalizzato al miglioramento genetico della fragola. Due delle selezioni derivano da incroci intraspecifici di *F. x ananas-*

sa, mentre due costituiscono la F1 e la F2 di incroci interspecifici di *F. ananassa x F. virginiana glauca* (AN94.414.52 e AN00.239.55, rispettivamente). Le selezioni, hanno mostrato, in studi precedenti, alti contenuti di fenoli e un'alta TAC. Un particolare interesse è rivolto alla selezione AN94.414.52, in quanto le sue caratteristiche qualitative e nutrizionali si differenziano nettamente dagli altri parentali, risultando superiori per tutti i caratteri analizzati. Studi precedenti hanno inoltre rivelato la notevole capacità di questa selezione di trasmettere alle progenie gli elevati caratteri qualitativi e nutrizionali, indipendentemente dall'altro parentale di incrocio (13).

Il nostro studio ha confermato l'importante ruolo della componente genetica sulla composizione fitochimica e sulle proprietà antiossidanti dei frutti di fragola, e le differenze tra varietà e selezioni sono state evidenziate mediante i saggi di routine così come dalle analisi cromatografiche.

La valutazione della TAC sugli estratti è stata ottenuta mediante TEAC e FRAP, 2 saggi spettrofotometrici di facile applicazione e utilizzati soprattutto per la selezione di ampie popolazioni di sementi ottenuti da combinazioni di incrocio programmate. I due saggi hanno condotto a risultati estremamente simili e confrontabili ($r = 0.95$), e hanno rivelato che i frutti della selezione a più elevato potere

antiossidante mostrano una TAC quasi doppia rispetto ai valori più bassi osservati (Fig. 1). Il contenuto di vitamina C dei frutti ha confermato differenze legate al genotipo. Inoltre, la correlazione positiva con i valori di TAC testimonia che notevole è il contributo individuale della vitamina C al potere antiossidante totale delle fragole, ma altri composti, come i polifenoli, giocano un ruolo altrettanto importante. Ancora più significativa è la variabilità riscontrata a livello del contenuto di folati nei frutti (Fig. 2). Il contenuto di folati nelle selezioni che ne sono più ricche è persino sette volte superiore ai valori riscontrati nelle varietà; il dato è ancor più interessante se si considera che in letteratura non sono riscontrate differenze così rilevanti, tra cloni coltivati nello stesso campo sperimentale e in condizioni ambientali necessariamente simili. Non sorprende che le due selezioni con i valori di folati spiccatamente superiori alla media siano entrambe frutto di un incrocio interspecifico tra la fragola coltivata e la specie selvatica *F. virginiana glauca*, a conferma dell'ipotesi che quest'ultima specie possa essere considerata una buona fonte naturale di caratteri di qualità del frutto (14).

La figura 3 mostra un esempio di analisi antiossidante dei singoli composti. Il sistema si basa sulla separazione cromatografica dei composti e loro successiva rilevazione al

passaggio attraverso un detector PDA. In seguito, il flusso in eluzione entra in una serpentina di reazione post-colonna, dove si mi-

Figura 1 - Capacità Antiossidante Totale (TAC) di estratti di fragole provenienti dai 9 genotipi in studio. I risultati sono espressi come μmoli di equivalenti di Trolox per grammo fresco di fragola ($\mu\text{moli TE/g FW}$). Le colonne con sovrascritte lettere differenti corrispondono a valori significativamente differenti ($p < 0.05$, $n = 4$ ripetizioni).

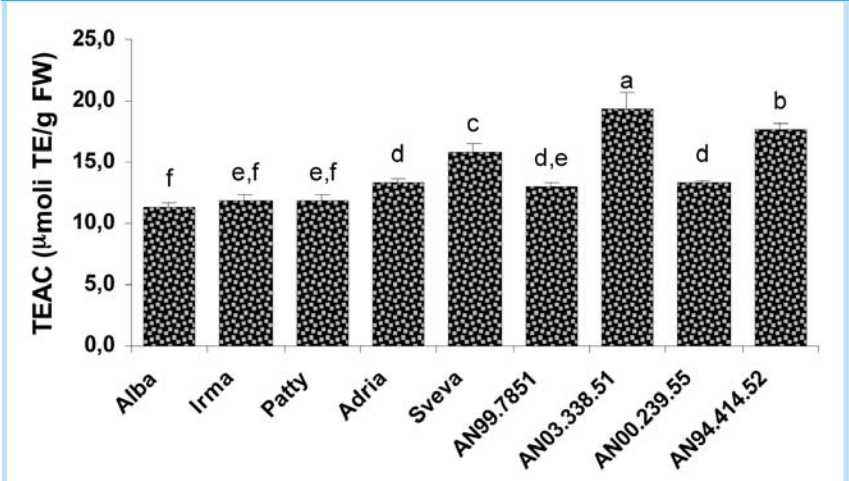
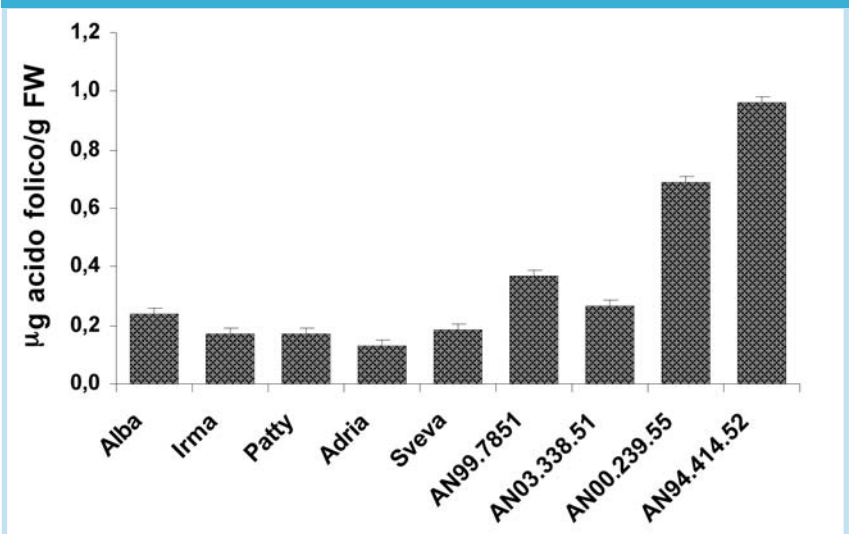


Figura 2 - Contenuto di folati nei 9 diversi genotipi di fragola. Valori espressi come μg acido folico/g FW.



scela con una soluzione radicalica pre-costituita. La quantità di radicale estinto da ogni singolo composto antiossidante eluito dalla colonna cromatografica viene rilevata al passaggio della miscela di reazione in un secondo detector (UV-VIS), e permette di valutare il potere antiossidante della sostanza in questione.

In tutti i cromatogrammi è stato possibile distinguere tre regioni in cui si concentrano i principali composti antiossidanti (Fig. 3), ma una certa variabilità qualitativa e quantitativa è stata rinvenuta nel profilo fenolico e antiossidante dei singoli estratti. La prima regione corrisponde ad antiossidanti altamente polari, che eluiscono dopo 2-3 minuti dall'iniezione dei campioni e complessivamente forniscono il contributo più rilevante alla TAC degli estratti. Il principale composto di questa regione è rappresentato dalla vitamina C. Il secondo gruppo di antiossidanti eluiscono tra i 7 e i 15 minuti dall'iniezione

dei campioni, e la maggior parte di essi sono stati identificati come acidi fenolici, sulla base delle caratteristiche spettrali e cromatografiche. Tra gli idrossicinnamati chiaramente identificati un particolare interesse è stato rivolto a due composti derivati dell'acido p-cumarico (p-cumarico glucoside e p-cumarico glucoside) che, pur essendo rinvenuti in tutti gli estratti, variavano in modo rilevante per le concentrazioni osservate, e di conseguenza per il contributo apportato alla TAC dei frutti. Infine, il terzo gruppo di antiossidanti eluisce tra i 19 e i 26 minuti, e vi sono rappresentati principalmente antocianine e acido ellagico in forma libera. In tutti i campioni le antocianine apportano il maggior contributo alla TAC, fatta eccezione della vitamina C. Sebbene la pelargonidina-glucoside sia il composto più rappresentato in tutti i cloni di fragole, differenze qualitative e quantitative nel profilo antocianinico sono state osservate tra le cultivar in studio.

Infine, lo studio sui possibili effetti plasmatici in acuto del consumo di fragole da parte di individui volontari sani ha condotto a risultati solo parzialmente previsti. A conferma da quanto presente in letteratura e osservato in precedenti lavori, la capacità antiossidante plasmatica degli individui, se misurata mediante saggio FRAP, ha mostrato un aumento statisticamente significativo ($p < 0.01$) già dopo un'ora dal consumo dei frutti. L'aumento, intorno al 17-18% circa, si manteneva costante nelle successive due ore. La valutazione della TAC mediante saggio TEAC non evidenzia, al contrario, nessuna variazione rilevante nell'arco del periodo di osservazione. La discrepanza nella sensibilità dei due saggi utilizzati sembra derivare dalla natura dei campioni in analisi, mentre, ad esempio, i due saggi spettrofotometrici fornivano risultati estremamente simili nella valutazione della TAC dei frutti, la correlazione viene persa nel caso dei campioni di plasma. Ciò potrebbe derivare dalla maggiore complessità del plasma rispetto all'estratto metanolico dei frutti, causata principalmente dalla presenza di un maggior numero di composti ad attività antiossidante, e dal fatto che alcuni composti contribuiscono in modo molto più incisivo di altri alla TAC. La determinazione del contenuto serico di acido ascorbico e acido urico conferma che i livelli di acido ascorbico aumentano in maniera rilevante già

Figura 3 - Esempio di separazione cromatografica combinata all'analisi antiossidante dei composti in un estratto di fragola (vedi testo).

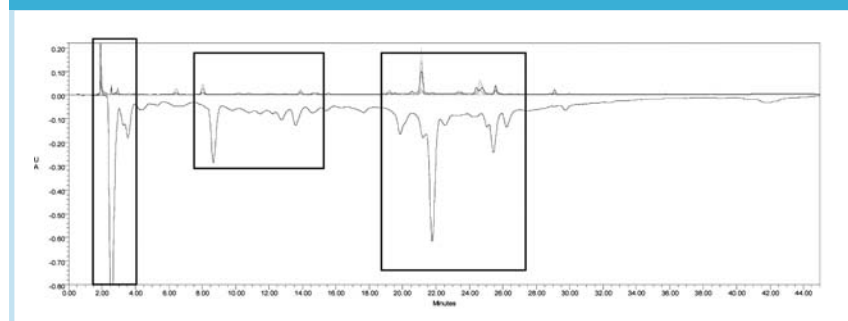
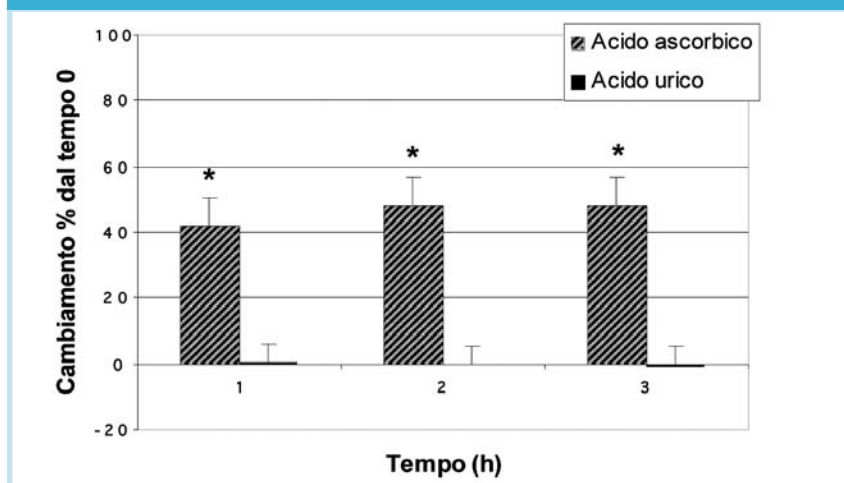


Figura 4 - Variazione percentuale dei livelli serici di acido ascorbico e urico nel tempo, rispetto alle concentrazioni rinvenute prima del consumo di fragole (tempo zero). Gli asterischi indicano differenze significative rispetto alle concentrazioni determinate prima del consumo di fragole ($p < 0.01$, $n = 4$ ripetizioni).



dopo un'ora dal consumo di fragole, mentre non si apprezza alcuna variazione significativa dei livelli di acido urico (Fig. 4). Il dato è in contrasto con quanto visto in esperimenti simili basati però sul consumo di frutti di altra specie (12), e testimonia che l'aumento del potere antiossidante plasmatico può essere in larga parte collegato all'assorbimento e al rinvenimento in circolo degli antiossidanti alimentari, tra cui la vitamina C sembra rivestire un ruolo predominante.

Bibliografia

1. Kähkönen M P, Heinämäki J, Ollilainen V, Heinonen M. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *J Sci Food Agric* 2003; 83: 1403-11.
2. Kähkönen M P, Heinämäki J, Ollilainen V, Heinonen M. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *J Sci Food Agric* 2003; 83: 1403-11.
3. Hakkinen SH, Karenlampi SO, Heinonen M., Mykkanen HM, Törrönen AR. Content of flavonols Quercetin Myricetin and Kaempferol in 25 edible berries. *J Agric Food Chem* 1999; 47: 2274-9.
4. Mattila P, Hellstrom J, Törrönen R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 7193-9.
5. Mattila P, Hellstrom J, Törrönen R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 7193-9.
6. 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.
7. Olsson ME, Ekvall J, Gustavsson K, et al. Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberry (*Fragaria x ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 2490-8.
8. Olsson ME, Ekvall J, Gustavsson K, et al. Antioxidants, low molecular weight carbohydrates, and total antioxidant capacity in strawberry (*Fragaria x ananassa*): effects of cultivar, ripening, and storage. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 2490-8.
9. Helsen JPF, de Vos CHR, Maas FM, et al. Response of selected antioxidants and pigments in tissues of *Rosa hybrida* and *Fuchsia hybrida* to supplemental UV-A exposure. *Physiologia Plantarum* 2003; 117: 171-7.
10. 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.
11. Beekwilder J, Jonker H, Meesters P, Hall RD, van der Meer IM, Ric de Vos CH. Antioxidants in raspberry: on-line analysis links antioxidant activity to a diversity of individual metabolites. *J Agric Food Chem* 2005; 53: 3313-20.
12. Lotito S, 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: 251-8.
13. Mezzetti B, Scalzo J, Capocasa F, Pallandrini A, Battino M. Il miglioramento genetico per aumentare qualità e capacità antiossidante delle fragole. *Frutticoltura* 2005; 4: 26-9.
14. Hancock JF, Luby JJ, Dale A, Callow PW, Serce S, El-Shiek A. Utilizing wild *Fragaria virginiana* in strawberry cultivar development: inheritance of photoperiod sensitivity, fruit size, gender, female fertility and disease resistance. *Euphytic* 2002; 126: 177-84.