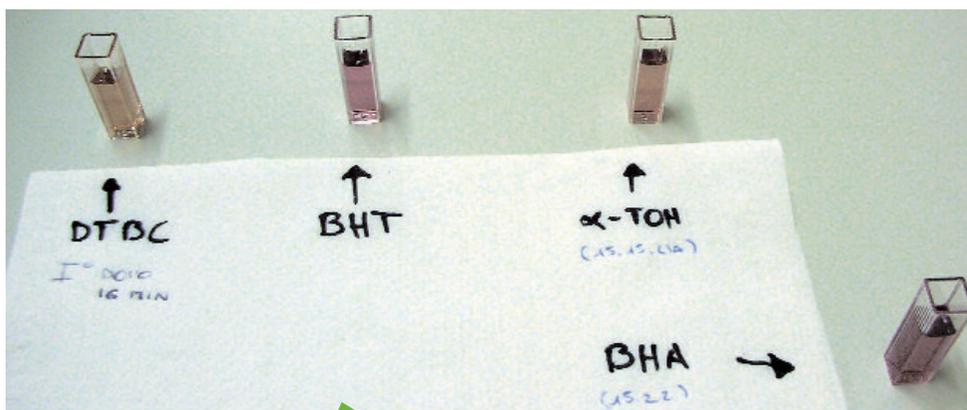


CHIMICA & MECCANISMI DI OSSIDAZIONE



Maria Grazia Fumo,
Riccardo Amorati,
Gian Franco Pedulli
Dipartimento di
Chimica Organica
"A. Mangini"
Università di Bologna
mariagrazia.fumo@studio.unibo.it

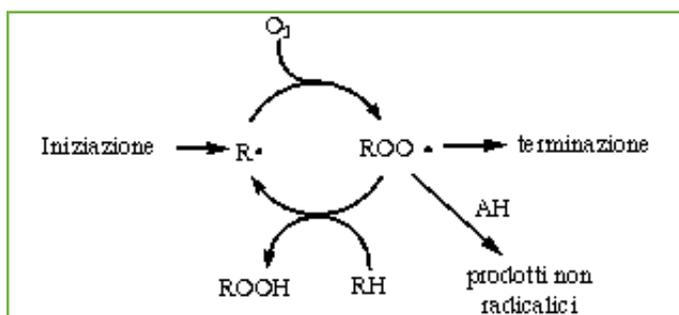
ATTIVITÀ ANTIOSSIDANTE

ESPERIENZA DI LABORATORIO DI CHIMICA ORGANICA

Il radicale stabile 2,2-difenil-1-picrilidrazile (DPPH[•]) viene utilizzato nell'ambito di un laboratorio didattico per misurare l'attività antiossidante di alcuni fenoli, mostrando come non tutti i protocolli descritti in letteratura forniscano risultati chimicamente significativi.

Gli antiossidanti sono importanti additivi usati industrialmente nella stabilizzazione delle sostanze facilmente deteriorabili per azione dell'ossigeno atmosferico, quali ad esempio materie plastiche, vernici, preparazioni farmaceutiche e cosmetiche, alimenti. La preoccupazione riguardo ai potenziali rischi per la salute che possono essere causati da antiossidanti sintetici ha suscitato un rinnovato interesse verso gli antiossidanti naturali che, essendo ottenuti frequentemente da piante usate nell'alimentazione, si presume siano più sicuri [1]. Negli organismi viventi, la presenza di sostanze antiossidanti riduce i danni dovuti ad un'eccessiva produzione di radicali liberi causata dal metabolismo e da errate abitudini di vita. Per fornire agli studenti le basi chimiche fondamentali per una miglior comprensione di questa tematica complessa ma con interessanti e crescenti risvolti applicativi ed occupazionali, nel corso di laurea in Chimica e Tecnologia Farmaceutiche dell'Università di Bologna è stato attivato l'insegnamento com-

plementare "Chimica dei radicali liberi e degli antiossidanti", nell'ambito del quale è stata svolta la breve attività di laboratorio descritta di seguito. L'obiettivo è quello di mostrare come uno dei metodi più usati per la determinazione dell'attività antiossidante di una sostanza possa fornire misure chimicamente significative o meno a seconda del protocollo seguito [2]. Il proposito di questa esperienza è quello di aiutare gli studenti a valutare in maniera critica i risultati pubblicati, spesso con molta enfasi, nella letteratura scientifica. Gli antiossidanti sono molecole che, pur presenti in piccola quantità, sono in grado di proteggere substrati organici naturali o sintetici dall'attacco dei radicali liberi [3]. La loro azione si può esplicitare mediante due meccanismi distinti: prevenzione della formazione dei radicali iniziatori che danno origine a catene radicaliche che portano all'ossidazione di numerose molecole di substrato (ad esempio sequestrando i metalli di transizione o decomponendo in maniera non radicalica gli idroperossidi) oppure tramite reazione e spegnimen-



Schema 1 - La reazione di autoossidazione, in assenza di antiossidanti (AH), è una catena radicalica sostenuta dai radicali perossili (ROO[•]) che porta alla distruzione del substrato ossidabile (RH) con formazione di idroperossidi (ROOH)

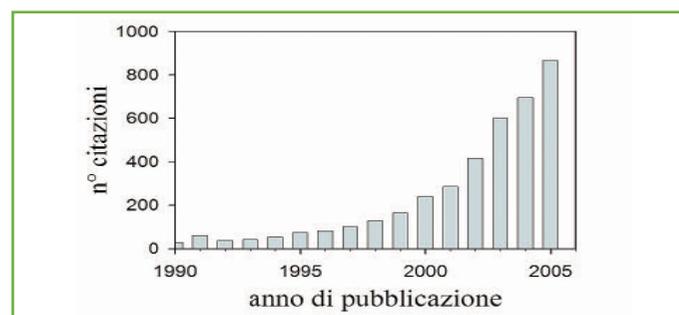
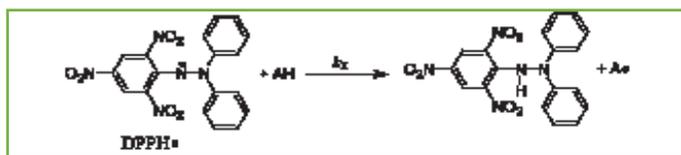
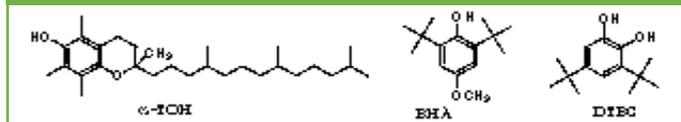


Fig. 1 - Numero di articoli riportanti la parola "DPPH" per anno di pubblicazione, fonte SciFinder



Schema 2



Schema 3

to di radicali già formati che propagano le catene radicaliche. Gli antiossidanti che agiscono tramite quest'ultimo meccanismo sono detti "interrottitori di catena" (*chain breaking*) e sono caratterizzati da due parametri indipendenti:

- la costante di velocità per la reazione con un determinato radicale (k_x^*).
- il numero di radicali intrappolati (n).

I radicali coinvolti nel danno ossidativo (vale a dire i perossili, Schema 1) sono difficili da studiare, perché sono specie transienti a vita breve: per aggirare questa difficoltà, si utilizzano sistemi modello costituiti da radicali stabili, molto più pratici e maneggevoli, anche se non presenti nei sistemi reali [2]. Il più comune tra questi è il DPPH• (2,2-difenil-1-picrilidrazile), un radicale di sintesi intensamente colorato di violetto in grado di strappare un atomo di idrogeno dagli antiossidanti, trasformandosi nell'idrazina corrispondente, debolmente colorata di giallo (Schema 2). Il successo dei metodi basati sulla decolorazione del DPPH (vedi Fig. 1) è dovuto al fatto che l'andamento della reazione può essere facilmente valutato per via spettrofotometrica. Nell'esperimento qui descritto, il potere antiossidante di tre molecole fenoliche (Schema 3) viene

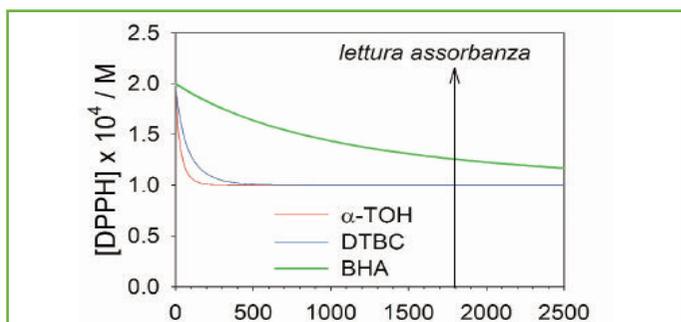


Fig. 2 - Decadimento nel tempo della concentrazione di DPPH• (2×10^{-4} M) in presenza dei tre antiossidanti (5×10^{-5} M) la cui struttura è mostrata in Schema 3. Si osserva che dopo 30 minuti due degli antiossidanti hanno reagito con la stessa quantità di DPPH• nonostante le velocità di reazione siano molto diverse tra loro

Costante cinetica per la reazione con il radicale DPPH• (solvente metanolo) e numero di radicali intrappolati da ogni molecola di inibitore (n) per i tre antiossidanti studiati [5]

Antiossidante	k_x^* ($M^{-1}s^{-1}$)	n
α -TOH	200	2
DTBC	80	2
BHA	5	2

valutato misurando con uno spettrofotometro la quantità di DPPH• che reagisce con esse, utilizzando i seguenti metodi tratti dalla recente letteratura:

- 1) misura della concentrazione residua di DPPH• dopo 30 minuti dall'aggiunta di una quantità nota di antiossidante (Fig. 2) [4];
- 2) misura della velocità di decadimento del DPPH dopo l'aggiunta di un eccesso di antiossidante, in condizioni cioè di pseudo prim'ordine (Fig. 3) [5].

Si può mostrare che il primo metodo dà informazioni grossolane, che dipendono dalla velocità di reazione, dal numero di radicali intrappolati dall'antiossidante e dal tempo di reazione. Se la lettura è effettuata al termine della reazione, può essere usato per misurare il numero di radicali intrappolati per ogni molecola di antiossidante (n) senza poter stimare la costante cinetica di reazione (k_x^*). Quest'ultima può essere invece ottenuta con il secondo metodo, che è sensibile alla struttura del fenolo e può essere usato per studi di correlazione struttura-attività. I risultati ottenuti (Tabella, sopra) possono essere spiegati in funzione dei valori dell'energia di dissociazione del legame O-H fenolico [6] e dell'ingombro sterico intorno all'ossidrilie. Agli studenti viene quindi data la possibilità di verificare che la misura di un parametro importante, come l'attività antiossidante, richiede un'approfondita conoscenza della chimica alla base del fenomeno studiato.

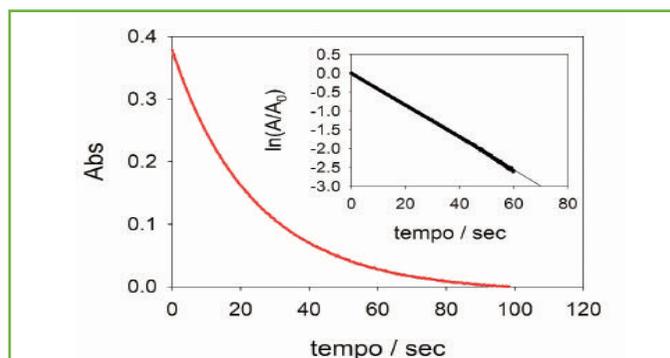


Fig. 3 - Andamento della concentrazione di DPPH• (0,1 mM) in presenza di DTBC (1 mM). Dall'analisi della cinetica (inserto) è possibile risalire alla costante cinetica di reazione

Bibliografia

- [1] N.V. Yanishlieva, in *Antioxidants in food: practical applications*, J. Pokorny *et al.* (Eds.), CRC Press, 2001.
- [2] V. Roginsky, E.A. Lissi, *Food Chem.*, 2005, **92**, 235.
- [3] P. Mulder *et al.*, *Helv. Chim. Acta*, 2005, **88**, 370.

- [4] Per esempio: J.H. Lee *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 5416.
- [5] L.R.C. Barclay *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 6226.
- [6] G. Brigati, M. Lucarini *et al.*, *J. Org. Chem.*, 2002, **67**, 4828.

Antioxidant Activity. An Organic Chemistry Laboratory Experiment

The stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH•) can be used to measure the antioxidant activity of some natural and synthetic phenols, showing students that only one of experimental methods described in recent literature affords chemically significant results.