

Attività antiossidante di bevande Esperimenti per le scuole secondarie superiori

Riassunto

Il tema “radicali liberi e antiossidanti” è interessante sia dal punto di vista della ricerca attuale sia dal “quotidiano”.

Questo articolo presenta una semplice possibilità per la determinazione dell'attività antiossidante di diverse bevande utilizzando la reazione oscillante di Briggs-Rauscher. In presenza di salda d'amido le oscillazioni possono essere seguite attraverso il cambio periodico del colore: incolore → giallo → blu → incolore ...

L'aggiunta di una bevanda che contiene antiossidanti a una miscela oscillante di Briggs-Rauscher fa cessare subito le oscillazioni ma dopo un certo tempo ricominciano di nuovo. Questo tempo, detto “di inibizione” dipende linearmente dalla quantità di antiossidanti contenuti nella bevanda e può essere misurato con un contasecondi.

Con questo esperimento è possibile confrontare le attività antiossidanti di diverse bevande in un laboratorio scolastico anche poco attrezzato.

L'esperimento non è costoso e utilizza materiali e sostanze a disposizione in qualsiasi laboratorio didattico.

Abstract

Antioxidant Properties of Drinks – Experiments for high school students

The topic “free radicals and antioxidants” is very popular from

(*) Technische Universität Braunschweig, Institut für Fachdidaktik der Naturwissenschaften, Abteilung Chemie und Chemiedidaktik, Pockelsstrasse 11, D-38106 Braunschweig, e-mail: k.hoener@tu-bs.de

(**) Dipartimento di Chimica “G. Ciamician”, Università degli Studi di Bologna, Via Selmi 2, I-40126 Bologna, e-mail: rcerv@ciam.unibo.it

KERSTIN HÖNER(*)
RINALDO CERVELLATTI(**)

the point of view of the actual research and from that of mankind life. This article provides an examination of the antioxidant activity of different drinks using the oscillating Briggs-Rauscher reaction. In the presence of starch the oscillations can be observed by periodic colour changes: colourless → yellow → blue → colourless ... etc.

The addition of a drink containing antioxidants to the active mixture above stops the oscillations immediately, but after a certain time the oscillations starts again. This ‘inhibition time’ linearly depends on the amount of antioxidants in the drink added and can be measured with a stopwatch. With this experiment the antioxidant activity of different drinks can be evaluated. The experiment is inexpensive and utilises materials and substances that are usually available in every student laboratory.

Introduzione

Attualmente nell'insegnamento della chimica a livello di scuola secondaria è molto importante scegliere temi che interessano gli studenti e che permettano loro di considerare la chimica meno “ostica” e realizzare che i suoi principi stanno alla base delle scienze naturali. Molte indagini hanno mostrato che gli studenti si interessano soprattutto a temi legati alla vita quotidiana. Inoltre, nel nostro mondo complesso diventano sempre più importanti le conoscenze interdisciplinari. Il tema “antiossidanti e radicali liberi” presentato qui è adatto a trattare diversi aspetti chimici,

biologici e fisiologici che fanno parte della nostra vita quotidiana. Gli integratori vitaminici e altri cibi dietetici con ingredienti “attivi” contro i radicali liberi sono arrivati dagli Stati Uniti anche in Europa. Nelle erboristerie si trovano per esempio capsule di tè verde (figura 1).



Tè verde – un regalo della natura !

Tè verde, la scoperta della Cina che mantiene il benessere in generale.

Gli effetti positivi del tè verde sono conosciuti in Asia già da secoli. Il tè verde contiene una grande quantità di sostanze che giocano un ruolo importante per la nostra salute: **Polifenoli**, **Flavonoidi**, **Vitamina C**, queste sostanze difendono le cellule dall'attacco dei **radicali liberi**.

Figura 1. Pubblicità di capsule di tè verde

Tè verde – un regalo della natura - così dice la pubblicità. Il tè verde viene esaltato per favorire il benessere in generale, si parla degli effetti positivi già conosciuti da secoli e dei componenti di grande valore che possono proteggere le cellule dall'attacco dei radicali liberi.

Nelle erboristerie si trovano anche capsule di vino rosso (figura 2).



capsule di vino rosso

Con **sostanze bioattive**.
Il vino rosso è più di una bevanda con tanti vantaggi per la salute.

Le **sostanze bioattive** contenute possono difendere le cellule dai **danni**.

I francesi sono debitori della loro salute cardiovascolare grazie alla loro preferenza per il vino rosso.

Le capsule non contengono alcool.

Contenuto: 300 mg polvere di vino rosso/capsula

Figura 2: Pubblicità di capsule di vino rosso

Anche qui si parla delle sostanze bioattive e dei loro vantaggi per la salute perchè possono difendere l'organismo dai danni prodotti dai radicali. Vengono nominati anche i francesi che sarebbero debitori della loro salute grazie alla loro preferenza per il vino rosso, ma c'è anche scritto che le capsule non contengono alcool. Che cosa vuol dire tutto questo ?

Uno degli scopi di questo articolo è dare una risposta a questa domanda, un altro scopo è presentare un esperimento didattico adatto per l'introduzione del tema "radicali liberi e antiossidanti" nelle scuole secondarie superiori. Oltre ad aspetti diversi viene illustrato un semplice metodo analitico con cui diventa possibile determinare l'attività antiossidante di miscele o di sostanze pure in qualsiasi laboratorio scolastico.

Considerazioni preliminari

I radicali liberi godono oggi di una grande popolarità e tutti li conoscono e li sentono ricordare dalla pubblicità, sia quella televisiva sia quella che si trova su riviste e giornali, che propaganda prodotti "miracolosi" contro i "radicali liberi", entità misteriose definite con termini pittoreschi, dai quali risulta chiaro che si tratta di specie infide da cui bisogna ben guardarsi perché responsabili di numerosi misfatti, come la comparsa di rughe, la caduta dei capelli, i prematuri segni di invecchiamento, e così via. In effetti i radicali liberi possono provocare danni ben peggiori; essi sono infatti ritenuti responsabili di numerose forme patologiche molto gravi tra le quali, oltre a disfunzioni cardiocircolatorie, sono ad esempio l'arteriosclerosi, la cataratta, l'artrite reumatoide e certe forme di cancro [1, 2].

Secondo un rapporto dell'Organizzazione Mondiale della Sanità ci sono stati nel 1998 più di 12 milioni di casi di morte a causa delle malattie cardiocircolatorie e di questi casi più di 7,3 milioni sono stati dovuti a gravi disfunzioni coronariche.

Nei Paesi industrializzati, le malattie cardiocircolatorie sono la principale causa di morte, esse sono in aumento anche nei Paesi in via di sviluppo. L'analisi dei dati statistici di 14 Paesi europei, dell'Australia, del Canada, della Nuova Zelanda e degli Stati Uniti ha dato un risultato sorprendente: un consumo moderato di alcool mostra un effetto protettivo contro le malattie coronariche [3]. Questo fatto è anche conosciuto sotto il nome di "Paradosso francese" [4]. L'indagine ha mostrato che esiste una dipendenza lineare tra il numero di casi di morte causati dalle malattie coronariche e il consumo giornaliero di grassi per molti Paesi, ma la Francia è fuori dalla retta [4]. Con più o meno lo stesso consumo di grassi come in Francia, l'incidenza delle malattie coronariche è 5 volte maggiore in Inghilterra. La spiegazione è stata: per l'alto consumo di vino rosso dei francesi. Sicché, all'inizio, i ricercatori avevano concluso che l'alcool è un fattore di protezione contro le malattie coronariche. In uno studio danese (Copenhagen City Heart Study [5]) in cui 13000 donne e uomini sono stati controllati per 12 anni, questo risultato è stato confermato: un consumo di circa un mezzo litro di vino rosso al giorno può

diminuire l'incidenza di infarti cardiaci del 60 %.

Ma attenzione ! Anche un consumo giornaliero di vino più alto di mezzo litro aumenta il rischio di un infarto cardiaco. E così anche in questo caso vale la frase di Paracelsus:

"Qualsiasi sostanza è velenosa. Non c'è niente di non tossico. Solo la dose fa che una sostanza non dia un effetto velenoso" [6].

Gli effetti positivi diretti dell'assunzione di quantità moderate di alcool sono stati attentamente esaminati. L'alcool ha un'influenza positiva sui valori dei grassi nel sangue. I valori per il colesterolo "buono", cioè non dannoso (HDL = High Density Lipoproteine) vengono aumentati e contemporaneamente quelli del colesterolo "cattivo", cioè dannoso (LDL = Low Density Lipoproteine) vengono diminuiti. Si sa anche che l'alcool rende il sangue più coagulabile perché diminuisce l'aggregazione dei globuli, evitando il rischio della formazione di un embolo [7].

Ma oltre agli effetti positivi diretti dell'alcool ci deve essere anche qualcos'altro nei vini perchè, come dice la pubblicità, le capsule di vino rosso non contengono alcool, bensì le sostanze bioattive, i cosiddetti antiossidanti. Si tratta di un gruppo di sostanze particolari che hanno attirato l'interesse dei ricercatori.

Queste sostanze sono sottrattori di radicali liberi e possono evitare lo stress ossidativo causato da essi, che è molto dannoso per l'organismo. Esempi di questi antiossidanti sono i flavonoidi, gli stilbenoidi, i derivati idrossilici dell'acido cinnamico e i derivati idrossilici dell'acido benzoico. I processi ossidativi come l'ossidazione delle lipoproteine da parte dei radicali liberi sono fattori fondamentali nell'insorgenza di diverse malattie come l'arteriosclerosi. Le strutture delle lipoproteine del lato interno delle arterie che sono ricche di colesterolo vengono modificate da processi ossidativi. Queste modificazioni causano la resistenza corporea e i macrofagi consumano le particelle ossidate delle lipoproteine e formano cellule 'schiumose'. Un accumulo di queste cellule 'schiumose' nel lato interno delle arterie fa crescere le cosiddette 'striscie di grasso'. Lo strato interno dell'arteria si rompe e causa un aumento di tessuto connettivo e il deposito di lipidi. Alla fine l'arteria è

chiusa totalmente e può subentrare l'infarto cardiaco [8]. La protezione dei lipidi dall'ossidazione è quindi un fattore importante per prevenire le malattie del sistema cardiocircolatorio. Una definizione del termine radicale libero tra le varie possibili è quella più generale che definisce come radicale libero qualsiasi specie chimica che possiede uno o più elettroni spaiati. Secondo questa definizione vanno considerati radicali liberi sia l'ossidrilico (HO^\bullet), sia l'anione superossido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e anche l'ossigeno molecolare nel suo stato di tripletto.

A causa della presenza dell'elettrone spaiato i radicali mostrano una reattività molto accentuata. Ma i diversi radicali presentano differenti reattività. Il radicale ossidrilico (HO^\bullet) è molto reattivo e cerca di attaccare qualsiasi molecola incontri sul suo cammino. Il superossido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) è reattivo solo moderatamente e reagisce solo con poche molecole biologiche ma circola con il sangue e può trovarsi dappertutto. Poi dà luogo a radicali perossidi (ROO^\bullet) e idroperossili (HOO^\bullet) i quali sono precursori sia di radicali alcossili (RO^\bullet) sia dell'ossidrilico (HO^\bullet). L'acqua ossigenata non è un radicale e non è troppo reattiva come specie contenente ossigeno ma può attraversare le membrane e può portare alla formazione di radicali ossidrilici tramite la reazione di Fenton.

Nell'organismo ci sono strade diverse che portano alla formazione di radicali liberi [1]:

- Un'importante fonte sono le radiazioni elettromagnetiche ad alta energia, cioè raggi cosmici, raggi gamma, raggi X e radiazioni ultraviolette.
- Una seconda strada che porta alla formazione di radicali liberi *in vivo* è la reazione di Fenton e le reazioni a questa collegate: $\text{HOOH} + \text{Fe}^{++} \rightarrow \text{Fe}^{+++} + \text{HO}^- + \text{HO}^\bullet$. Queste reazioni che danno luogo ai radicali liberi più reattivi che si conoscano, cioè gli ossidrilici, hanno bisogno di ioni metallici, sempre presenti negli organismi viventi.
- Una strada ulteriore è rappresentata dalla reazione di riduzione dell'ossigeno molecolare (o atmosferico) a superossido catalizzata dagli enzimi e dai coenzimi della catena respiratoria.
- Anche la formazione di altre specie radicaliche centrate sull'ossigeno reattive con enzimi specifici gioca un

ruolo importante per la trasformazione di sostanze in altre.

Naturalmente ci sono anche altre possibilità ma per la loro complessità non è possibile affrontarle in questo articolo.

Va infine detto che non tutti i radicali liberi di rilevanza nei sistemi biologici sono sinonimo di danno. Per esempio si conoscono alcuni intermedi radicalici della catena respiratoria la cui presenza è indispensabile alla vita degli organismi stessi.

Naturalmente gli organismi per poter sopravvivere hanno sviluppato dei meccanismi di difesa contro queste specie reattive, in genere sotto forma di enzimi specifici (v. figura 3).

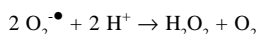
anche altri fenoli e polifenoli (indicati genericamente Ar-OH) giocano un ruolo fondamentale [2]. Ad esempio essi reagiscono con i radicali idroperossili e diventano radicali loro stessi. I radicali degli antiossidanti sono molto meno reattivi dei radicali idroperossili, e si trasformano in prodotti non dannosi per l'organismo.

La concentrazione degli antiossidanti nei tessuti dell'organismo dipende da una nutrizione adatta. In molti casi si può far uso di opportuni integratori. Un livello alto di antiossidanti può aiutare ad evitare le malattie cardiocircolatorie.

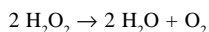
Ma sicuramente nell'insegnamento nelle scuole non è consigliabile fare

Meccanismi di difesa contro $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2

Superossido dismutasi (SOD)



Catalasi, (glutazione perossidasi)



Antiossidanti a basso peso molecolare (indicati genericamente Ar-OH)

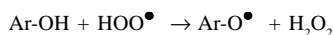


Figura 3: Meccanismi di difesa dai radicali liberi

Per esempio l'enzima superossidodismutasi è in grado di eliminare il radicale anione superossido catalizzando la reazione di dismutazione che porta ad acqua ossigenata e ossigeno molecolare. A sua volta l'acqua ossigenata viene rimossa per effetto dell'azione della catalasi mediante la reazione mostrata in fig. 3, che porta ad acqua e ossigeno.

Oltre agli enzimi ci sono anche antiossidanti a basso peso molecolare che possono difendere l'organismo contro i radicali (v. figura 3). Per la difesa dall'ossidazione lipidica la vitamina E è l'antiossidante più importante ma

la pubblicità per il consumo di vino rosso e le capsule che si possono acquistare in erboristeria sono costose. Rimane la domanda "c'è una buona alternativa?"

Per fortuna non solamente il vino contiene i polifenoli ma anche altre bevande senza alcool, specialmente il tè verde e il tè nero. Anche un succo di ribes nero contiene una grande quantità di antiossidanti attivi. In Tabella 1 è mostrato il contenuto totale di fenoli e le attività antiossidanti in valori TAS (Total Antioxidant Status) che sono valori relativi in confronto a una sostanza scelta come standard [9].

Tabella 1. Contenuti di fenoli e attività antiossidante di bevande

bevande	contenuto di fenoli (mg/L)	attività antiossidante TAS
vino rosso	2000	10
tè verde	1560	10
tè nero	1590	9,2
succo di ribes nero	1430	6,7
succo d'uva rossa	1070	3,3
succo di pompelmo	830	2,3
succo d'arancia	750	2,1

Già da molti anni l'attenzione dei ricercatori si è concentrata sulle sostanze antiossidanti efficaci, in grado di proteggere l'organismo dai danni. Per valutare la capacità di sostanze a contrastare i radicali è necessario avere metodi adatti per la misura della loro attività antiossidante. Numerosi metodi sono stati sviluppati per la determinazione *in vitro* dell'attività di miscele o di sostanze pure [10-14]. Si ritiene infatti che le sostanze attive nei sistemi *in vitro* siano anche attive *in vivo*. La maggior parte dei metodi analitici lavora ad un pH di 7,4 che è il pH del sangue. Ma ci sono anche altri che lavorano a pH diversi.

Tutti i metodi sono basati su reazioni che formano radicali liberi le cui caratteristiche (spettroscopiche, chemiluminescenza, ecc.) vengono misurate in modo adeguato. L'aggiunta di un antiossidante alla miscela di reazione inibisce la formazione dei radicali diminuendone la quantità in confronto ad una misura "in bianco". L'entità dell'inibizione è linearmente dipendente dalla concentrazione dell'antiossidante e serve per la determinazione della sua attività, normalmente in confronto a una sostanza scelta come standard [10-14].

Le differenze principali tra i metodi sono:

- Il modo in cui il radicale viene formato
- Il tipo di radicale che è il substrato dell'ossidazione
- Il metodo di determinazione delle caratteristiche del radicale

Il metodo TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity [10, 11]), è diventato il metodo più comune perché la ditta Radox Laboratories (Irlanda) produce e commercializza un test kit, ma questo test kit è abbastanza costoso: 100 misure costano sui 500 euro. Lo standard è il Trolox, un analogo della vitamina E. L'applicazione di questo metodo (e anche degli altri) nella pratica didattica di laboratorio nelle scuole secondarie superiori è pressoché impossibile perché vengono utilizzate apparecchiature e sostanze molto costose.

Una possibilità semplice, poco costosa e applicabile in qualsiasi laboratorio scolastico è il metodo basato sulla reazione oscillante di Briggs-Rauscher (reazione BR).

La reazione di Briggs-Rauscher. Parte per l'insegnante

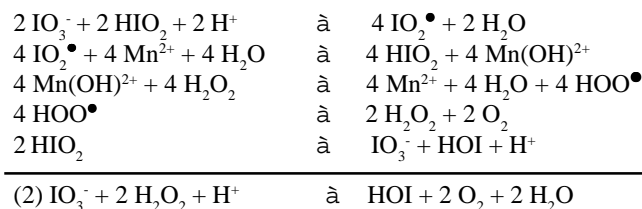
Gennaio - Febbraio 2002

La reazione di Briggs-Rauscher è stata scoperta nel 1973 [15]. Questo sistema oscillante consiste nella iodurazione e ossidazione di un substrato organico (in generale acido malonico e suoi derivati C2 sostituiti) da parte di ioni iodato in ambiente acido in presenza di perossido di idrogeno con ioni Mn(II) come catalizzatore. La reazione BR può essere considerata come un 'ibrido' fra le ben note reazioni di Belousov[16]-Zhabotinsky[17] e di Bray [18]-Liebhafsky [19].

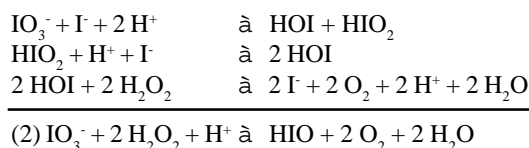
Il sistema BR mostra, in condizioni opportune, una variazione periodica delle concentrazioni degli intermedi e del catalizzatore. I principali intermedi le cui concentrazioni oscillano sono: gli ioni ioduro, lo iodio molecolare, le specie ossioduro HOI, HIO₂ e IO₂[•] e i radicali idroperossili HOO[•]. Il coinvolgimento e il ruolo importante giocato dai radicali HOO[•] nel far insorgere le oscillazioni è stato riportato in altre riviste [20, 21]. Quando sostanze antiossidanti sottrattori di radicali liberi vengono aggiunte a una miscela BR in pieno regime oscillante, le oscillazioni cessano immediatamente, ma dopo un certo tempo esse ricominciano. La dipendenza del tempo di inibizione (cioè il tempo trascorso fra la cessazione e la ripresa delle oscillazioni) dalla concentrazione di antiossidanti aggiunti, è di tipo lineare in un ampio intervallo di concentrazione [20-23].

In presenza di salda d'amido come indicatore, le oscillazioni sono 'visibili' in modo spettacolare: la miscela cambia periodicamente di colore nella sequenza: **incoloro** à **giallo** à **blu** à **incoloro** ...

Il meccanismo della reazione BR è molto complicato. Un primo 'schele-



Il cammino non-radicalico del processo (2) è interpretabile dalla somma dei seguenti stadi:

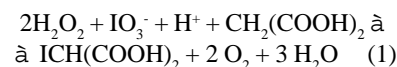


Il processo (3) accoppia i due cammini con cui può avvenire il processo (2) attraverso gli stadi (3') e (3''):

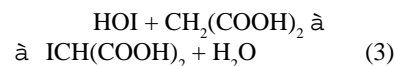
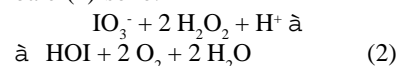
tro' di meccanismo, proposto nel 1982 da R.M. Noyes e S. D. Furrow (modello NF [24]), fu in grado di riprodurre alcuni degli aspetti principali delle oscillazioni nel sistema. Recentemente, questo meccanismo è stato modificato da S.D. Furrow, R. Cervellati e G. Amadori [21], in base alle evidenze sperimentali che hanno dimostrato il ruolo importante che i radicali HOO[•] giocano nell'instaurarsi del regime oscillante [20, 21].

Una semplice interpretazione del comportamento oscillante è la seguente:

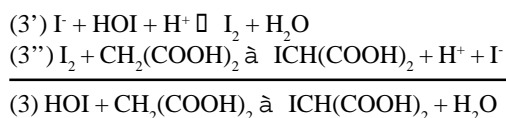
La reazione globale della reazione BR durante il regime oscillante è:



L'acido iodomalonic può decarbossilarsi al termine del regime oscillante formando diossido di carbonio e iodio molecolare. I principali processi che rendono conto della reazione globale (1) sono:



Il processo (2) può avvenire seguendo un veloce cammino radicalico o seguendo un lento cammino non-radicalico. Quale di questi due cammini predomina nel processo (2) viene regolato dalla concentrazione di ioni ioduro nella miscela. Quando la [I⁻] è bassa predomina il cammino radicalico, invece quando la [I⁻] è alta, diviene predominante il cammino non-radicalico. Il cammino radicalico del processo (2) è interpretabile dalla somma dei seguenti stadi:



generando così il regime oscillante. Infatti, quando per il processo (2) è dominante il cammino radicalico veloce, la miscela di reazione è gialla perché viene formato iodio dalla reazione (3'), e resta gialla fino a che $[\text{HOI}] > [\text{I}]$. Quando $[\text{HOI}]$ diventa minore di $[\text{I}]$ la miscela, in presenza di salda d'amido, diviene blu perché si produce una sufficiente quantità di ioni $\text{I}_3^- (\text{I}_2 + \text{I}^- \rightleftharpoons \text{I}_3^-)$ per formare il tipico complesso amido- I_3^- di colore blu. Quando la $[\text{I}]$ diviene abbastanza alta, il processo (2) passa sotto la predominanza del cammino non-radicalico lento. Il colore blu sparisce perché I_2 viene consumato dallo stadio (3'') più velocemente di quanto ne viene formato dallo stadio (3'), sicché la miscela diviene incolore. La somma degli stadi (3') e (3'') consuma quindi così tanto HOI fino che a un certo punto la concentrazione degli ioni I diviene sufficientemente bassa per far ritornare il processo (2) sotto la predominanza del cammino radicalico. Il colore della miscela diventa giallo e il ciclo si ripete.

Nel cammino non radicalico si forma anche l'intermedio HIO_2 e durante il cammino radicalico si producono radicali IO_2^\bullet e HOO^\bullet . Le reazioni redox del catalizzatore avvengono nel cammino radicalico perché IO_2^\bullet è in grado di ossidare Mn(II) a Mn(III) e il perossido di idrogeno è in grado di ridurre Mn(III) a Mn(II).

Nel sistema di Briggs-Rauscher entrambi i cammini – radicalico e non-radicalico – hanno la stessa stechiometria ma due diversi meccanismi. Il processo (3), regolando la concentrazione degli ioni ioduro, permette l'instaurarsi del regime oscillante fra i due diversi cammini del processo (2).

Per scopi di ricerca i comportamenti oscillanti nel sistema BR vengono seguiti per via spettrofotometrica (andamento oscillante dell'assorbanza di I_2 a 460 nm [25]) o per via elettrochimica potenziometrica (andamento oscillante del potenziale della soluzione utilizzando una coppia elettrodo di platino – elettrodo di riferimento o andamento oscillante della concentrazione degli ioni I utilizzando una coppia elettrodo ionosensibile – elettrodo di riferimento [20, 23]. In questo caso non è necessaria la sal-

da d'amido.

Per scopi didattici, le oscillazioni possono essere seguite misurando, con un contasecondi, l'intervallo di

tempo che intercorre fra due successive variazioni di colore (ad esempio fra due successive colorazioni blu).

Come già detto, l'aggiunta di un antiossidante (o di estratti contenenti antiossidanti) a una miscela BR in pieno regime oscillante, blocca immediatamente le oscillazioni che poi riprendono dopo un certo tempo. Questo effetto inibitorio è dovuto all'azione sottrattiva dei radicali HOO^\bullet da parte dell'antiossidante.

Il tè verde gode di particolare considerazione per il suo contenuto di antiossidanti, ma recenti ricerche indicano che anche il tè nero contiene una grande quantità di antiossidanti [26, 27]. Perciò ci sembra opportuno proporre una ricerca sulle diverse qualità di tè anche nelle scuole secondarie superiori. Si possono anche studiare le proprietà antiossidanti di diversi succhi di frutta e di alcuni vini.

Approccio didattico

Come riportato nelle Considerazioni Preliminari, la reazione BR può essere utilizzata come metodo per la determinazione dell'attività antiossidante di bevande nei laboratori didattici delle scuole secondarie superiori.

Ciò che segue è una descrizione molto semplice che può essere utilizzata in classe (o direttamente in laboratorio) senza entrare nei dettagli del complicato meccanismo di reazione. L'insegnante può fornire e discutere con gli allievi le seguenti informazioni:

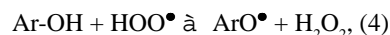
- L'equazione globale (1) della reazione BR.
- Gli ioni manganese(II) catalizzano la reazione (1).
- Importanti intermedi di reazione sono: I_2 , I e HOO^\bullet .
- Le caratteristiche dei radicali (atomi o gruppi atomici con almeno un elettrone spaiato) e la loro elevata reattività che può provocare gravi danni alla salute.
- I cambiamenti di colore (oscillazioni) nelle miscele BR sono dovuti a variazioni periodiche di concentrazioni degli ioni ioduro e dello iodio. Quando le concentrazioni di ioni ioduro e di iodio sono entrambe basse la miscela di reazione è incolore. Quando $[\text{I}_2]$ è alta e $[\text{I}]$ è bassa compare nella miscela il colore giallo tipico dello iodio. Quando anche la $[\text{I}]$ è alta si for-

mano ioni poliioduro ($\text{I}_2 + \text{I}^- \rightleftharpoons \text{I}_3^-$) che si legano all'amido formando il tipico complesso di colore blu:

$[\text{I}_2]$	$[\text{I}]$	Colore
bassa	bassa	incolore
alta	bassa	giallo*
alta	alta	blu**

*(colore dello iodio) **(colore del complesso degli ioni poliioduri I_3^- con l'amido)

• Gli antiossidanti sono composti contenenti gruppi fenolici e possono essere genericamente indicati come Ar-OH. Essi sono sottrattori di radicali liberi e reagiscono con i radicali idroperossili:



sicché il meccanismo della reazione BR viene disturbato e le oscillazioni cessano.

• Le oscillazioni ricominciano quando tutto l'antiossidante aggiunto ha reagito diventando esso stesso radicale durante la reazione (4). I radicali ArO^\bullet decadono poi a prodotti stabili e non dannosi.

Parte sperimentale

Materiali:

- Perossido di idrogeno (H_2O_2) al 30 % (Attenzione ! Maneggiare con guanti e occhiali di sicurezza perché l'acqua ossigenata a questa concentrazione provoca danni se viene a contatto con la pelle o con gli occhi, **R:8-34, S3-28-36/39-45**)
- Amido solubile
- Iodato di sodio (NaIO_3)
- Acido solforico 0,077 mol/L (Attenzione ! Se per preparare questa soluzione si adopera H_2SO_4 concentrato, usare le stesse precauzioni come per il perossido di idrogeno, **R:35, S29-S30-S45**)
- Solfato di manganese(II) monoidrato ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Acido malonico
- Sodio metabisolfito
- Diversi tè (in bustine di 1,75 g)
- Diversi succhi di frutta
- Un vino rosso, un vino bianco
- Vetreria (matraci e pipette tarate, bechers, ...)
- agitatore magnetico
- foglio di carta bianca
- contasecondi

Preparazione delle soluzioni per una serie di misure

- Soluzione d'amido

In un becher da 250 mL aggiungere 3 g di amido solubile a 100 mL di acqua distillata. Scaldare la miscela fino all'ebollizione poi lasciare raffreddare.

La soluzione deve essere preparata di fresco.

• Soluzione di iodato

In un matraccio tarato da 100 mL porre 3,96 g di NaIO_3 , sciogliere e portare a volume con una soluzione di H_2SO_4 0,077 M (per preparare 100 mL di H_2SO_4 0,077 M porre in un matraccio tarato 50 mL di acqua distillata e aggiungere 7,7 mL di H_2SO_4 1 M. Portare a volume.) Questa soluzione è 0,2 M in IO_3^- e 0,077 M in H_2SO_4 .

• Soluzione di acido malonico

In un matraccio da 50 mL porre 1,57 g di acido malonico. Sciogliere con acqua distillata e portare a volume. Questa soluzione è 0,3 M in acido malonico.

• Soluzione di solfato di manganese

In un matraccio da 20 mL porre 0,135 g di $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Sciogliere con acqua distillata e portare a volume. Questa soluzione è 0,04 M in Mn^{2+} .

Esperimenti con tè diversi:

Preparazione degli estratti acquosi di tè:

a) Una bustina di tè (contenuto: 1,75 g) viene posta in 100 mL di acqua bollente per 5 minuti. Dopo 5 minuti la bustina viene tolta dall'acqua. Il modo di estrarre la bustina deve essere sempre lo stesso per ogni tè.

b) Per il confronto di tè diversi alla stessa diluizione gli estratti concentrati preparati come sopra (a) vengono diluiti 2:100 con acqua distillata.

c) Per la determinazione della dipendenza del tempo di inibizione dalla concentrazione gli estratti concentrati preparati come sopra (a) vengono diluiti a: 3:100, 4:100, 5:100, ... con acqua distillata.

Esperimenti con succhi di frutta diversi:

I succhi di frutta vengono diluiti nell'intervallo 2:100 – 10:100.

Esperimenti con due vini:

Preparare le diluizioni da 2:100 a 7:100 di un vino rosso e da 2:10 a 7:10 di un vino bianco con acqua distillata.

Precauzioni di sicurezza Al termine del regime oscillante, la reazione procede con decomposizione del prodotto iodurato (acido iodomalónico) per dare CO_2 e abbondante precipitazione di iodo molecolare. Questa miscela non può essere versata nei lavandini. Si deve quindi approntare, sotto cappa con buona aspirazione, un recipiente da almeno 1 L contenente 500 mL di soluzione concentrata di sodio metabisolfito. In questa soluzione vanno

aggiunte le miscele finali (lo iodio viene ridotto a I^- e si produce SO_2). Anche i becher devono essere lavati con la soluzione di metabisolfito e risciacquati con abbondante acqua. Quando la soluzione di metabisolfito non reagisce più con lo iodio (colore giallo paglierino) si deve eliminare versandola in un recipiente contenente acqua e tale miscela può essere versata negli scarichi, facendo fluire abbondante acqua.

Procedimento sperimentale

Sull'agitatore magnetico si mette un foglio di carta bianca per far osservare meglio i cambiamenti di colore.

Si deve anzitutto osservare il comportamento oscillante di una miscela BR di riferimento (senza aggiungere una bevanda ma aggiungendo 1 mL di acqua distillata.)

Per ogni prova si deve preparare la seguente miscela poco prima della misurazione.

In un becher da 50 o 100 mL porre i volumi delle soluzioni nell'ordine riportato in Tabella 2:

Tabella 2. Ordine di aggiunta delle soluzioni

Soluzione	Volume
salda d'amido	1 mL
acqua distillata	2 mL
Perossido di idrogeno	10 ml
Acido malonico	5 mL
Iodato acido	10 mL
Per far partire la reazione	
Solfato di manganese(II)	2 mL
Nel momento in cui la miscela diventa per la seconda volta blu aggiungere, facendo contemporaneamente partire il contasecondi:	
Acqua distillata o la diluizione di una bevanda	1 mL

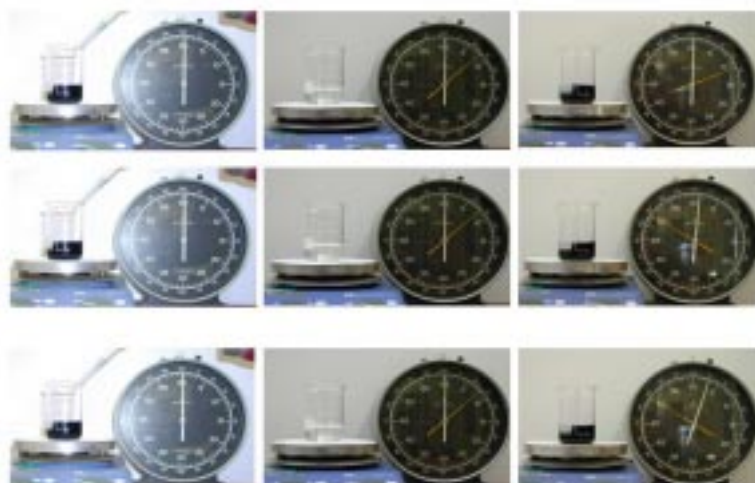


Figura 4. Fotografie di sequenze sperimentali

Si può notare che i tempi fra i due blu sono 11 secondi per la prova in bianco e 50 secondi per il tè (prima e seconda riga di Fig. 4 rispettivamente). Il tè usato in questo esperimento è un tè rosso diluito 2:100.

I tempi di inibizione dipendono dalla temperatura: al crescere della temperatura diventano più bassi e perciò è importante assicurarsi che durante esperimenti successivi che si vogliono confrontare la temperatura ambiente rimanga più o meno la stessa.

Risultati e discussione

I risultati di questi esperimenti permettono di rendere 'visibili' le differenze dell'attività antiossidante di tè diversi sempre diluiti nello stesso modo (2 : 100).

Si possono per esempio riassumere i risultati in un grafico come quello riportato in figura 5.

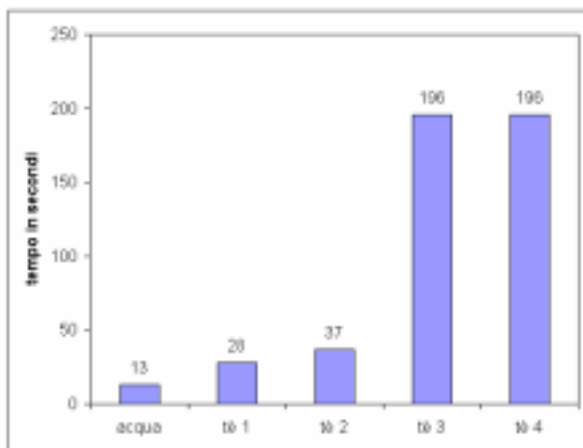


Figura 5. Diagramma a barre dei tempi di inibizione per quattro tipi di tè (diversi da quelli di Tabella 3) Tè 1 = tè alla frutta, Tè 2 = tè rosso (Puh Erh tè), Tè 3 = un tè nero, Tè 4 = un tè verde

Oltre a paragonare i diversi tè alla stessa diluizione si possono anche studiare gli effetti inibitori a diverse diluizioni per uno stesso tè.

Si preparano soluzioni a cinque o sei diluizioni diverse di un tè partendo dall'estratto concentrato e si eseguono le misure del tempo di inibizione come descritto in precedenza. In Tabella 3 sono riportati i dati di una tipica serie di esperimenti con quattro tipi di tè¹.

I grafici tempo di inibizione/concentrazione mostrano una dipendenza lineare fra queste grandezze (figura 6). Negli esempi riportati nella figura 6 sono stati studiati due tè neri che sono più attivi del tè verde.

Tabella 3. Risultati di una serie di misure per quattro tipi di tè

Concentrazione (unità arbitrarie)*	tempo tra il secondo e il terzo "blu" (secondi)			
	Tè 1 (nero)	Tè 2 (nero)	Tè 3 (verde)	Tè 4 (frutta)
0,01	40	45	30	22
0,02	136	108	76	38
0,03	226	198	126	58
0,04	316	287	186	79
0,05	416	365	238	95
0,1	853	825	503	211

*La concentrazione è espressa in termini di diluizione dell'estratto concentrato, sicché 0,01 sta per diluizione 1:100, 0,02 sta per 2:100, ecc.

Facendo esperimenti con altre marche di tè verde si potrà concludere che il tè nero contiene in media più o meno la stessa quantità di antiossidanti del tè verde. Questo è in buon d'accordo con i risultati di recenti ricerche [25, 26].

Anche succhi di frutta diversi mostrano un'attività antiossidante differente. In Tabella 4 sono riportati i dati per cinque succhi.

Sono state trovate le diluizioni opportune per avere tempi di inibizione tra 35 e 400 secondi che danno una dipendenza lineare dalla diluizione. Tempi più bassi di 35 secondi sono fuori della linearità. Tempi più lunghi stanno nelle rette ma non sono adatti per esperimenti didattici perché diventa troppo noioso (e troppo lun-

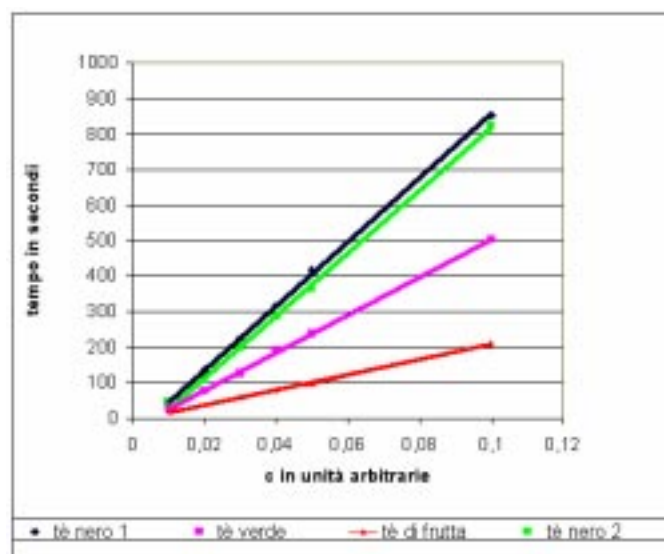


Figura 6. Rette di regressione lineare tempo di inibizione vs concentrazione per i quattro tè (dati di Tabella 3)

¹ I dati riportati qui si riferiscono a una temperatura ambiente di 19 °C.

Tabella 4: Risultati di una serie di misure per cinque succhi di frutta

c in unità arbitrarie	succo di ribes nera	succo d'uva rossa	succo di mela	succo d'arancia	succo di pompelmo
0,0075	43	..**	..**	..**	..**
0,0125	131	..**	..**	..**	..**
0,0175	262	..**	..**	..**	..**
0,0225	382	..**	..**	..**	..**
0,05	..*	62	37	45	48
0,07	..*	138	69	142	115
0,09	..*	198	103	186	202
0,1	..*	235	119	231	223

* tempi troppo lunghi

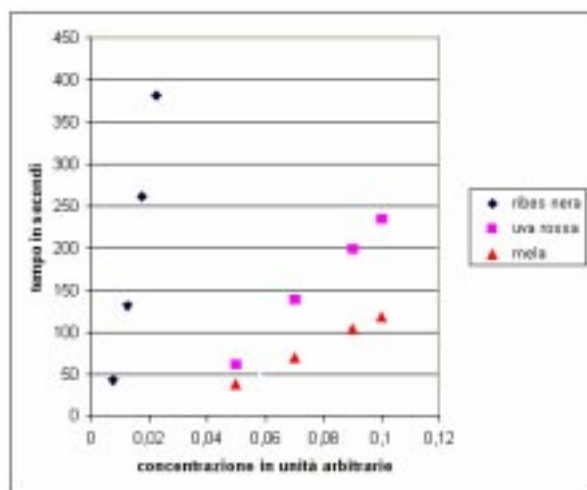
** tempi troppo bassi, fuori della linearità della rette

go) per gli studenti aspettare più di 6 o 7 minuti fino alla ripresa delle oscillazioni.

Il succo di ribes nera normalmente non ha un contenuto in frutta del 100 %. Nel nostro caso abbiamo usato un succo di ribes nera al 25 % di frutta. Sono state preparate le diluizioni da 3:100 a 9:100 che danno, divise per 4, le concentrazioni finali arbitrarie da 0,0075 a 0,0225.

Tutti gli altri succhi sono al 100 % (dichiarato) di frutta.

I grafici riportati in Figura 7 mostrano la dipendenza del tempo di inibizione dalla diluizione per tre succhi.

**Figura 7.** Dipendenza del tempo di inibizione dalla concentrazione per tre succhi di frutta

Si può notare il seguente ordine dell'attività antiossidante: succo di ribes nera >> succo d'uva rossa > succo di mela. Questo ordine è in buon d'accordo con i risultati della ricerca at-

² I dati riportati qui si riferiscono a una temperatura ambiente di 19 °C.

tuale. Le attività antiossidanti del succo d'arancia e del succo di pompelmo (v. Tabella 4) stanno fra quelle del succo d'uva rossa e del succo di mela.

In Tabella 5 sono riportati i dati di una tipica serie di esperimenti con un vino rosso e un vino bianco².

I risultati mostrano che il vino rosso è più attivo del vino bianco. Facendo l'esperimento con vini bianchi e vini rossi diversi ci si può accorgere di grandi differenze fra vini rossi diversi e anche fra vini bianchi diversi. Comunque i vini rossi sono sempre molto più attivi di quelli bianchi.

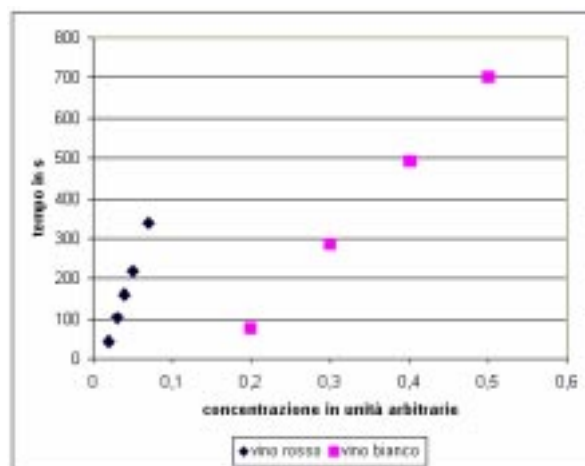
I dati della tabella 5 sono riportati anche sotto forma di grafici in figura 8. Sotto le concentrazioni usate qui i tempi di inibizione deviano dall'andamento lineare curvando e tendendo a zero.

Alcune considerazioni finali

Si possono pianificare gli esperimenti insieme agli studenti. Ad esempio per i tè, i parametri importanti da considerare al fine di ottenere risultati

Tabella 5. Risultati di una serie di misure su due tipi di vini

concentrazione in unità arbitrarie	tempo tra il secondo e il terzo "blu" in s vino rosso	concentrazione in unità arbitrarie	tempo tra il secondo e il terzo "blu" in s vino bianco
0,02	42	0,2	75
0,03	101	0,3	284
0,04	160	0,4	493
0,05	220	0,5	701
0,07	338	—	—

**Figura 8.** Dipendenza del tempo di inibizione dalla concentrazione per due tipi di vini

coerenti sono:

- il peso del tè;
- il volume e la temperatura dell'acqua per preparare l'estratto concentrato;
- il modo di estrarre la bustina del tè;
- il tempo di infusione della bustina del tè;

• la temperatura dell'ambiente durante le misure dei tempi di inibizione. Riteniamo che il tema "antiossidanti e radicali liberi" sia interessante sia dal punto di vista del "quotidiano" sia da quello della ricerca attuale. Nella pratica didattica, oltre all'estrema semplicità dell'attrezzatura, ci sono altri vantaggi dell'esperimento seguito visivamente rispetto a quello effettuato per via potenziometrica [28]. Anzitutto, disponendo di un laboratorio anche poco attrezzato è possibile far lavorare gli studenti a piccoli gruppi, ma anche in una scuola priva di laboratorio, tutta la classe può partecipare direttamente all'esperimento effettuato a banco dall'insegnante. Inoltre, gli alunni non hanno bisogno di conoscenze di elettrochimica, il che permette di focalizzare maggiormente l'attenzione sulla possibilità di sviluppare un metodo analitico per la determinazione dell'attività di sostanze antiossidanti.

Bibliografia

- [1] Cross, C. E.; Halliwell, B.; Borish, E. T.; Pryor, W. A.; Ames, B. N.; Saul, R. L.; McCord, J. M.; Harman, D., Oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.*, **107**, 526, 1987
- [2] Rice-Evans, C.A.; Packer, I., *New York: Flavonoids in Health and Disease*. New York: Marcel Dekker 1998.
- [3] St. Leger, A.S., Cochrane, A.L., Moore, F., Factors associated with cardiac mortality in developed countries with particular reference to the consumption of wine. *Lancet*, **1**, 1017-1020, 1979
- [4] Renaud, S.; De Lorgeril, M., Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523, 1992
- [5] Copenhagen City Heart Study: <http://www.uthsca.edu/gastro/chilton9-6/sld042.htm>
- [6] Paracelsus (Theophrast von Hohenheim), Sieben Defensiones. In: K. Sudhoff, *Klassiker der Medizin*, Verlag Johann Ambrosius Barth, Leipzig 1915
- [7] Roche Lexikon Meizin. Hoffmann-La Roche AG und Urban & Schwarzenberg, München 1995
- [8] <http://www.cardionews/archiv/cardio799/cardio24.htm>
- [9] <http://www.nutrifood-complex.de/sps/antioxidativ.html>
<http://www.universimed.com/fofiaca/fol19990308s.html>
- [10] Miller, N. J.; Rice-Evans, C.A.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*, **84**, 407-412, 1993
- [11] Baderschneider, B.; Luthria, D.; Waterhouse, A. L.; Winterhalter, P., Antioxidants in white wine (cv. Riesling): I. Comparison of different testing methods of antioxidant activity. *Vitis*, **38**, 127-131, 1999
- [12] Frankel, E.N.; German, J. B.; Davis, P. A., He adspace gas chromatography to determine human low-density-lipoprotein oxidation. *Lipids*, **27**, 1047-1051, 1992
- [13] Marco, G. J., A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **45**, 594-598, 1968
- [14] Pryor, W. A.; Cornocelli, J. A.; Deva, L. J.; Tait, B.; Trivedi, B. K.; Witiak, D. T.; Wu, M., Rapid screening test to determine the antioxidant potencies of natural and synthetic antioxidants. *J. Org. Chem.*, **58**, 3521-3532, 1993
- [15] Briggs, T.; Rauscher, W., An oscillating iodine clock. *J. Chem. Educ.*, **50**, 496, 1973
- [16] Belousov, B. P., *Sb. Ref. Radiats. Med.za* 958, Medgiz, Moscow, **1**, 145, 1959 (in Russian). The English translation of Belousov's full paper is in: R. J. Field and M. Burger, Eds., 'Oscillations and Travelling Waves in Chemical Systems', New York: Wiley 1985, pp. 605-613.
- [17] Zhabotinsky, A. M., Periodic course of oxidation of malonic acid solution (An investigation of the kinetics of the reaction of Belousov. *Biophysics*, **9**, 329-335, 1964
- [18] Bray, W. C., A periodic reaction in homogeneous solution and its relation to catalysis. *J. Am. Chem. Soc.*, **43**, 1262, 1921
- [19] Liebafsky, H. A. ; Wu, L. S., Reactions Involving Hydrogen Peroxide, Iodine and Iodate ion. V. Introduction to the Oscillatory Decomposition of Hydrogen Peroxide. *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 7180, 1974
- [20] Cervellati, R.; Crespi-Perellino, N.; Furrow, S. D.; Minghetti, A., Inhibitory effects by soy antioxidants on the oscillations of the Briggs-Rauscher reaction. *Helv. Chim. Acta*, **83**, 3179-3190, 2000
- [21] Furrow, S. D. ; Cervellati, R.; Amadori, A. (2001). New substrates for the oscillating Briggs-Rauscher reaction. *J. Phys. Chem.* in corso di stampa.
- [22] Höner, K.; Cervellati, R.; Neddens, C. (2001). Measurements of the in-vitro antioxidant activity of German white wines using a novel method. *Eur. Food Res. Tech.* in corso di stampa, on-line DOI 10.1007/s00217-001-0443-4.
- [23] Cervellati, R.; Höner, K.; Furrow, S. D.; Neddens, C.; Costa, S. (2001). The Briggs Rauscher reaction as a test to measure the activity of antioxidants. *Helv. Chim. Acta*, **84**, 3533-3547, 2001.
- [24] Furrow, S. D. ; Noyes, R. M., The Briggs-Rauscher reaction. 3. A skeleton mechanism for oscillations. *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 45-48, 1982
- [25] Furrow, S.D., Comparison of Several Substrates in the Briggs-Rauscher Oscillating System. *J. Phys. Chem.*, **99**, 11131-11140, 1995
- [26] Engelhardt, U. H., Polyphenole in Tee. Habilitationsschrift, Technische Universität Braunschweig, 1995
- [27] Engelhardt, U. H., Polyphenole im Tee – eine Übersicht. *Lebensmittelchemie*, **49**, 134, 1995
- [28] Cervellati, R., Fetto, P., Effetto di sostanze sottrattrici di radicali liberi sulla reazione oscillante di Briggs-Rauscher, *CnS-La Chimica nella Scuola*, **XXII**, 22-26, 2000