

Effetto di sostanze sottrattrici di radicali liberi sulla reazione oscillante di Briggs-Rauscher

Riassunto

In questo articolo vengono descritti esperimenti sugli effetti inibitori nel regime oscillatorio della reazione di Briggs-Rauscher, causati dall'aggiunta di estratti acquosi di farina di soia. L'effetto consiste in una immediata cessazione delle oscillazioni, che ricompaiono dopo un certo tempo ma con ampiezza e frequenza diverse da quelle osservate in una miscela 'bianca'. Il tempo di inibizione dipende linearmente dalla concentrazione delle sostanze contenute nell'estratto. Il fenomeno è dovuto all'attività di scavengers di radicali liberi posseduta da sostanze contenute nella farina di soia. Questi effetti sono quindi una prova indiretta della presenza di radicali idroperossili come intermedi nella reazione di Briggs-Rauscher. Gli esperimenti sono particolarmente adatti a livello universitario nei laboratori di esercitazioni di chimica fisica e di chimica analitica, ma possono anche essere eseguiti negli Istituti Tecnici con specializzazioni chimiche e nei Licei con indirizzo chimico-biologico. Infine, questi esperimenti sono parte di una più ampia ricerca avente lo scopo di mettere a punto un test rapido e poco costoso per misurare l'attività di sostanze antiossidanti.

Abstract

This paper describes experiments on the inhibition of the oscillatory regime in an actively Briggs-Rauscher mixture caused by the addition of aqueous extracts of soy flour. The effect consists in an immediate cessation of oscillations, but after

RINALDO CERVELLATI (*)
PASQUALE FETTO (*)

some time the oscillatory behavior is regenerated with amplitude and frequency of oscillations different from those observed in a 'blank' mixture. The inhibition time linearly depends on the concentration of substances contained in the extract. This phenomenon is due to the high free radicals scavenging activity of substances contained in the soy flour. These effects are a strong indirect evidence for the involvement of hydroperoxyl radicals in the Briggs-Rauscher reaction. These experiments are particularly suitable for undergraduate chemistry students in the physical chemistry and/or analytical chemistry laboratories, but we believe that they can be suited in pre-university schools with chemical or biological-chemical specialization. Finally, these experiments are part of a wider research work aimed to setting up a rapid and inexpensive test to measure the activity of antioxidants.

Introduzione

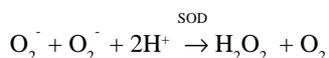
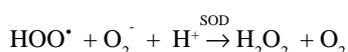
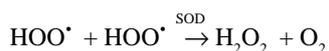
I radicali liberi, e cioè qualsiasi specie che possiede uno o più elettroni spaiati [1] sono attualmente molto popolari presso il grande pubblico. In tutti i periodici, e non solo quelli riguardanti la salute, si trovano numerose pubblicità di prodotti 'miracolosi' contro i 'radicali liberi' che vengono presentati come entità misteriose definite 'avversari da battere', 'mine vaganti', o con altri termini allarmanti dai quali risulta comunque chiaro che si tratta di entità perfide che occorre reprimere perché responsabili di fenomeni come la comparsa di rughe, la caduta dei

capelli, i prematuri segni di invecchiamento ecc.. In effetti, ben altri sono i danni che possono provocare i radicali liberi; essi sono infatti ritenuti responsabili di numerose forme patologiche molto gravi come ad es. la cataratta, l'arteriosclerosi, l'artrite reumatoide, certe forme di cancro e, non ultima, la peggiore malattia che affligge l'umanità e alla quale non si può sfuggire: la vecchiaia [1].

A parte i prodotti dietetici reclamizzati per contrastare gli effetti dei radicali liberi, è ovvio che l'attenzione dei ricercatori è concentrata sulla ricerca di sostanze ad alta efficacia nel reagire, 'neutralizzandoli', con i radicali liberi più dannosi per la salute.

Nel meccanismo che conduce agli andamenti oscillanti della reazione di Briggs-Rauscher (sistema costituito da acqua ossigenata, ioni iodato in ambiente acido, un substrato organico iodurabile e ioni Mn^{2+} come catalizzatore, di cui ci siamo già occupati in questa rivista [2]), sembra che il radicale idroperossile $HOO\cdot$ giochi un ruolo di notevole importanza [3]. D.A. Franz, in un articolo comparso nella rubrica 'tested demonstrations' del *Journal of Chemical Education* [4], ha riportato che l'aggiunta di una compressa di superossido dismutasi (SOD) per uso dietetico (un prodotto facilmente acquistabile in un qualsiasi drugstore americano, 2000 unità enzimatiche/compressa) finemente polverizzata, aggiunta a una miscela di Briggs-Rauscher in pieno regime oscillante fa cessare immediatamente le oscillazioni [4]. Nello stesso articolo, D.A. Franz sostiene che anche l'aggiunta di una quantità equivalente di SOD pura provoca lo stesso effetto. Poiché la superossido dismutasi è un enzima che catalizza la dismutazione del radicale idroperossile e della sua base coniugata, il ra-

dicale anione superossido O_2^- , secondo le reazioni



Franz trae la conclusione che le oscillazioni nel sistema BR cessano per effetto della SOD che 'blocca' i radicali liberi HOO^\bullet .

Gli esperimenti di D.A. Franz sono stati ripetuti più volte nel nostro laboratorio, ottenendo da un lato la conferma dell'effetto della compressa di SOD per uso dietetico, ma rilevando solo deboli effetti sull'ampiezza delle oscillazioni aggiungendo SOD pura fino a 11600 unità enzimatiche. Pertanto, D.A. Franz deve aver preso un abbaglio sostenendo che la SOD pura ha lo stesso effetto della compressa nelle oscillazioni del sistema di Briggs-Rauscher (reazione BR). In effetti il pH ottimale per l'azione della SOD è 4.8 [1], ben al di sopra del pH ($\cong 1$) della miscela oscillante BR. Pertanto qualche altra sostanza (o sostanze) contenuta nella compressa deve essere la principale responsabile degli effetti osservati.

Fra i riempitivi della compressa vi sono fibre di soia, ed è noto che l'incidenza di alcune malattie croniche è statisticamente inferiore nelle popolazioni asiatiche (la cui dieta è largamente basata su cibi a base di semi di soia) rispetto a quella nelle popolazioni europee e americane.

Pertanto è stato effettuato uno studio preliminare sugli effetti di un estratto acquoso di una compressa di SOD sulle oscillazioni di sistemi BR con risultati sorprendenti: 1 mL di tale estratto dapprima fa cessare il regime oscillatorio, ma dopo un certo tempo questo riprende con durata maggiore rispetto a una miscela di riferimento a cui l'estratto non viene aggiunto. Questi fenomeni si accentuano moltissimo se al posto dell'estratto acquoso della compressa si usa un estratto acquoso di farina integrale di soia [5]. E' chiaro che le ricerche continuano al fine di identificare le sostanze contenute nella soia che, come tutto fa pensare, devono possedere un'elevata attività antiossidante. Poiché tuttavia, quando è possibile e utile, riteniamo importante tra-

sferire i risultati della ricerca nella pratica didattica, lo scopo di questo lavoro è di proporre un'esercitazione di laboratorio per analizzare in modo semi-quantitativo gli effetti inibitori dell'aggiunta di un estratto acquoso di farina di soia sul regime oscillante della reazione BR.

Questa analisi mostrerà che l'attività di sostanze antiossidanti nel sottrarre radicali liberi dipende linearmente dalla loro concentrazione. Il lavoro rientra in un progetto di rinnovamento del programma del laboratorio di chimica fisica sia per l'università (primo livello) sia per gli istituti di istruzione secondaria superiore con indirizzi chimici e chimico-biologici.

Progetti di questo tipo si svolgono da tempo negli USA, finanziati in larga misura dalla Division of Undergraduate Education, Instrumentation and Laboratory Improvement Program della National Science Foundation [6].

Parte sperimentale

Materiali e strumentazione occorrenti

- Perossido di idrogeno (H_2O_2) al 35%
 - Iodato di potassio o di sodio (KIO_3 o $NaIO_3$) per analisi
 - Acido perclorico ($HClO_4$) al 70-72% per analisi
 - Acido malonico per analisi
 - Solfato di manganese (II) ($MnSO_4 \cdot H_2O$) per analisi
 - Sodio metabisolfito per uso fotografico
 - Farina integrale di soia (facilmente reperibile in confezioni da 500 g nei negozi di cibi naturalisti e vegetariani e anche in molti supermercati)
 - Vetreria (matracchi e pipette tarate, bechers, ecc.)
 - centrifuga
 - agitatore magnetico (microstirrer)
 - pHmetro con scala in mV con uscita per registratore a carta o asservibile a un PC
 - un elettrodo ionosensibile agli ioni I^- , oppure un elettrodo di platino
 - un elettrodo di riferimento ($Ag/AgCl$ o calomelano)
- (se si usa un elettrodo di platino combinato per misure redox, si può fare a meno dell'elettrodo di riferimento).

Preparazione delle soluzioni (quantità per 100 mL).

Soluzione A

In un matraccio tarato da 100 mL porre 40 mL di acqua distillata e aggiun-

gere lentamente e cautamente 39.5 mL di H_2O_2 al 35%. Portare a volume con acqua distillata. Questa soluzione è 3.6 M in H_2O_2 . *Usare guanti e occhiali di protezione poiché l'acqua ossigenata a questa concentrazione provoca gravi danni se viene a contatto con la pelle o con gli occhi.*(R:8-34. S:3-28-36/39-45).

Soluzione B

In un matraccio tarato da 100 mL porre 4.2800 g di KIO_3 (oppure 3.9578 g di $NaIO_3$), sciogliere e portare a volume con una soluzione di $HClO_4$ 0.1 M. (Per preparare 100 mL di $HClO_4$ 0.1 M, porre in un matraccio tarato 50 mL di acqua distillata e aggiungere lentamente e cautamente 0.85 mL di $HClO_4$ al 70-72%, portare a volume). Questa soluzione è 0.2 M in IO_3^- e circa 0.1 M in $HClO_4$. *Usare le stesse misure di sicurezza come per la preparazione della soluzione A* (R:5-8-35. S:23-26-36-45).

Soluzione C

In un matraccio tarato da 100 mL si pongono 1.5609 g di acido malonico (MA) e 0.3204 g di $MnSO_4 \cdot H_2O$. Sciogliere con acqua distillata e portare a volume. Questa soluzione è 0.15 M in MA e 0.02 M in Mn^{2+} .

Estratto acquoso di farina di soia (madre)

2 g di farina di soia vengono stemperati in 50 mL di acqua distillata. Il tutto viene tenuto sotto agitazione per 20 minuti. Il miscuglio viene poi centrifugato per circa 15 minuti a 10.000 giri. Prelevare il surnatante con un capillare Pasteur e raccogliere le varie porzioni in un unico matraccio da 50 mL. L'estratto è opalescente poiché una parte di sostanze amidacee resta in sospensione. NON portare a volume.

Procedimento sperimentale

Si deve anzitutto registrare il comportamento oscillante di una miscela BR di riferimento (cioè senza aggiunta di estratto).

A tale scopo porre in un becher da 50 mL, 10 mL di soluzione A e 10 mL di soluzione B. Mantenere il becher sotto agitazione e immergervi gli elettrodi opportunamente collegati al pHmetro. Aggiungere ora 10 mL di soluzione C e far partire immediatamente la registrazione.

Un esempio di registrazione è riportato in figura 1a.

Per verificare l'effetto dell'aggiunta dell'estratto acquoso di farina di soia si può procedere ad esempio come segue. Predisporre una miscela BR come quella di riferimento e, dopo aver registrato 2 o 3 oscillazioni, aggiungere rapidamente 1 mL di estratto acquoso di farina di soia. Si noterà che le oscillazioni cessano immediatamente, e ricominciano dopo più di 30 min. (figura 1b). Ora si possono preparare estratti di-

luti di farina di soia partendo dall'estratto madre. Ad esempio per preparare un estratto diluito 7:10 si prelevano 7 mL di estratto madre, si pongono in un matraccio da 10 mL e si porta a volume con acqua distillata. Per studiare l'effetto di tale estratto si procede come nel caso precedente avendo cura di agitare bene il matraccio da 10 mL prima di prelevare 1 mL da aggiungere alla miscela BR. La registrazione relativa a questa pro-

va è riportata in figura 1c.

Nelle figure 1d, 1e e 1f sono riportate le registrazioni relative agli effetti dell'aggiunta di 1 mL di estratto diluito rispettivamente 5:10, 3:10, 2:10.

Se si dispone di un certo numero di pH-metri/mV-metri, l'esercitazione può essere condotta per gruppi di studenti: ciascun gruppo eseguirà il test e avrà assegnata una o più diluizioni di estratto madre da saggiare.

Attenzione: al termine del regime

oscillante la reazione procede con decomposizione del prodotto iodurato (acido iodomalonic) per dare CO_2 e abbondante precipitazione di iodio 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 BR finali (lo iodio viene ridotto a I^- e si produce SO_2). Anche il becher da 50 mL deve essere lavato con la soluzione di metabisolfito e risciacquato con abbondante acqua. Quando la soluzione di metabisolfito non reagisce più con lo iodio (colore giallastro) si deve eliminare versandola in un recipiente contenente acqua e tale miscela può essere versata negli scarichi, facendo fluire abbondante acqua. Gli elettrodi devono essere tolti immediatamente al termine di ciascuna prova e risciacquati a lungo con acqua distillata, si raccomanda di asciugarli molto bene.

Elaborazione e interpretazione dei dati

Dalle registrazioni su carta (o attraverso il PC) è possibile determinare il tempo di inibizione, cioè il tempo che intercorre fra l'aggiunta dell'estratto e la ripresa delle oscillazioni. In tabella sono riportati i dati da noi ottenuti in una serie di sette prove.

La 'concentrazione' dell'estratto è

Tabella - Tempi di inibizione in funzione della concentrazione (in unità arbitrarie) dell'estratto di farina di soia. Concentrazioni iniziali in miscela come nella didascalia della figura 1.

t inib. /s	conc. estratto
7	0.05
88	0.1
300	0.2
520	0.3
930	0.5
1280	0.7
2100	1.0

espressa in termini di diluizione, ad es. 0.1 significa diluizione della madre 1:10, 0.2 diluizione 2:10 fino a 1.0 che sta per l'aggiunta di 1 mL dell'estratto madre. E' quindi un'unità 'arbitraria'.

Ponendo in grafico il tempo di inibizione in funzione della concentrazione, si nota che i punti sono ben

interpolati da una linea retta (figura 2). Vi è dunque una relazione lineare fra il tempo di inibizione e la concentrazione delle sostanze attive presenti nell'estratto. Si può quindi ritenere che tali sostan-

ze attive 'blocchino' i radicali HOO^\bullet facendo così cessare le oscillazioni. Quando le sostanze attive si sono esaurite, il sistema torna a produrre radicali e le oscillazioni ricominciano. Si potrebbe obiettare che la retta dovrebbe passare per lo zero: a concentrazione nulla di sostanze attive, tem-

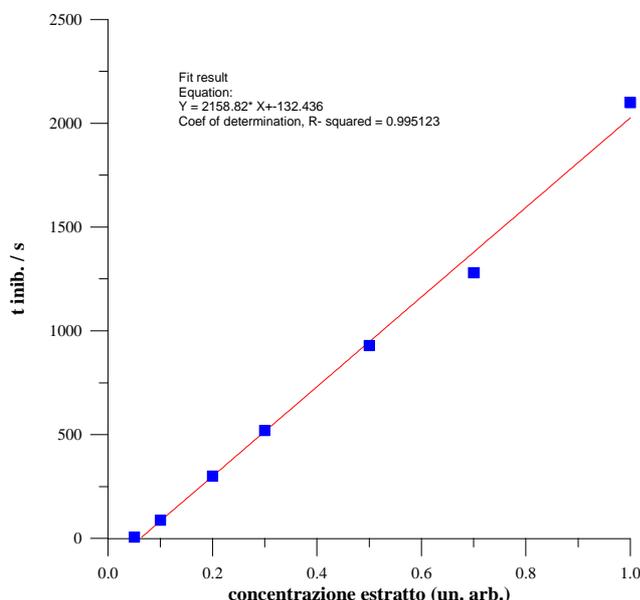


Figura 2. Grafico del tempo di inibizione in funzione della concentrazione dell'estratto di farina di soia.

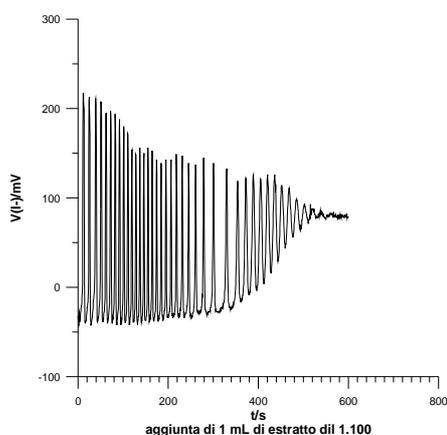


Figura 3. Registrazione della miscela BR (concentrazioni iniziali come nella didascalia di figura 1) a cui è stato aggiunto 1 mL di estratto di farina di soia diluito 1:100.

ze attive 'blocchino' i radicali HOO^\bullet facendo così cessare le oscillazioni. Quando le sostanze attive si sono esaurite, il sistema torna a produrre radicali e le oscillazioni ricominciano. Si potrebbe obiettare che la retta dovrebbe passare per lo zero: a concentrazione nulla di sostanze attive, tem-

rilevabile^(*). A sostegno di questa ipotesi è riportata, in figura 3, la registrazione relativa all'aggiunta di 1 mL di estratto diluito 1:100.

Come si può notare c'è ancora una lievissima inibizione, il cui tempo non è praticamente misurabile. Questa registrazione è inoltre sensibilmente diversa da quella della miscela di riferimento (figura 1a).

Alcune considerazioni finali

Come già detto i risultati ottenuti e discussi mostrano che la farina integrale di soia contiene una o più sostanze con buona attività di sottrattori ('scavengers') di radicali liberi idroperossili nella reazione BR.

La relazione lineare fra il tempo di inibizione e la 'concentrazione' delle sostanze attive fa inoltre ben sperare che la reazione oscillante di Briggs-Rauscher possa diventare un metodo semplice e poco costoso per determinare l'attività di sostanze antiossidanti. Naturalmente occorreranno lunghe ricerche per estrarre, isolare e caratterizzare le sostanze attive contenute nella soia. Stiamo appunto lavorando

^(*) Sotto tale soglia la retta dovrebbe curvare tendendo a zero al tendere a zero della concentrazione di sostanze attive nell'estratto.

in questa direzione.

Un'altra questione aperta è la ripresa del regime oscillante quando cessa l'azione dei sottrattori di HOO': la durata della fase di ripresa (generalmente maggiore di quella della miscela di riferimento) e la diversa forma e frequenza delle oscillazioni, che pure dipendono, anche se non linearmente, dalla 'concentrazione' dell'estratto può far pensare che la reazione fra lo (o gli) scavenger(s), conduce a uno (o più) prodotti iodurabili che funzionano come substrato organico per la reazione BR. Anche la verifica di questa ipotesi richiederà un paziente lavoro di ricerca.

Un suggerimento per coloro ai quali non piacesse esprimere la concentrazione in 'unità arbitrarie': si può por-

tere a secco un'aliquota misurata dell'estratto madre (preferibilmente usando un rotavapor) e pesare il residuo ottenuto. Conoscendo il volume totale dell'estratto madre se ne ricava così il 'peso secco' e si può quindi esprimere la concentrazione delle varie diluizioni in mg/mL. Occorre tuttavia avere ben chiaro che in questo 'peso secco' non sono contenute solo le sostanze attive ma anche amidi e glutini che inevitabilmente restano in sospensione anche dopo centrifugazione.

Infine, riteniamo di aver presentato un esperimento di laboratorio che illustra come si imposta e si conduce una ricerca scientifica e come, in base ai primi risultati ottenuti, si programmino gli sviluppi futuri.

Bibliografia

- [1] G. F. Pedulli, *Gli inibitori delle reazioni radicaliche*, relazione svolta al Convegno Celebrativo in onore dei Proff. Anna Maria Sechi e Carlo Alfonso Rossi dal tema 'Le ricerche della Facoltà di Farmacia: il ruolo della Chimica Biologica con particolare riguardo ai meccanismi radicalici' Accademia delle Scienze, Università di Bologna, 14/11/1995
- [2] P. Ambrogi, R. Cervellati, *CnS-La Chimica nella Scuola*, **XX**, 7-11 (1998)
- [3] S. D. Furrow, *J. Phys. Chem.*, **99**, 11131-11140 (1995)
- [4] D.A. Franz, *J. Chem. Educ.*, **68**, 57, (1991)
- [5] R. Cervellati, S.D. Furrow, G. Amadori, XXIX Congresso Nazionale di Chimica Fisica, Taormina, 5-9/10/1998, Libro dei Riassunti, pp. 94-95
- [6] J. A. Pojman, W. W. West, *J. Chem. Educ.*, **73**, 35, (1996)

EDICHEM99



Continua da pagina 19

e dei Direttivi che hanno immediatamente preceduto gli organi attualmente in carica; infatti i lavori della Conferenza misero in evidenza l'esistenza di un patrimonio cospicuo nel campo della ricerca didattica, di una grande attenzione ai mutamenti istituzionali in corso nella scuola italiana, di un forte impegno per pilotare la transizione, valorizzando la qualificazione professionale degli insegnanti, ed esaltando l'insostituibile funzione educativa della scuola pubblica. In quella Conferenza, e poi costantemente nell'anno trascorso, il punto di riferimento nel Direttivo per una difesa intransigente della professionalità dell'insegnamento della chimica è stato dato dall'attività della prof. Livia Mascitelli (Mascitelli.Livia@iol.it). Più in particolare, dal punto di vista 'organizzativo', fu chiaro fin da allora che agli interessi professionali - che favorivano un discorso comune - si andavano sommando quei rapporti intensi di amicizia e di fiducia personale che costituiscono la base indispensabile per la costruzione di una comunità. L'anno che è passato dall'incontro di Bologna ha confermato questa sensazione, e quindi il bilancio di attività che presento a nome del Direttivo ha diversi punti positivi.

Va ricordato innanzi tutto il Convegno "Insegnanti di qualità. I percorsi di formazione", organizzato a Trieste dal 3 al 5 maggio 1999, dal prof. Giacomo Costa (costa@dsch.univ.trieste.it), membro del nostro Direttivo. Dal Convegno emersero due indicazioni, in qualche modo contrastanti ma non inaspettate. Da una parte il lavoro di ricerca portava buoni risultati, e si andava consolidando la collaborazione con le altre Associazioni interessate alla didattica delle scienze, dall'altra la partecipazione diretta degli

insegnanti ai lavori del Convegno rimaneva al di sotto delle aspettative, dimostrando le difficoltà per la penetrazione nelle Scuole di un interesse diffuso verso la formazione professionale permanente. (Anche la diminuzione di iscritti che ha subito la Divisione è specchio di queste difficoltà). Ma dal Convegno ebbe origine anche un'iniziativa estremamente interessante, che nell'uso corrente all'interno della Divisione è ormai nota come 'Progetto Trieste'.

Si tratta di un progetto di ricerca che ha come tema generale "L'insegnamento della chimica nella nuova scuola dell'autonomia", e che si articola in modo più specifico nella formulazione di proposte sulla didattica per moduli, l'area di progetto, l'orientamento e la continuità. Dato che il successo del Progetto dipende dalla partecipazione diretta degli insegnanti della scuola secondaria il Direttivo ha ritenuto opportuno chiedere al Consiglio Centrale della SCI un finanziamento, destinato integralmente a favorire la mobilità dei colleghi che non hanno fondi propri, e alla produzione di materiale a stampa che raccolga gli esiti della ricerca. Con l'efficace mediazione del prof. Mario Anastasia, la nostra Divisione ha ottenuto un finanziamento di 5 milioni, rinnovabile per eguale ammontare sulla base dei risultati conseguiti. I partecipanti al progetto hanno già tenuto diverse riunioni, in cui ci si è dato anche un obiettivo concreto: la produzione di un fascicolo sulla didattica per moduli da portare al prossimo Congresso della SCI che si terrà a Rimini nel giugno 2000. Dai lavori del Progetto, fra l'altro, è emersa anche l'opportunità di stendere un protocollo che regoli la produzione dei moduli, in modo da orientare e favorire una delle procedure più interessanti della scuola dell'autonomia. Due Colleghe, professoresse Rosarina Carpignano (carpignano@ch.unito.it) e Fausta Carasso Mozzi (carassof@unive.it), hanno assunto

l'onere organizzativo del Progetto; ricordo che Carpignano è la nostra attenta tesoriera, e che Carasso Mozzi è stata recentemente cooptata nel Direttivo della Divisione.

Quasi contemporaneamente al Progetto Trieste si è sviluppato un secondo impegno della Divisione, nato nel Forum delle associazioni disciplinari della scuola, e perciò proprio nella prospettiva di collaborazione con le altre Associazioni a cui ho accennato all'inizio. Si tratta della messa a punto dei contenuti di chimica per la formazione scientifica nell'iter scolastico precedente l'istruzione terziaria. Il destinatario finale dell'elaborazione è il Ministero della P.I., di qui anche l'impegno della Divisione e la serietà del lavoro che è stato svolto. Dopo un'ampia consultazione fra i Soci è stata costituita una "Commissione Curricoli della Società Chimica Italiana-Divisione di Didattica", che a sua volta si è articolata in tre Commissioni di lavoro per formulare proposte corrispondenti ai segmenti attualmente previsti per l'iter scolastico, ovvero tre cicli di 7, 2 e 3 anni.

I lavori delle tre Commissioni sono coordinate rispettivamente dai professori R. Andreoli (andreoli@unimo.it), F. Olmi (f.olmi@fi.flashnet.it), e E. Niccoli (fatti@dcci.unipi.it). Per il primo ciclo si è convenuto che i contenuti di chimica non appaiano nei curricoli in forma esplicitamente disciplinare, situazione invece prevista per i cicli successivi. È evidente a tutti che la situazione di (eccessiva) fluidità in cui si trova tuttora la situazione istituzionale della scuola, con una collocazione ancora incerta dei tre anni della media dell'obbligo, ha reso e rende particolarmente difficile il lavoro dei Colleghi. Malgrado ciò, l'elaborazione è proceduta speditamente, e quando questa mia relazione andrà a stampa saranno disponibili i testi prodotti dalle tre Commissioni.