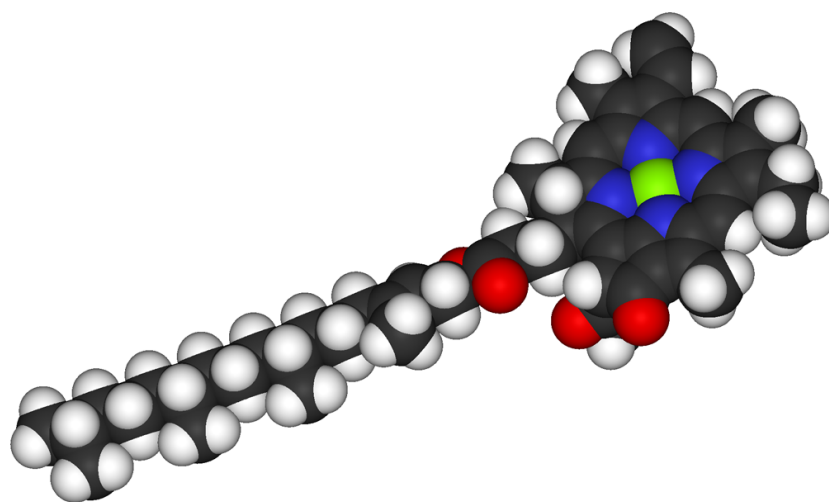


LAM DI CHIMICA

LE PROPRIETÀ ANTIOSSIDANTI DELLA CLOROFILLA

Maraya Wyss, 4E

LICEO DI LOCARNO



Professori Responsabili

Julia BERNASCONI

Mattia SABETTI

2023/2024

Figura 0.1: *Clorofilla 3D* [1]

Indice

Abstract	iv
Prefazione	v
1 Introduzione	1
2 Teoria	3
2.1 Le redox	3
2.1.1 Numero di Ossidazione	4
2.1.2 Potenziali redox	5
2.2 I radicali liberi	6
2.2.1 Ossigeno come radicale	7
2.2.2 Stress Ossidativo	8
2.2.3 Come si formano i radicali liberi	9
2.2.4 Il DPPH	11
2.3 Gli antiossidanti	14
2.3.1 Classificazione degli antiossidanti	15
2.3.2 Valutazione del potere antiossidante	18
2.4 Cosa è la clorofilla?	19

<i>INDICE</i>	iii
2.4.1 Formule e strutture chimiche della clorofilla	21
2.4.2 Proprietà della clorofilla	22
2.4.3 I derivati della clorofilla	25
2.4.4 Metallo-clorofille: la clorofillina rameica	26
2.4.5 Le forme di clorofilla presenti sul mercato	28
2.5 Meccanismo di reazione tra DPPH e clorofilla	28
2.6 Spettrofotometria	29
2.6.1 Struttura degli spettrofotometri	30
2.6.2 Legge di Beer-Lambert	31
3 Esperimenti	33
3.1 Estrarre la clorofilla dagli spinaci	33
3.2 Quantificare la concentrazione di clorofilla	35
3.3 Dimostrare le proprietà antiossidanti utilizzando una soluzione con DPPH	36
4 Risultati	38
4.1 Prima fase sperimentale	38
4.2 Seconda fase sperimentale	39
5 Discussione	44
6 Conclusione	50
7 Sviluppi futuri	52

Abstract

Assumendo che la clorofilla sia un pigmento con capacità antiossidanti, sono stati svolti esperimenti con l'obiettivo di quantificare il potenziale antiossidante. Esso è stato confrontato poi con altri integratori di clorofilla reperibili sul mercato, contenenti clorofillina semisintetica, per determinare se è effettivamente necessario integrare il pigmento già presente nell'alimentazione.

Innanzitutto è stata quantificata la clorofilla totale presente negli spinaci. In seguito sono state eseguite delle misurazioni allo spettrofotometro per calcolare l'inibizione del radicale DPPH in modo da misurare la capacità antiossidante delle sostanze analizzate. Da questi esperimenti si è potuto dedurre che le clorofilline semisintetiche presenti negli integratori possiedono 5 volte la capacità antiossidante della clorofilla proveniente dagli spinaci, il cui potenziale antiossidante è unicamente pari a 4,95% per una concentrazione di $5,07 \cdot 10^{-8}$ M, dopo 30 minuti.

In aggiunta, i due tipi di integratori sono stati analizzati in due solventi diversi dimostrando che il solvente usato influenza in modo significativo la capacità antiossidante. Questo dimostra come le interazioni intermolecolari tra soluto e solvente influenzano le molecole e di conseguenza la loro attività, che sarà diversa.

Prefazione

Ho scelto di fare questa Lavoro di Maturità con l'idea di occuparmi della cosiddetta *droga* di Hollywood, cioè *Ozempic*, un medicamento spesso utilizzato da persone famose per la perdita di peso. Informandomi però ulteriormente su affermazioni scientifiche spesso ritenute veritiere senza fondamenti sperimentali, ho incontrato un'enorme frenesia sui *social media* nei confronti della clorofilla. Essa infatti è considerata un *superfood*, attribuendole infatti molteplici benefici per la salute. Fin da subito questo argomento ha attirato la mia attenzione, anche se ero molto scettica riguardo alla credibilità che una singola molecola possa causare così tanti benefici. Attraverso il lavoro di ricerca sono riuscita a smentire i miei dubbi, confermando infatti la capacità del diminuire la presenza di radicali liberi *in vitro* di un semplice pigmento già presente nella nostra alimentazione. Allo stesso tempo però sono riuscita a concretizzare il mio pensiero critico e la mia capacità di interpretare i risultati ottenuti, tenendo conto anche degli errori sperimentali.

Grazie alla stesura del Lavoro di Maturità sono riuscita a riconfermare il mio interesse nel settore scientifico, motivandomi a proseguire gli studi universitari in ambito della biochimica o della biomedicina.

Vorrei ringraziare i docenti responsabili Mattia Sabetti e Julia Bernasconi, per aver proposto questo Lavoro di Maturità e per avermi seguita durante il svolgimento di esso, soprattutto durante la parte pratica. Vorrei inoltre ringraziare mio fratello per avermi aiutato a risolvere i problemi tecnici di \LaTeX e i miei compagni per avermi supportato nei momenti di difficoltà.

Capitolo 1

Introduzione

Nella società moderna, lo stile di vita viene sempre più influenzato dai *social media*, spingendoci a seguire tendenze e nuove pratiche senza comprendere appieno la loro validità scientifica. Infatti, la visibilità di prodotti e marche attraverso piattaforme come *Instagram* e *TikTok*, può generare velocemente tendenze di consumo che vanno a influenzare la quotidianità dell'essere umano. Questo fenomeno può essere dannoso visto che chiunque, anche coloro con meno capacità di discernimento, può accedere a *Internet*, rimanendo esposto a una vasta gamma di informazioni, spesso contraddittorie e non sempre basate su solide basi scientifiche, causando così disinformazione. La situazione diventa estremamente critica quando vengono fatte delle affermazioni su presunti benefici salutari di una qualche pratica.

Negli ultimi anni, su varie piattaforme di social network, è spopolato il *Trend* di bere clorofilla diluita in acqua in quanto si presume possa portare a miglioramenti nella condizione della pelle, stimoli la perdita di peso, contrasti gli odori corporei sgradevoli e offra benefici dovuti alle sue proprietà antiossidanti [2] [3]. Infatti cercando l'hashtag *#chlorophyll* su *TikTok*, si trovano tantissimi *influencer* e guru del benessere che usano gocce verdi per infondere la loro acqua con la clorofilla [4]. Visto che si tratta di un integratore che promette una vasta gamma di benefici molte persone comuni lo provano, senza comprenderne i rischi.

Il consiglio di integrare la clorofilla tramite appositi supplementi ha guadagnato sempre più popolarità, benché sia già presente nelle nostre diete attraverso il consumo di vegetali a foglia verde. Il fenomeno ha attirato soprattutto l'attenzione di numerosi *influencer*, i quali promuovono l'assunzione di integratori di clorofilla senza una valutazione accurata degli effetti promessi, spesso tralasciando anche informazioni riguardo agli effetti negativi, di cui si sa ancora poco. Questo solleva preoccupazioni non solo in termini di sicurezza, dovuta alla mancata certezza riguardo al dosaggio

corretto, ma anche per il rischio di trascurare un'alimentazione equilibrata. Inoltre, poiché l'efficacia degli integratori e i relativi effetti collaterali non sono ancora sufficientemente studiati, potrebbero rivelarsi essere una spesa inutile di soldi. Infatti gli integratori a base di clorofilla, insieme a molti altri, sono estremamente costosi e, data l'incertezza sulla loro efficacia, potrebbero rappresentare una spesa superflua.

Sarebbe sbagliato però sostenere che la reputazione della clorofilla come integratore per la salute e il benessere sia una cosa nuova, anzi, si tratta di una pratica esistente da molti decenni che solo recentemente ha suscitato interesse su *TikTok*. Infatti, già da tanto tempo si parla dei benefici per la salute, tra cui la prevenzione del cancro, la guarigione delle ferite, cura della pelle, trattamento dell'acne, perdita di peso, controllo dell'odore corporeo, aumento dell'energia, alleviare la stitichezza e i gas. Czerwony mette però in guardia dal considerarla una cura per tutti i problemi citati, infatti dice [4]:

”Se qualcosa funzionasse davvero per tutte queste cose, è sicuro che non sarebbe un segreto nuovo appena esposto al mondo attraverso *TikTok*. C'è motivo per cui si è scettici.”

L'obiettivo di questo LaM è dunque di verificare *in vitro* uno dei tanti benefici presunti, cioè se effettivamente la clorofilla possiede effetti antiossidanti e se gli integratori presenti sul mercato siano più efficaci della clorofilla naturale contenuta nella frutta e verdura a foglia verde.

Capitolo 2

Teoria

2.1 Le redox

In questo lavoro di ricerca sono di estrema importanza la clorofilla e il DPPH, sostanze che verranno descritte nei capitoli successivi. Si tratta di due tipi diversi di molecole, ossia gli antiossidanti e i radicali liberi, che interagiscono tra di loro attraverso reazioni di ossidoriduzione, comunemente note come reazioni redox. Queste reazioni coinvolgono due semi-reazioni che avvengono simultaneamente: l'ossidazione e la riduzione. Durante queste reazioni, avviene una modifica dello stato di ossidazione dei reagenti [5]. Nel 1862, Lavoisier definì la reazione di ossidazione come quella che comporta un aumento del contenuto di ossigeno nella molecola, mentre la riduzione come la reazione che comporta una perdita di ossigeno. Attualmente, le reazioni redox sono considerate processi in cui degli elettroni vengono trasferiti tra due reagenti, portando alla formazione di nuove composizioni strutturali di molecole. Più in specifico nell'ossidazione e, rispettivamente nella riduzione, un reagente perde o acquista uno o più elettroni.

Una semi-reazione può riguardare la parte ossidativa o quella riduttiva. Nella parte ossidativa, si verifica una perdita di elettroni da parte di una specie chimica, pertanto essa agisce come agente riducente durante la reazione. Questa perdita di elettroni comporta un aumento del numero di ossidazione degli atomi o ioni che compongono la molecola, parliamo dunque di un'ossidazione. D'altra parte, nella parte riduttiva, si verifica un acquisto di elettroni da parte dell'altra molecola coinvolta nella reazione, e quindi essa agisce come agente ossidante. In questo caso, la molecola si riduce e il numero di ossidazione dei propri atomi diminuisce [5]. È importante specificare che non sempre tutti gli atomi di una molecola subiscono una variazione del numero di ossidazione. Spesso infatti gran parte di atomi di una molecola non subiscono

nessuna variazione del proprio numero di ossidazione, che rimane dunque invariato nel corso della reazione redox.

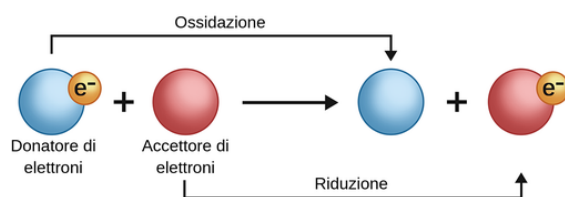


Figura 2.1: *Schema delle reazioni redox* [6]

È fondamentale sottolineare che le due reazioni, ossidazione e riduzione, si verificano sempre contemporaneamente, e quindi non può avvenire una riduzione senza una corrispondente ossidazione. In altre parole per una sostanza che provoca l'ossidazione, dunque l'agente ossidante, ce n'è un'altra, il riducente, che ossidandosi provoca la riduzione della prima sostanza (figura 2.1). Inoltre, come accade nelle reazioni acido-base, l'ossidante o il riducente più forte deve essere presente all'inizio della reazione, altrimenti la reazione non avrà luogo. Questa non è l'unica somiglianza tra i due tipi di reazione; infatti, anche nelle reazioni redox, l'equilibrio di reazione è spostato verso il lato dei riducenti o degli ossidanti più deboli. Inoltre, è importante notare che più un riducente è forte, più la sua coppia ridotta sarà debole e viceversa anche per gli ossidanti. Ogni molecola in una reazione redox fa parte di una coppia redox con la sua forma ossidata o ridotta, dunque possiedono una simile formula chimica che risulta diversa per il numero di ossidazione di un atomo [7]. Dunque, in una reazione redox, sono sempre presenti almeno due coppie redox che interagiscono tra loro.

2.1.1 Numero di Ossidazione

Non è stato possibile riconoscere un marcatore dell'avvenimento delle reazioni redox fino alla scoperta dell'elettrone nel 1897. Solo allora fu chiaro che queste reazioni comportavano una redistribuzione degli elettroni, dovuta a una differenza di elettronegatività tra due atomi coinvolti in un legame, che condividono i così detti elettroni di legame. Tra di essi ce ne era uno che attraeva fortemente gli elettroni, dunque propenso a ridursi essendo più elettronegativo, mentre l'altro subiva l'ossidazione essendo meno elettronegativo [7]. Per identificare una reazione di ossidoriduzione, si guarda dunque se avviene una variazione nel numero di ossidazione di un atomo nel corso della reazione. Il numero di ossidazione rappresenta infatti lo stato di ossidazione di un atomo ed è calcolato seguendo regole convenzionali basate sull'elettronegatività.

Il numero di ossidazione viene assegnato a ogni atomo di una molecola rispetto al suo stato elementare, guardando i legami che possiede all'interno della molecola. Gli elettroni di legame vengono distribuiti in modo che vadano a finire sul atomo di legame più elettronegativo. Quando due atomi hanno elettronegatività equivalente, gli elettroni di legame sono divisi equamente. Questo numero è fondamentale per comprendere la reattività di una sostanza, la distribuzione spaziale degli elettroni e la nomenclatura delle molecole. Inoltre, un atomo può avere diversi numeri di ossidazione in base al solvente in cui si trova, essendo che i legami intermolecolari tra il soluto e il solvente possono essere diversi [8]. Ogni volta che si forma un nuovo legame, il numero di ossidazione di un atomo può cambiare. Dunque per verificare la presenza di un'ossidazione il numero di un determinato atomo deve aumentare, mentre nel caso si una riduzione il numero di ossidazione dell'atomo diminuisce.

2.1.2 Potenziali redox

Studiando le molecole e come reagiscono, è emerso l'interesse di poter controllare e prevedere in modo preciso il funzionamento delle reazioni. È dunque essenziale sviluppare una scala che permetta di prevedere le reazioni possibili e non. Questa scala, determinata tramite la misurazione del potenziale elettrico, confronta la tendenza delle diverse molecole a ridursi rispetto un elettrodo di riferimento, solitamente si tratta di idrogeno. Grazie ai dati sperimentali si è determinata la differenza di potenziale di riduzione. Essa è specifica per coppia redox ed è chiamata *potenziale standard* E° e viene misurato in condizioni standard [8].

Più il potenziale è alto, maggiore è la propensione della molecola a ridursi nella presenza della coppia redox dell'idrogeno (H^+ / H_2). Grazie alla tabella di dati, ottenuta sperimentalmente, è possibile confrontare due molecole e determinare quale agirà da ossidante, avendo un potenziale redox maggiore, e viceversa quale si ossiderà [8]. Permette inoltre di prevedere l'avvenimento di una reazione, visto che le reazioni avvengono solo se i prodotti hanno un potenziale redox inferiore rispetto ai reagenti, favorendo la reazione diretta.

Ad esempio, nella fotosintesi, la clorofilla presente nel fotosistema II, nota come P680, ossidandosi diventa $P680^+$, specie avente un potenziale elettrico di 1,3 V [9]. Questo la rende uno degli agenti ossidanti biologici più potenti conosciuti, permettendo l'ossidazione dell'acqua durante la fotosintesi, producendo ossigeno. Al contrario, nel fotosistema I si trova il più potente agente riducente biologico: il pigmento P700, il quale presenta un potenziale di -1,2 V.

2.2 I radicali liberi

I radicali liberi sono delle specie chimiche, o dei frammenti di una molecola [10], in grado di esistere in modo indipendente, che possiedono un elettrone non accoppiato nel orbitale atomico più esterno [11]. Di conseguenza queste molecole sono altamente reattive e spesso estremamente instabili [12]. I radicali sono continuamente alla ricerca di una molecola a cui legarsi per poter rigenerare la coppia di elettroni e diventare più stabili [11]. Il loro elettrone spaiato viene convenzionalmente rappresentato, in ambito chimico, come un punto in apice: R^\bullet . Questa categoria di molecole è in grado di donare un elettrone o di accettarne uno, risultando capace sia di agire come ossidante che come riducente. I radicali sono dunque coinvolti nelle reazioni redox [10], e hanno un ruolo importante nella generazione di patologie nel corpo umano. Anche se per molto tempo si pensava che la reattività dei radicali e la reversibilità delle reazioni redox, ne escludesse l'esistenza in organismi viventi [13]. Visto che i radicali hanno una natura evanescente¹ e una durata di vita corta (misurata in frazioni di secondi) risulta difficile condurre esperimenti che danno un risultato chiaro [10]. Un ulteriore ostacolo è rappresentato dalla difficoltà di condurre esperimenti in *in vivo*, visto che i radicali sono presenti solo in basse concentrazioni e solo in vicinanza del loro punto di formazione.

Durante la reazione di un radicale con una molecola non radicale potrebbero originarsi molecole radicali a partire da molecole non radicali. Questi potrebbero indurre a loro volta una reazione a catena in grado di generare diversi danni, dovuti alla loro formazione, anche lontani dal suo sito di origine del radicale iniziale [13].

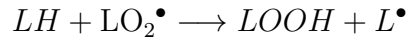
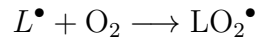
Queste reazioni si suddividono in (per facilitare la lettura la molecola segnata con L è la molecola con caratteristiche antiossidanti, mentre la molecola R un radicale) [14]:

1. Iniziazione:

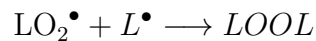
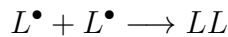


¹Molecole che possono cambiare rapidamente, rendendo difficile la loro osservazione o comprensione

2. Propagazione:



3. Terminazione: avviene una reazione di dismutazione, che può avvenire non catalizzata con una velocità di reazione bassa o catalizzata dall'enzima superossido dismutasi [10]:



In biochimica, i radicali liberi più importanti sono il radicale idrossile (OH^{\bullet}), il superossido ($O_2^{-\bullet}$), il perossido di idrogeno (H_2O_2), l'ipoclorito (ClO^-) e il radicale ossido nitrico (NO^-) [11]. Spesso si considera anche l'ossigeno (O_2) un radicale, come verrà approfondito nel capitolo 2.2.1. Inoltre, anche i metalli di transizione vengono spesso considerati dei radicali visto che sono responsabili per la generazione del superossido.

2.2.1 Ossigeno come radicale

L'ossigeno è strettamente legato alle condizioni di vita aerobiche e rappresenta una componente indispensabile per il metabolismo delle cellule, dunque della loro vitalità. Allo stesso tempo però presenta un potenziale aspetto dannoso e tossico, a causa delle sue caratteristiche paramagnetiche [12]. L'ossigeno molecolare possiede infatti due elettroni non appaiati nei suoi due orbitali più esterni e viene dunque spesso considerato un di-radicalo, cioè una molecola neutra, pronta a donare o accettare un elettrone da un radicale [10].

Reagisce molto velocemente quando viene trasformato metabolicamente, dando origine a intermedi di reazione parzialmente ossidati molto reattivi, cioè dei radicali liberi indicati come specie reattive all'ossigeno (*ROS*). Si tratta di una serie di radicali che si formano tramite reazioni che seguono nella pagina successiva [12]:

- Radicale superossido: $O_2 + e^- \longrightarrow O_2^{-\bullet}$
- Perossido di idrogeno: $O_2^{-\bullet} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$
- Radicale idrossile: $H_2O_2 + e^- + H^+ \longrightarrow OH^\bullet + H_2O$
- Neutralizzazione: $OH^\bullet + e^- + H^+ \longrightarrow H_2O$

Le sostanze che sono neutre, ma sono derivati intermedi coinvolti nella produzione di radicali ossigenati, rientrano nelle specie reattive all'ossigeno, un esempio è il perossido di idrogeno H_2O_2 . Questa molecola risulta essere molto reattiva e la sua reattività è dovuta all'atomo di ossigeno, pur essendo complessivamente neutra. La terza reazione, di quella indicate sopra, (2.2.1) viene catalizzata dagli ioni dei metalli di transizione come il ferro, il rame e il cromo. Essi, donando elettroni, promuovono la produzione di radicali idrossilici dal perossido di idrogeno. Si tratta delle reazioni di Fenton [15].

Le sostanze reattive all'azoto (*RNS*)

Sono sostanze reattive all'azoto (*RNS*), come l'ossido nitrico (NO), il biossido di azoto (NO_2^-), come anche il perossinitrito ($ONOO^-$), il nitrosoperossicarbonato ($ONOOCO_2^-$) e gli ioni nitronio (NNO_2^+). Esse si generano in piccole quantità durante processi cellulari come il rilassamento muscolare e la fagocitosi [12]. L'ossido nitrico ha infatti un ruolo significativo nella segnalazione cellulare e nella risposta immunitaria [16]. La molecola viene considerata un radicale, anche se priva di carica, essendo altamente reattiva a causa dell'elettrone spaiato che presenta [17]. Come vedremo più avanti anche il DPPH rientra in questa categoria.

2.2.2 Stress Ossidativo

Il termine stress ossidativo si riferisce alla situazione di squilibrio tra la produzione di radicali liberi e la presenza di antiossidanti. Si crea dunque uno sbilanciamento dell'equilibrio nell'organismo, dovuta principalmente a un'elevata presenza di *ROS* [12]. Finora non è stata formulata una vera definizione univoca di cosa è lo "stress ossidativo". Una definizione del concetto stress ossidativo accettata nell'ambito della biochimica è la seguente: "Uno squilibrio tra ossidanti e antiossidanti a favore degli ossidanti, che porta all'interruzione della segnalazione delle redox, dovuta alla interruzione della fosforilazione, e al controllo del danno del molecolare all'interno del sistema" [18].

Questa condizione di sbilanciamento dell'omeostasi delle redox causa vari danni a diverse biomolecole, come lipidi e proteine, visto che i radicali liberi ossidano le macromolecole provocando cambiamenti nella loro struttura, e consecutivamente nella funzione.

Uno stress ossidativo temporaneo può essere dovuto a un eccesso di sport o a infezioni. In questo caso i tessuti lesi producono un quantità maggiore di enzimi, che generano radicali, l'attivazione dei fagociti o l'interruzione delle catene di trasporto degli elettroni della fosforilazione ossidativa, producendo un eccesso di *ROS*. Il cancro, come anche il Parkinson, il diabete mellito e altre malattie neuro-degenerative si ipotizza siano dovute alla eccessiva presenza di *ROS* che causano uno stravolgimento del sistema di difesa antiossidante, causando nel peggiore dei casi la morte cellulare.

2.2.3 Come si formano i radicali liberi

I radicali liberi possono formarsi in due modi differenti [10]. Generalmente sono il risultato di un trasferimento di elettroni (equazione 2.1), che può consistere nella perdita o aggiunta di un singolo elettrone a una molecola. I radicali liberi possono anche formarsi per rottura omolitica (equazione 2.2) di un legame covalente, vale a dire che ogni atomo mantiene uno degli elettroni di legame. La fissione omolitica richiede in genere un'elevata quantità di energia. Essa può essere fornita portando la sostanza ad altre temperature, tramite radiazioni ultraviolette (UV) o ionizzanti. La fissione avviene meno rispetto al trasferimento di elettroni, che risulta essere più comune nei sistemi biologici. I radicali liberi dunque possono essere sia caricati positivamente, sia negativamente che elettricamente neutri, come l'ossigeno che possiede due elettroni non accoppiati.



Come si generano nel corpo umano?

I radicali liberi possono prodursi sia a causa di fattori esogeni, come un'eccessiva esposizione a radiazioni ultraviolette, intossicazione chimica, abuso di farmaci o uso di sostanze cancerogene, ma anche da fattori endogeni, legati soprattutto ai processi

metabolici del corpo umano [11]. Infatti, nel corpo umano si generano continuamente radicali liberi a causa di reazioni controllate che appartengono al normale metabolismo della cellula, ma anche in modo deliberato, ad esempio durante la fagocitosi e in caso di infiammazioni. Per esempio, la respirazione cellulare è un processo redox che avviene nel mitocondrio. Esso genera, soprattutto a causa dell'attività del citocromo P450, sostanze legate all'ossigeno molecolare molto reattive come il superossido [10]. Ma gli esempi sono molti di più visto che in quasi tutte le reazioni del normale metabolismo, che spesso risultano essere delle reazioni redox, si generano diverse molecole *ROS*, come i radicali intermedi con un ossigeno parzialmente ridotto. Spesso però questi intermedi sono strettamente legati al sito attivo degli enzimi e sono così rivolti a un bersaglio specifico [13]. Infatti, l'enzima necessita della caratteristica radicalica nel suo sito attivo per poter svolgere la propria funzione, ma generalmente la loro concentrazione è controllata da una difesa antiossidante efficace, non causando danni eccessivi alla cellula [12].

Con l'avanzare dell'età vi è un maggiore accumulo di radicali, essendovi una produzione progressiva, che vanno a conferire cambiamenti nelle cellule dell'essere umano. I cambiamenti sono però anche influenzati da differenze ambientali, di stile di vita e predisposizioni genetiche che insieme alla presenza elevata di radicali liberi, aumentano il rischio di, ad esempio, cancro o arteriosclerosi [11].

La sovrapproduzione di radicali, dovuta principalmente all'età e a fattori esogeni, compromette le difese antiossidanti (capitolo 2.3.1). Gli antiossidanti non riescono più a limitare i danni ossidativi, di conseguenza si ha una distruzione ossidativa di membrane cellulari, causando gravi danni a tessuti corporei [10]. L'organismo è in una situazione di stress ossidativo, visto che c'è un forte sbilanciamento tra le due molecole che reagiscono insieme.

Danni che causano

I radicali liberi, soprattutto le specie reattive *ROS* cioè i radicali più importanti, sono così reattive che sono in grado di attaccare macromolecole biologiche, provocando gravi danni alla cellula, disturbandone anche l'omeostasi. Alcuni danni possibili sono una perdita di compartimentazione, accumulo di mutazioni e modifiche strutturali delle proteine. Tutti questi sono causati da ossidazioni avvenute su [11]:

- Membrane lipidiche della cellula: le ossidazioni causano una perossidazione dei lipidi, la cui conseguenza è una perdita di fluido interno, così la membrana perde anche la sua funzione
- Proteine, causando la denaturazione o la disattivazione

- Basi azotate, e occasionalmente anche il desossiribosio, degli acidi nucleici causando mutazioni a livello genetico [19]
- Carboidrati, compromettendo funzioni cellulari associate a, ad esempio, prostaglandine e neurotrasmettitori [12]

2.2.4 Il DPPH

Dato l'enorme interesse nel comprendere gli antiossidanti, in particolare quelli in grado di prevenire i presunti effetti negativi dei radicali liberi nell'organismo umano e a impedire il deterioramento dei grassi e di altri alimenti [20], si è cercato un metodo rapido e accurato per valutare le capacità antiossidanti di diverse composti.

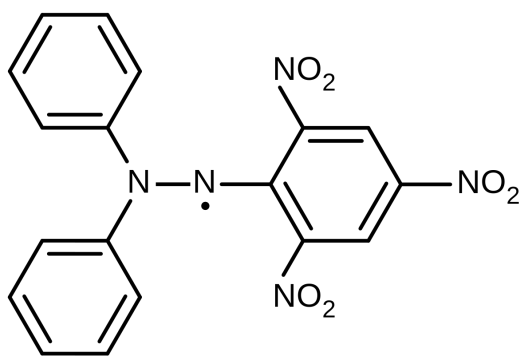


Figura 2.2: Il DPPH [21]

Uno dei metodi più popolari, proprio per la sua semplicità, è il saggio del DPPH, abbreviazione comune per la molecola 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Esso fa uso del composto organico azotato diphenylpicrylhydrazyl, un radicale libero particolarmente adatto a questa tipologia di analisi essendo molto stabile, anche in soluzioni acquose. La sua idoneità deriva inoltre dal fatto che agisce come un indicatore sensibile di attività antiossidante sia in modo quantitativo, essendo possibile misurare un valore preciso attraverso uno spettrofotometro, che qualitativo, visto che con la perdita di elettroni cambia colore.

Di conseguenza, dopo un'attenta valutazione delle diverse alternative a mia disposizione, ho concluso che l'uso del metodo del DPPH rappresentasse la scelta più appropriata per il lavoro di maturità. Questa decisione è stata motivata anche dalla suo largo utilizzo tra ricerche precedenti nell'ambito dello studio degli antiossidanti, fornendo così una solida base per i miei esperimenti.

Il radicale DPPH fu scoperto nel 1922 da Goldsmith e Renn [22]. Mentre il metodo dell'uso del DPPH fu usato per la prima volta da Marsden Blois, nel 1985 [23]. Esso prevede l'uso di uno spettrofotometro in grado di rilevare le lunghezze d'onda assorbite dal campione. Il metodo da lui individuato viene usato tuttora da numerosi ricercatori, anche se alcuni hanno eseguito delle leggere modifiche per aumentare l'efficacia.

Nel commercio il DPPH è spesso disponibile come una miscela di fasi di polvere cristallina scura. Le diverse fasi cristalline si differenziano per la simmetria del reticolo cristallino.

Struttura del DPPH

Il DPPH (2,2-difenil-1-picrylhydrazyl) è categorizzato come un radicale libero stabile. La sua stabilità è dovuta a un elettrone non accoppiato sul azoto delocalizzabile all'interno di tutta la molecola, che permette alla molecola di possedere diverse forme di risonanza (figura 2.3). Questa caratteristica causa anche il tipico colore viola scuro della molecola. La delocalizzazione degli elettroni genera una distribuzione equa sui diversi legami tra gli atomi di azoto, di conseguenza questi risultano di ordine maggiore e dunque più stabili visto che riescono a completare maggiormente la loro mancanza di elettroni di legame nell'orbitale esterno. La molecola necessita di una maggiore energia di attivazione per reagire.

Essendo che l'elettrone si trova sull'azoto la molecola rientra nel gruppo di sostanze reattive sul azoto *RNS* (capitolo 2.2.1). Infatti la sua reattività è data dalla caratteristica radicale libero idrazilico [21].

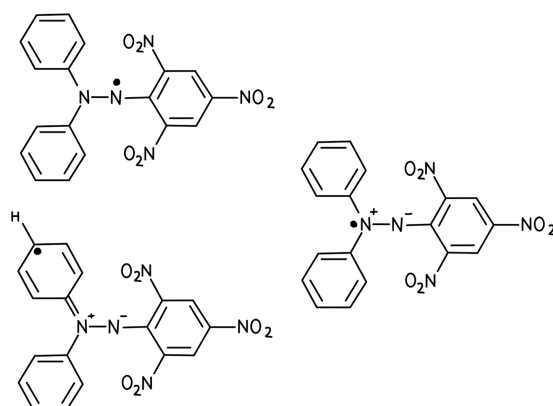


Figura 2.3: *Diverse forme di risonanza del DPPH*

La struttura di Lewis della figura 2.2 rappresenta il DPPH. Esso è costituito da una parte di molecola derivata dalla difenilammina, una derivata dall'anello picrilico e infine il radicale idrazilico (figura 2.4).

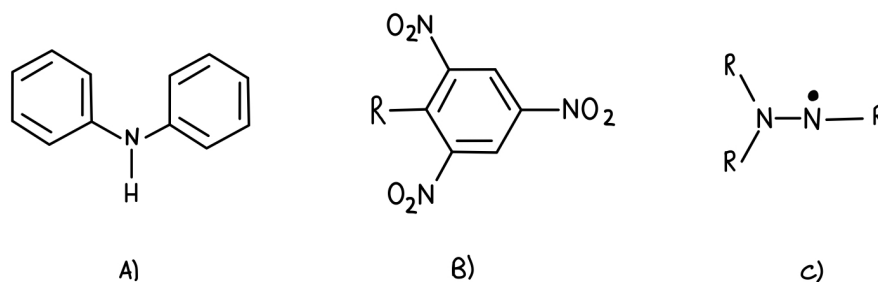


Figura 2.4: A) *Difenilammina*, B) *anello picrilico*, C) *radicali idrazilico*

Caratteristiche del DPPH

Durante la reazione con una sostanza che possiede capacità antiossidanti il DPPH si riduce nella corrispondente idrazina DPPH-H (2,2-difenil-1-picrylhydrazine). Questo grazie all'acquisizione di un elettrone che va a completare il doppietto sull'orbitale esterno dell'azoto, o grazie a un nuovo legame con un atomo di idrogeno proveniente dal solvente [24]. Il DPPH possiede infatti un potenziale redox sufficientemente alto da ossidare maggior parte degli antiossidanti naturali [25], ma anche quelli sintetici. Infatti il DPPH tende ad accettare un elettrone o un radicale idrogeno diventano una molecola stabile, ma può anche essere ossidato, processo che richiedendo molta energia, è irreversibile.

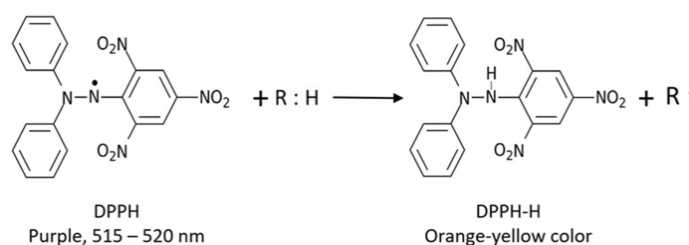


Figura 2.5: *Reazione del DPPH* [26]

Il DPPH è comunemente usato per valutare la capacità antiossidante dei composti, dato che nel corso della reazione con una molecola donatrice perde la sua colorazione viola diventando giallo chiaro, a causa del gruppo picrilico ancora presente [20]. Questa proprietà permette di misurare spettrofotometricamente un cambiamento di assorbanza attorno ai 517nm [27]. Con i valori ottenuti si è poi in grado di quantificare, attraverso dei calcoli, la capacità antiossidante del composto analizzato. L'intensità della decolorazione è invece solo un'indicazione aggiuntiva, puramente qualitativa, della capacità antiossidante del composto in prova.

Gli antiossidanti sono in grado di reagire con il DPPH due modi diversi [21]:

- Sostituzione nucleofila (figura 2.6): in questo caso si deve confrontare il potenziale redox. Nel caso in cui il radicale ossida il substrato, si genera un

radicale libero instabile. Se, contrariamente a prima, il substrato possiede un potenziale redox maggiore, vi è la possibilità che avvenga un attacco nucleofilo all'anello picrilico.

- Meccanismo radicalico libero (figura 2.7): questo tipo di reazione avviene quando si accoppia un radicale libero con un altro radicale libero. In questo caso si ottiene un composto p-fenilico.

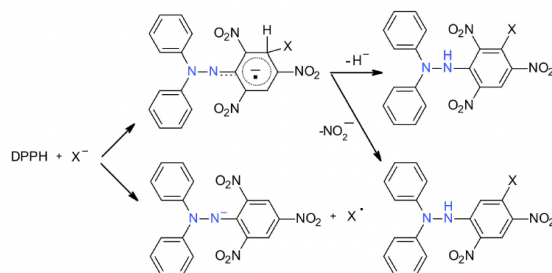


Figura 2.6: Meccanismo di reazione del DPPH con un nucleofilo X^- [21]

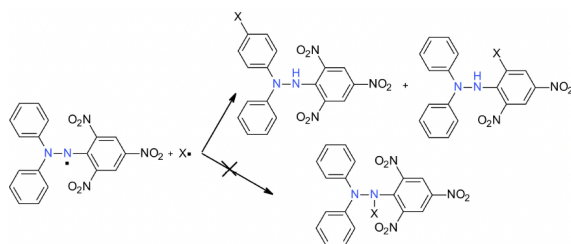


Figura 2.7: Meccanismo di reazione del DPPH con un radicale libero X^\bullet [21]

Nel caso specifico delle reazioni con gli antiossidanti, i radicali liberi possono agire sia come ossidanti che come riducenti [10]. In relazione al caso specifico del lavoro di ricerca, nella reazione tra la clorofilla e il DPPH, il radicale si riduce, comportandosi come un ossidante, mentre la clorofilla si ossida, cedendo elettroni al DPPH.

2.3 Gli antiossidanti

Una prima definizione generale, a livello chimico, è stata data da Halliwell e Gutteridge nel 1989, i quali definiscono un antiossidante come "un composto che, quando è presente a basse concentrazioni rispetto a quelle di un substrato facilmente ossidabile, ritarda o inibisce significativamente l'ossidazione di quel substrato", includendo nella loro definizione sia composti di natura enzimatica che non enzimatica [28] [12] [19]. In altre parole possiamo dire che un'antiossidante è un composto chimico o un agente fisico in grado di rallentare, prevenire o limitare l'ossidazione, cioè le reazioni dovute alla presenza di ROS [11]. Si tratta infatti di un'agente riducente che ossida

rapidamente, trasferendo elettroni a un ossidante, spesso un radicale. Gli antiossidanti sono dunque delle molecole chimiche abbastanza stabili, in grado di donare un elettrone a un radicale libero, diminuendo così la sua reattività e le sue capacità ossidanti.

Infatti, la caratteristica principale che accomuna una determinata sostanza e un sistema antiossidante, è appunto la capacità di stabilizzare, o direttamente eliminare, un radicale libero, contribuendo così alla riduzione del danno ossidativo nel corpo umano.

Un'altra caratteristica che determina la capacità antiossidante di un composto è la capacità di una determinata sostanza di inibire la generazione di specie reattive all'ossigeno (*ROS*) [29]. È inoltre importante precisare che è definita antiossidante, anche una sostanza in grado di aumentare i livelli delle difese antiossidanti endogene *in vivo* regolando ad esempio l'espressione dei geni che codificano gli enzimi antiossidanti [29].

In generale, nel corpo umano, gli antiossidanti sono in grado di limitare la denaturazione delle proteine, i danni al DNA. Invece, negli alimenti, riducono l'irrancidimento ossidativo, ossia il processo che causa la rancidità.

Negli ambienti in cui è presente l'ossigeno, diversi organismi viventi hanno sviluppato dei meccanismi di difesa, sia biochimici che fisiologici, contro i danni dovuti ai radicali liberi. Un esempio di meccanismo fisiologico è il sistema microvascolare umano che ha la funzione di mantenere livelli standard di O_2 nei tessuti. Altri metodi fisiologici per limitare lo stress ossidativo sono, ad esempio, l'adattamento delle alghe che occupando nicchie di acque profonde evitando le radiazioni luminose o l'esistenza del DNA sotto forma di cromatina.

A livello biochimico, la difesa antiossidante può essere enzimatica, non enzimatica, oppure volta a riparare le cellule danneggiate [12]. Una classificazione ulteriore suddivide gli antiossidanti in specie endogene, dunque prodotte dal organismo, ed esogene, introdotti nell'essere vivente attraverso il cibo. Soprattutto alimenti del regno vegetali influenzano la quantità di antiossidanti esogeni nell'organismo, aumentando la prevenzione di una serie di patologie.

2.3.1 Classificazione degli antiossidanti

Gli antiossidanti possono essere classificati in tre categorie in base alla loro funzione. Possono essere primari, quelli con funzione preventiva, secondari, quelli con funzione intercettiva, oppure come ultimi quelli con funzione riparativa. Gli antiossidanti primari sono responsabili per la prevenzione contro la formazione di radicali liberi

interrompendo oppure impedendo completamente l'avvio della reazione a catena indotta dalle specie *ROS*, cioè delle reazioni che avvengono tra radicali e non radicali, producendo a loro volta radicali. Le reazioni continuano così finché due radicali non si combinano, formando una specie neutra. Gli antiossidanti secondari, invece, hanno una funzione di intercezione. Sono infatti, in grado di intercettare l'elettrone spaiato di un radicale libero attraverso un processo di disattivazione. La reazione avviene tra antiossidante e radicale libero, e produce un prodotto meno reattivo in grado di interagire con molecole d'acqua in modo da rigenerarsi. Il prodotto è dunque in grado di ricostruire il proprio doppietto libero, poiché dopo aver ceduto un elettrone al radicale ne conserva solo uno spaiato. Lo scopo generale di questo processo è di trasferire la reattività di un radicale su un composto in un luogo privo di potenziali sostanze soggette a ossidazione [28]. Infine l'ultima categoria sono gli antiossidanti con proprietà riparativa. Questi agiscono sui danni provocati alla cellula dai radicali liberi. Sono necessari visto che la prevenzione e l'intercezione non sono completamente efficaci.

Enzimi antiossidanti

Gli organismi aerobici hanno sviluppato un sistema enzimi antiossidanti come la superossido dismutasi (SOD), la catalasi (CAT), la glutatione perossidasi (GPx) e la DT-diaforasi. Questi enzimi sono responsabili soprattutto per le reazioni e i prodotti legati alle specie *ROS*. Risultano dunque, appartenere soprattutto alla categoria di antiossidanti primari, ma hanno anche proprietà intercettive. Infatti, hanno un ruolo di prevenzione contro la formazione di radicali liberi interrompendo la reazione a catena indotta dalle specie *ROS*. La difesa contro l'avvio delle reazioni a catena comprende il legame di metalli, in particolare del ferro e del rame. Infatti molti enzimi, specialmente la superossido dismutasi, che è un metalloenzima, richiedono un metallo come cofattore per la loro attività. Per esempio la CAT utilizza il ferro o il magnesio come cofattore per catalizzare la degradazione del perossido di idrogeno (H_2O_2) [12]. Pertanto, le proteine che legano i metalli di transizione, come la ferritina, la transferrina, sono di importanza centrale nel controllo delle potenziali reazioni che generano radicali. Infatti, queste proteine controllano il livello di ioni metallici liberi, legandoli e trasportandoli nel fegato nel caso della transferrina o fungendo da riserva di ferro nelle cellule nel caso della ferritina. In questo modo prevengono la generazione di *ROS* dovute alle reazioni che promuovono la produzione di radicali idrossilici dal perossido di idrogeno (reazione 2.2.1), visto che queste sono catalizzate dai metalli [15]. Anche il glutatione risulta importante essendo in grado di mantenere sotto controllo il livello di stress ossidativo, agendo

sulle specie *ROS*. Altri enzimi, come la glutazione s-transferasi, sono responsabili per il trasporto e per l'eliminazione dei composti ossidanti [28].

La produzione di questi enzimi di natura proteica, che appartengono al sistema endogeno, viene regolata dal DNA [12]. Ci sono alcuni antiossidanti che sono classificati tali perché sono in grado di aumentare l'espressione dei geni, provocando una maggiore produzione di antiossidanti nel caso di una maggiore concentrazione di molecole *ROS* [29].

Nell'immagine 2.8 si vedono le reazioni e gli enzimi che sono coinvolti nella generazione e propagazione delle specie reattive dell'ossigeno. Infatti l'ossigeno, una volta diventato superossido diventa perossido di idrogeno a causa dell'attività degli enzimi SOD. Il perossido di idrogeno diventa poi H_2O a causa dell'attività della catalasi (CAT). Successivamente il perossido di idrogeno diventa un idrossile a causa della presenza di ioni metallici o di un superossido. Di conseguenza grazie a una molecola con capacità antiossidanti, l'idrossile viene neutralizzato, ma si genera un radicale R^\bullet . Infine, con la reazione di esso e l'ossigeno si ottiene il perossile. La glutazione perossidasi sfrutta l'elettrone non appaiato dell'idrossile per ridurre/ossidare il glutathione, mentre a sua volta la glutazione reduttasi sfrutta l'elettrone della reazione precedente per ridurre NADPH.

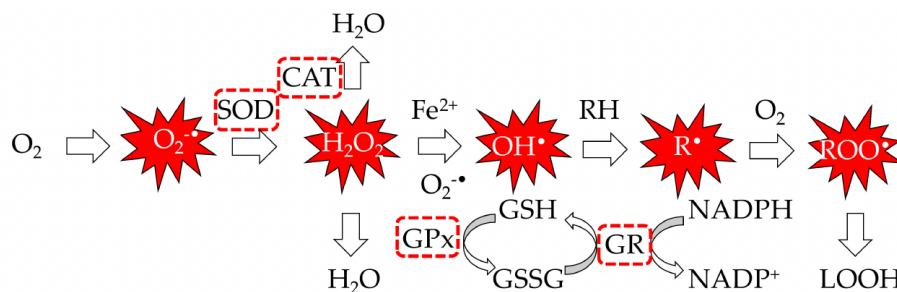


Figura 2.8: Reazioni ed enzimi coinvolti nella generazione e nelle reazioni a catena dovute alle ROS, che sono: superossido ($O_2^{\bullet-}$), idrossile (OH^\bullet), perossile (ROO^\bullet) e perossido di idrogeno (H_2O_2). Enzimi antiossidanti: SOD: superossido dismutasi, CAT: catalasi, GPx: glutathione perossidasi, GR: glutathione reduttasi, GSH/GSSG: glutathione ridotto/ossidato [19]

Antiossidanti non enzimatici

Esiste una seconda categoria di antiossidanti: quelli non enzimatici. Essi sono in grado di intrappolare i radicali liberi, rientrando dunque nella categoria di antiossidanti secondari. Riescono infatti, a evitare la produzione di ulteriori radicali liberi, formati durante la reazione iniziale in cui una specie *ROS* diventa reattiva. Questo tipo di antiossidanti sono in grado di catturare e neutralizzare, donando elettroni,

i radicali liberi, evitando così una progressione della reazione innescata dalla specie *ROS*. Durante questo processo di deattivazione, gli antiossidanti possono a loro volta impossessarsi di elettroni, acquisendo proprietà reattive caratteristiche dei radicali liberi. Questi composti risultano però essere meno reattivi e vengono facilmente neutralizzati con reazioni che coinvolgono molecole d'acqua o tramite altri antiossidanti del organismo [28]. Durante il processo l'elettrone non accoppiato del radicale libero viene trasferito su un composto che, una volta ricevuto l'elettrone, risulta meno reattivo e che si trova in un luogo della cellula privo di composti soggetti a potenziali ossidazioni.

In questa categoria rientrano soprattutto antiossidanti esogeni come, ad esempio, la vitamina C, i caroteni, ma soprattutto i composti che contengono fenoli risultano particolarmente efficaci nel inibire la reazione a catena. Anche alcuni pigmenti endogeni risultano non essere enzimatici, come la melatonina.

Sistema di riparazione

Infine negli organismi viventi è presente anche un sistema di riparazione costituito da enzimi che riparano le biomolecole danneggiate dai prodotti radicalici dovuti alle reazioni indotte dalle *ROS* [28]. Alcuni esempi comuni di questo tipo di antiossidanti sono la DNA polimerasi III, che ripara il DNA danneggiato dalle radiazioni, e gli enzimi proteolitici² che agiscono sulle proteine [12].

2.3.2 Valutazione del potere antiossidante

Tramite l'esecuzione di alcuni esperimenti piuttosto semplici è possibile esaminare la capacità antiossidante *in vitro* e allo stesso tempo, verificare il possibile effetto pro-ossidante [12]. Questo approccio permette di escludere molecole poco efficaci *in vitro*, visto che *in vivo* solitamente lo sono ancora meno. Inoltre si deve tenere a mente che un composto che riduce i radicali *in vitro* non necessariamente si comporta come antiossidante *in vivo*, dato che i radicali liberi si diffondono molto velocemente e hanno una vita estremamente breve, dell'ordine dei nanosecondi. In aggiunta le reazioni tra antiossidanti e radicali liberi dipendono sia dalle concentrazioni delle due sostanze che da fattori legati alla struttura dei reagenti, al solvente e alle condizioni in cui una reazione si svolge [12]. Risulta dunque importante tenere conto delle concentrazioni del composto che agisce come antiossidante *in vitro*, essendo possibile

²proteolitici: enzimi coinvolti nella digestione

che si trovino in concentrazioni diverse *in vivo* [29].

Durante il test in *in vitro* è comunque importante tenere conto che un determinato antiossidante potrebbe avere anche degli effetti dannosi, essendo che se agisce come antiradicale (*scavenger*) potrebbe diventare a sua volta un radicale [29].

2.4 Cosa è la clorofilla?

Il nome clorofilla deriva dal greco *chloròs* (= verde) e *phyllon* (= foglia) [30]. L'etimologia riflette la proprietà di questo pigmento di rendere verdi piante e altri vegetali, come le alghe. Questa caratteristica permette loro di catturare la luce necessaria per la fotosintesi: un processo fondamentale con il quale alcuni organismi viventi sono in grado di trasformare energia luminosa in energia chimica utilizzabile. Infatti, grazie a questa reazione metabolica, i vegetali autotrofi sono in grado di produrre glucosio, con lo scarto di O_2 , partendo da H_2O e CO_2 in presenza di luce [31]. Contemporaneamente, la pianta è in grado di sintetizzare ATP, necessario la sopravvivenza del vegetale.

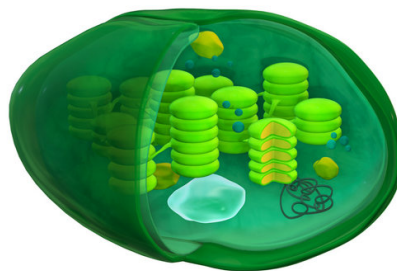


Figura 2.9: Cloroplasto [32]

La clorofilla è presente, nelle cellule vegetali, in degli organelli specializzati chiamati cloroplasti. Più in specifico si trova tra i fosfolipidi delle membrane dei tilacoidi, presenti nello stroma del cloroplasto (figura 2.9). Le molecole di clorofilla, insieme ad altri pigmenti e proteine, formano dei complessi chiamati fotosistemi. Queste strutture organizzate sono in grado di captare e assorbire la luce come delle antenne.

La fotosintesi è suddivisa in due fasi: la fase luminosa e il ciclo di Calvin, che avviene in assenza di luce. La clorofilla però, è attiva esclusivamente nelle reazioni che trasformano l'energia luminosa in energia chimica, le quali avvengono durante la fase luminosa. I pigmenti sono infatti in grado di assorbire l'energia contenuta nei fotoni, che causa l'ossidazione delle molecole di clorofilla. Esse cedono così gli elettroni alle molecole adiacenti nel fotosistema (figura 2.10). Gli elettroni passano per diversi

pigmenti e trasportatori fino ad arrivare all'accettore finale, il NADP^+ , il quale si riduce diventando NADPH . La molecola di clorofilla, che ha assorbito l'energia dei fotoni, deve recuperare i suoi elettroni e lo fa facendo ossidare una molecola di acqua. Questo passaggio causa la produzione di O_2 , che si libera nell'atmosfera [33].

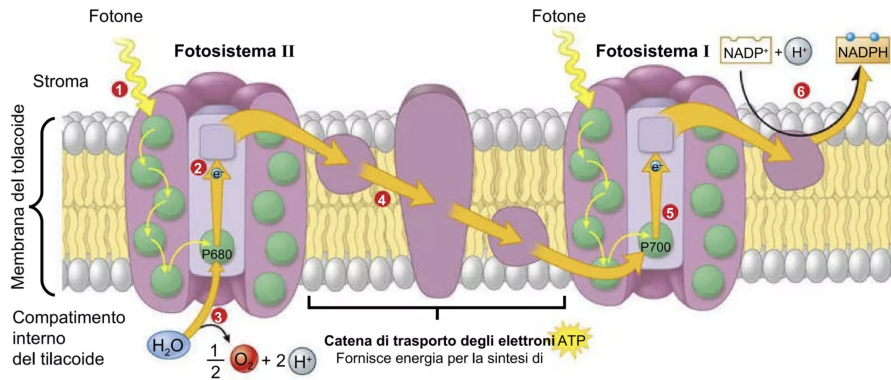


Figura 2.10: Catena di trasporto degli elettroni [34]

In natura sono presenti due tipi di clorofilla: *Chl a* e *Chl b*. Entrambe svolgono un ruolo importante nella fotosintesi, la clorofilla *b* però è unicamente un pigmento accessorio associato alla forma *a* nell'assorbimento della luce. Infatti la clorofilla *b* è responsabile di massimizzare l'intervallo di lunghezza d'onda, e dunque anche l'energia, assorbita permettendo l'assorbimento della luce blu-violetta. La clorofilla *a* invece è il pigmento che troviamo al centro dei due fotosistemi, ma in essi troviamo due aggregati leggermente diversi.

Il centro di reazione del fotosistema II è costituito unicamente da una clorofilla monomerica, che risulta avere una carica positiva e pertanto in grado di ossidare una molecola di H_2O . Il monomero di clorofilla *a* è detto P680, dove il numero indica la lunghezza d'onda massima assorbita, espressa in nm. Il pigmento ottiene energia sia dal trasferimento di energia dai pigmenti accessori del fotosistema I, che direttamente dai fotoni della luce. Grazie all'energia ricevuta il donatore primario del complesso passa a uno stato eccitato, nel quale un suo elettrone passa a un livello energetico maggiore. Di conseguenza l'elettrone viene trasferito a una molecola di feofitina accentratrice, che accettando l'elettrone nel suo orbitale più esterno si riduce, all'interno del fotosistema II [35]. A causa di questo trasferimento il P680 si ossida diventando P680^+ , causando l'ossidazione della molecola di H_2O . Invece nel fotosistema I vi è il pigmento P700, che si differenzia principalmente dalla lunghezza d'onda massima assorbita che risulta essere 700 nm. Inoltre è costituito da due molecole di clorofilla che formano un dimerico, cioè un polimero derivato dall'unione di due molecole di clorofilla *a* [36]. Questa coppia di clorofille *a* è circondata da un complesso antenna, costituito da diversi pigmenti e proteine, in grado di trasferire

energia. Infatti i pigmenti sono in grado di assorbire energia dei fotoni, passando a uno stato eccitato, per poi trasferire l'energia, tramite risonanza, alla clorofilla centrale che sfrutta l'energia facendo passare un suo elettrone a un livello energetico maggiore. Questi elettroni vengono poi trasferiti tramite delle redox ai fillochinoni adiacenti. Questi a loro volta, fanno ridurre altre molecole fino a che l'elettrone viene trasferito alla ferredossina che riduce l'enzima ferredossina-NADP⁺ reductasi, in grado poi di catalizzare la reazione di riduzione del NADP⁺ in NADH [37].

Il pigmento clorofilliano fu isolato per la prima volta nel 1817 dai chimici francesi Pierre-Joseph Pelletier e Joseph Bienaimé Caventou, usando un'estrazione con alcool [1]. Tuttavia, l'importanza di questo pigmento era già conosciuta da tempo, sebbene non fosse ancora chiaro quale fosse il suo ruolo all'interno delle cellule vegetali. Nel corso dei secoli, l'interesse nei confronti della clorofilla ha riscontrato una forte crescita, persistendo ancora oggi, motivando numerosi scienziati a dedicare le proprie ricerche a questo pigmento. Una delle scoperte più rilevanti è sicuramente quella di Schunk e Marchlewski, i quali scoprirono sorprendenti analogie tra molecola di clorofilla e l'emoglobina del sangue. Un'altra scoperta di notevole rilevanza fu quella di Willstätter, il quale contribuì in modo significativo alla comprensione della struttura molecolare della clorofillina [38]. Inoltre, scoperte più recenti hanno anche avuto un ruolo di grande importanza, soprattutto nell'ambito della ricerca sulla cura del cancro. Infatti si sta facendo una grande ricerca sulla capacità antiossidante, antimutagena e antitossica del pigmento all'interno del corpo umano.

2.4.1 Formule e strutture chimiche della clorofilla

La clorofilla è costituita da un anello aromatico di porfirina, il quale presenta quattro atomi di azoto legati allo ione metallico centrale Mg²⁺. I legami seguono una geometria planare quadrata. La clorofilla possiede anche una lunga coda di estere fitilico, apolare, costituita da 20 carboni nella posizione C17, che rende la molecola altamente idrofoba. Questa parte della molecola risulta essere più affine ai lipidi, permettendo alla clorofilla di inserirsi tra i lipidi della membrana dei tilacoidi [39]. Infatti, il suo anello tetrapirrololico è lipofobico, dunque è l'estere, lipofilo, a inserirsi tra i lipidi.

Il termine clorofilla non indica una sola molecola, anzi può essere usato per indicare un vasto insieme di molecole simili che possiedono però delle minime differenze strutturali. Si conoscono infatti almeno sei diverse molecole di clorofilla, le quali si differenziano a dipendenza dei diversi gruppi funzionali legati all'anello: le clorofille *a* e *b* (entrambe presenti nei cloroplasti), *c*, *d*, *e* (presenti soprattutto nelle alghe) e

le batterioclorofille (presenti nei batteri in grado di fare fotosintesi).

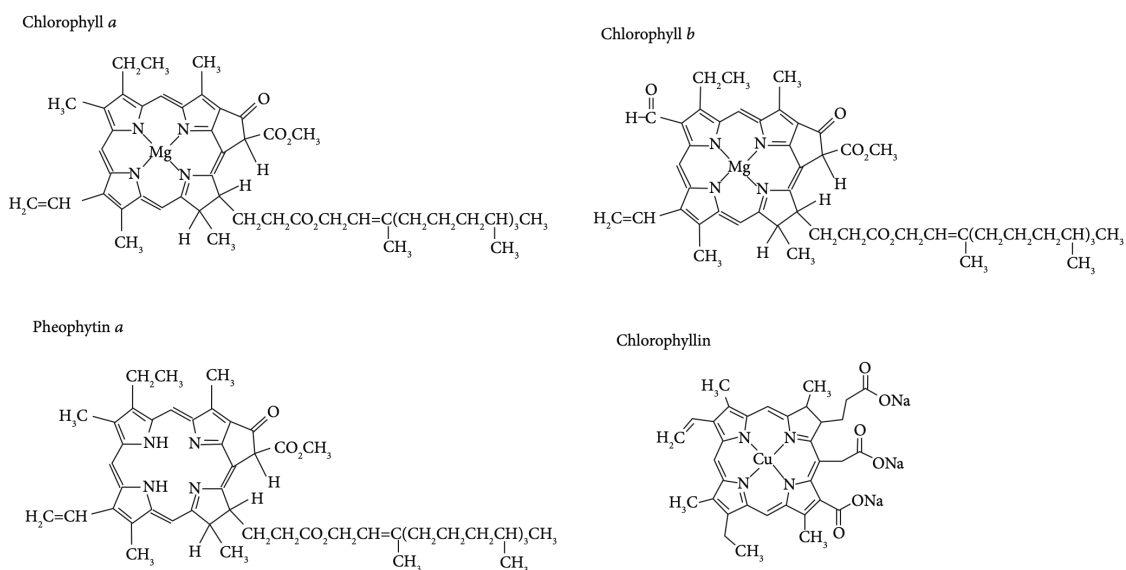


Figura 2.11: Strutture molecolari delle clorofille [40]

Le due varianti di clorofilla più comunemente reperibili in natura (in particolare nelle piante superiori), presentano un gruppo funzionale diverso legato in posizione C7 (figura 2.11). Infatti, la clorofilla *a* possiede un gruppo metilenico ($-\text{CH}_3$), laddove la clorofilla *b* possiede un gruppo formile ($-\text{CHO}$) [41]. Questa differenza rende la *Chl a* costituita da 135 atomi rispetto ai 136 atomi che formano la *Chl b*. Dunque, le due varianti possiedono due formule chimiche leggermente diverse, per *Chl a* vale la formula $\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{MgN}_4\text{O}_5$ mentre per *Chl b* vale $\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{MgN}_4\text{O}_6$ [42].

2.4.2 Proprietà della clorofilla

Assorbimento luce

Come in molti altri composti in cui c'è una parte metallica legata a una organica, viene assorbita una determinata lunghezza d'onda della luce. Nel caso della clorofilla viene assorbita la lunghezza d'onda della luce nella regione blu e rossa, essendo necessarie per svolgere la fotosintesi. Essa riflette invece la luce verde, che va a conferire la colorazione delle foglie.

La funzione della clorofilla *a* e *b* è leggermente diversa, quindi, come si può intuire dalla diversità di struttura, vi è una leggera differenza nella lunghezza d'onda della

luce che viene assorbita dalle due forme del pigmento.

Le clorofille presentano due bande principali di assorbimento della luce, una sul lato blu dello spettro visivo (figura 2.13) (380-460 nm) e una sul rosso (630-670 nm) [43]. Più in preciso la clorofilla *a*, in etere dietilico, possiede due picchi di assorbanza rilevanti a 430 nm e rispettivamente a 662 nm. Invece, la clorofilla *b* presenta un picco a 453 nm e uno a 642 nm [44].

Capacità antiossidante

Per verificare il potere antiossidante del pigmento sono stati svolti diversi studi, nei quali si usa un approccio sperimentale comune che consiste nell'analisi di diversi tessuti provenienti da roditori sottoposti a diete ricche di clorofilla. Diversi risultati hanno dimostrato la capacità delle clorofille di ridurre i livelli generali di *ROS* (approfonditi nel capitolo 2.2.1) *in vitro*, dimostrando così le capacità antiossidanti della clorofilla e dei suoi derivati [19]: esse agiscono come agenti riduttori che diminuiscono il livello di ossidazione delle *ROS*.

In questi esperimenti si prendono delle biomolecole ossidate come marcatori ossidativi, per poi misurare l'attività antiossidante delle clorofille *in vivo*. Infatti, una generazione di *ROS* eccessiva causa danni nei lipidi, nelle proteine e nel DNA (capitolo 2.2).

Degli esempi di marcatori per lo stress ossidativo sono la rottura del filamento di DNA, dovuta a una diversa conformazione delle basi a causa dei legami con i radicali, oppure la formazione di gruppi carbossilici, derivati da aldeidi e chetoni, nel caso in cui si analizzano le proteine [45].

Oltre alle capacità antiossidanti si è riusciti a determinare che la clorofilla, e i suoi derivati, sono in grado di potenziare l'attività di alcuni enzimi che mediano l'eliminazione di *ROS*, sostanze cancerogene e tossine nella cellula. In uno degli esperimenti condotti, è stata iniettata in dei topi una percentuale di clorofilla rameica proporzionale al loro peso corporeo. Questo studio ha mostrato un aumento dell'attività dell'enzima superossido dismutasi, catalasi e glutatione perossidasi [46]. Questi enzimi fanno parte del sistema enzimatico antiossidante degli organismi aerobici e sono in grado di prevenire la formazione di radicali liberi interrompendo la reazione a catena indotta dalle specie *ROS*, essendo che possiedono proprietà intercettive.

In ulteriori studi è stata scoperta la capacità della clorofilla di aumentare l'espressione del gene Nrf-2, responsabile per la trascrizione dei geni dell'elemento di risposta agli antiossidanti [19], riducendo parallelamente la produzione di sostanze cancero-

gene attive dovuta all'attività degli enzimi citocromo P450 [47].

Studiando l'effetto della clorofilla sui roditori è stato scoperto anche che essa possiede proprietà anti-cancerogene. È stato infatti osservato che è in grado di formare stretti legami con sostanze chimiche cancerogene chiamate aflatossine, limitandone l'assorbimento a livello dell'intestino [48].

Altre proprietà

Diversi studi hanno anche provato che la clorofilla è in grado di ridurre l'infiammazione, senza causare effetti collaterali tossici, e di rallentare la riproduzione di batteri. Risulta infatti di essere batteriostatica, ma non batteriocida di conseguenza inibisce la riproduzione batterica senza uccidere questi organismi [49].

Si pensa inoltre che la clorofilla abbia la capacità di ridurre odori sgradevoli, soprattutto nell'urina. Questa proprietà è stata sfatata da Brocklenhrusrt nel 1953 che tramite 4 esperimenti ha determinato che l'odore rimane invariato [50]. Finora però è stato l'unico ad avere trovato dati sperimentali su questa proprietà. Trattandosi di un campo di ricerca piuttosto recente può essere che nel corso degli anni si trovino risultati diversi.

Potenziale redox

La clorofilla possiede due potenziali, uno per le ossidazioni (E^{R+}) e uno per le riduzioni (E^{O-}), misurati entrambi nel solvente della reazione studiata considerando l'elettrone trasmesso proveniente da un elettrodo a contatto con la soluzione. I due valori determinano quando il pigmento agisce come donatore, nel momento in cui il suo singoletto è eccitato, ed è in grado di ridurre esotermicamente un ossidante con un potenziale di riduzione maggiore di E^{R+} . Invece agisce come accettore, ossidando un riduttore con un potenziale di ossidazione minore di E^{O-} [51]. Non essendoci ancora stata abbastanza ricerca nel campo, le informazioni sul meccanismo di ossidazione della clorofilla, ma anche su molti altri aspetti di questa molecola, sono limitate. La maggior parte dei ricercatori però identificano il ruolo dominante dello ione centrale di Mg^{2+} come antiossidante. Si ipotizza infatti che la presenza dello ione metallico aumenti la densità elettronica e dunque anche la capacità di donare elettroni.

2.4.3 I derivati della clorofilla

Le proprietà antiossidanti della clorofilla sono state studiate anche per i derivati più comuni della clorofilla. Si pensa infatti, che la diversa struttura e configurazione dei derivati, presenti in natura o creati artificialmente, influiscano sulla attività antiossidante attribuita alla clorofilla. Infatti, persino la clorofilla *a* e *b* si differenziano nella loro capacità di limitare le ossidazioni. Le principali posizioni in cui vi è una differenza tra i vari derivati sono il metallo centrale, C₇, C₁₃₂ e C₁₇₃ [19]. Spesso si tratta di derivati che sono già presenti negli organismi vegetali e che risultano essere più assimilabili dal corpo umano. Inoltre, possono anche prodursi a livello della digestione di un organismo animale visto che la clorofilla risulta essere molto sensibile all'ambiente in cui si trova, subendo facilmente cambiamenti strutturali. Infatti è facilmente soggetta al pH, a enzimi e a reazioni ossidanti. Per esempio la clorofilla *a*, attraverso la feoforizzazione, una reazione ossidativa, diventa una feoforbide [52].

Di particolare importanza, proprio perché studiate per le loro proprietà antiossidanti, sono [19]:

- Feofitine: non possiedono un metallo centrale
- Metallo-clorofille: il magnesio centrale è sostituito con uno ione metallico, di rame, zinco o ferro
- Feoforbidi: tramite ulteriori processi in cui si elimina il gruppo fitile (C₂₀H₄O) in posizione C₁₇₃

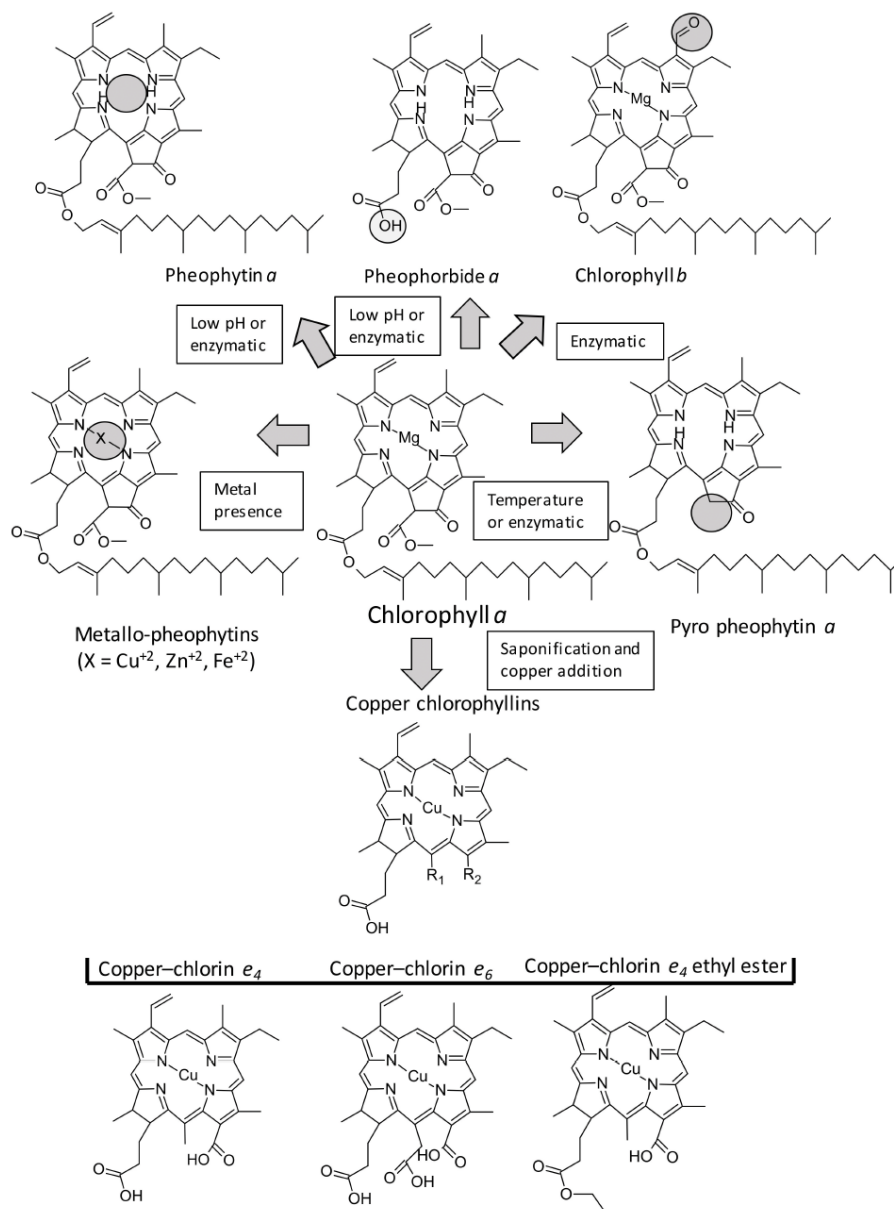


Figura 2.12: *Diversi derivati della clorofilla* [19]

2.4.4 Metallo-clorofille: la clorofilla rameica

Questo composto organico è la sostanza analizzata nei vari esperimenti condotti in questo lavoro di maturità. Il complesso è ottenuto grazie a una saponificazione della clorofilla naturale in un solvente alcalino, che contiene idrossido di sodio in metanolo che causa l'apertura dell'anello e la rimozione dell'estere. La sua struttura è dunque caratterizzata dalla mancanza del fitolo in posizione C₁₇ e dalla forma aperta dell'anello. Risulta dunque leggermente polarizzata e, solubile in acqua [19]. La sostituzione del magnesio con il rame avviene invece utilizzando solfato di rame in un mezzo acido, conferendogli un'elevata stabilità [41].

Durante la sintesi della clorofillina rameica si formano anche una varietà di strutture complesse secondarie basate sulla clorina, come le clorine di rame e_4 e e_6 (derivati dalla clorofilla *a* e *b*). Inoltre, potrebbero prodursi anche feoforbidi *a* e clorine senza rame. Risulta dunque, molto difficile quantificare e caratterizzare i componenti della clorofillina rameica commerciale, essendo ricca di impurezze. Questa mancanza di informazioni causa una limitazione nello sviluppo di parametri e valutazione accurata negli esperimenti [41].

Caratteristiche antiossidanti

In diversi saggi, è stata determinata una maggiore attività antiossidante manifestata dalla clorofillina rameica, che può essere fino a cinque volte superiore rispetto ai derivati privi dello ione metallico Cu^{2+} . La clorofillina rameica può essere considerata un antiossidante grazie alle sue capacità di ridurre il livello di stress ossidativo e di contrastare la formazione di specie reattive all'ossigeno.

La sua azione antiossidante si manifesta soprattutto nella protezione del DNA dalle radiazioni e nella inibizione della perossidazione lipidica, indotta da enzimi. Si dimostra essere addirittura più efficace di alcuni antiossidanti endogeni, in quanto è in grado di neutralizzare i radicali perossile e idrossile. Questa proprietà antiossidante è associata al suo ione metallico Cu^{2+} , che è situato al centro dell'anello pirilico. Tuttavia, la capacità antiossidante è stata attribuita soprattutto alla clorina rameica, che si è rivelata essere otto volte più efficace della clorofillina. La clorina rameica è considerata un'impurità che si forma durante la sintesi della clorofillina rameica, ed è dunque presente nelle soluzioni in commercio [41]. Pertanto, alcuni esperti sono scettici sull'uso della clorofillina impura disponibile sul mercato e consigliano di utilizzare composti di clorina rameica il più puro possibile [41].

Alcuni esperimenti hanno rilevato però un'attività pro-ossidante della clorofillina rameica, soprattutto nel caso in cui essa veniva illuminata da una sorgente luminosa prevalentemente rossa, causando un aumento la concentrazione di molecole reattive all'ossigeno (*ROS*). Questi risultati dovrebbero però essere ulteriormente investigati soprattutto in ambito alimentare.

Inoltre, la clorofillina rameica ha dimostrato di indurre la risposta di enzimi secondari, come la chinone reduttasi, che svolgono un ruolo nella protezione delle cellule contro composti ossidanti ed elettrofilici [41].

2.4.5 Le forme di clorofilla presenti sul mercato

Sul mercato si trovano diversi integratori a base di una miscela alcolica che contengono clorofilla disciolta. In alternativa, è possibile acquistare anche delle compresse che contengono il pigmento. Tuttavia, è importante notare che spesso, negli integratori, la sostanza presente è un pigmento semi-sintetico, il quale non possiede lo ione di magnesio tipico della clorofilla naturale, ma, al suo posto, presenta uno ione di rame (Cu^{2+}) o di azoto (Na^+). Questo composto prende il nome di complesso rameico clorofillina, descritto esaustivamente nel capitolo precedente, ed è preferito per la sua maggiore stabilità. Il complesso viene ottenuto tramite un processo di sintesi in cui la clorofilla naturale perde lo ione Mg^{2+} e la sua coda idrocarburica. Di conseguenza, il composto ottenuto risulta essere idrosolubile e può essere sospeso in un solvente.

Uno dei *superfood* più comunemente acquistati per le sue alte concentrazioni di clorofilla è la spirulina. Questa alga azzurra non risulta essere solo una fonte ricca di clorofilla, ma contiene anche una varia varietà di minerali e vitamine. Inoltre, la sua digeribilità è migliore essendo priva di cellulosa, tipica delle piante, il che la rende facilmente assimilabile.

La clorofilla semi-sintetica è spesso utilizzata come colorante alimentare o come ingrediente in alcuni deodoranti naturali, soprattutto nel mercato asiatico. La sigla E141ii indica la presenza del complesso rameico della clorofillina nei prodotti alimentari, mentre la sigla E140 la presenza della clorofilla naturale [53].

2.5 Meccanismo di reazione tra DPPH e clorofilla

Il DPPH possiede un alto potenziale redox visto che i gruppi nitro più importanti sono situati in posizione para rispetto all'atomo di azoto, dunque risultano difficilmente ossidabili [21]. Di conseguenza nella reazione con la clorofilla essa agisce come un riducente e il DPPH accetta elettroni.

La reazione tra clorofilla e DPPH avviene tramite una donazione di idrogeno da parte della clorofilla. Il pigmento perde dunque un elettrone, diventando un radicale libero. La reattività è però contenuta essendo che l'elettrone spaiato è delocalizzabile e risulta generare molte forme di risonanza, che stabilizzano la forma ossidata della clorofilla, riducendo la reattività [54].

Finora non è ancora stato trovato un meccanismo di reazione tra queste due molecole, ma si ipotizza che lo ione metallico centrale abbia un ruolo importante, soprattutto nel caso in cui la reazione avviene tra DPPH e clorofillina rameica. Il motivo per cui non si è riusciti a trovare il meccanismo esatto è per il fatto che si tratta di un campo di ricerca piuttosto nuovo e dunque non è ancora stato possibile ottenere delle conferme un meccanismo di reazione tra DPPH e clorofilla.

2.6 Spettrofotometria

La spettrofotometria rappresenta una tecnica di misurazione quantitativa che consente di esaminare le proprietà ottiche di sostanze in un vasto intervallo di lunghezze d'onda, che si estende dall'ultravioletto fino all'infrarosso, comprendendo quindi anche lo spettro visibile [55]. Questo metodo sfrutta il principio di base secondo il quale ogni sostanza, in base alle sue caratteristiche a livello atomico e molecolare, interagisce in modo specifico con la luce assorbendo o trasmettendo una determinata lunghezza d'onda. La misurazione riguarda l'intensità di un fascio luminoso, ovvero la quantità di fotoni assorbiti dal campione analizzato. Questa informazione permette di identificare la natura della sostanza e la concentrazione all'interno di una soluzione.

In base alla quantità di luce trasmessa o assorbita, correlata alle proprietà specifiche di un composto chimico, è possibile determinare la concentrazione della sostanza nel composto usando la legge di Beer (capitolo 2.6.2) [56]. Infatti, maggiore è la concentrazione della soluzione, maggiore sarà l'assorbimento luminoso. La frazione di energia luminosa che attraversa il campione determina il colore della soluzione, che coincide con la porzione di luce trasmessa.

Le due grandezze di trasmittanza e assorbanza sono strettamente correlate, infatti, quando una aumenta, l'altra diminuisce, ma la loro somma totale è sempre uguale a 1 [57].

La spettrofotometria è ampiamente utilizzata, soprattutto nei campi della chimica, biochimica e fisica e ha diverse applicazioni.

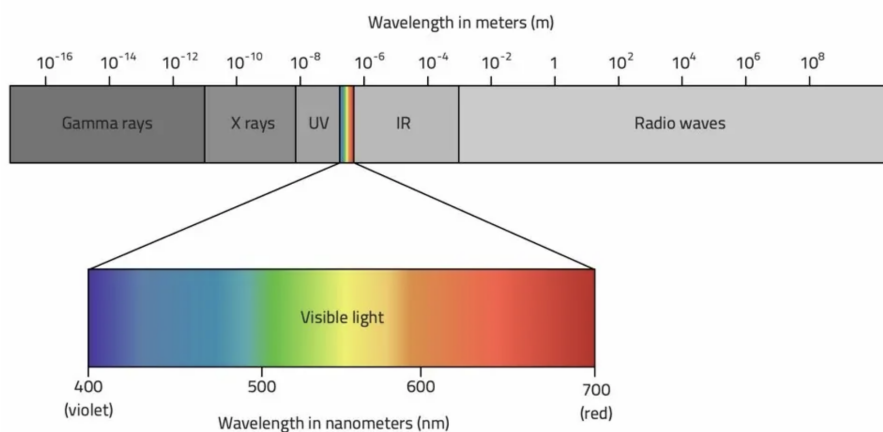


Figura 2.13: *Spettro di radiazione elettromagnetica* [58]

A dipendenza dell'intervallo di lunghezza d'onda della sorgente luminosa all'interno dello spettro di radiazione elettromagnetica (figura 2.13), la spettrofotometria si suddivide in due categorie principali:

- Spettrofotometro UV-visibile: si utilizza luce dell'intervallo ultravioletto e visibile (185 nm - 700 nm)
- Spettrofotometro IR: utilizza la luce nell'intervallo infrarosso (700 nm - 1500 nm)

2.6.1 Struttura degli spettrofotometri

La struttura di base degli spettrofotometri (figura 2.14) comprende una sorgente di luce, un collimatore, un monocromatore con una prisma o reticolo, una fenditura d'uscita che funge da selettore di lunghezza d'onda, una cuvetta che contiene la soluzione campione e un rivelatore fotoelettrico per le misurazioni[56].



Figura 2.14: *Struttura spettrofotometro: (a) fonte di luce, (b) collimatore, (c) monocromatore (prisma/reticolo), (d) fenditura selettiva / d'uscita, (e) cuvetta, (f) rivelatore, (g) lettore* [59]

Il funzionamento dello spettrometro inizia con la generazione di una vasta gamma di lunghezze d'onda di luce, che viene convertito in un fascio rettilineo di fotoni dalla lente di collimazione. Successivamente il monocromatore, grazie al prisma, suddivide il fascio luminoso in base alle diverse lunghezze d'onda. Infine, il fotometro misura la quantità di fotoni che non sono stati assorbiti dalla soluzione campione dopo che il fascio luminoso l'ha attraversata.

2.6.2 Legge di Beer-Lambert

La legge di Beer-Lambert mette in relazione le proprietà del materiale con l'intensità della luce assorbita. In particolare, lo spettrofotometro misura l'intensità luminosa della sorgente, cioè I_0 , e l'intensità luminosa del fascio che ha attraversato il campione, indicato con I . Con questi dati è possibile calcolare l'assorbanza del campione (A) utilizzando la seguente equazione 2.3:

$$A = \log_{10} \frac{I_0}{I} \quad (2.3)$$

Tuttavia, l'equazione 2.3 è valida solo sotto due presupposti esterni [60]:

- L'assorbanza deve essere direttamente proporzionale alla concentrazione del campione:

$$A \propto C$$

- L'assorbanza deve essere direttamente proporzionale alla larghezza della cuvetta:

$$A \propto l$$

Queste proporzioni possono essere integrate in un'unica equazione aggiungendo una costante. Otteniamo dunque la legge di Beer-Lambert 2.4, che afferma l'esistenza di una relazione lineare tra l'assorbanza e la concentrazione del campione [61]:

$$A = \varepsilon l C \quad (2.4)$$

Dove A rappresenta la misura dell'assorbanza, l è la larghezza standard della cuvetta (solitamente 1 cm), C la concentrazione del campione e ε il coefficiente di assorbimento molare.

Quest'ultimo è una costante specifica, che varia per ogni molecola a dipendenza della lunghezza d'onda e del solvente utilizzato, come ovviamente dalla molecola stessa. È invece indipendente dalla temperatura. Risulta avere l'unità: $L \cdot cm^{-1} \cdot mol^{-1}$

Capitolo 3

Esperimenti

3.1 Estrarre la clorofilla dagli spinaci

Lo scopo di questo esperimento è di ottenere una clorofilla il più pura possibile evitando che si degradi. Questo lo si fa in modo da poter confrontare le quantità di antiossidanti presenti nella clorofilla dei cibi che ingeriamo e nella clorofilla degli integratori alimentari [62].

Materiali

- Becher (40 ml)
- 5 g di spinaci deidratati
- 30 mL di acetone al 80%
- 260 mg di MgSO_4
- Mortaio e pestello
- 20 mL acqua distillata e deionizzata
- 60 mL etere di petrolio
- Filtro (20 μm)
- Cilindro graduato (50 mL)
- Provetta da 20 mL

Procedimento

Innanzitutto, prima di iniziare gli esperimenti, ci si è assicurati che ci fosse poca luce, per limitare il danneggiamento della clorofilla.

5 g di spinaci sono stati tagliati, dopo essere stati precedentemente deidratati in un forno da cucina, e sono stati aggiunti al mortaio. In seguito sono stati tritati e vi sono stati aggiunti 2 mL di acetone, continuando a tritare. Dopodiché il miscuglio è stato aggiunto a una beuta insieme a 48 mL di acetone, usati per sciacquare e ripulire il mortaio, al fine di massimizzare il contenuto di clorofilla nel prodotto finale. Successivamente il miscuglio è stato mischiato leggermente e poi lasciato riposare per 10 minuti. Nel frattempo è stata preparata la postazione di filtrazione, visto che nel passo successivo il miscuglio è stato filtrato sottovuoto. Al filtrato sono stati aggiunti lentamente 100 mL di acetone, finché esso non ha ottenuto una colorazione meno verde, tendente al marroncino. La soluzione ottenuta è stata poi trasferita in un imbuto decantatore aggiungendo 20 mL di acqua deionizzata e 60 mL di etere di petrolio. Una volta chiuso con un tappo, l'imbuto è stato scosso leggermente, aprendo regolarmente la valvola in modo da eliminare il gas che si era creato. Una volta che non usciva più gas, il miscuglio è stato lasciato riposare per 15 minuti per permettere la formazione di due fasi. Una volta che il tempo era scaduto, è stata tolta la parte acquosa, che si trovava nella parte inferiore. Per ottenere una clorofilla più pura, il processo di decantazione è stato ripetuto 3 volte. Infine, è stata fatta un'ultima decantazione aggiungendo però solo 20 mL di acqua deionizzata, per poi lasciarla riposare per 10 minuti. Dopo che la parte acquosa è stata tolta, la soluzione è stata messa in una bottiglia di vetro marrone, chiudendo il tappo con uno strato di parafilm. Essa è poi rimasta in congelatore a -18°C per la notte. Il giorno successivo, il contenuto della bottiglia è stato messo in un becher aggiungendo 260 mg di MgSO_4 , per poi filtrare il miscuglio sottovuoto al fine di togliere i grumi che si erano formati. È stato poi usato un rotavapor per 4 ore a 40° , con la pressione a 553 mbar, per far evaporare l'etere di petrolio ancora contenuto nel miscuglio. Infine, quanto ottenuto è stato sospeso in 100 mL di acetone e conservato a -20°C fino al momento delle analisi.

3.2 Quantificare la concentrazione di clorofilla

Materiali

- Spettrofotometro
- 700 mL acetone
- 700 mL metanolo
- Matracci
- Becher
- Spettrofotometro
- Cuvette
- 2 pastiglie di clorofilla
- 50 gocce di clorofilla liquida

Procedimenti

Tutte le soluzioni devono avere concentrazione di 1 mMol di clorofilla in acetone/metanolo. Dunque, in 100ml di soluzione di acetone devono esserci 0,089 g di soluto.

25 gocce di clorofilla sono state dunque diluite in 137,77 mL di acetone, rispettivamente metanolo. 1 pastiglia è stata tritata con un mortaio e successivamente diluita in 27,7 mL di acetone, rispettivamente un'altra pastiglia è stata tritata e diluita in 27,7 mL di metanolo. Avendo parti solide sospese, le due soluzioni sono state filtrate sotto vuoto. La clorofilla estratta è stata diluita in acetone fino a ottenere una colorazione simile a quelle preparate precedentemente. Tutte le soluzioni sono state analizzate allo spettrofotometro e quelle troppo concentrate sono state diluite maggiormente.

Infatti, sono stati prelevati 10 mL della soluzione dell'integratore liquido in metanolo e portati a volume con 100 mL di metanolo in modo da ottenere una diluizione di 100x. Rispettivamente 1 mL di integratore in pastiglia in metanolo è stato portato a volume a 100 mL con metanolo per ottenere una diluizione di 100x. Sono stati prelevati anche 10 mL della soluzione dell'integratore liquido in acetone, che è stato portato a volume fino a 100 mL con acetone per ottenere una diluizione di 100x. 0,5 mL di clorofilla proveniente dagli spinaci è stata portata a volume con 100 mL di

acetone per ottenere una diluizione di 200x. Questa è stata la soluzione poi analizzata in tutti i vari esperimenti.

Infine sono stati prelevati 3 mL di ogni soluzione e analizzate allo spettrofotometro. Sono state così prese le misurazioni dell'assorbanza delle soluzioni sia diluite che non, in metanolo e acetone della clorofilla dagli spinaci, della pastiglia e quella liquida. Per poi poter determinare, tramite dei calcoli, la quantità di clorofilla contenuta negli spinaci e negli integratori.

3.3 Dimostrare le proprietà antiossidanti utilizzando una soluzione con DPPH

Materiali

- 2,49 mg DPPH al 95%
- Carta Alu
- 150 mL acetone
- 150 mL di metanolo
- Matracci
- Becher
- Spettrofotometro
- Eppendorf da 1,5 mL
- Micropipetta
- 10 μ L clorofilla estratta dagli spinaci
- 10 μ L clorofilla alimentare liquida in acqua distillata (diluata poi con metanolo/acetone)
- 10 μ L clorofilla alimentare in pastiglia (diluata con metanolo/acetone)

Procedimenti

Sono stati misurati 2,49 mg di DPPH e aggiunti a un becher con 50 mL di acetone, e altri 2,49 mg sono stati aggiunti a un becher con 50 mL di metanolo, al fine di sciogliere il sale. Successivamente, le due soluzioni sono state versate in due matracci da 100 mL diversi. In seguito, le soluzioni sono state portate a volume fino a 100 mL, una con l'acetone e, rispettivamente, l'altra con il metanolo. È stata poi misurata l'assorbanza delle soluzioni a 515 e 517 nm [63].

Infine, sono state preparate diverse cuvette con all'interno le diverse clorofille e il DPPH per successivamente misurare la variazione di assorbanza.

Cuvette				
Cuvette	Acetone (μL)	Metanolo (μL)	DPPH (μL)	Campione (μL)
Controllo	200	-	2800	-
Controllo	-	200	2800	-
Campione	100	-	2800	100
Campione	-	100	2800	100

Tabella 3.1: *Preparazione cuvette*

Ogni cuvetta è stata preparata seguendo la tabella 3.1, contenendo complessivamente 3 mL di soluzione. Inoltre sono stati fatti anche due *blank* con solo acetone puro e due *blank* di metanolo puro. Successivamente le cuvette sono state messe nello spettrofotometro ed è stata misurata l'assorbanza circa ogni minuto a 517 nm per tutti i diversi tipi di clorofilla fino a 30 minuti, in modo da poter misurare la diminuzione del picco del DPPH [27]. Di seguito le provette sono state messe nella carta alu e lasciate incubare al buio a 25°C per 1 giorno [64]. Dopodiché l'assorbanza è stata misurata nuovamente a 517 nm.

Capitolo 4

Risultati

4.1 Prima fase sperimentale

Nel seguente capitolo sono riportati i risultati della prima fase sperimentale. La tabella 4.1 riporta i dati dell'assorbanza in acetone, mentre nella tabella 4.2 sono presenti i dati dell'assorbanza in metanolo. Nella tabella 4.3 sono invece riportate le quantificazioni della concentrazione di clorofilla nelle diverse soluzioni analizzate e in quelle iniziali.

Per determinare la quantità di clorofilla totale, dunque sia Chl_a che Chl_b , sono state usate le equazioni 4.2 e 4.1 [65] [66] [67], nelle quali ho riportato le misure dell'assorbanza trovate sperimentalmente.

Equazione per determinare la concentrazione di clorofilla in metanolo [67] con i risultati in nmol/mL:

$$Chl_{tot} = 24,23 \cdot A_{652} - 3,26 \cdot A_{665,2} \quad (4.1)$$

Equazione per determinare la concentrazione di clorofilla in acetone al 80% [66] con i risultati in nmol/mL:

$$Chl_{tot} = 20,31 \cdot A_{645} + 8,05 \cdot A_{663} \quad (4.2)$$

Tabella 4.1: Valori dell'assorbanza della clorofilla in acetone

Lunghezza d'onda [nm]	Assorbanza spinaci in acetone 500x	Assorbanza spinaci in acetone 2000x	Assorbanza liquida in acetone	Assorbanza pastiglia in acetone	Assorbanza spinaci in acetone 200x
644.9	0.2632	0.0182	0.2138	0.4953	1.4204
662.9	0.6295	0.0362	0.1495	0.3462	2.7194

Tabella 4.2: Valori dell'assorbanza della clorofilla in metanolo

Lunghezza d'onda [nm]	Assorbanza clorofilla liquida in metanolo	Assorbanza clorofilla pastiglia in metanolo
652	0,0254	0,0474
665.2	0,0168	0,0326

Tabella 4.3: Concentrazioni di clorofilla

	Clorofilla liquida in metanolo 100x	Clorofilla dalla pastiglia in metanolo 100x	Clorofilla liquida in acetone 100x	Clorofilla pastiglia in acetone	Clorofilla spinaci in acetone 200x	Clorofilla spinaci in acetone 500x	Clorofilla spinaci in acetone 2000x
Clorofilla totale in [mmol/mL] nella cuvetta	0,562	1,04	5,55	12,9	50,7	10,4	0,661
Clorofilla soluzione iniziale [M]	$1,69 \cdot 10^{-10}$	$3,13 \cdot 10^{-9}$	$1,66 \cdot 10^{-9}$	$1,39 \cdot 10^{-9}$	$3,04 \cdot 10^{-7}$		
Clorofilla in una pastiglia [g]		0,0626		0,0278			
Clorofilla in 25 gocce [g]	0,0168		0,166				

Le diverse soluzioni sono state diluite al fine di ottenere una soluzione in grado di consentire un'analisi accurata allo spettrofotometro. Dunque è necessario che siano poco pigmentate, poiché maggiore è la trasparenza della soluzione più lo spettrofotometro è efficace.

Sperimentalmente si è ottenuto un contenuto di clorofillina rameica nelle pastiglie iniziali di 27,6 e 62,6 mg di clorofillina rameica, mentre nella clorofillina liquida di 16,8 e 166 mg.

Purtroppo non sapendo il volume finale della soluzione dell'estrazione della clorofilla degli spinaci, non si può risalire al contenuto, e dunque alla purezza, della clorofilla contenuta nei 5 g di spinaci deidratati. Sappiamo però che la concentrazione dell'estrazione è pari a $3,04 \cdot 10^{-7}$ M.

4.2 Seconda fase sperimentale

Nelle tabelle che seguono sono invece rappresentati i dati della seconda parte sperimentale, in cui è stata fatta una valutazione della capacità antiossidante di diversi tipi di clorofilla, in diversi soluti.

L'esatta concentrazione iniziale del DPPH (C_{DPPH}) nel metanolo è stata calcolata con una curva di calibrazione (4.3), trovata sperimentalmente in lavori di ricerca precedenti [68] e i risultati ottenuti sono stati rappresentati nella tabella 4.4.

$$Abs_{515nm} = (10594 \cdot C_{DPPH}) - 5,2 \cdot 10^{-3} \quad (4.3)$$

Tabella 4.4: Concentrazione iniziale di DPPH in metanolo

Sostanza	Lunghezza d'onda (nm)	Abs (DPPH)	[DPPH] iniziale (mol/L)
Chl pastiglia in metanolo	515	0.505831371	$4,8 \cdot 10^{-5}$
Chl liquida in metanolo	515	0.53083316	$5,1 \cdot 10^{-5}$

Non è stato possibile calcolare la concentrazione iniziale del DPPH in acetone visto che non è stata trovata una curva di calibrazione adatta in lavori di ricerca precedenti.

L'attività antiossidante dei preparati viene espressa come declino della presenza di DPPH, dunque nella percentuale di inibizione (IP) dei radicali di DPPH. Il valore viene determinato con la formula 4.4 [68]:

$$IP = \left[\frac{Abs_{t=0min} - Abs_t}{Abs_{t=0min}} \right] \cdot 100 \quad (4.4)$$

$Abs_{t=0min}$ rappresenta la quantità assorbita dal DPPH a $t = 0$ minuti

Abs_t rappresenta l'assorbanza delle diverse clorofille dopo 30 minuti rispettivamente 24 ore

Nella tabella seguente (4.5) sono rappresentati i risultati ottenuti con la formula 4.4 inserendo i dati trovati sperimentalmente (tabella 7.1). Le percentuali sono state poi rappresentate in un istogramma (figura 4.1) per permettere un confronto facilitato tra le misurazioni prese dopo 30 minuti e quelle dopo 24 ore di incubazione.

Tabella 4.5: Capacità di ridurre il DPPH

Sostanza	IP (30 min)	IP (24 h)	Incremento IP in percentuale
Chl liquida in acetone	2,27%	5,14%	126%
Chl dalla pastiglia in acetone	7,40%	11,73%	59%
Chl dagli spinaci in acetone	4,95%	8,56%	73%
Chl liquida in metanolo	19,94%	27,95%	40%
Chl da pastiglia in metanolo	1,37%	1,02%	-26%

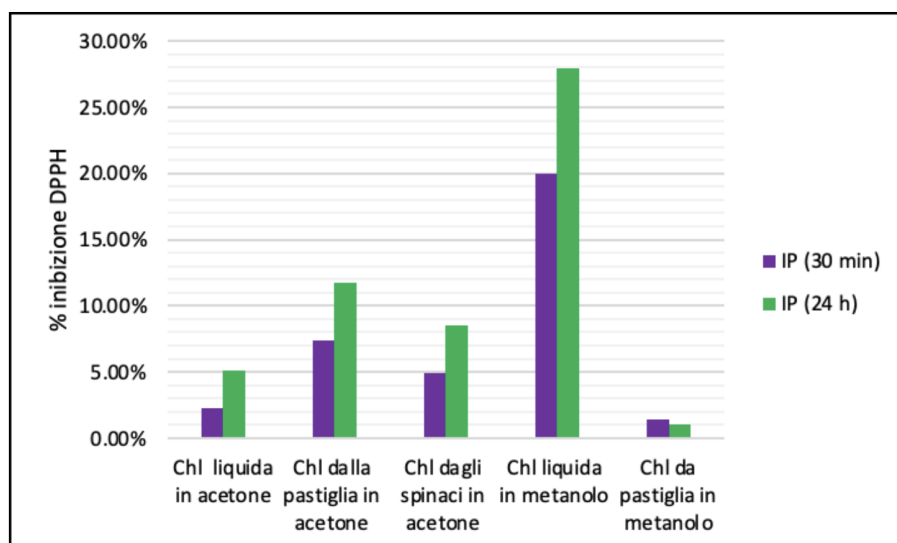


Figura 4.1: *Confronto dell'inibizione (IP) di DPPH*

I dati dell'assorbanza rilevati a 516,9 nm (tabella 7.1 in allegato), sono stati rappresentati nei grafici sulle pagine successive. Visto che è possibile determinare la quantità di DPPH grazie alla misura dell'assorbanza in un determinato momento, i grafici permettono di trarre delle conclusioni sull'efficacia antiossidante di una soluzione.

I grafici 4.2 e 4.4 rappresentano l'inibizione del radicale DPPH nel corso di 24h con il tempo in scala logaritmica. I grafici 4.3 e 4.5 rappresentano invece l'inibizione del radical solamente nel corso di 30 minuti.

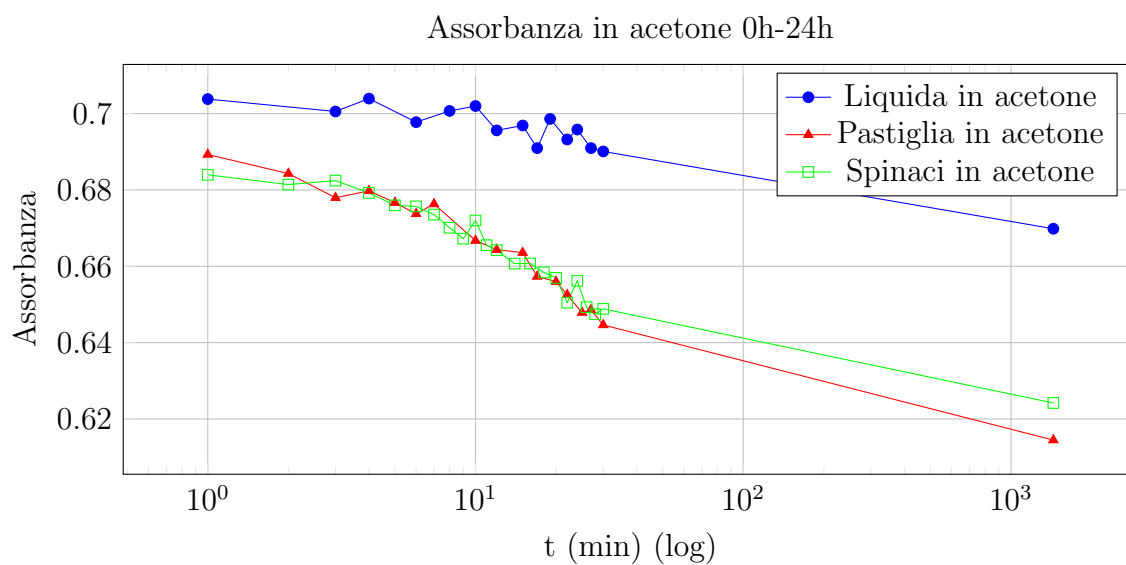


Figura 4.2: *Inibizione del radicale DPPH in acetone nel corso di 24h in scala logaritmica a 516.9 nm*

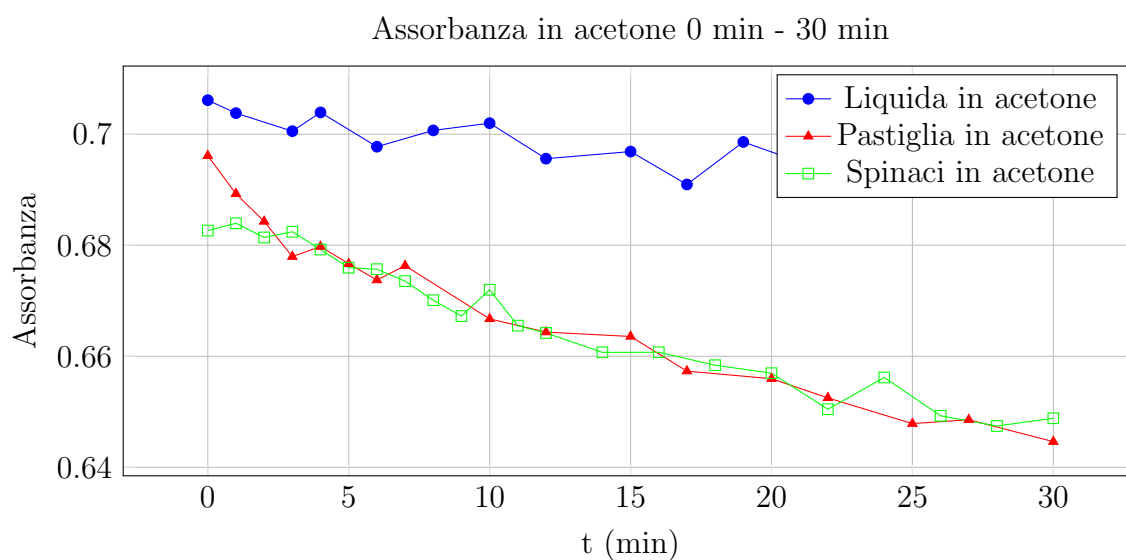


Figura 4.3: *Inibizione del radicale DPPH in acetone nel corso di 30 minuti a 516.9 nm*

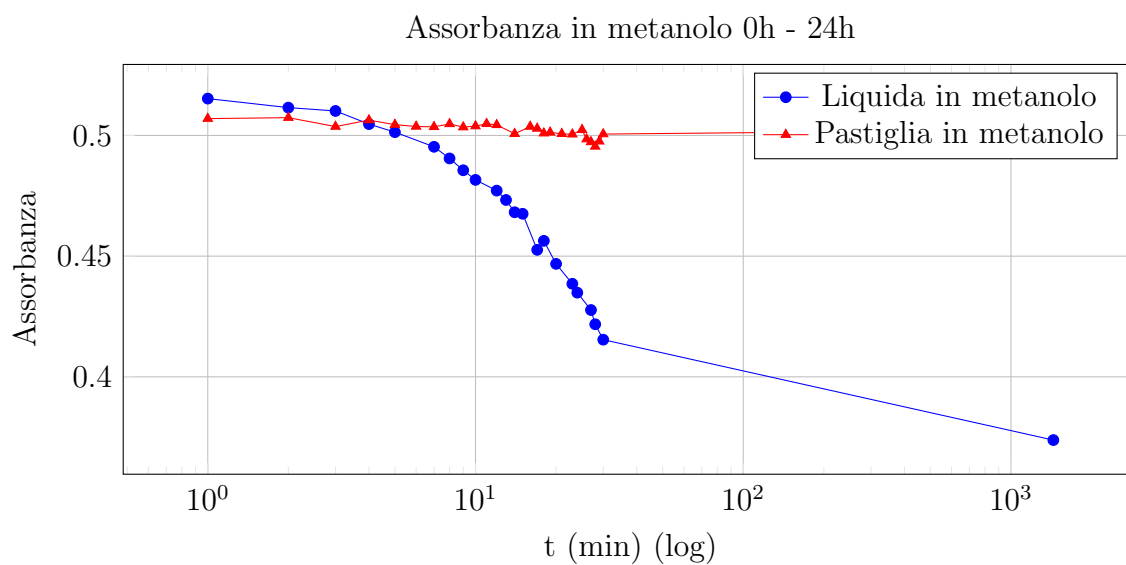


Figura 4.4: *Inibizione del radicale DPPH in metanolo in scala logaritmica nel corso di 24 ore a 516.9 nm*

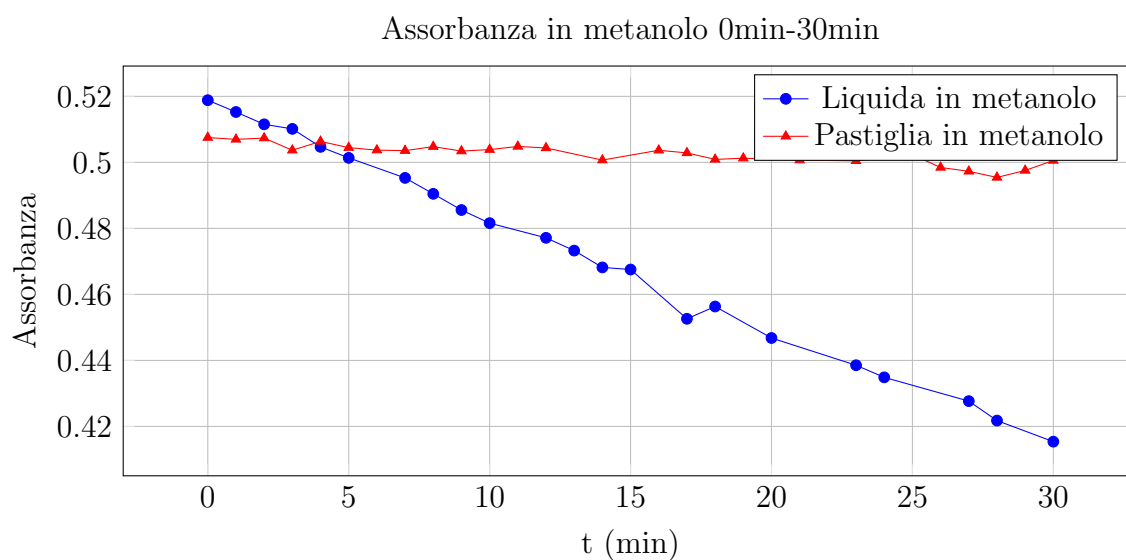


Figura 4.5: *Inibizione del radicale DPPH in metanolo nel corso di 30 minuti a 516.9 nm*

Capitolo 5

Discussione

Innanzitutto va specificato che la clorofilla estratta dagli spinaci non è stata disciolta in metanolo visto che durante l'estrazione è stato usato etere di petrolio, il quale risulta non essere miscibile con il metanolo. Infatti il metanolo, essendo polare, riesce a interagire solo in modo limitato con la molecola apolare di etere di petrolio. D'altra parte però l'etere di petrolio è miscibile con la molecola di acetone visto che entrambe hanno caratteristiche strutturali simili, infatti entrambe le molecole sono apolari. Generalmente la miscibilità di due solventi dipende dalle loro caratteristiche chimiche e tendono a essere miscibili quando sono simili strutturalmente, dunque solventi polari sono miscibili con altri solventi polari e viceversa quelli apolari con altri solventi apolari.

Gli integratori di clorofilla sono stati invece disciolti in acetone, in modo che un solvente risultasse costante nel corso di tutti gli esperimenti, e in metanolo, dato che molti ricercatori avevano rilevato una migliore capacità antiossidante in questo solvente [68].

Osservando i risultati della prima parte sperimentale emerge un forte contrasto a livello della concentrazione misurata sperimentalmente (tabella 4.3) e quella indicata sull'imballaggio dell'integratore. Infatti nel caso della clorofillina liquida, l'imballaggio sostiene che 25 gocce, dunque circa 0,71 mL sempre secondo l'imballaggio, contengono circa 0,1 g di clorofillina rameica, ma sperimentalmente ne rileviamo 0,0168 g nel caso del metanolo e 0,166 g nel caso dell'acetone. Questa problema può essere ricondotto al fatto che le gocce non sempre escono uniformemente dal contagocce e dunque potrebbe causare delle variazioni, ma anche alla presenza di altri errori sperimentali inevitabili durante vari procedimenti.

Questa contraddizione è ritrovabile anche nella pastiglia contenente clorofillina, la cui concentrazione secondo le indicazioni sull'imballaggio dovrebbe essere pari a 0,02

g per pastiglia. Sperimentalmente però la quantità di clorofillina contenuta in una pastiglia vale, 0,062 g per la misurazione in metanolo e 0,027 g per quella in acetone. Essendo in entrambi il caso la misurazione maggiore di quello che dovrebbe essere, il problema può essere ricondotto al fatto che il valore sull'imballaggio sia solamente una stima. Si sarebbero dovute dunque fare più misurazioni di diverse pastiglie dello stesso integratore in stessi solventi, in modo da verificare l'effettiva concentrazione della pastiglia. La stessa cosa vale anche per la clorofilla liquida, per la quale si avrebbe dovuto comprare più flaconi della stessa marca e fare misurazioni nello stesso solvente in modo da poter verificare se il dato indicato sull'imballaggio sia effettivamente veritiero.

Grazie a ripetute misurazione sarebbe stato anche possibile ricondurre il problema al fatto della poca riproducibilità nella fabbricazione degli integratori, visto che il mercato di quest'ultimi è poco regolamentato.

A livello nazionale gli integratori alimentari sono categorizzati come derrate alimentari, rientrando dunque sotto la legislazione alimentare [69]. Dunque non sono sottoposte a una procedura di autorizzazione ufficiale, ma la responsabilità del rispetto dei requisiti legali appartiene al produttore e al distributore, vale infatti il controllo autonomo. In particolare dunque l'integratore prodotto deve essere sicuro, cioè non compromettere la salute, e i consumatori non devono essere ingannati dai loro benefici [70].

Un integratore alimentare può contenere vitamine, sali minerali o altre sostanze che possiedono un effetto nutritivo o fisiologico. Sono offerti sul commercio in piccoli quantitativi e si presentano in capsule, falconi o compresse. La quantità massima di sostanza che contengono però non deve superare la dose giornaliera raccomandata dall'ambito medico [71]. Per poter essere commercializzati devono però soddisfare alcuni requisiti: non devono avere alcun effetto farmacologico, non devono contenere sostanze tossiche, rispettare le concentrazioni massime prescritte e non essere pubblicizzate come cure o prevenzioni per malattie [69]. Visto che non vengono sottoposte a una procedura di controllo ufficiale, le indicazioni sull'imballaggio potrebbero non corrispondere completamente alla realtà. Questo fatto spiega dunque la contraddizione tra i valori trovati sperimentalmente e quelli indicati sull'imballaggio dei due diversi integratori di clorofillina rameica.

La tabella dei dati 4.4 evidenzia la concentrazione iniziale del radicale DPPH in metanolo. Dai dati si nota una minor quantità del radicale presente nella soluzione usata per la clorofilla proveniente dalla pastiglia. Ma si tratta di una differenza minima rispetto alla misurazione della soluzione usata per la clorofilla liquida. Teoricamente però dovrebbero essere uguali in entrambi i casi ed essere pari a $6 \cdot 10^{-5}$ M. La differenza può essere attribuita a errori sperimentali, poiché la concentrazio-

ne desiderata di DPPH nel metanolo è stata ottenuta attraverso una diluizione, a differenza della soluzione in acetone, dove 2,49 mg di DPPH sono stati direttamente disciolti con 100 mL di acetone. Dunque la quantità effettiva di DPPH nel campione diluito potrebbe essere stata influenzata dal uso delle micropipette e la sospensione non completamente omogenea del DPPH.

Purtroppo non avendo trovato una curva di calibrazione adatta per la determinazione della concentrazione di DPPH in acetone, non è stato possibile fare un confronto tra la concentrazione iniziale di DPPH in metanolo con quella in acetone. Sarebbe però stato interessante osservare questo aspetto in modo da poterlo mettere in relazione alla capacità antiossidante delle diverse clorofille analizzate.

Analizzando i diversi protocolli, incluso quello originale di Blois [23], è stato rilevata una netta separazione tra ricercatori che prendevano le misurazioni dell'assorbanza solo nel corso di 30 minuti e coloro che prendevano unicamente le misurazioni dopo 24h di incubazione. Per ottenere più risultati e consentire un confronto maggiore, sono state effettuate misurazioni sia ogni minuto, nel corso di 30 minuti, che dopo 24h.

I risultati della tabella 4.5 mostrano un aumento medio di 54% dopo le 24 ore, indicando l'importanza di considerare anche l'aspetto del tempo nella valutazione della capacità antiossidante.

La diminuzione della percentuale della capacità antiossidante della clorofilla contenuta nella pastiglia diluita in metanolo dopo le 24h è giustificabile unicamente con dei problemi legati alla misurazione, ma dovrebbero essere indagati ulteriormente per garantire la validità dei risultati. Purtroppo però non è stato possibile rifare l'esperimento, in specifico la misurazione, essendo andato persa sia la soluzione di DPPH preparata precedentemente che le soluzioni di clorofilla a causa di un riordino nei laboratori.

Tabella 5.1: *Potenziali di inibizione a parità di concentrazione*

Sostanza	IP (30 min)	IP (30 min) proporzionali a concentrazione uguali
Chl liquida in acetone	2,27%	21,11%
Chl dalla pastiglia in acetone	7,40%	29,23%
Chl dagli spinaci in acetone	4,95%	4,95%
Chl liquida in metanolo	19,94%	1800,70%
Chl da pastiglia in metanolo	1,37%	66,46%

La clorofilla naturale, estratta dagli spinaci, però, mostra la minor attività antiossidante rispetto agli altri composti clorofilliani analizzati. Il basso potenziale di inibizione della clorofilla naturale è molto probabilmente data dalla sua alta instabilità chimica. Infatti, anche un minimo di esposizione alla luce luminosa porterebbe causare delle variazioni a livello strutturale cambiandone dunque le caratteristiche

antiossidanti [68]. Inoltre, è anche da considerare un aspetto tempistico visto che gli spinaci non sono stati usati subito dopo la loro estrazione, ma sono rimasti per due mesi in frigorifero a 5° C. Un'altra causa della differenza può essere attribuita a impurezze difficilmente gestibili in un laboratorio scolastico.

Nella tabella 5.1, sono raffigurati i diversi potenziali di inibizione del DPPH nel corso dei 30 minuti. Le percentuali a destra sono in proporzione, con una concentrazione fissata pari a $5,074 \cdot 10^{-8}$ M, cioè uguale a quella degli spinaci ottenuta sperimentalmente. Questa manipolazione dei dati ci permette di fare dei confronti. Infatti, vediamo chiaramente come gli integratori diluiti in metanolo risultano essere fino a 3 volte più efficaci che quelli in acetone. Possiamo dunque concludere che il solvente abbia un ruolo importante a livello di solubilità del soluto, permettendogli di agire maggiormente. Infatti molto probabilmente il solvente usato e la struttura di esso ha un influsso sul tipo di interazioni all'interno della soluzione. Specialmente possiamo ipotizzare che a dipendenza del solvente usato il radicale venga stabilizzato in modo diverso, visto che il suo elettrone spaiato è in grado di interagire con il solvente. Nel caso in cui le interazioni tra un determinato solvente e il radicale siano maggiori, la capacità antiossidante del soluto risulta essere minore visto che il radicale viene già stabilizzato dal solvente. Sicuramente però non sono da tralasciare errori sperimentali. Infatti non avendo potuto rifare gli esperimenti e le misurazione più volte, i risultati non possono essere considerati assolutamente veritieri non avendo una doppia conferma.

La clorofillina rameica risulta essere maggiormente solubile nel metanolo, permettendo infatti una maggiore capacità antiossidante [72]. Questo ipotesi si riflette anche nei dati della tabella 5.1 che riguardano la pastiglia disciolta in acetone e in metanolo. Infatti risulta essere, a parità di concentrazione del complesso rameico, più efficace nel metanolo. I dati della clorofillina rameica liquida, che nella tabella 5.1 presentano la maggior capacità antiossidante, sarebbero da analizzare in modo più accurato. Infatti risulta strano che la soluzione possieda un potenziale di inibizione talmente alto quando nella cuvetta analizzata possedeva la minor concentrazione di clorofilla (vedi tabella 4.3). Molto probabilmente si tratta di un errore sperimentale avvenuto durante i calcoli o durante la misura dell'assorbanza, ma che non è stato possibile identificare la causa specifica. Non essendoci stato tempo e risorse, le misurazione non sono state potute essere ripetute, dunque risulta meglio escludere i dati riguardanti la clorofillina rameica liquida in metanolo durante la discussione, essendo che non possiamo essere sicura della loro accuratezza.

La differenza tra il potenziale di inibizione tra la clorofilla estratta dagli spinaci e quella semisintetica è data sicuramente dalla differenza di struttura, specialmente dalla presenza dello ione rame al centro della struttura, come ipotizzato da molti ricercatori e discusso già nel capitolo 2.4.5. Inoltre anche dal fatto che lo ione rameico Cu^{2+} è un agente riducente più forte dello ione magnesio, avendo un potenziale redox maggiore.

Complessivamente i dati confermano l'ipotesi del lavoro, dimostrando che la clorofilla proveniente dagli spinaci possiede una capacità antiossidante pari a 4,95% per una concentrazione a $5,074 \cdot 10^{-8}$ M, sebbene questa sia minore a quella dei pigmenti semisintetici. Dal grafico 4.2 possiamo ricavare un'equazione di diminuzione dell'assorbanza (5.1), dunque della diminuzione della presenza di DPPH, segnalando così la presenza di capacità antiossidante negli spinaci:

$$Abs(t) = 0,682 \cdot e^{-0,1 \cdot t} \quad (5.1)$$

Sull'impallaggio degli integratori si consiglia di ingerire 1 pastiglia, rispettivamente 25 gocce di clorofillina rameica, ottenendo una capacità antiossidante pari a circa 25%. Per ottenere la stessa capacità antiossidante si dovrebbe dunque ingerire circa 1,49 kg di spinaci. Questa stima si basa sulla media di contenuto di clorofilla negli spinaci, che è di circa 0,11 mg/g secondo Higdon [73]. Si deve però specificare che probabilmente la quantità di spinaci da ingerire sarebbe molta minore, visto che il valore della capacità antiossidante misurato riguarda delle molecole di clorofilla in parte già degradate. Infatti, gli spinaci da cui sono state ottenute sono stati deidratati con calore, esposti al sole e successivamente sono state conservate a lungo tempo dopo l'estrazione. Questo confronto evidenzia che l'utilizzo di integratori risulta essere più pratico in termini di quantità di sostanza necessaria per ottenere la stessa dose di clorofilla. Inoltre viene preferito l'uso degli integratori visto che alcuni studi indicano una maggiore assorbibilità della clorofillina rameica durante la digestione. Ulteriori motivazioni che ne giustificano l'uso sono la sua stabilità, risultando così più convenienti a livello economico visto che sono conservabili a lungo, permettendone un uso maggiore. Tuttavia, nonostante l'integrazione della clorofillina, è essenziale mantenere una alimentazione equilibrata. Infatti, frutta e verdura sono alimenti ricchi di vitamine e fibre fondamentali per la salute umana. In questo contesto, va notato che alcuni dietologi sconsigliano vivamente l'uso eccessivo di integratori, poiché gli effetti negativi sulla salute umana non sono ancora completamente conosciuti [4].

Gli integratori sono spesso l'opzione scelta visto la loro elevata concentrazione di clorofilla rispetto agli spinaci. Tuttavia se consideriamo una parità di soldi spesi, l'acquisto di integratori potrebbe non essere più tanto conveniente. Infatti questi prodotti, oltre a essere molto costosi di principio con un costo che varia da CHF 17 a flacone fino a CHF 50 per 200 pastiglie, mostrano un potere antiossidante significativamente inferiore rispetto agli spinaci. Questi ultimi, a parità di spesa, possiedono una capacità antiossidante quasi 13 volte maggiore a quella degli integratori (vedi tabella 5.2). Pertanto per qualcuno che desidera aumentare l'assunzione di clorofilla nella propria alimentazione, è consigliabile valutare attentamente anche l'aspetto economico, per non rischiare di compiere una spesa inutile. Infatti, potrebbe risultare più conveniente optare per gli spinaci, nonostante la loro durata di conservazione sia minore rispetto agli integratori. Risultano però essere delle decisioni individuali dove ognuno deve valutare per se stesso ciò che è meglio per sé.

Tabella 5.2: *Capacità antiossidante a parità di soldi spesi*

Sostanza	Prezzo al Kg	Quantità in g ottenuta per CHF 7,8	capacità antiossidante
Spinaci	CHF 7,80	1000 g	17%
Integratore liquido di Chl	CHF 288,14	0,028 g	0,69 %
Integratore pastiglia di Chl	CHF 590	4,6 g	0,79 %

Per concludere possiamo dire che in tutti i composti analizzati è presente una capacità antiossidante essendoci una diminuzione dell'assorbanza a 516.9 nm, ma essa è limitata. In linea con gli studi condotti da Krishnaiah [27], non possiamo dunque dedurre una capacità di eliminazione dei radicali liberi da parte della sostanza nel corpo umano. Infatti, visto che gli esperimenti sono stati condotti unicamente *in vitro* non sono in grado di tenere conto delle situazioni presenti all'interno di un organismo, come la generazione di una possibile risposta infiammatoria o magari la generazioni di danni dovuti alla sostanza ritenuta antiossidante. Per poter avere delle prove chiare sull'efficacia antiossidante degli estratti si dovrebbero fare delle indagini sistematiche *in vivo*, per poi poterle usare come antiossidanti nella medicina.

Inoltre, per avere dei dati completi e significativi, si dovrebbero fare più misurazioni, con diversi metodi di estrazione e di conservazione degli spinaci oppure con una costante variazione di concentrazione dei diversi soluti analizzati. Le misurazione dovrebbero poi anche essere ripetute più volte in modo da poter limitare gli errori sperimentali e scartare facilmente dati poco accurati. Purtroppo per questioni legate al tempo e alla mancanza delle risorse adatte nella scuola, non è stato possibile farlo.

Capitolo 6

Conclusione

Da questo lavoro sperimentale si può concludere che la clorofilla proveniente dagli spinaci abbia effettivamente un potere antiossidante. Il pigmento naturale però risulta essere meno efficace rispetto alla clorofilla semisintetica contenuta negli integratori, sottolineando l'importanza strutturale che causa una variazione del potenziale antiossidante. Essa infatti è principalmente data dalla presenza dello ione rameico nelle clorofille semisintetiche, come avevano già rilevato molte altre ricerche precedenti [68]. Infatti lo ione rameico risulta permettere una riduzione più efficace visto che possiede più elettroni di valenza. Nel lavoro è anche emerso che la clorofilla semisintetica presente nell'integratore liquido risulta essere più efficace di quella presente nella pastiglia. Questo suggerisce che la modalità di conservazione può influenzare l'efficacia dell'antiossidante. Da questo lavoro possiamo determinare anche che il solvente causa una differenza nel potenziale antiossidante, infatti le clorofiline semisintetiche risultano essere più efficaci nel metanolo. Questo sottolinea l'importanza della scelta delle condizioni della valutazione della capacità antiossidante, particolarmente il solvente usato, durante gli esperimenti rispetto a situazioni che effettivamente potrebbero accadere nella realtà.

Nonostante l'efficacia superiore degli integratori semisintetici, rispetto alla clorofilla degli spinaci, è importante sottolineare che essi non dovrebbero sostituire una dieta equilibrata e ricchi di alimenti vegetali. Infatti, gli integratori possono fornire un contributo vantaggioso per coprire il fabbisogno di clorofilla, ma non contengono altri nutrienti fondamentali, come vitamine e fibre, presenti invece negli alimenti vegetali. Pertanto è meglio promuovere una dieta variegata in modo da garantire una salute ottimale.

In conclusione questo lavoro di ricerca ci permette di capire la capacità antiossidante della clorofilla proveniente dagli spinaci in confronto a quella semisintetica, soffermandosi allo stesso tempo sull'importanza strutturale della molecola che definisce l'attività antiossidante di essa.

Capitolo 7

Sviluppi futuri

Questo lavoro potrebbe proseguire con ulteriori esperimenti basati su diverse metodologie per chiarire l'esatto meccanismo dell'attività antiossidante dei composti analizzati, verificando soprattutto se l'ipotesi dell'importanza dello ione rameico sia veritiera. Sarebbe anche interessante esaminare il potenziale antiossidante di diverse clorofille provenienti da diverse verdure, variandone la concentrazione. Infine, ma non meno importante, si potrebbe proseguire con una ricerca clinica dello studio per verificare l'effettiva efficacia *in vivo* dei benefici di potenziali antiossidanti dei derivati di clorofilla. D'altronde sono già in atto degli studi su come la clorofilla possa fungere da *drug enhancer* per medicinali della chemioterapia [74].

Allegato

Sostanza	Lunghezza d'onda [nm]	Abs [l = 0 min]	Abs [l = 1 min]	Abs [l = 2 min]	Abs [l = 3 min]	Abs [l = 4 min]	Abs [l = 5 min]	Abs [l = 6 min]	Abs [l = 7 min]	Abs [l = 8 min]	Abs [l = 9 min]	Abs [l = 10 min]	Abs [l = 11 min]	Abs [l = 12 min]	Abs [l = 13 min]	Abs [l = 14 min]
Di Ispide in acetone	516.9	0.6673285	0.7161426	0.7327849	0.7526926	0.7326575	0.6874627									
Chi di Ispide in acetone	516.9	0.6759044	0.6611502	0.6807368	0.6453003	0.6739112	0.6705618	0.6767046	0.6781344							
Chi di Ispide in acetone	516.9	0.6324265	0.6824831	0.6889187	0.6813661	0.6444517	0.6762621	0.6766666	0.6768671	0.6730364	0.6705461	0.6624206	0.6719624	0.6651168		0.6600764
Chi di Ispide in metanolo	516.9	0.5027876	0.5071499	0.5087364	0.5073617	0.5062368	0.5041071	0.5027167	0.5026645	0.5047363	0.5034006	0.5026742	0.5048194	0.5047484		0.5009906
Chi di Ispide in metanolo	516.9	0.5027024	0.5198377	0.5126841	0.5110308	0.5101877	0.5047069	0.5027867	0.4999671	0.4964215	0.4924793	0.4913668			0.4792717	0.4883038
Di Ispide in acetone	516.9	0.6671144	0.6663475		0.6663014			0.6663013		0.6663416			0.6663017		0.6663013	0.6663016
Chi di Ispide in acetone	516.9	0.6659346	0.6710987			0.6694033		0.6651006			0.6497191		0.6481786		0.6440318	0.6447244
Chi di Ispide in acetone	516.9	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144	0.6671144
Chi di Ispide in metanolo	516.9	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149	0.5027149
Chi di Ispide in metanolo	516.9	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303	0.4874303

Figura 7.1: Assorbanza sperimentale a 516.9 nm

Elenco delle figure

0.1	Clorofilla 3D [1]	i
2.1	Schema delle reazioni redox [6]	4
2.2	Il DPPH [21]	11
2.3	Diverse forme di risonanza del DPPH	12
2.4	A) Difenilammina, B) anello picrilico, C) radicali idrazilico	13
2.5	Reazione del DPPH [26]	13
2.6	Meccanismo di reazione del DPPH con un nucleofilo X^- [21]	14
2.7	Meccanismo di reazione del DPPH con un radicale libero X^\bullet [21]	14
2.8	Reazioni ed enzimi coinvolti nella generazione e nelle reazioni a catena dovute delle ROS, che sono: superossido ($O_2^{\bullet-}$), idrossile (OH^\bullet), perossile (ROO^\bullet) e perossido di idrogeno (H_2O_2). Enzimi antiossidanti: SOD: superossido dismutasi, CAT: catalasi, GPx: glutazione perossidasi, GR: glutazione reductasi, GSH/GSSG: glutazione ridotto/ossidato [19]	17
2.9	Cloroplasto [32]	19
2.10	Catena di trasporto degli elettroni [34]	20
2.11	Strutture molecolari delle clorofille [40]	22
2.12	Diversi derivati della clorofilla [19]	26
2.13	Spettro di radiazione elettromagnetica [58]	30

2.14	Struttura spettrofotometro: (a) fonte di luce, (b) collimatore, (c) monocromatore (prisma/reticolo), (d) fenditura selettiva / d'uscita, (e) cuvetta, (f) rilevatore, (g) lettore [59]	30
4.1	Confronto dell'inibizione (IP) di DPPH	41
4.2	Inibizione del radicale DPPH in acetone nel corso di 24h in scala logaritmica a 516.9 nm	42
4.3	Inibizione del radicale DPPH in acetone nel corso di 30 minuti a 516.9 nm	42
4.4	Inibizione del radicale DPPH in metanolo in scala logaritmica nel corso di 24 ore a 516.9 nm	43
4.5	Inibizione del radicale DPPH in metanolo nel corso di 30 minuti a 516.9 nm	43
7.1	Assorbanza sperimentale a 516.9 nm	53

Elenco delle tabelle

3.1	Preparazione cuvette	37
4.1	Valori dell'assorbanza della clorofilla in acetone	39
4.2	Valori dell'assorbanza della clorofilla in metanolo	39
4.3	Concentrazioni di clorofilla	39
4.4	Concentrazione iniziale di DPPH in metanolo	40
4.5	Capacità di ridurre il DPPH	40
5.1	Potenziali di inibizione a parità di concentrazione	46
5.2	Capacità antiossidante a parità di soldi spesi	49

Bibliografia

- [1] Wikipedia, *Clorofilla* — *Wikipedia, L'enciclopedia libera*, <https://it.wikipedia.org/wiki/Clorofilla/>, [accesso al 24 luglio 2023], 2022.
- [2] E. Wilson, *Why are people on TikTok drinking chlorophyll, and should you start?* <https://fashionjournal.com.au/beauty/tiktok-drinking-chlorophyll-trend/>, accesso: 21-07-2023, 2021.
- [3] X115, *Clorofilla e Clorofillina — Benefici — Pelle e Salute*, <https://magazine.x115.it/x115/clorofilla/>, accesso: 10-05-2023, 2022.
- [4] C. Clinic, *Are There Health Benefits to Using Liquid Chlorophyll?* <https://health.clevelandclinic.org/are-there-health-benefits-to-using-liquid-chlorophyll/>, accesso: 04-12-2023, 2021.
- [5] L. J. Peter Atkins e L. Laverman, *Fondamenti della chimica generale*. Zanichelli, 2018.
- [6] L. T. Pages, *Redox*, <https://theory.labster.com/it/redox-reactions-crl/>, accesso: 03-12-2023.
- [7] V. Amendola e G. Rizzelli, *Chimica per concetti 2*. ETAS Libri, 1998.
- [8] D. Pinzani, C. Panero e G. Bagni, *Sperimentare la chimica*. Zanichelli, 2015.
- [9] F. Rappaport, M. Guergova-Kuras, P. J. Nixon, B. A. Diner e J. Laverne, «Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II,» *Biochemistry*, vol. 41, n. 26, pp. 8518–8527, 2002.
- [10] K. H. Cheeseman e T. F. Slater, «An Introduction to Free Radical Biochemistry,» *British Medical Bulletin*, vol. 49, n. 3, pp. 481–493, 1993.
- [11] V. Lobo, A. Patil, A. Phatak e N. Chandra, «Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health,» *Pharmacognosy Reviews*, vol. 4, n. 8, pp. 118–126, 2010.
- [12] N. F. Santos-Sánchez, R. Salas-Coronado, C. Villanueva-Cañongo e B. Hernández-Carlos, «Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism,» in *Antioxidants*, E. Shalaby, cur., Rijeka: IntechOpen, 2019, cap. 2.

- [13] P. Southorn e G. Powis, «Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions,» *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 63, n. 4, pp. 381–389, 1988.
- [14] M. Battino, P. Bullon, M. Wilson e H. Newman, «Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of anti-oxidants to free radicals and reactive oxygen species. Critical reviews in oral biology and medicine,» *American Association of Oral Biologists*, vol. 10, n. 4, pp. 458–476, 1988.
- [15] W.-L. Lee, J.-Y. Huang, L.-F. Shyur et al., «Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms,» *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 2013, 2013.
- [16] F. C. Fang, «Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies,» *Nature Reviews Microbiology*, vol. 2, n. 10, pp. 820–832, 2004.
- [17] V. Dhawan, «Reactive oxygen and nitrogen species: general considerations,» in *Studies on respiratory disorders*, Springer, 2014, pp. 27–47.
- [18] «Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine,» *Redox biology*, vol. 46, n. 4, pp. 180–183, 2015.
- [19] A. Pérez-Gálvez, I. Viera e M. Roca, «Carotenoids and Chlorophylls as Antioxidants,» *Antioxidants*, vol. 6, n. 9, p. 505, 2020.
- [20] P. Molyneux et al., «The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity,» *Songklanakarin J. Sci. Technol*, vol. 26, n. 2, pp. 211–219, 2004.
- [21] P. Ionita, «The Chemistry of DPPH· Free Radical and Congeners,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, n. 4, 2021.
- [22] S. Goldschmidt e K. Renn, «Zweiwertiger Stickstoff: Über das , -Diphenyl-trinitrophenyl-hydrazyl. (IV. Mitteilung über Amin-Oxydation),» *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, vol. 55, n. 3, pp. 628–643, 1922. DOI: <https://doi.org/10.1002/cber.19220550308>.
- [23] B. Marsden, «Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical,» *Nature*, vol. 181, n. 1, pp. 1199–2000, 1958.
- [24] Z. Akar, M. Küçük e H. Doğan, «A new colorimetric DPPH scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs,» *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, vol. 32, n. 1, pp. 640–647, 2017.
- [25] J. Flieger e M. Flieger, «The DPPH/DPPH-H-HPLC-DAD Method on Tracking the Antioxidant Activity of Pure Antioxidants and Goutweed (*Aegopodium podagraria* L.) Hydroalcoholic Extracts,» *Molecules*, vol. 25, n. 24, p. 6005, 2020.

- [26] M. K. Islam, T. Sostaric, L. Y. Lim, K. Hammer e C. Locher, «Development and validation of an HPTLC–DPPH assay and its application to the analysis of honey,» *JPC-J Planar Chromat*, vol. 33, pp. 301–311, 2020.
- [27] D. Krishnaiah, R. Sarbatly e R. Nithyanandam, «A review of the antioxidant potential of medicinal plant species,» *Food and Bioproducts Processing*, vol. 89, n. 3, pp. 217–233, 2011.
- [28] H. Sies, «Oxidative stress: oxidants and antioxidants,» *Exp Physiol*, vol. 82, n. 2, pp. 291–5, 1997.
- [29] B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Löliger e O. I. Aruoma, «The characterization of antioxidants,» *Food and Chemical Toxicology*, vol. 33, n. 7, pp. 601–617, 1995.
- [30] N. Zingarelli, *Lo Zingarelli 2015 - Vocabolario della Lingua Italiana*. Zanichelli, 2015.
- [31] J. Gross, *Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids*. Springer Science e Business Media, 2012.
- [32] Tumeggy, *Chloroplast structure, 3D illustration*, <https://www.sciencephoto.com/media/1112605/view>, accesso: 03-12-2023.
- [33] M. Taylor, E. Simon, J. Dickey, K. Hogan e J. Reece, *Il Campbell – edizione azzurra*. Pearson Italia Spa, 2021.
- [34] N. A. Campbell, J. B. Reece, M. R. Taylor, E. J. Simon e J. L. Dickey, *Biologia Secondo biennio e quinto anno*. Pearson, 2012.
- [35] Wikipedia, *P680 — Wikipedia, L'enciclopedia libera*, [//it.wikipedia.org/w/index.php?title=P680&oldid=130899831](https://it.wikipedia.org/w/index.php?title=P680&oldid=130899831), accesso: 26-09-2023, 2022.
- [36] G. Raszewski, B. A. Diner, E. Schlodder e T. Renger, «Spectroscopic Properties of Reaction Center Pigments in Photosystem II Core Complexes: Revision of the Multimer Model,» *Biophysical Journal*, vol. 95, n. 1, pp. 105–119, 2008.
- [37] U. degli Studi Mediterranea di Reggio Calabria, *Fotosintesi*, https://www.unirc.it/documentazione/materiale_didattico/598_2011_283_12973.pdf, accesso: 28-11-2023, 2011.
- [38] G. Gola, *Clorofilla – Enciclopedia Italiana*, <https://www.treccani.it/enciclopedia/clorofilla%5F%28Enciclopedia-Italiana%29/#%3A~:%3Atext%3DCon%2520questo%2520nome%2520Pelletier%2520e%2520da%2520Senebier%2520%281782%29>, accesso: 10-09-2023, 1931.
- [39] C.-Y. Hsu, P.-Y. Chao, S.-P. Hu e C.-M. Yang, «The Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Chlorophylls and Pheophytins,» *Food and Nutrition Sciences*, vol. 4, n. 8A, pp. 1–8, 2013.

- [40] K. Vaňková, I. Marková, J. Jašprová et al., «Chlorophyll-Mediated Changes in the Redox Status of Pancreatic Cancer Cells Are Associated with Its Anticancer Effects,» *Oxidative medicine and cellular longevity*, vol. 406916, 2018.
- [41] «Copper chlorophyllin: A food colorant with bioactive properties?» *Food Research International*, vol. 46, n. 2, pp. 451–459, 2012.
- [42] L. Hedayatifar, E. Irani, M. Mazarei et al., «Optical absorption and electronic spectra of chlorophylls a and b,» *RSC advances*, vol. 6, n. 111, pp. 109778–109785, 2016.
- [43] A. Aminot e F. Rey, «Standard procedure for the determination of chlorophyll a by spectroscopic methods,» *International Council for the Exploration of the Sea*, vol. 112, p. 25, 2000.
- [44] G. Jeana, *Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids*. Springer, 1995.
- [45] I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani e R. Colombo, «Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress,» *Clinica Chimica Acta*, vol. 329, n. 1, pp. 23–38, 2003.
- [46] S. Kumar, B. Shankar e K. B. Sainis, «Effect of chlorophyllin against oxidative stress in splenic lymphocytes in vitro and in vivo,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1672, n. 2, pp. 100–111, 2004.
- [47] K. Kavitha, P. Thiyagarajan, J. Rathna @ Nandhini, R. Mishra e S. Nagini, «Chemopreventive effects of diverse dietary phytochemicals against DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis via the induction of Nrf2-mediated cytoprotective antioxidant, detoxification, and DNA repair enzymes,» *Biochimie*, vol. 95, n. 8, pp. 1629–1639, 2013.
- [48] W. E. Contributors, *Health Benefits of Chlorophyll*, <https://www.webmd.com/diet/health-benefits-chlorophyll>, accesso: 30-07-2023, 2022.
- [49] H. E. Kirschner, *CHLOROPHYLL as THERAPY–Cancer–Germs–Intestines*, <http://www.medicinacomplementar.com.br/biblioteca/pdfs/Cancer/ca-4654.pdf>, 2020.
- [50] J. C. Brocklehurst, «Assessment of Chlorophyll as a Deodorant,» *British Medical Journal*, vol. 1, n. 4809, p. 541, 1953.
- [51] G. R. Seely, «The energetics of electron-transfer reactions of chlorophyll and other compounds,» *Photochemistry and Photobiology*, vol. 25, n. 5, pp. 639–654, 1978.

- [52] K. Chen e M. Roca, «In vitro digestion of chlorophyll pigments from edible seaweeds,» *Journal of Functional Foods*, vol. 40, pp. 400–407, 2018.
- [53] I. Viera, A. Pérez-Gálvez e M. Roca, «Green Natural Colorants,» *Molecules*, vol. 24, n. 1, 2019. indirizzo: <https://www.mdpi.com/1420-3049/24/1/154>.
- [54] *Meccanismi di azione degli antiossidanti*, [https://www.univpm.it/Entra/Engine/RAServeFile.php/f/P002330/allegati_ins/ChiII\(0910\)Dia05Antiossidanti.pdf](https://www.univpm.it/Entra/Engine/RAServeFile.php/f/P002330/allegati_ins/ChiII(0910)Dia05Antiossidanti.pdf), accesso: 12-11-2023.
- [55] Nist, *Spectrophotometry*, <https://www.nist.gov/programs-projects/spectrophotometry>, accesso: 31-10-2023, 2021.
- [56] K. Vo, *Spectrophotometry*, <https://shorturl.at/acIJP>, accesso: 31-10-2023.
- [57] P. P. Valim, *Introdução à Espectrofotometria*, <https://cienciaemacao.com.br/introducao-a-espectrofotometria/>, accesso: 31-10-2023, 2020.
- [58] Radioastronomia, *Le componenti dello spettro elettromagnetico*, <https://www.radio2space.com/it/le-componenti-dello-spettro-elettromagnetico/>, accesso: 04-12-2023, 2013.
- [59] Kasvi, *Espectrofotometria: Análise da concentração de soluções*, <https://kasvi.com.br/espectrofotometria-analise-concentracao-solucoes/>, accesso: 04-12-2023.
- [60] J. Clark, *The Beer-Lambert Law*, [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/The_Beer-Lambert_Law/](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy_Basics/The_Beer-Lambert_Law/), accesso: 31-10-2023.
- [61] D. Calloway, «Beer-Lambert Law,» *Journal of Chemical Education*, vol. 74, n. 7, p. 744, 1997.
- [62] E. Dikio e D. Isabirye, «Isolation of Chlorophyll A from Spinach Leaves,» *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, vol. 22, n. 2, pp. 301–304, 2008.
- [63] O. P. Sharma e T. K. Bhat, «DPPH antioxidant assay revisited,» *Food Chemistry*, vol. 113, n. 4, pp. 1202–1205, 2009.
- [64] A. Sachett, M. Gallas-Lopes, G. M. M. Conterato, A. P. Herrmann e A. Piatoi, *Antioxidant Activity by DPPH Assay: In vitro*, <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.btbpnimn>, accesso: 12-05-2023, 2021.
- [65] K. Miazek e S. Ledakowicz, «Chlorophyll extraction from leaves, needles and microalgae: A kinetic approach,» *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, vol. 6, n. 2, pp. 107–115, 2013.

- [66] D. I. Arnon, «COPPER ENZYMES IN ISOLATED CHLOROPLASTS. POLYPHENOLOXIDASE IN BETA VULGARIS,» *Plant Physiology*, vol. 24, n. 1, pp. 1–15, 1949.
- [67] R. Porra, W. Thompson e P. Kriedemann, «Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy,» *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, vol. 975, n. 3, pp. 384–394, 1989.
- [68] U. M. Lanfer-Marquez, R. M. C. Barros e P. Sinnecker, «Antioxidant Activity of Chlorophylls and Their Derivatives,» *Food Research International*, vol. 38, n. 8-9, pp. 885–891, 2005.
- [69] *Integratori alimentari*, <https://www.blv.admin.ch/blv/it/home/lebensmittel-und-ernaehrung/lebensmittelsicherheit/einzelne-lebensmittel/nahrungsergaenzung.html>, accesso: 14-12-2023, 2023.
- [70] *Domande e risposte – Integratori alimentari - All'attenzione dei consumatori*, https://www.blv.admin.ch/dam/blv/it/dokumente/lebensmittel-und-ernaehrung/lebensmittelsicherheit/lebensmittel-im-fokus/faq-nem-konsumenten.pdf.download.pdf/faq-nem-konsumenten_IT.pdf, accesso: 14-12-2023, 2022.
- [71] *Ordinanza del DFI sugli integratori alimentari*, <https://www.fedlex.admin.ch/filestore/fedlex.data.admin.ch/eli/cc/2017/155/20200701/it/pdf-a/fedlex-data-admin-ch-eli-cc-2017-155-20200701-it-pdf-a-5.pdf>, accesso: 14-12-2023, 2020.
- [72] R. Podgornik, G. Cevc e B. Žekš, «Solvent structure effects in the macroscopic theory of van der Waals forces,» *The Journal of chemical physics*, vol. 87, n. 10, pp. 5957–5967, 1987.
- [73] J. Higdon, V. J. Drake e R. E. Kopec, *Chlorophyll and Metallo-Chlorophyll Derivatives*, <https://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/chlorophyll-metallo-chlorophyll-derivatives>, accesso: 03-12-2023, 2022.
- [74] V. K. Mishra, R. Bacheti e A. Husen, «Medicinal uses of chlorophyll: A critical overview,» *Chlorophyll: Structure, function and medicinal uses*, pp. 177–196, 2011.