

CORSO DI LAUREA IN BIOLOGIA PER LA SOSTENIBILITÀ



METODOLOGIE BIOANALITICHE ***Modulo B (6 CFU)***

LEZIONE 1

Prof. Paola Di Donato

Dipartimento di Scienze e Tecnologie

Stanza 520, V piano lato NORD

Tel. 081 547 6625

E-mail: paola.didonato@uniparthenope.it

METODOLOGIE PER IL DOSAGGIO DI SOSTANZE ANTIOSSIDANTI

- **Definizione di stress ossidativo**
- **Definizione di sostanza antiossidante**
- **Principali metodologie per il saggio dell'attività antiossidante**

• **Definizione di stress ossidativo**

perturbazione dell'equilibrio redox fisiologico, non bilanciata da adeguate risposte adattative della cellula

Equilibrio redox: bilanciamento dei processi di ossidoriduzione che avvengono all'interno della cellula (livelli di sostanze ossidanti altamente reattive)

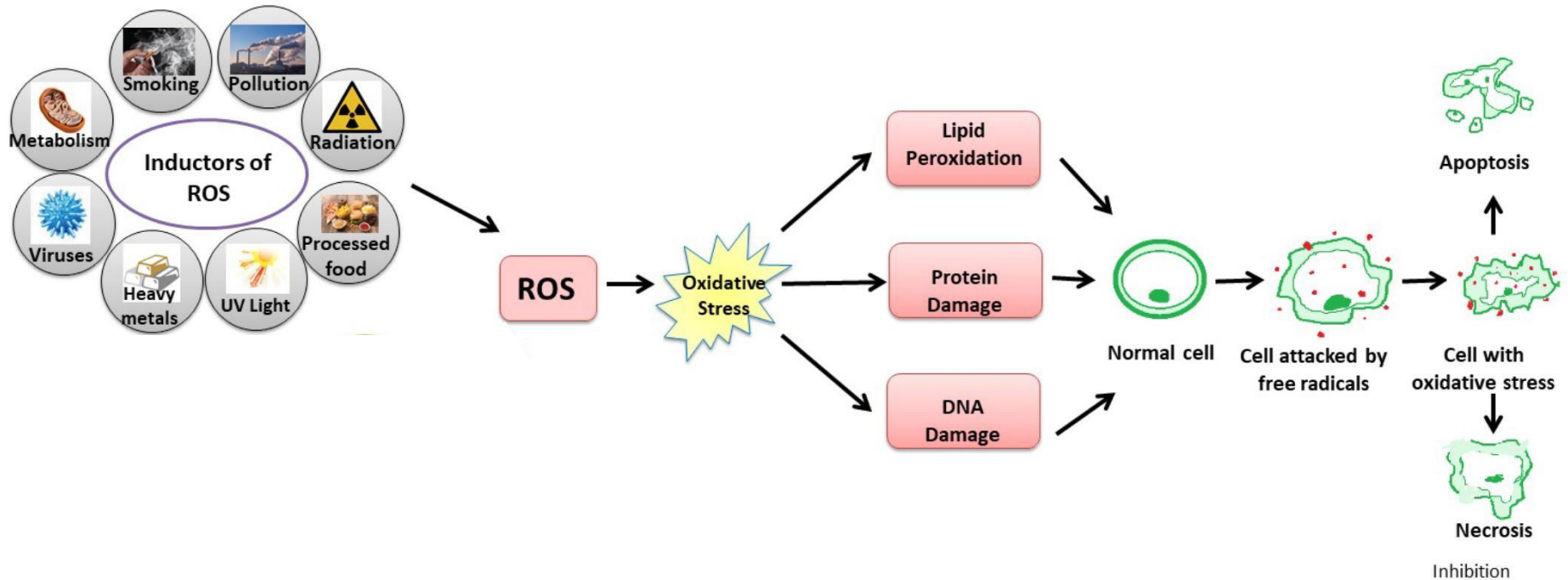
• Definizione di sostanza antiossidante

Sostanza di origine naturale o sintetica in grado di prevenire o rallentare fenomeni di ossidazione mediante disattivazione delle specie ossidanti o controllo della loro produzione

“any substance that when present at relatively low concentrations, compared with those of the oxidizable substrate, significantly delays or inhibits oxidation of that substrate”

(Halliwell, & Gutteridge, *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, 18, 125–126).

• Definizione di sostanza antiossidante



• Definizione di sostanza ossidante altamente reattiva

ROS: Reactive Oxygen Species

RNS: Reactive Nitrogen Species

RCS: Reactive Chlorine Species

Radicali

Specie non radicaliche

• ROS

Free radicals

Reactive oxygen species (ROS)

Superoxide, $O_2^{\bullet-}$

Hydroxyl, OH^{\bullet}

Hydroperoxyl, HO_2^{\bullet}

Peroxyl, RO_2^{\bullet}

Alkoxyl, RO^{\bullet}

Carbonate, $CO_3^{\bullet-}$

Carbon dioxide, $CO_2^{\bullet-}$

Nonradicals

Hydrogen peroxide, H_2O_2

Hypobromous acid, $HOBr$

Hypochlorous acid, $HOCl$

Ozone O_3

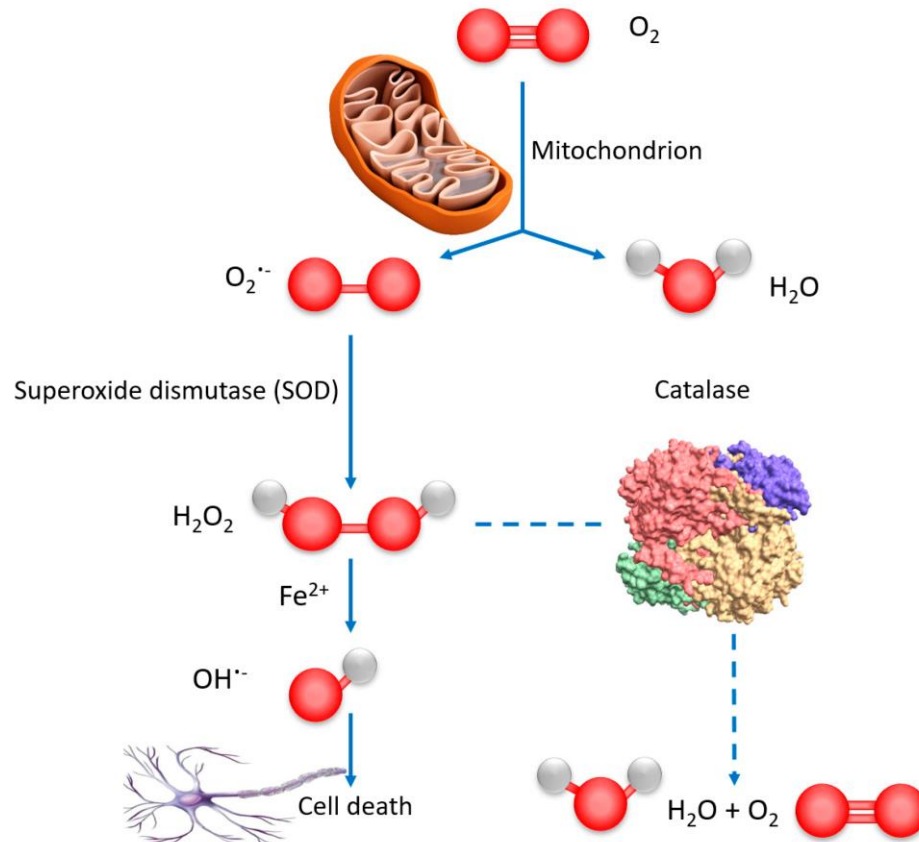
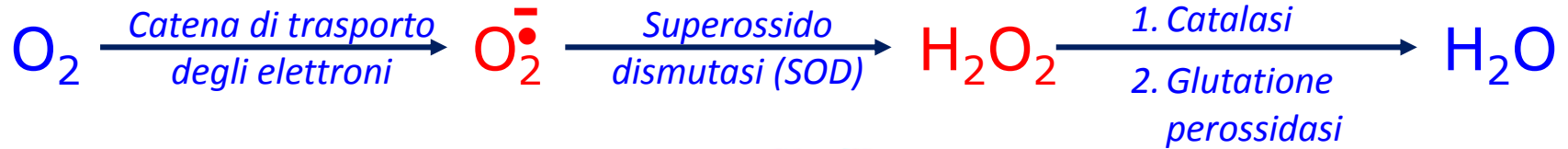
Singlet oxygen ($O_2^1\Delta_g$)

Organic peroxides, $ROOH$

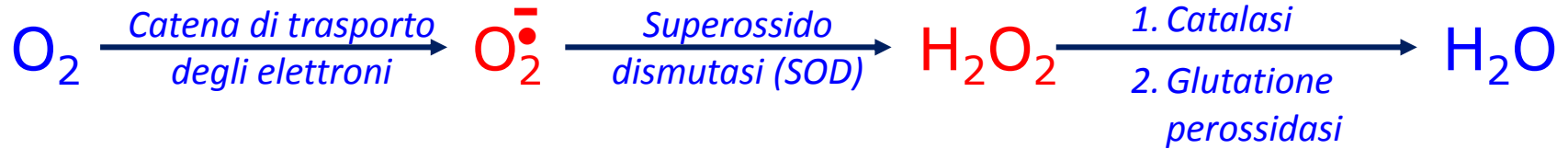
Peroxynitrite, $ONOO^-$

Peroxynitrous acid, $ONOOH^-$

• ROS: origine di alcune specie



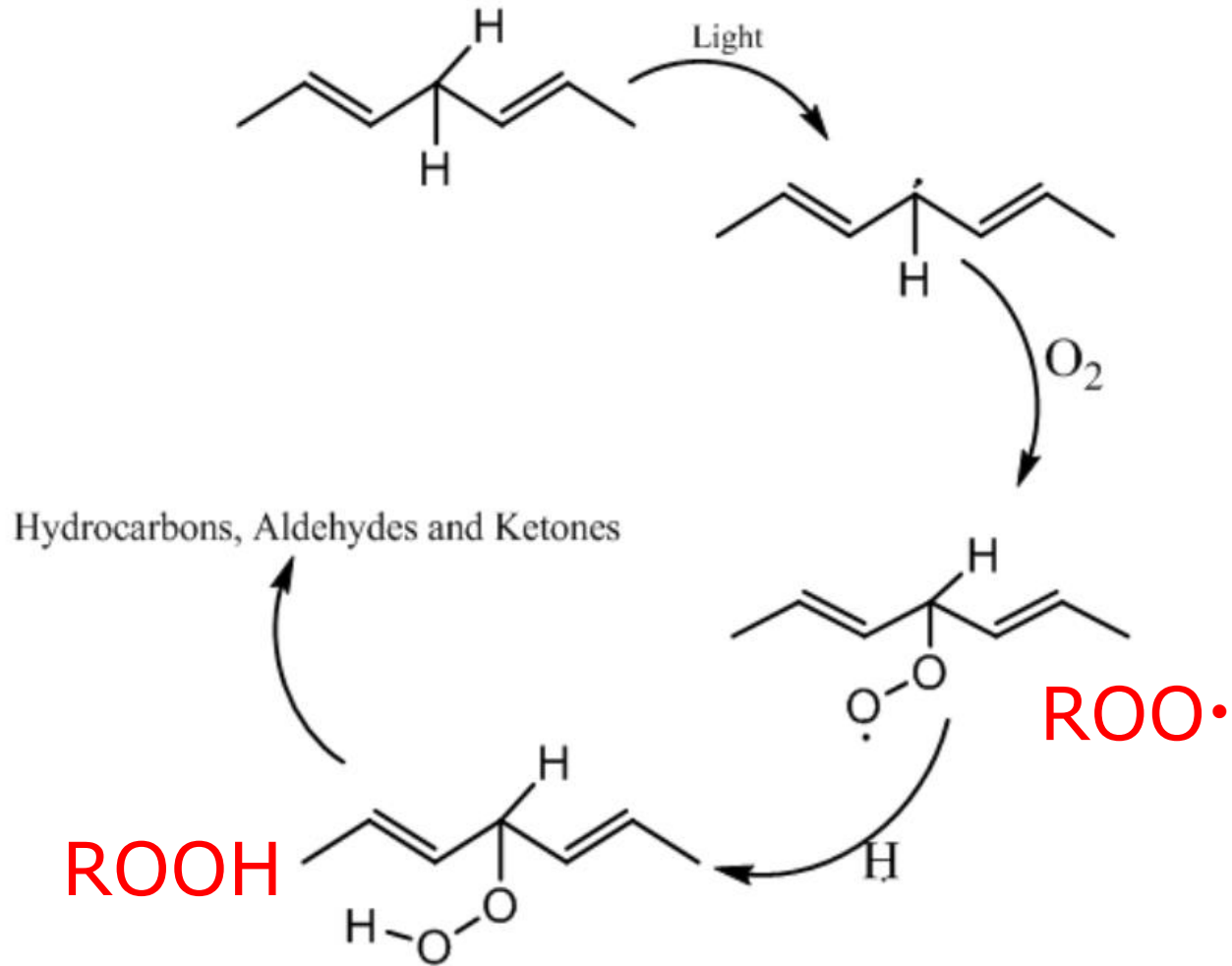
• ROS: origine di alcune specie



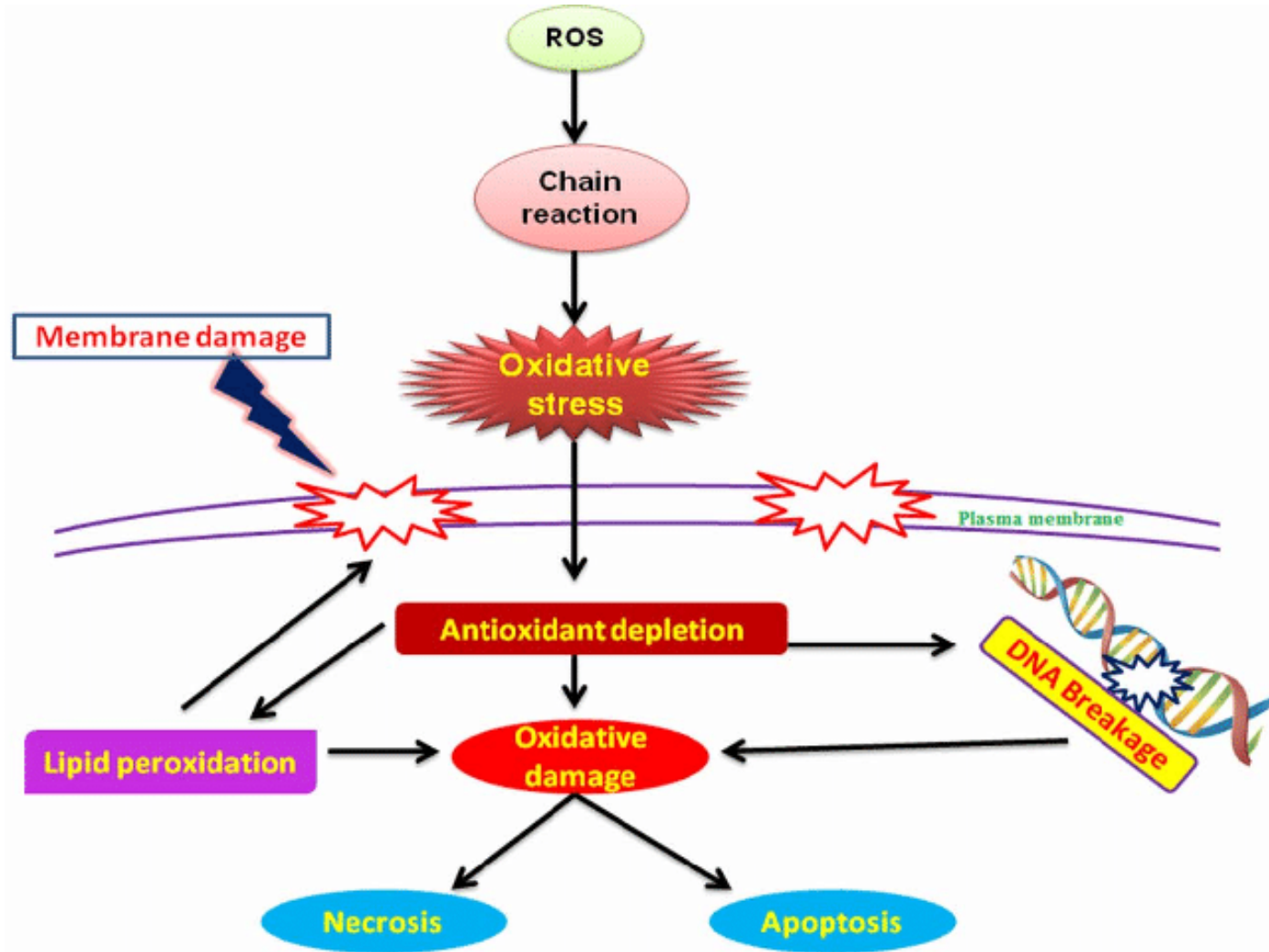
CHIMICA DI FENTON



• ROS: origine di alcune specie



• ROS: alcuni effetti cellulari



•RNS

Free radicals

Nonradicals

Reactive nitrogen species (RNS)

Nitric oxide, NO^\bullet

Nitrogen dioxide, NO_2^\bullet

Nitrous acid, HNO_2

Nitrosyl cation, NO^+

Nitroxyl anion, NO^-

Dinitrogen tetroxide, N_2O_4

Dinitrogen trioxide, N_2O_3

Peroxynitrite, ONOO^-

Peroxynitrous acid, ONOOH

Nitronium (nitryl) cation, NO_2^+

Alkyl peroxynitrites, ROONO

Nitryl (nitronium) chloride, NO_2Cl

• RCS

Free radicals

Nonradicals

Reactive chlorine species (RCS)

Atomic chlorine, Cl^\bullet

Hypochlorous acid, HOCl

Nitryl (nitronium) chloride, NO_2Cl

Chloramines

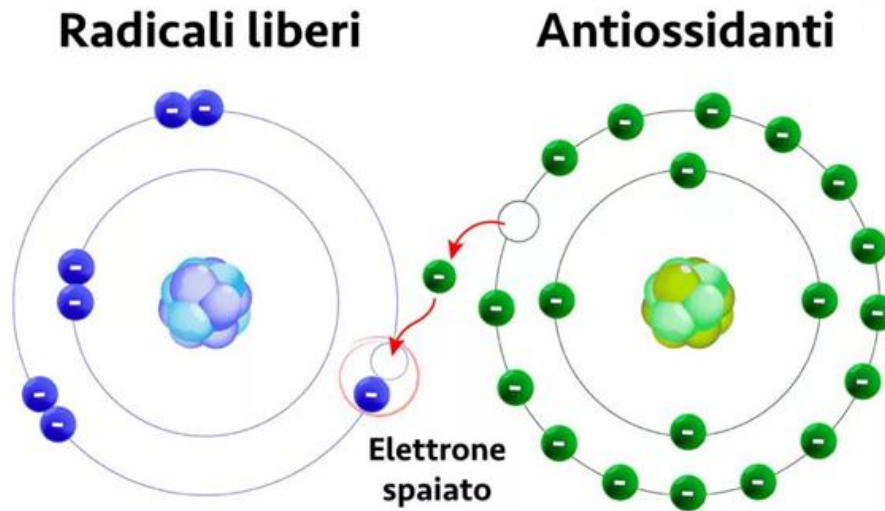
Chlorine gas (Cl_2)

- **Sostanze ossidanti di natura non radicalica**



Antiossidanti di natura enzimatica

- **Sostanze ossidanti di natura radicalica**



- **Saggi di attività antiossidante**

Saggi ET (electron transfer): basati sul trasferimento di elettroni

Saggi HAT (hydrogen atom transfer): basati sul trasferimento di atomi di idrogeno

- **Saggi ET (electron transfer): meccanismo di azione dell'antiossidante (AH/ArOH)**



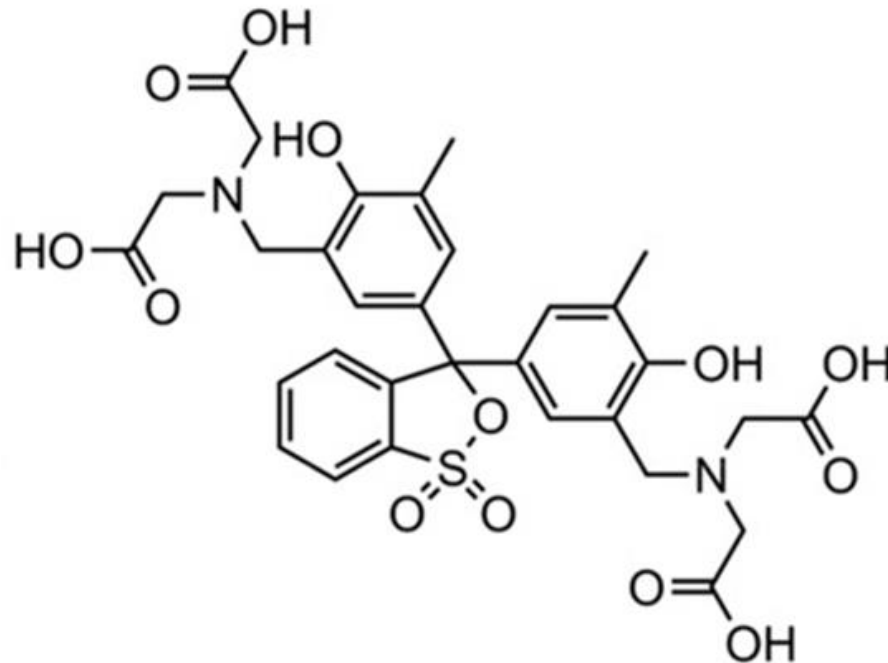
- **Saggi ET (electron transfer)**

L'antiossidante reagisce in presenza di o direttamente con una sostanza (probe) il cui colore cambia dopo il processo di riduzione (operato dall'antiossidante che è oggetto di studio)

Metodi spettrofotometrici basati sulla variazione di colore del probe: metodo del FOX

•Saggi ET (electron transfer)

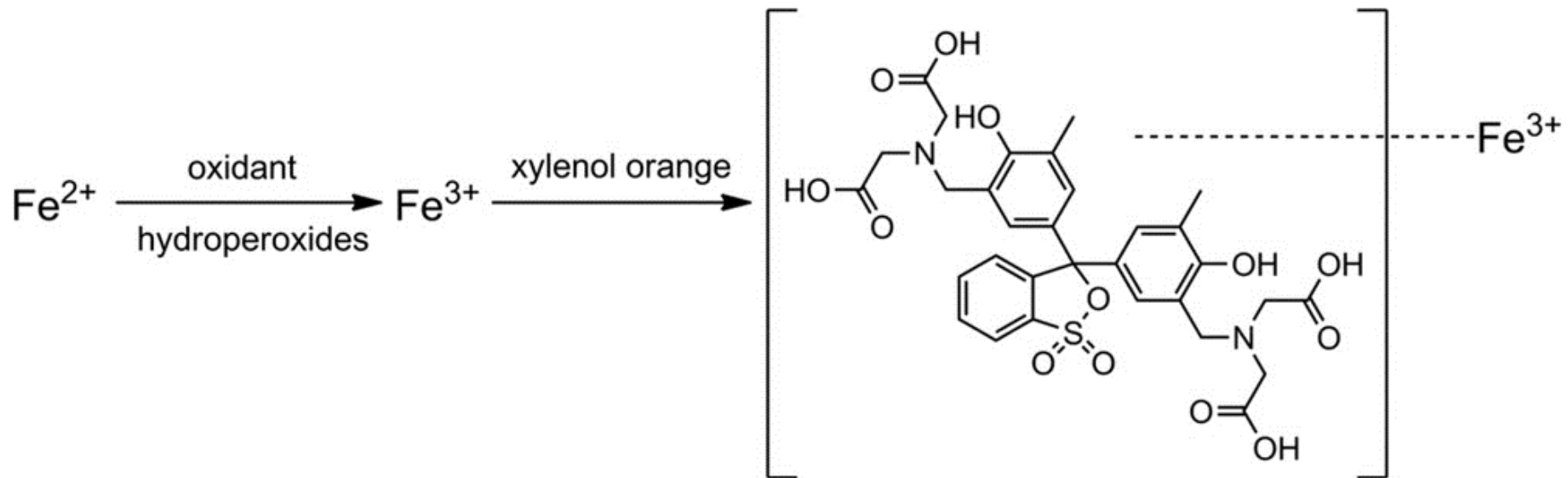
Metodo del FOX (ferrous oxidation–xylenol orange)



xylenol orange: sostanza di colore giallino ($\lambda \approx 400\text{nm}$)

•Saggi ET (electron transfer)

Metodo del FOX (ferrous oxidation–xylenol orange)

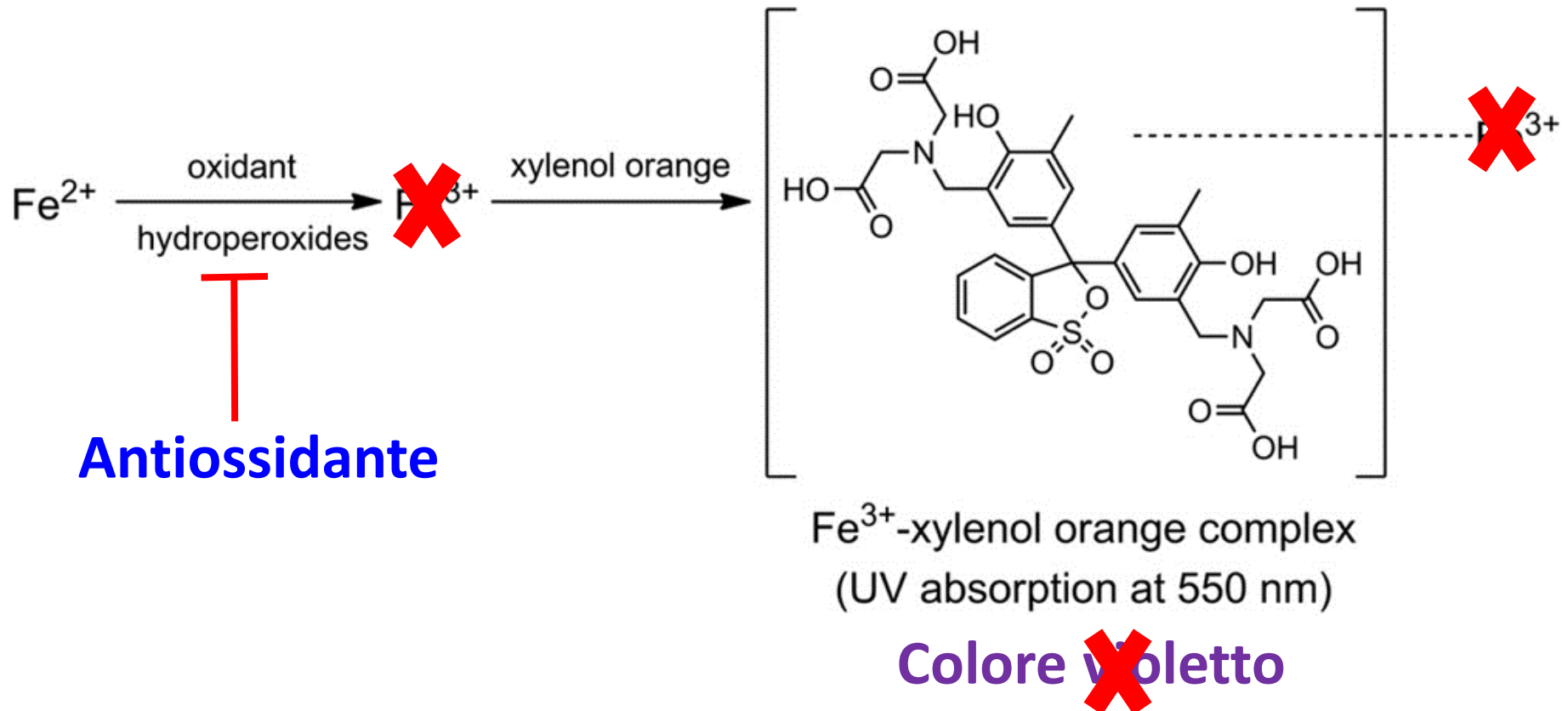


Fe^{3+} -xylenol orange complex
(UV absorption at 550 nm)

Colore violetto

•Saggi ET (electron transfer)

Metodo del FOX (ferrous oxidation-xylenol orange)



•Saggi ET (electron transfer)

Metodo del FOX (ferrous oxidation–xylenol orange)

Esempio di applicazione alla ricerca di sostanze antiossidanti di potenziale uso in ambito agricolo: il caso degli acidi umici

“HA are heterogeneous mixtures of relatively small molecules (<1000 Da) with different polarity and rich in functional groups including quinone, phenol, carboxyl and hydroxyl moieties, which confer them many useful properties encompassing metal ions chelation, organic pollutants absorption, antioxidant and anti-inflammatory activity as well as regenerable red-ox behaviour”

•Saggi ET (electron transfer)

Metodo del FOX (ferrous oxidation–xylenol orange)

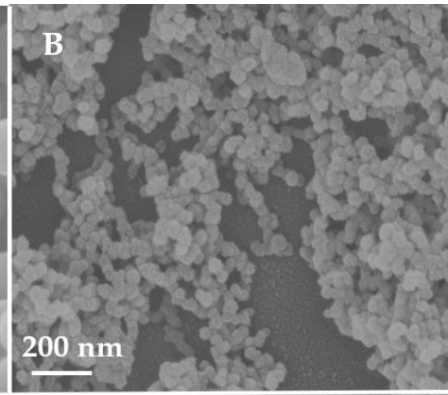
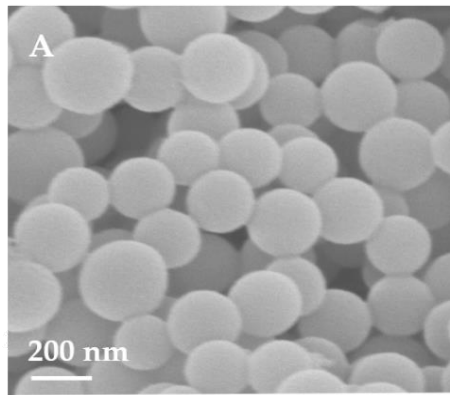
Esempio di applicazione alla ricerca di sostanze antiossidanti di potenziale uso in ambito agricolo: il caso degli acidi umici

“However, aggregation and degradation phenomena in aqueous environment prevent from their full exploitation. A valid strategy to address these issues relies on combining HAs moieties with a foreign inorganic nanostructured matrix, leading to more stable hybrid nanomaterials with tunable functionalities. Indeed, chemical composition of HAs can determine their interactions with inorganic components in the hybrid nanoparticles and consequently affect their overall physico-chemical properties, including their stability and functional properties in aqueous environment. As a fundamental contribution to HA materials-based technology, this study aims at unveiling this aspect. To this purpose, SiO₂ NP have been chosen as a model platform and three different HAs extracted from composted biomasses, manure (HA_Man), artichoke residues (HA_Art) and coffee grounds (HA_Cof), ”

•Saggi ET (electron transfer)

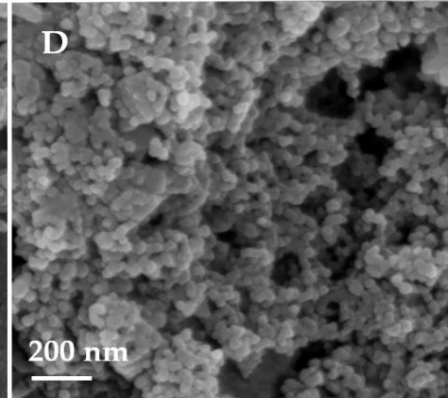
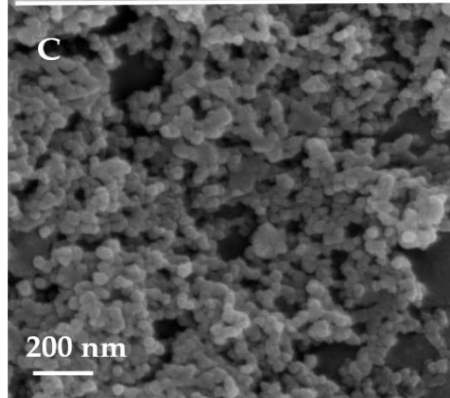
Metodo del FOX (ferrous oxidation–xylenol orange)

Nanoparticelle di silicio (NP)



NP + acidi umici da deiezioni animali

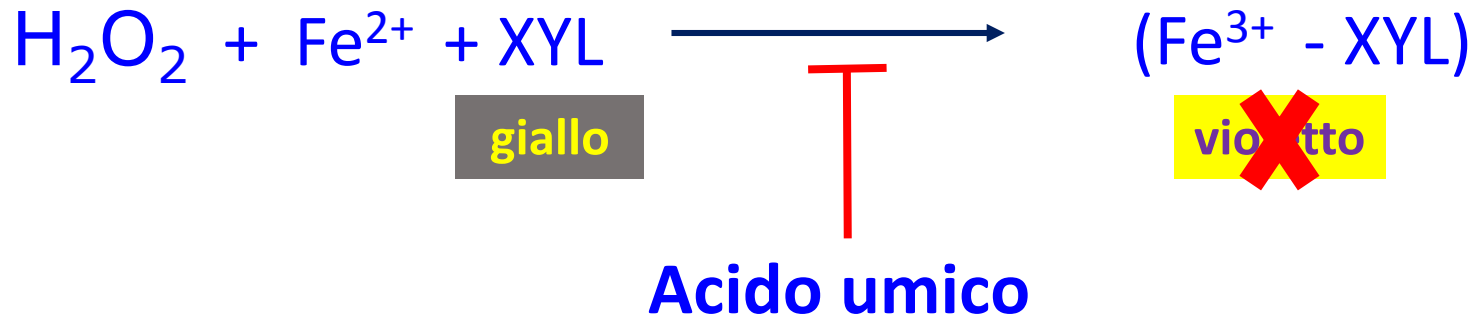
NP + acidi umici da residui di caffè



NP + acidi umici da residui di carciofo

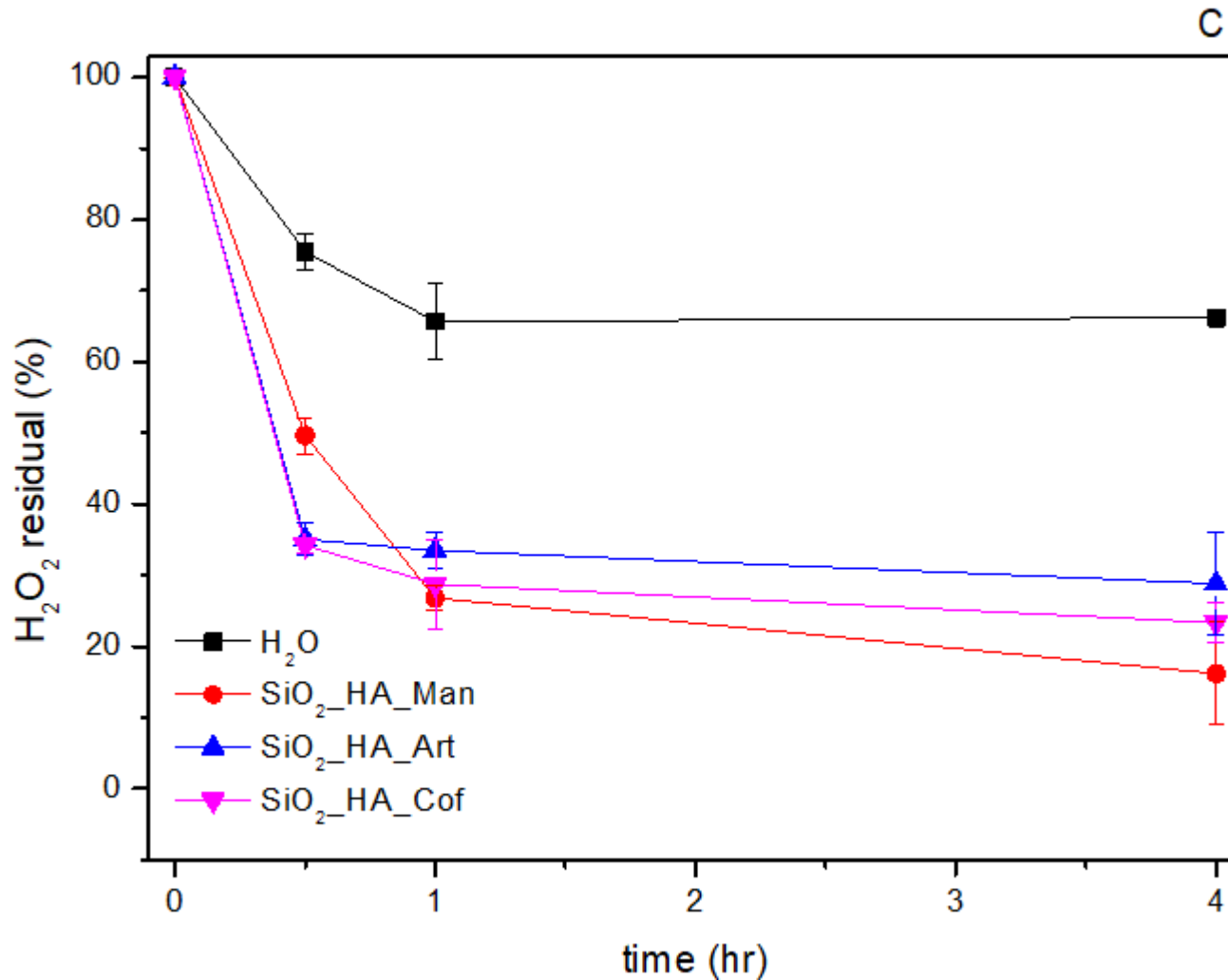
•Saggi ET (electron transfer)

Metodo del FOX (ferrous oxidation–xylenol orange)



• Saggi ET (electron transfer)

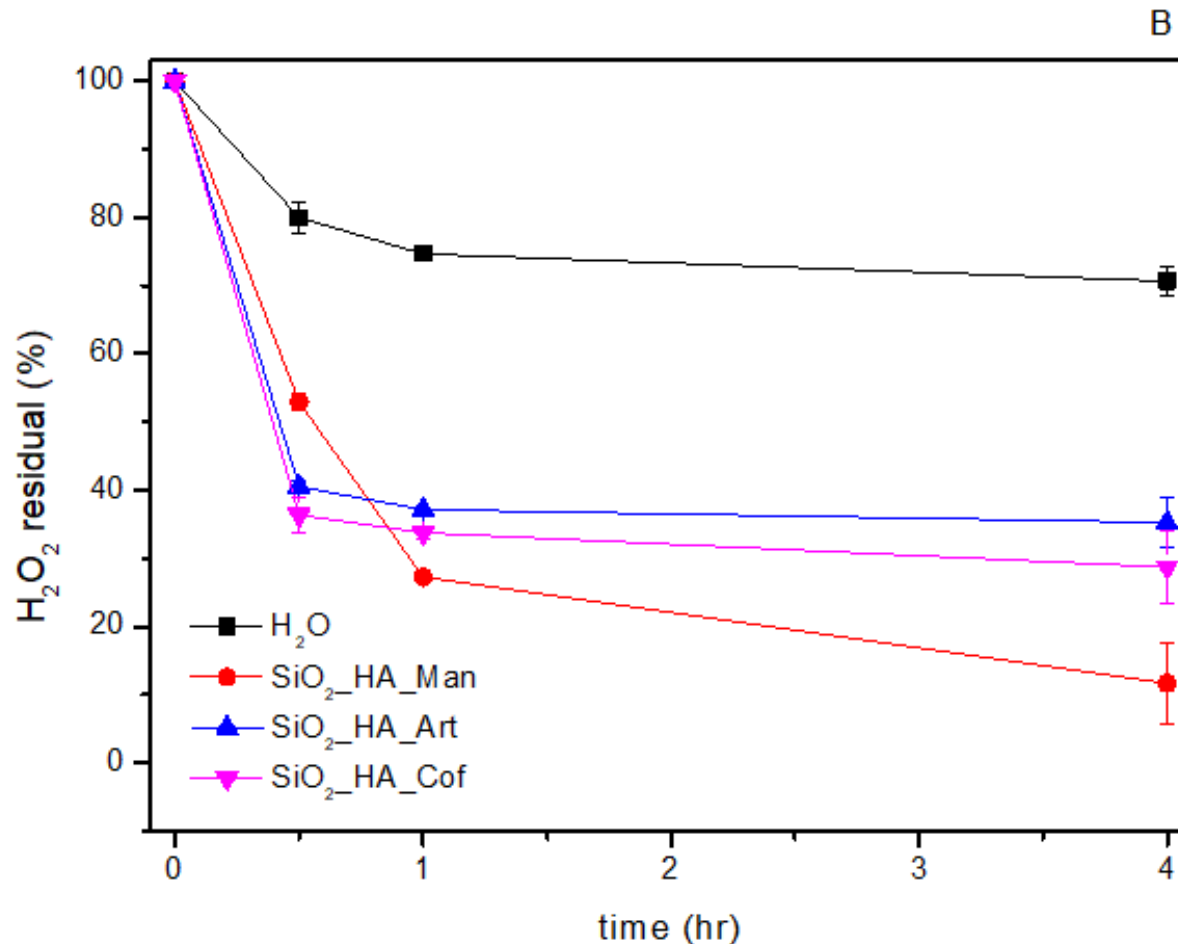
Metodo del FOX (ferrous oxidation–xylenol orange)



H₂O₂ 10 μ M

• Saggi ET (electron transfer)

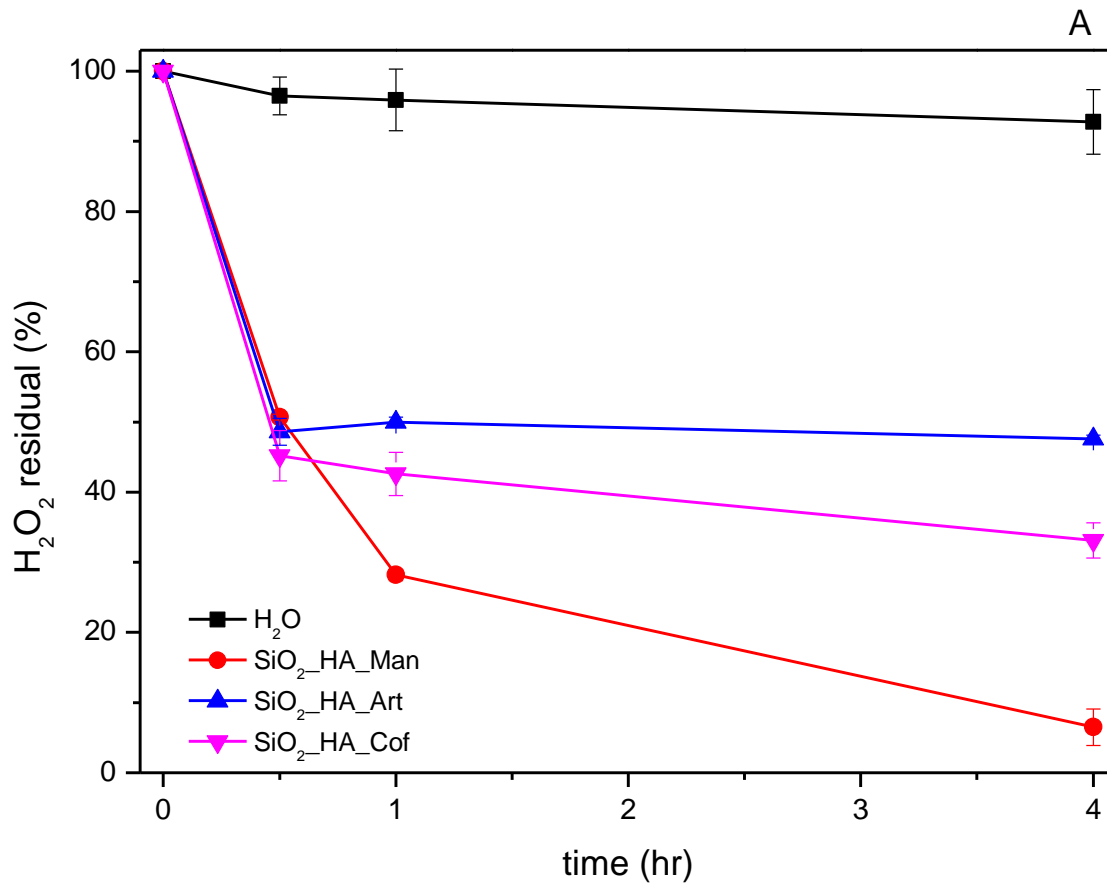
Metodo del FOX (ferrous oxidation–xylenol orange)



H_2O_2 12.5 μ M

• Saggi ET (electron transfer)

Metodo del FOX (ferrous oxidation–xylenol orange)



H_2O_2 25 μ M

- **Saggi HAT (hydrogen atom transfer):**
meccanismo di azione dell'antiossidante
(AH/ArOH)



Con questo tipo di Saggi si dosano antiossidanti che agiscono da scavengers di radicali donando un atomo di idrogeno

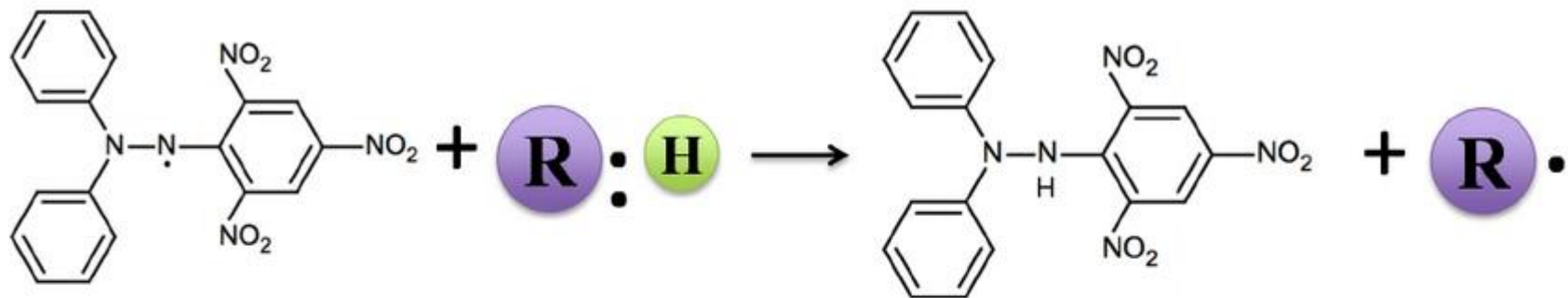
- **Saggi HAT (hydrogen atom transfer)**

L'antiossidante reagisce con il probe colorato donando ad esso un atomo di idrogeno: tale reazione causa la variazione di colore

Saggi spettrofotometrici basati sulla variazione di colore del probe ad opera dell'antiossidante: metodi con i radicali stabili DPPH e ABTS

•Saggi HAT (hydrogen atom transfer)

Metodo del radicale stabile DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)




DPPH

Purple, 519 nm

DPPH-H

Colorless

 represents antioxidant

• Saggi HAT (hydrogen atom transfer)

Metodo del radicale catione $ABTS^{+\bullet}$ (acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-solfonico))

