

Valutare l'**attività** **antiossidante** dei **mirtilli**

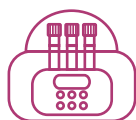
Obiettivo Determinare attraverso il test del DPPH e per via spettrofotometrica l'attività antiossidante dei mirtilli raccolti da terreni a coltivazione biologica, intensiva e da zone boschive in cui crescono in maniera spontanea.

Autore Liceo Scientifico Leonardo da Vinci di Trento
Secondo classificato Mad for Science 2020
Progetto "I microrganismi del suolo e la loro relazione
con le piante di *Vaccinium myrtillus*"



Materiali e reagenti

- DPPH in polvere
- Mirtilli
- Etanolo 80%
- Spatola
- Navicella da pesata o carta stagnola
- Cilindro graduato da 100 ml
- Becher
- Beuta da 250 ml
- Beuta da 100 ml
- Ancoretta magnetica
- Tubi da 15 ml
- Pipette graduate
- Provette da 5 ml
- Puntali
- Cuvette da 10 mm
- Pennarello



Strumenti

- Bilancia tecnica
- Bacchetta di vetro
- Mortaio e pestello
- Piastra magnetica riscaldante
- Pipettatore manuale o automatico
- Centrifuga
- Micropipette
- Spettrofotometro UV/Visibile



Sicurezza

- Camice
- Guanti
- Occhiali di protezione



Tempo

Circa due ore



Procedimento

Il punto di partenza di questo protocollo sono i mirtilli raccolti in ognuno dei siti individuati in tre sacchetti separati, come descritto nel protocollo “Campionamento di terreno della rizosfera di piante di mirtillo e raccolta di mirtilli” nella sezione “Scienze naturali”.

1. Selezionare i mirtilli campionati da un sito e preparare un estratto di mirtilli:
 - da ognuno dei tre sacchetti di mirtilli campionati dal sito A1 ad agricoltura biologica prelevare casualmente 5 mirtilli, che si presentino integri (senza abrasioni, segni di manipolazione o tagli superficiali) e omogenei per forma, colore e dimensione. Congelare i restanti mirtilli;
 - trasferire i 15 mirtilli selezionati in un becher, precedentemente etichettato con l’indicazione “Mirtilli sito A1 biologici” e mescolarli con una bacchetta di vetro;
 - pesare 5 g di mirtilli, trasferirli in un mortaio e frantumarli con un pestello;
 - aggiungere ai mirtilli frantumati nel mortaio 10 ml di Etanolo 80% e trasferire tutto l’estratto di mirtilli dal mortaio ad una beuta, precedentemente etichettata con l’indicazione “Estratto mirtilli sito A1 biologico” e in cui è stata inserita una ancoretta magnetica;
 - mescolare l’estratto di mirtilli su piastra magnetica per 15 minuti a temperatura ambiente. Questo passaggio permette l’estrazione degli antiossidanti dai mirtilli;
 - nel frattempo, preparare due tubi da 15 ml e scrivere con un pennarello “Estratto mirtilli sito A1 biologico”;
 - con una pipetta graduata trasferire la soluzione in uno dei due tubi da 15 ml, precedentemente preparati, evitando di prelevare frammenti di buccia o pezzi rimasti integri di mirtillo;
 - centrifugare l’estratto di mirtilli a 5.000 rpm per 3 minuti per rimuovere eventuali residui;
 - con una pipetta graduata trasferire il surnatante nell’altro tubo da 15 ml.

L’estratto di mirtilli così ottenuto è concentrato circa 500 mg/ml (5 g di mirtilli in 10 ml di Etanolo 80%).

2. Diluire l'estratto di mirtilli a concentrazioni variabili da 1 a 10 mg/ml in 10 ml di Etanolo 80%:

- predisporre 5 tubi da 15 ml e indicare su ogni tubo "Estratto mirtilli sito A1 biologico" e la concentrazione finale (1 mg/ml, 2.5 mg/ml, 5 mg/ml, 7.5 mg/ml e 10 mg/ml) a cui la soluzione sarà diluita;
- con una pipetta graduata, trasferire in ogni tubo il volume calcolato di Etanolo 80%, come riportato nella colonna 2 della tabella sottostante;
- con una micropipetta, trasferire in ogni tubo il volume calcolato dell'estratto di mirtilli, come riportato nella colonna 3 della tabella sottostante. Compiere un movimento *up and down* della micropipetta per mescolare le soluzioni.

| CONCENTRAZIONE FINALE | VOLUME DI ETANOLO 80% | VOLUME DI ESTRATTO DI MIRTILLI |
|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|
| 1 mg/ml | 9.98 ml | 20 µl |
| 2.5 mg/ml | 9.95 ml | 50 µl |
| 5 mg/ml | 9.90 ml | 100 µl |
| 7.5 mg/ml | 9.85 ml | 150 µl |
| 10 mg/ml | 9.80 ml | 200 µl |

3. Preparare la soluzione di 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH):

- con una bilancia pesare 10 mg di DPPH, aiutandosi con una spatola e una navicella da pesata;
- trasferire la polvere in una beuta da 250 ml, su cui è stata precedentemente apposta una etichetta con la scritta "Soluzione DPPH (0.1 mg/ml)";
- con un cilindro misurare e aggiungere 100 ml di Etanolo 80%.

La soluzione così preparata ha una colorazione viola scuro.

4. Allestire in triplicato la reazione tra il DPPH e l'estratto di mirtilli per valutare la concentrazione di antiossidanti:

- predisporre 19 provette da 5 ml e numerarle in ordine crescente (1, 2, 3, 4, 5, ...). Le prime 15 provette saranno utilizzate per la reazione tra l'estratto di mirtilli e il DPPH (ogni concentrazione di estratto di mirtilli sarà analizzata in triplicato), le successive 3 provette serviranno per il controllo di reazione, costituito esclusivamente da DPPH, e l'ultima provetta per il bianco di reazione, in cui sarà presente solo Etanolo 80%;
- su un foglio associare la numerazione delle provette al campione analizzato (es. provetta 1, 2 e 3 = 1 mg/ml di estratto di mirtilli del sito A1 ad agricoltura biologica; provetta 16, 17 e 18 = controllo; provetta 19 = bianco di reazione), come indicato nella tabella sottostante;
- con una pipetta graduata, trasferire 2 ml di soluzione DPPH in 18 provette, ad eccezione della provetta 19;

- nelle provette 1, 2 e 3 aggiungere 2 ml di estratto di mirtilli 1 mg/ml;
- nelle provette 4, 5 e 6 aggiungere 2 ml di estratto di mirtilli 2.5 mg/ml;
- nelle provette 7, 8 e 9 aggiungere 2 ml di estratto di mirtilli 5 mg/ml;
- nelle provette 10, 11 e 12 aggiungere 2 ml di estratto di mirtilli 7.5 mg/ml;
- nelle provette 13, 14 e 15 aggiungere 2 ml di estratto di mirtilli 10 mg/ml;
- nelle provette 16, 17 e 18 aggiungere 2 ml di Etanolo 80%;
- nella provetta 19 aggiungere 4 ml di Etanolo 80%;
- mescolare delicatamente la soluzione contenuta nelle provette.

| NOMENCLATURA PROVETTE | | VOLUME DI DPPH | VOLUME DI ESTRATTO DI MIRTILLI | VOLUME DI ETANOLO 80% |
|-----------------------|-----------|----------------|--------------------------------|-----------------------|
| 1 - 2 - 3 | 1 mg/ml | 2 ml | 2 ml | - |
| 4 - 5 - 6 | 2.5 mg/ml | 2 ml | 2 ml | - |
| 7 - 8 - 9 | 5 mg/ml | 2 ml | 2 ml | - |
| 10 - 11 - 12 | 7.5 mg/ml | 2 ml | 2 ml | - |
| 13 - 14 - 15 | 10 mg/ml | 2 ml | 2 ml | - |
| 16 - 17 - 18 | Controllo | 2 ml | - | 2 ml |
| 19 | Bianco | - | - | 4 ml |

5. Incubare le provette a temperatura ambiente per 30 minuti.
6. Osservare i colori che le soluzioni estratto di mirtilli-DPPH assumono a seconda della diversa concentrazione di antiossidanti contenuti nell'estratto di mirtilli: il colore viola della soluzione è segno di bassa o assente attività antiossidante, mentre il colore giallo identifica una attività antiossidante molto sviluppata.
7. Con uno spettrofotometro misurare l'assorbanza di ogni campione a 517 nm:
 - azzerare lo strumento, determinando l'assorbanza del campione bianco (provetta 19);
 - misurare e riportare su un foglio l'assorbanza di ciascuna soluzione di controllo (provette 16, 17 e 18);
 - misurare e riportare su un foglio l'assorbanza di tutte le soluzioni estratto di mirtilli-DPPH (provette 1-15).
8. Calcolare il valore medio di assorbanza del controllo ($A_{\text{controllo}}$).
9. Calcolare il valore medio di assorbanza per ogni concentrazione delle soluzioni estratto di mirtilli-DPPH, ovvero A_{1-3} , A_{4-6} , A_{7-9} , A_{10-12} e A_{13-15} (genericamente A_{campione}).

- 10.** Calcolare la percentuale di inibizione del radicale libero del DPPH da parte di ogni concentrazione di estratto di mirtilli, utilizzando la seguente formula:

$$\text{Inibizione (\%)} = \frac{A_{\text{controllo}} - A_{\text{campione}}}{A_{\text{controllo}}} \times 100$$

- 11.** Utilizzando un foglio di calcolo e rappresentando la percentuale di inibizione sull'asse della Y e le concentrazioni delle soluzioni di estratto di mirtilli sull'asse delle X, è possibile identificare il valore IC_{50} , che rappresenta la concentrazione in mg/ml alla quale gli antiossidanti dei mirtilli provocano un'inibizione del 50% dell'attività del radicale libero del DPPH.
- 12.** Ripetere il procedimento per conoscere la capacità antiossidante dei mirtilli raccolti dagli altri siti a coltivazione biologica, intensiva e a crescita spontanea e confrontarne i risultati.

Note

- I radicali liberi sono atomi o molecole caratterizzate dalla presenza di elettroni spaiati, che la specie chimica tende ad accoppiare, acquistando o cedendo altri elettroni. Per questo motivo i radicali liberi sono altamente instabili e reattivi e sono dannosi per la salute dell'uomo: danneggiano le macromolecole cellulari, denaturando e degradando ad esempio le proteine o inibendo l'attività degli enzimi o, ancora, causando mutazioni genetiche nel DNA; inducono la comparsa di patologie, come il diabete, disordini cardiaci e neurologici, arteriosclerosi e infiammazione; determinano l'invecchiamento cellulare.
- Gli antiossidanti sono sostanze chimiche di varia natura, che agiscono come agenti riducenti, ovvero si ossidano e donano gli elettroni mancanti al radicale libero (che si riduce), neutralizzandone l'attività. È ormai noto che la frutta e la verdura sono fonti di antiossidanti, come il retinolo (vitamina A), l'acido ascorbico (vitamina C), la vitamina E, i carotenoidi, i flavonoidi, i tannini e altri composti polifenolici.
- Il test del DPPH è ampiamente utilizzato per valutare l'attività antiossidante di vari composti nei confronti dei radicali liberi. La procedura è stata sviluppata da alcuni scienziati del Dipartimento di Chimica dell'Eckerd College di St. Petersburg (Florida, USA) ed è stata messa a punto e adattata all'ambiente scolastico dal team di docenti di scienze del Liceo Scientifico Leonardo da Vinci di Trento. Al link sottostante è possibile scaricare l'articolo scientifico di riferimento in formato PDF: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/17518253.2011.603756?needAccess=true>.
- Il test del DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), un radicale libero con assorbimento massimo a 517 nm, consiste nel far reagire il composto organico con un antiossidante (A-H) per misurare la capacità dell'antiossidante di ridurre il DPPH mediante trasferimento di un protone. Infatti, l'elettrone spaiato del DPPH si lega al protone, donato dal composto antiossidante, e si forma il composto ridotto DPPH-H. Il DPPH, che inizialmente è viola, assume un colore giallo nella forma DPPH-H.



- La capacità antiossidante è espressa sotto forma di concentrazione inibente o IC_{50} , ovvero la concentrazione di antiossidante necessaria affinché si osservi una inibizione del 50% dell'attività del radicale libero. Più basso è il valore di IC_{50} e maggiore è l'effetto dell'antiossidante. Questo valore è ottenuto mediante spettrofotometria, misurando l'assorbimento del DPPH a 517 nm.
- Il DPPH è una sostanza a bassa tossicità, ma se non maneggiata adeguatamente potrebbe provocare reazione allergica cutanea, irritazione oculare o cutanea e sintomi allergici o asmatici o difficoltà respiratorie se inalato. Tenere lontano da fonti di calore, scintille e fiamme libere. Consigliamo, quindi, di non far preparare la soluzione di DPPH ed Etanolo 80% agli studenti, ma che se ne occupi il docente sotto cappa chimica. Indossare camice, guanti ed occhiali protettivi.
- La soluzione di DPPH ed etanolo deve essere preparata fresca nel giorno dell'esperimento.
- Dal momento che per questo esperimento è richiesta l'analisi dell'assorbanza di molti campioni, è preferibile utilizzare cuvette in plastica.
- L'idea di mescolare i mirtilli raccolti da diverse aree di campionamento di uno stesso sito deriva dall'idea che frutti cresciuti in uno stesso campo e con uguali modalità di coltivazione non presentino valori molto diversi in quantità di antiossidanti e attività inibente del DPPH. Si consiglia di applicare il presente protocollo a due campioni selezionati di mirtilli, prelevati da uno stesso sito, e di confrontarne i risultati. Se il dato di inibizione non è conforme, eseguire il protocollo su un terzo campione selezionato di mirtilli.
- Questo protocollo è stato applicato allo studio dell'attività antiossidante dei mirtilli, ma sarebbe interessante anche suddividere gli studenti in 5 gruppi per analizzare l'attività antiossidante di vari frutti rossi, come i lamponi, le more, i mirtilli, le bacche di acai o l'uva e confrontare il risultato per conoscere quale di questi frutti ha una attività antiossidante più marcata.