

**ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITA' DI BOLOGNA**

**SCUOLA DI FARMACIA, BIOTECNOLOGIE E SCIENZE MOTORIE**

**CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE**

Determinazione dello stato di stress ossidativo in tessuti di topo trattati con sale sodico di clorofillina magnesiacca

---

Presentata da:

Federica Cella

Relatore:

Romana Fato

Matricola n°

0000683977

Correlatore:

Christian Bergamini

Sessione I

Anno Accademico 2015/2016

# INDICE

1	INTRODUZIONE .....	4
1.1	Struttura della clorofilla.....	4
1.2	Usi clinici della clorofilla .....	5
1.3	Controindicazioni della clorofilla.....	6
1.4	Dosi e metodi di somministrazione.....	7
1.5	La clorofilla come integratore alimentare.....	7
1.5.1	<i>Aumento dell'ematocrito</i> .....	8
1.5.2	<i>Potenziale antiossidante</i> .....	8
2	SCOPO DELLA TESI.....	10
3	MATERIALI E METODI.....	11
3.1	Trattamento degli animali.....	11
3.1.1	<i>Prima corte</i> .....	11
3.1.2	<i>Seconda corte</i> .....	12
3.2	Preparazione e conservazione dei campioni per saggio TBARS .....	12
3.3	Analisi dello stato di stress ossidativo mediante saggio TBARS .....	13
3.4	Preparazione e conservazione dei campioni per saggio FRAP .....	15
3.5	Verifica della presenza della clorofilla nei tessuti e del potere antiossidante mediante saggio FRAP .....	16
4	RISULTATI .....	19
4.1	Saggio TBARS.....	19

4.2	Saggio FRAP sui tessuti dei topi trattati per 21 giorni .....	21
4.3	Saggio FRAP sui tessuti dei topi trattati a intervalli di tempo diversi nell'arco delle 24 ore 23	
4.3.1	<i>FRAP e spettrofluorimetria dei campioni di tessuto dei topi trattati a intervalli di tempo diversi nell'arco delle 24 ore .....</i>	<i>26</i>
5	<b>CONCLUSIONI .....</b>	<b>28</b>
5.1	Saggio TBARS .....	28
5.2	Saggio FRAP sui tessuti dei topi trattati per 21 giorni .....	28
5.3	Saggio FRAP sui tessuti dei topi trattati a intervalli di tempo diversi nell'arco delle 24 ore 29	
5.4	Conclusioni .....	30
6	<b>REFERENZE BIBLIOGRAFICHE .....</b>	<b>31</b>
6.1	Testi .....	31
6.2	Articoli .....	31

# 1 INTRODUZIONE

## 1.1 Struttura della clorofilla

La clorofilla è il principale pigmento che assorbe luce nelle piante e negli organismi procarioti che fanno fotosintesi. Si tratta di un pigmento verde che ha diverse varianti strutturali: la clorofilla a e la clorofilla b sono le principali, nonché quelle presenti nei cloroplasti delle piante superiori. Le varianti strutturali differiscono fra loro anche per lo spettro di assorbimento della luce. La clorofilla ha una struttura policiclica che ricorda la protoporfirina dell'emoglobina, ma al centro, invece che un atomo di ferro, c'è uno ione  $Mg^{2+}$  che coordina i quattro atomi di azoto dell'anello. Inoltre la clorofilla possiede una lunga catena laterale di natura terpenoide che consiste in alcol a lunga catena (fitolo) esterificato con un sostituito propionico in posizione 7 del quarto anello pirrolico. Questa lunga molecola apolare è molto importante nella struttura della clorofilla: il radicale fitolo permette all'intera molecola una corretta orientazione sulla superficie delle lamelle interne dei cloroplasti. Infine ha un quinto anello, assente nell'eme dell'emoglobina. La struttura eterociclica a cinque anelli ha legami sia singoli che doppi ed è in grado di assorbire la luce nella regione visibile dello spettro.

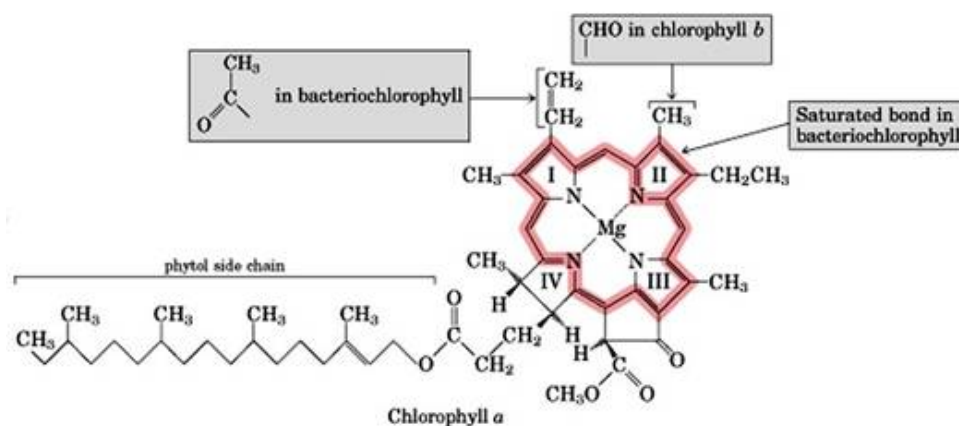
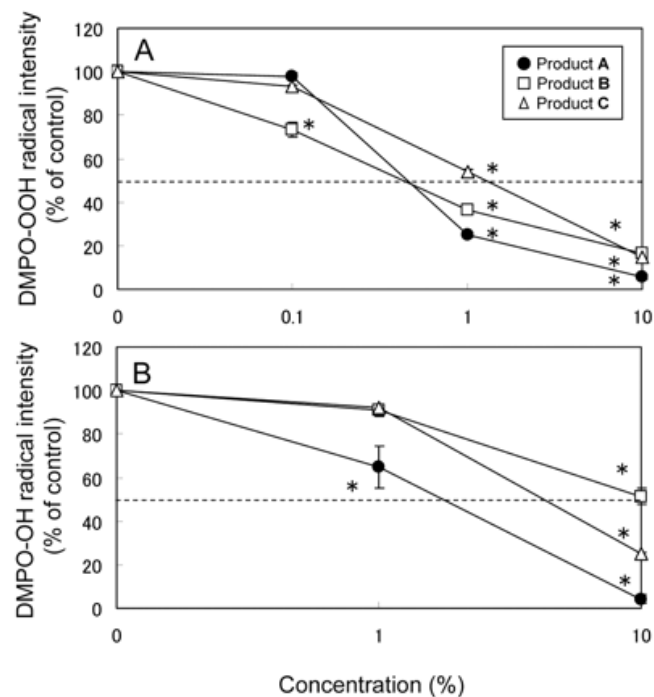


Fig. 1-1 - Struttura della clorofilla.

## 1.2 Usi clinici della clorofilla

La clorofilla è stata tradizionalmente usata, specialmente in Asia, come deodorante naturale. Più di recente è stata usata come detossificante e come antiinfiammatorio per condizioni patologiche quali la pancreatite ed è stato dimostrato come sia anche un potente antiossidante e chemoprotettivo. In particolare è stato studiato l'effetto di prodotti commerciali derivati da estratti di *Sasa senanensis*<sup>1</sup> sulla resistenza cellulare all'infezione di HIV, al danno da raggi UV e alla formazione di radicali. Tutti e tre i prodotti commerciali presi in esame contenevano clorofillina rameica o ferrica e sono risultati efficaci in maniera dose dipendente per ogni analisi. Soprattutto l'attività antiossidante è risultata positiva nel prevenire la formazione di radicali liberi.



*Fig. 1-2 Effetti dei prodotti A, B e C sull'intensità del radicale anione superossido, misurato come DMPO-OOH prodotto dalla reazione ipoxantina-xantina (A) e del radicale idrossile, misurato come DMPO-OH prodotto dalla reazione di Fenton (B). il DMPO è una sonda spin trap fra le più usate che reagisce con i radicali dell'O-, N-, S- e C-.*

<sup>1</sup> H. Sagakami et al., Comparative study of biological activity of three commercial products of *Sasa senanensis* Rehder leaf extract, *In Vivo* (2012), Volume 26, 259-264

Tuttavia le proprietà benefiche sopra elencate sono state talvolta confutate o parzialmente smentite da altri protocolli sperimentali. La ripetibilità degli esperimenti si è rivelata lacunosa e l'efficacia della clorofilla non è ancora inconfutabilmente accertata. Per questo motivo la clorofilla non è catalogata nella lista degli alimenti generalmente riconosciuti come sicuri (GRAS) dalla U.S. Food and Drug Administration (FDA).

Un beneficio maggiormente accreditato alla clorofilla è la sua capacità di contrastare l'azione dell'aflatossina, una micotossina fortemente cancerogena. Se assunta per via orale con regolarità, è stato dimostrato che la clorofilla previene l'intossicazione da aflatossina<sup>2</sup>.

### ***1.3 Controindicazioni della clorofilla***

La clorofilla non ha controindicazioni particolari a livello sistemico, ad esclusione delle manifestazioni allergiche su alcuni individui.

Tuttavia se assorbita dai tessuti in quantità eccessivamente elevate può dare un effetto citotossico<sup>3</sup>. Il tessuto trattato con clorofilla può diventare sensibile alla luce: è stato osservato che in colture cellulari trattate con derivati di clorofilla si evidenzia un distacco delle cellule dal substrato e un danneggiamento delle rimanenti. L'effetto è tuttavia leggero e dose-dipendente e può essere apprezzato solo quando la concentrazione di clorofilla nel tessuto è di ca. 100µM. La sensibilità alla luce clorofilla-dipendente in vivo può causare eritemi o rush cutanei.

---

<sup>2</sup> P. Egner et al., Chlorophyllin intervention reduces aflatoxin-DNA adducts in individuals at high risk for liver cancer, PNAS (2001), volume 98, 14601-14606

<sup>3</sup> Rosenbach-Belkin et al., Serine Conjugates of Chlorophyll and Bacteriochlorophyll: Photocytotoxicity in vitro and Tissue Distribution in Mice Bearing Melanoma Tumors, Photochemistry and Photobiology (1996), 174-181

È stato dimostrato che la proteina BCRP/ABCG2 (Breast Cancer Resistance Protein) conferisce resistenza all'effetto fotofobico della clorofilla<sup>4</sup>. Si è infatti osservato che i topi in difetto di questa proteina diventano particolarmente sensibili alla feoforbide, un prodotto del catabolismo della clorofilla. Questa sensibilità comporta sensibilità alla luce e conseguenti lesioni epiteliali se i topi vengono esposti alla luce.

#### ***1.4 Dosi e metodi di somministrazione***

La clorofilla non ha una dose standard di somministrazione, né tantomeno una via preferenziale con cui viene somministrata. Con i prodotti naturali non è sempre chiaro quale sia la dose ottimale per bilanciare efficacia e sicurezza. Come dimostrato da molti studi sperimentali, la clorofilla nell'alimentazione umana viene assorbita solo per un 5%, mentre il restante 95% viene eliminato attraverso le feci.

Non ha interferenze significative con l'assunzione di farmaci o con l'assorbimento di cibi a livello intestinale. Non comporta complicanze nelle procedure di esami medici diagnostici e di routine. L'unica nota da sottolineare è la possibile attività ipoglicemica dovuta al suo metabolita acido fitanico.

#### ***1.5 La clorofilla come integratore alimentare***

Oggi la clorofilla è largamente in uso come integratore alimentare per sportivi e interessa un ampio target, dagli sportivi amatoriali a quelli professionisti. La clorofilla infatti, oltre a prevenire lo stress ossidativo a cui vanno in contro i tessuti sotto sforzo, sembra essere in grado di aumentare l'ematocrito. Queste evidenze non hanno ancora una causa certa.

---

<sup>4</sup> J. Jonker et al., The breast cancer resistance protein protects against a major chlorophyll-derived dietary phototoxin and protoporphyria, PNAS (2002), Volume 99, 15649-15654

### 1.5.1 Aumento dell'ematocrito

Sono stati condotti esperimenti in vivo su modelli murini affetti da anemia aplastica che hanno dimostrato l'efficacia della clorofillina rameica nell'aumentare l'ematocrito<sup>5</sup>. La clorofillina è un derivato della clorofilla che, al posto dell'atomo di Mg<sup>2+</sup>, ha un Cu<sup>2+</sup> ed è solubile in acqua sotto forma di sale sodico. La clorofillina agisce promuovendo la differenziazione delle cellule staminali mesenchimali e implementando la capacità immunoregolatoria dei topi affetti da anemia aplastica.

Un'altra possibile spiegazione all'aumento dell'ematocrito è la capacità dell'eme di aumentare la sua stessa sintesi e quella delle globine nelle cellule eritroidi, mentre nelle cellule non eritroidi questo non avviene<sup>6</sup>. Per analogia strutturale, è possibile pensare che anche la clorofilla sia in grado di indurre un aumento della trascrizione delle globine e dell'eme stesso. Tuttavia non vi è alcuna prova sperimentale che questa ipotesi sia vera.

### 1.5.2 Potenziale antiossidante

Come discusso nel paragrafo 1.2, la clorofilla sembra avere potere antiossidante, tuttavia i protocolli fin ora pubblicati descrivono solo esperimenti in vitro. Per confermare la capacità antiossidante della clorofilla sono stati portati avanti studi sui Quantitative Trait Loci (QTL, caratteri fenotipici variabili in modo continuo) di popolazioni Recombinant Inbred Lines (RILs) di *Lactuca sativa*<sup>7</sup>. L'obiettivo era capire quali geni determinassero il carattere "potere antiossidante" nella lattuga. I risultati hanno confermato quanto visto negli esperimenti

---

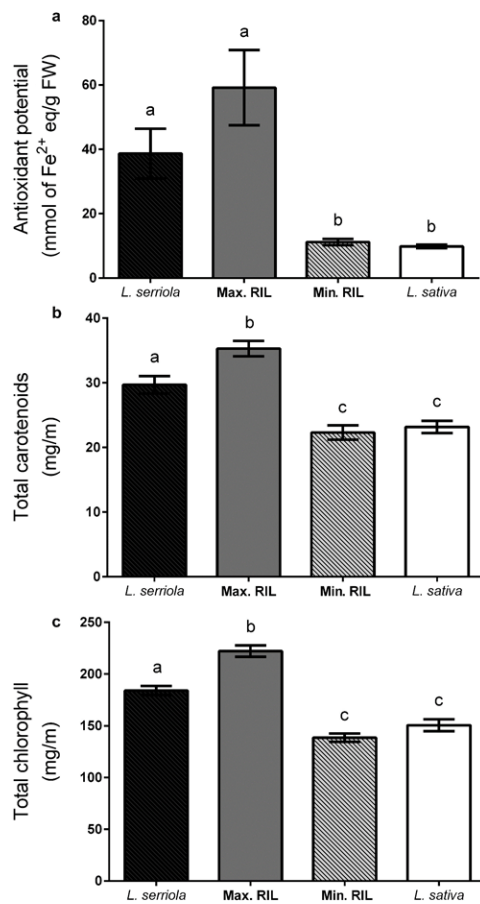
<sup>5</sup> Li-ming Yin et al., Effects of sodium copper chlorophyllin on mesenchymal stem cell function in aplastic anemia mice, *Chinese Journal of Integrative Medicine* (3013), Volume 19, 360-366

<sup>6</sup> D. Chiabrando et al., Heme and erythropoiesis: more than a structural role, *Haematologica* (2014), Volume 99, 973-983

<sup>7</sup> A. Damerun et al., Elucidating the genetic basis of antioxidant status in lettuce (*Lactuca sativa*), *Hortic Res.* (2015)



precedentemente citati: il QTL è determinato fortemente dai geni che codificano per gli enzimi coinvolti nelle vie biosintetiche dei fenoli, dei carotenoidi e delle clorofille.



**Figura 1.5.2-1 Fenotipizzazione della popolazione RIL. Analisi dei fenotipi relativi agli antiossidanti nelle linee parentali (*L. sativa* e *L. serriola*), nel RIL maggiore e in quello minore.**

## 2 SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi è duplice: studiare l'effetto della clorofilla sullo stato di stress ossidativo di diversi tessuti di topo dopo la somministrazione; studiare come la clorofilla somministrata ai topi si distribuisce nei tessuti e per quanto tempo permane dopo l'assunzione.

La strategia sperimentale è stata sviluppata nei seguenti punti:

1. Analisi dello stato di stress ossidativo nei tessuti di topo trattati per 21 giorni con due diverse quantità (10 $\mu$ L e 30 $\mu$ L) di sale sodico di clorofillina magnesiacca al 14% peso/volume in alcol 34% peso/volume mediante saggio Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS);
2. Estrazione in acetone della clorofilla dai campioni di tessuto dei topi sopra citati e dai campioni di tessuto di topi trattati con un'unica somministrazione (20 $\mu$ L) di soluzione idroalcolica di sale sodico di clorofillina magnesiacca sacrificati a diversi tempi;
3. Verifica del potere riducente della clorofillina e della sua presenza nei tessuti tramite saggio Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) su tutti i campioni.

## 3 MATERIALI E METODI

### 3.1 *Trattamento degli animali*

Gli animali utilizzati per questo studio sono stati divisi in due corti: la prima per lo studio della distribuzione e degli effetti di clorofillina a seguito di una somministrazione cronica, la seconda per lo studio della distribuzione e degli effetti della clorofillina a seguito di una somministrazione acuta

#### 3.1.1 Prima corte

È composta da 48 topi femmine BALB/c di 8 settimane di età e con un peso corporeo di 22-25 g, sane. Gli animali sono stati stabulati con un ciclo luce/buio costante (12 ore di luce artificiale e 12 ore di buio), a una temperatura di 22°C e sono stati alimentati con l'abituale dieta commerciale e permessa l'assunzione ad libitum di acqua. I topi BALB/c sono una linea inbreed di topi albini fra le più utilizzate nella sperimentazione animale. I topi sono stati suddivisi in 5 gruppi e per 21 giorni sono stati sottoposti ai seguenti trattamenti:

GRUPPO	TRATTAMENTO	N° DI ANIMALI
Gruppo 1	Nessuno (controllo)	8
Gruppo 2	10µL/die di soluzione idroalcolica al 34% peso/volume	10
Gruppo 3	30µL/die di soluzione idroalcolica al 34% peso/volume	10
Gruppo 4	10µL/die di soluzione idroalcolica di clorofillina	10
Gruppo 5	30µL/die di soluzione idroalcolica di corofillina	10

La soluzione utilizzata nel trattamento dei gruppi 4 e 5 è una soluzione di clorofillina magnesiacca 14% peso/volume in soluzione idroalcolica 34% peso/volume. La somministrazione sia della soluzione idroalcolica che della soluzione idroalcolica di clorofillina è stata effettuata per via orale con una pipetta. Tutte le procedure eseguite sugli animali sono

state condotte conformemente alle linee guida per l'impiego di animali e sono state approvate dal comitato etico dell'Università di Bologna.

### 3.1.2 Seconda corte

È composta da 44 topi con le stesse caratteristiche e sottoposti alle stesse condizioni di stabulazione descritti nel paragrafo 3.3.1. I topi sono stati divisi in 11 gruppi, 1 di controllo e 10 trattati con un'unica somministrazione di 20µL di soluzione di clorofillina magnesiacca 14% peso/volume in soluzione idroalcolica 34% peso/volume. I topi dei diversi gruppi sono stati sacrificati a tempi diversi nell'arco delle 24 ore successive al trattamento.

La somministrazione della soluzione idroalcolica di clorofillina è avvenuta tramite gavaggio, ovvero tramite una cannula direttamente nello stomaco dei topi.

INGREDIENTI	
clorofillina magnesiacca, maltodestrina	
sale sodico della clorofillina magnesiacca ottenuta da clorofilla estratta da vegetali ammessi da EU	
CARATTERISTICHE SENSORIALI E CHIMICO FISICHE	
aspetto	polvere verde scuro
solubilità	idrosolubile
odore e sapore	caratteristico
pigmento	98 % clorofillina sodica
potere colorante	E1% > 710 misurato a 404nm in una cuvetta di 1cm utilizzando acqua distillata a pH 7,5
DESCRIPTION	Sodium chlorophyllin manufactured from chlorophyll extracted from a vegetable source using malto dextrin as the carrier.

*Fig. 3.1-1 Dati tecnici della clorofillina utilizzata.*

## 3.2 Preparazione e conservazione dei campioni per saggio TBARS

Sono stati analizzati il fegato, la milza, i muscoli e i reni dei topi della prima corte. Per ogni misurazione sono stati utilizzati 50mg di campione ottenuti mettendo insieme i tessuti provenienti da due animali appartenenti allo stesso gruppo. I 50 mg di tessuto sono stati posti in tubi di vetro e sono stati addizionati con 1mL di tampone salino fosfato PBS + butilidrossitoluene (BHT) 100µM. Il BHT è necessario per evitare l'ulteriore perossidazione dei lipidi nei tessuti sottoposti allo stress meccanico dell'omogenazione. L'omogenazione è

stata effettuata con l'ultra-turrax. Durante tutti i passaggi i campioni sono stati tenuti in ghiaccio per evitare la denaturazione.

Una volta finita la preparazione, i tessuti rimanenti sono stati conservati nel freezer a -80°C per eventuale ripetizione dell'esperimento.

### 3.3 Analisi dello stato di stress ossidativo mediante saggio TBARS

Lo stress ossidativo è stato analizzato mediante il saggio TBARS, che misura la formazione della malondialdeide (MDA). Questa infatti si forma dalla rottura dei grassi polinsaturi e può essere usata come indice per determinare lo stato di perossidazione dei lipidi. L'MDA reagisce con l'acido tiobarbiturico e dà un prodotto di reazione rosso che assorbe luce a 535 nm.

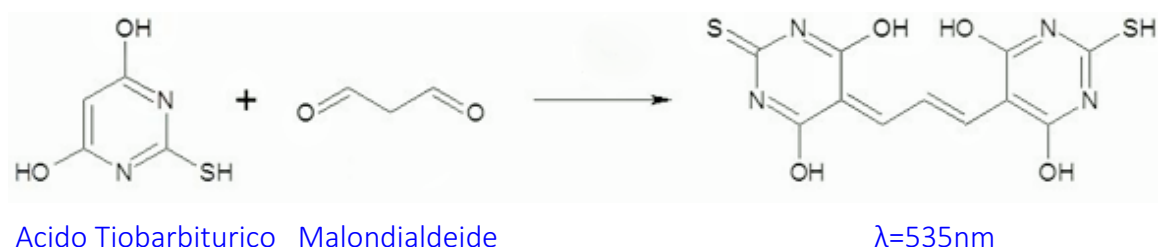


Figura 3.3-1 Reazione chimica del saggio TBARS.

Per il saggio bisogna preparare una soluzione stock contenente i seguenti reagenti:

- 15% peso/volume di acido tricloroacetico (TCA)
- 0,375% peso/volume di acido tiobarbiturico (TBA)
- 0,25 N di HCl

Per preparare la soluzione è necessario scaldare lievemente per far sciogliere il TBA. Il saggio viene effettuato con 600µL di reagente per 300µL di campione. Si scalda per 15 minuti in un bagnetto a 80°C e si effettua una centrifugazione a 20000g per 7 minuti per eliminare eventuali particelle in sospensione. Si effettua poi la lettura allo spettrofotometro con 535nm.

Per effettuare il saggio è stata prima di tutto allestita una curva di taratura dell'MDA, presa in quantità da 0 a 4,8 nmoli. Per costruire la curva di taratura abbiamo utilizzato una soluzione

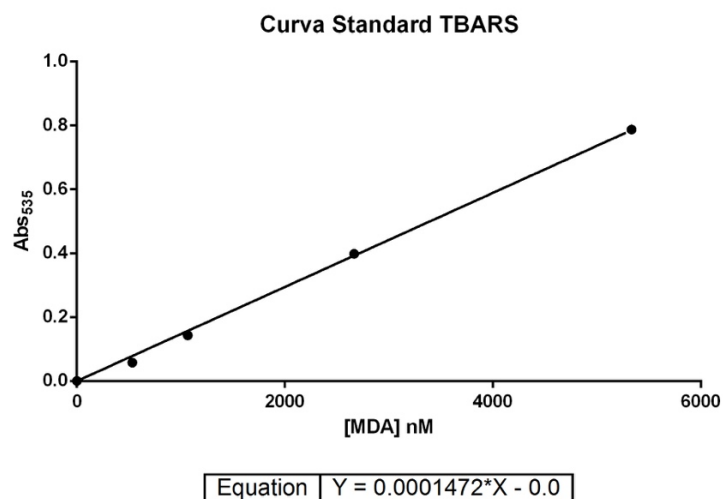
stock 0,16mM. È stato seguito lo schema di caricamento riportato in tabella e letta l'assorbanza a 535nm.

Sample (µL)	Acqua (µL)	Reagente (µL)
0	300	600
3	297	600
6	294	600
15	285	600
30	270	600

Dall'analisi sono stati ricavati i seguenti valori:

Quantità di MDA in nmoli	[MDA] nM	Abs
0,00	0	0,000
0,48	533	0,058
0,96	1066	0,143
2,40	2666	0,398
4,80	5333	0,787

Dai quali è stata costruita la curva:



*Figura 3.3-2 Curva Standard del saggio TBARS calcolata sulla concentrazione di MDA in nM.*

Per l'analisi dei campioni sono state utilizzate le seguenti quantità:

- 145µL di omogenato

- 255µL di acqua
- 600µL di reagente

Ogni campione è stato scaldato a 80°C per 15 minuti e centrifugato per poter eliminare il pellet. Il surnatante è stato quindi diluito 1:1 con acqua e il campione è stato letto a 535nm.

Il contenuto proteico è stato valutato mediante saggio di Lowry. Il protocollo del saggio è suddiviso in 7 passaggi:

1. Si mettono 100µL di soluzione DOC e 10µL di campione in un tubetto da saggio e si porta a volume di 1mL con H<sub>2</sub>O
2. Per ogni campione si aggiungono 2mL di reattivo composto da Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 2% peso/volume in NaOH 0,1M + CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1% peso/volume + Tartrato di Na e K-4H<sub>2</sub>O 2% peso/volume con la proporzione 100:1:1
3. Si aspettano 10 minuti
4. Si aggiungono ad ogni campione 200µL di reattivo Folin Fenolo diluito 1:1 con H<sub>2</sub>O
5. Si vorticano i campioni
6. Si aspettano 30 minuti
7. Si legge il campione in cuvette di plastica da 3mL a 750nm, il valore di lettura ideale è compreso fra Abs=0,1 e Abs=0,5

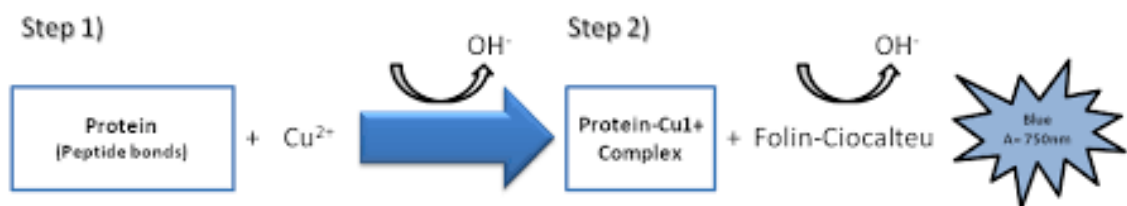


Fig. 3.3-1 Reazioni chimiche del saggio Lowry.

### 3.4 Preparazione e conservazione dei campioni per saggio FRAP

I tessuti analizzati sono fegato, intestino crasso, intestino tenue e muscolo dei topi della prima e della seconda corte. Per effettuare le analisi è stato necessario estrarre la clorofilla dai

tessuti, evitando così che altro materiale tissutale potesse interferire con i risultati. L'estrazione è stata effettuata in acetone.

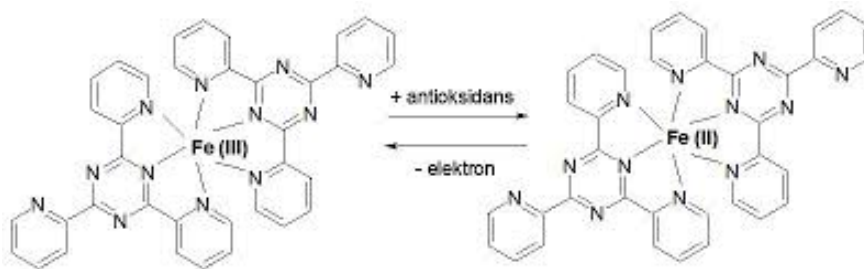
Sono stati omogenati 400-500mg di tessuto in 2mL di acetone. Gli omogenati sono stati centrifugati per 12 minuti a 20000g, il pellet è stato eliminato e l'estratto acetone è stato utilizzato sia per il dosaggio della clorofilla che per il FRAP.

Una volta finita la preparazione, i tessuti rimanenti sono stati conservati nel freezer a -80°C per eventuale ripetizione dell'esperimento.

### ***3.5 Verifica della presenza della clorofilla nei tessuti e del potere antiossidante mediante saggio FRAP***

Le analisi sono state svolte in due parti: l'analisi FRAP per verificare l'effetto della clorofilla sulla resistenza a stress ossidativo; l'analisi spettrofluorimetrica (non discussa in questa tesi) per la quantificazione della clorofilla nei tessuti.

Il saggio FRAP è utilizzato per misurare il potere riducente di un campione. Il principio su cui si basa è la capacità del campione di ridurre il ferro ferrico a ferroso. A pH acido il ferro lega la tripiridiltriazina (TPTZ) e quando è ridotto forma un complesso colorato blu rilevabile con lo spettrofotometro a 593nm.



**Figura 3.5-1** Reazione del saggio FRAP.

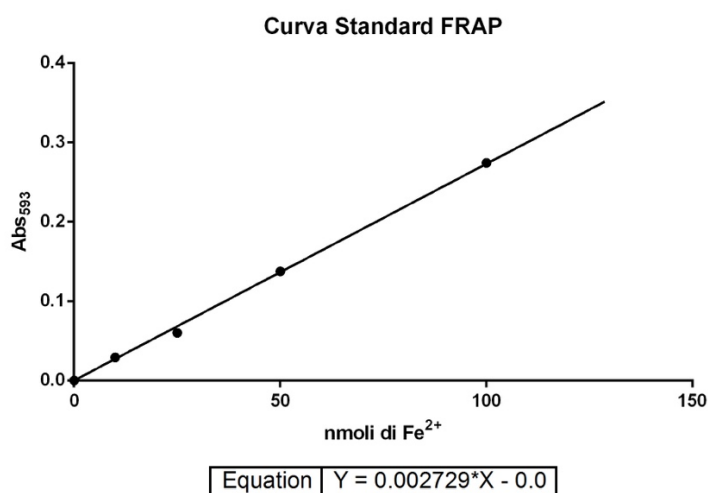
Il reagente della reazione, per ogni campione, è così composto:

- 10 parti di buffer acetato a pH 3,6
- 1 parte di TPTZ 10mM + HCl 40mM
- 1 parte di 20mM di FeCl<sub>3</sub>-6H<sub>2</sub>O



Per l'esecuzione del saggio si mette 1mL di reattivo in una cuvetta di quarzo nello spettrofotometro e si aggiungono 10µL di campione. Si legge a 593nm.

Prima di effettuare le analisi degli estratti, è stata allestita la curva standard del saggio FRAP utilizzando concentrazioni crescenti di ferro ferroso.



*Figura 3.5-2 Curva Standard del saggio FRAP. E' stata allestita aggiungendo un quantitativo crescente di ferro ferroso alla soluzione.*

Inoltre è stato eseguito il saggio con acetone puro come controllo negativo e con soluzione idroalcolica di clorofillina 1,57µM (0,014 peso/volume) come controllo positivo. A 3 minuti dall'inoculo del campione nella provetta le assorbanze erano:

	Abs a 180''
Acetone	0,000
Clorofillina 1,57µM	0,032

Interpolando i risultati con la curva standard, vediamo che la clorofillina 1,57µM causa la riduzione di 10nmoli di ferro ferrico a ferroso.

Per verificare che il potere riducente mostrato dalla clorofilla fosse dato dalla riduzione del ferro del reattivo e non da un artefatto dovuto alla chelazione del magnesio da parte del TPTZ, abbiamo eseguito l'analisi aggiungendo MgCl<sub>2</sub> al TPTZ. Anche se il magnesio venisse chelato dal TPTZ il complesso non è comunque rilevabile a 593nm. Abbiamo potuto affermare che il magnesio non influisce sul saggio FRAP.

Gli estratti in acetone sono stati analizzati prendendo in considerazione l'assorbanza dopo 3 minuti dall'aggiunta del campione nella cuvetta contenente il reattivo. Il contenuto della cuvetta è stato mantenuto in agitazione con un'ancoretta magnetica per far sì che il campione aggiunto reagisse in modo uniforme con tutto il reattivo presente.

## 4 RISULTATI

### 4.1 Saggio TBARS

L'analisi dello stato di stress ossidativo mediante saggio TBARS ha permesso di determinare l'impatto del trattamento cronico con soluzione idroalcolica di clorofillina sull'organismo.

I valori di assorbanza sono stati normalizzati sulla quantità di proteine presenti nel campione. I valori più alti sono indice di un maggiore stress ossidativo. Non ci aspettiamo di trovare un miglioramento nelle condizioni di stress del tessuto in quanto i topi non erano stati preventivamente stressati (per es. con esercizio fisico) e lo stato basale di perossidazione lipidica è basso.

In nessun campione è stata evidenziata una significativa differenza di stress ossidativo, se non nel fegato, dove il test ANOVA ha evidenziato la significatività di due risultati.

I risultati sono riportati nei grafici successivi:

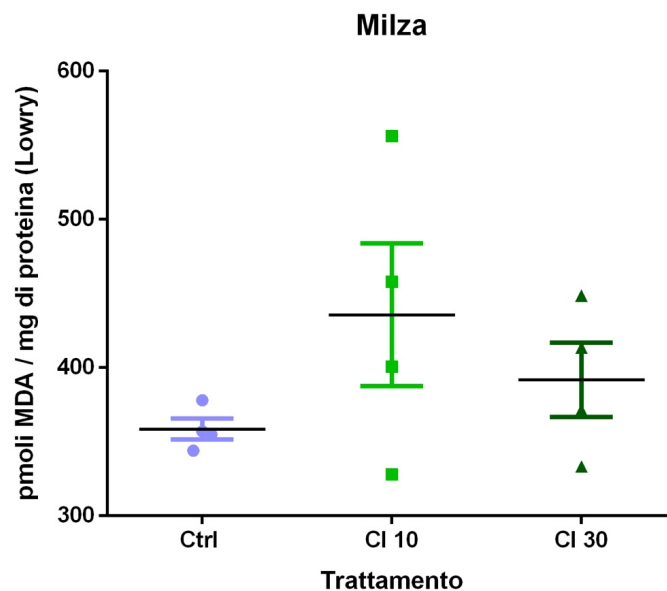


Figura 4.1-1 Analisi TBARS dell'omogenato della milza. I dati sono presentati come la media +/- l'errore medio standard.

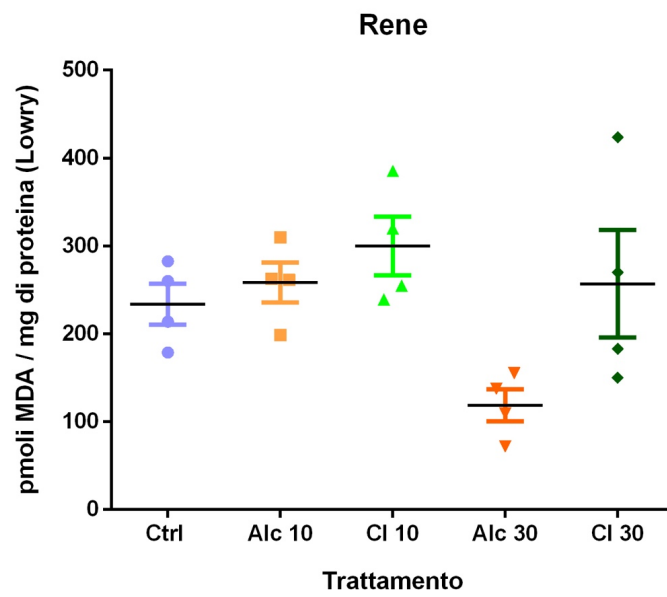


Figura 4.1-2 Analisi TBARS dell'omogenato del rene. I dati sono presentati come la media +/- l'errore medio standard.

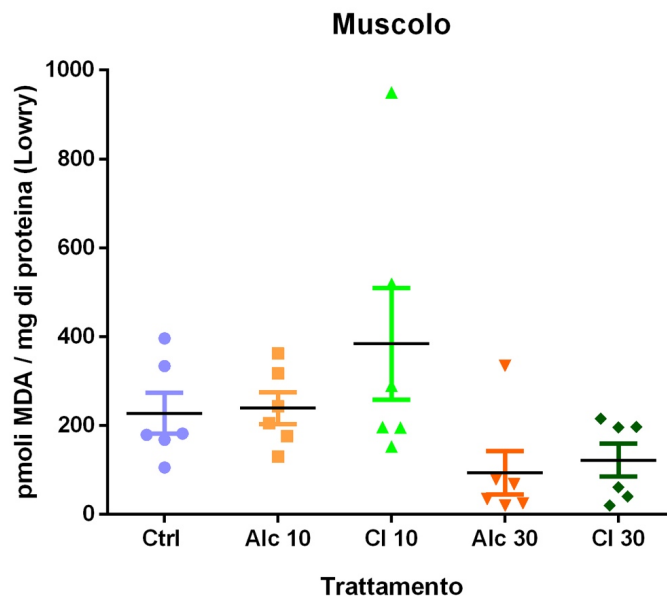
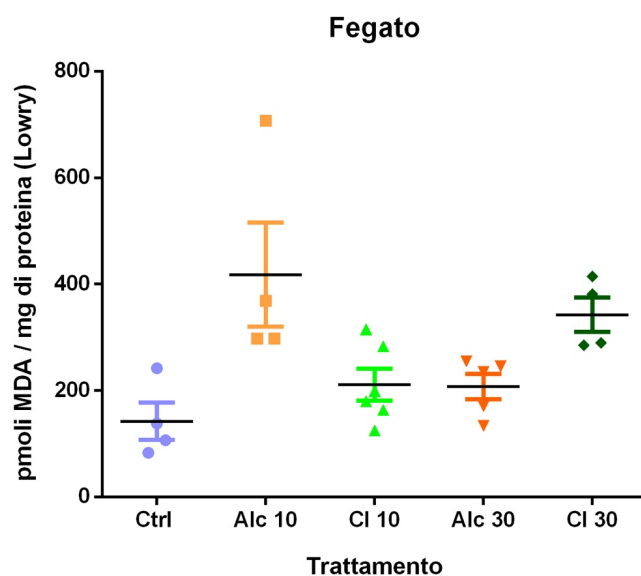


Figura 4.1-3 Analisi TBARS dell'omogenato del muscolo. I dati sono presentati come la media +/- l'errore medio standard.



Dunnett's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
Ctrl vs. Alc 10	-275.5	-464.9 to -86.01	Yes	**
Ctrl vs. Cl 10	-68.72	-241.7 to 104.2	No	ns
Ctrl vs. Alc 30	-65.55	-245.3 to 114.2	No	ns
Ctrl vs. Cl 30	-200.1	-389.6 to -10.64	Yes	*

*Figura 4.1-4 Analisi TBARS dell'omogenato del muscolo. I dati sono presentati come la media +/- l'errore medio standard.*

Tramite test della varianza ANOVA è stato possibile evidenziare la significativa differenza fra i valori di stress ossidativo nei campioni "fegato alcol 10" e "fegato clorofillina 30" rispetto al controllo.

#### **4.2 Saggio FRAP sui tessuti dei topi trattati per 21 giorni**

L'analisi FRAP è stata effettuata per due scopi principali: in primo luogo verificare il potere antiossidante della clorofillina estratta; in secondo luogo verificare la presenza della clorofilla nei tessuti. Questa analisi è stata effettuata dopo aver verificato che l'acetone puro non dà segnale, mentre la soluzione idroalcolica di clorofillina da noi usata sì (vedi paragrafo 3.4).

Per ogni campione di tessuto è stato fatto un estratto in acetone e l'assorbanza è stata misurata a 180 secondi dall'aggiunta dell'estratto al reattivo. I risultati ottenuti sono stati normalizzati sul peso umido del campione addizionato per il saggio. Dall'analisi ci aspettiamo di non avere nessun segnale nei campioni di controllo e nei campioni trattati solo con soluzione idroalcolica. Ci aspettiamo invece di avere un segnale maggiore nei campioni

trattati con la soluzione idroalcolica di clorofillina. In particolare il segnale più alto dovrebbe trovarsi in corrispondenza dei tessuti dei topi ai quali per 21 giorni sono stati somministrati 30 $\mu$ L di soluzione. Per insufficienza di tessuto, il campione di controllo del fegato è stato sostituito con il campione trattato con 30 $\mu$ L di soluzione idroalcolica.

I risultati ottenuti hanno rispecchiato le attese e sono riportati nei grafici sottostanti:

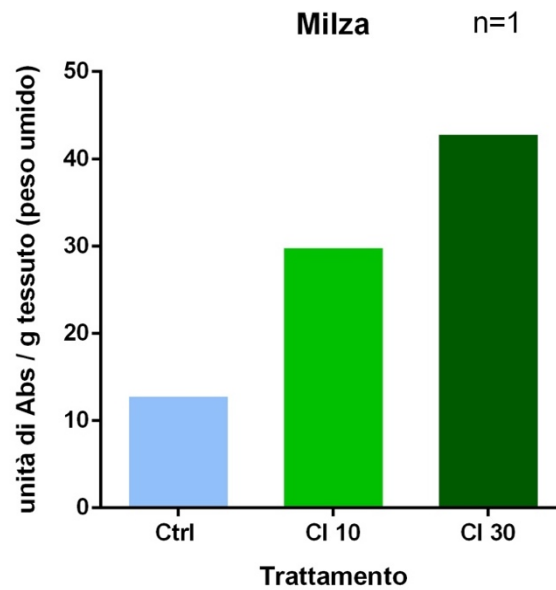


Figura 4.2-1 Analisi FRAP dell'estratto in acetone della milza.

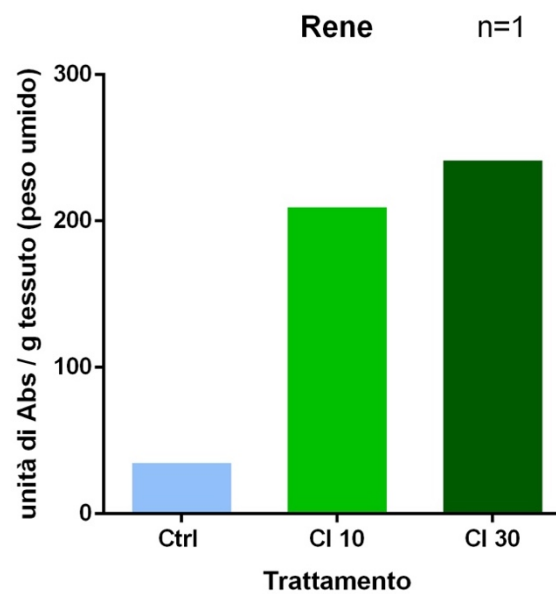


Figura 4.2-2 Analisi FRAP dell'estratto in acetone del rene.

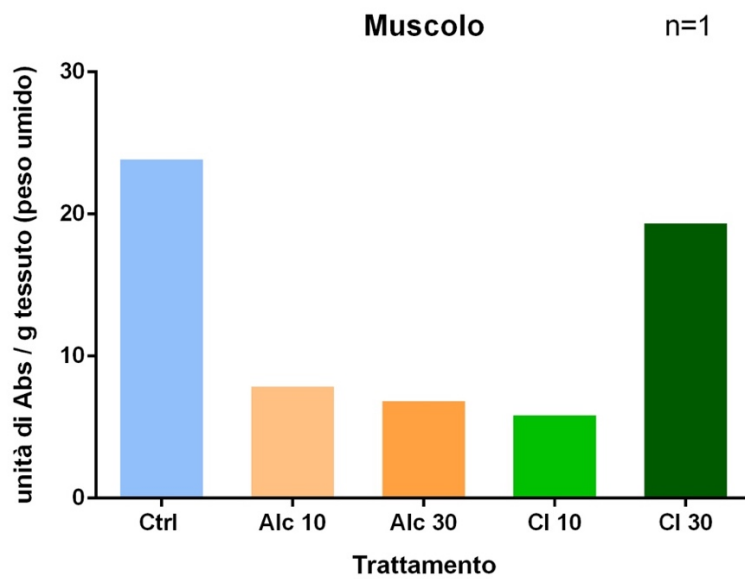


Figura 4.2-2 Analisi FRAP dell'estratto in acetone del muscolo.

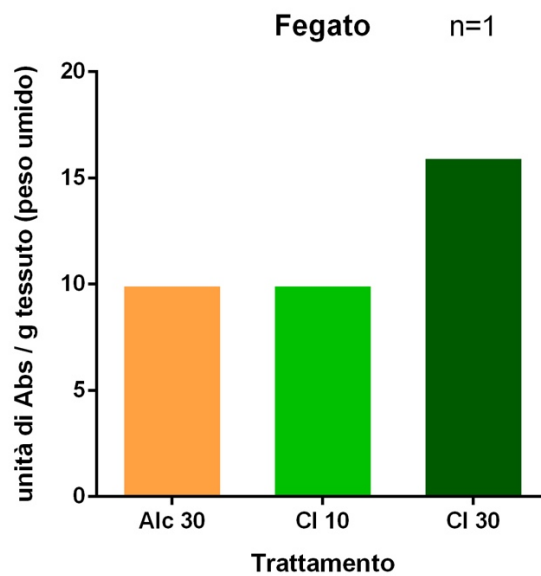


Figura 4.2-4 Analisi FRAP dell'estratto in acetone del fegato.

### 4.3 Saggio FRAP sui tessuti dei topi trattati a intervalli di tempo diversi nell'arco delle 24 ore

In questo caso lo scopo era analogo all'analisi compiuta sui tessuti dei topi trattati per 21 giorni, ma conducendo uno studio sulla somministrazione acuta della soluzione. In aggiunta,

si è voluta analizzare la distribuzione della clorofilla nei tessuti a diversi tempi per verificarne i livelli di accumulo e eliminazione.

Per ogni campione di tessuto sono stati fatti due estratti in acetone. Dall'analisi ci aspettiamo di poter apprezzare la presenza della clorofilla e il suo potere antiossidante come è avvenuto per i campioni descritti nel paragrafo 4.2.

I risultati sono riportati nei grafici successivi:

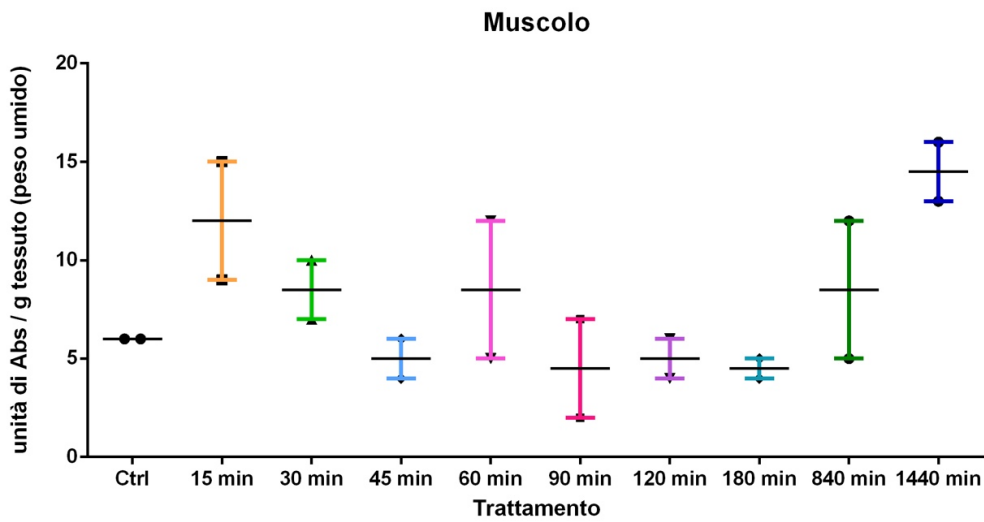


Figura 4.3-1 Analisi FRAP degli estratti in acetone del muscolo dei topi trattati a diversi intervalli di tempo. I dati sono rappresentati come la media +/- l'errore standard.

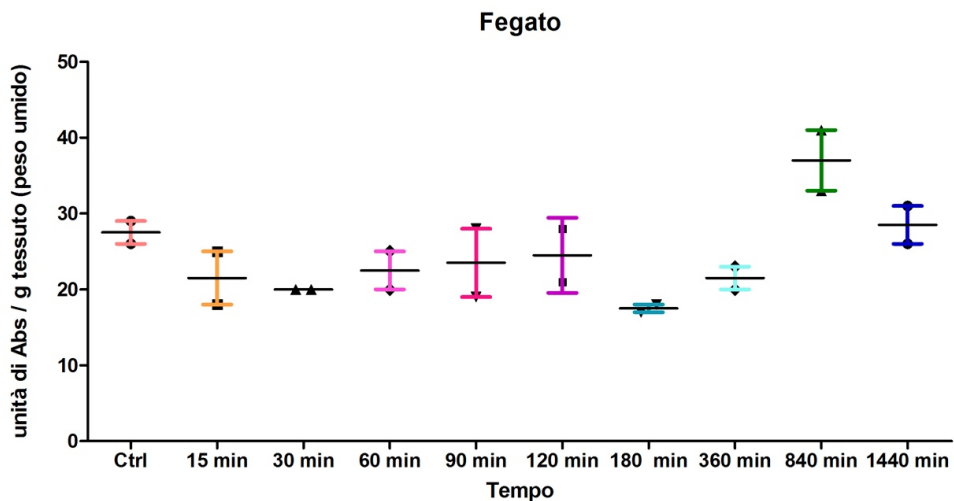


Figura 4.3-2 Analisi FRAP degli estratti in acetone del fegato dei topi trattati a diversi intervalli di tempo. I dati sono rappresentati come la media +/- l'errore standard.



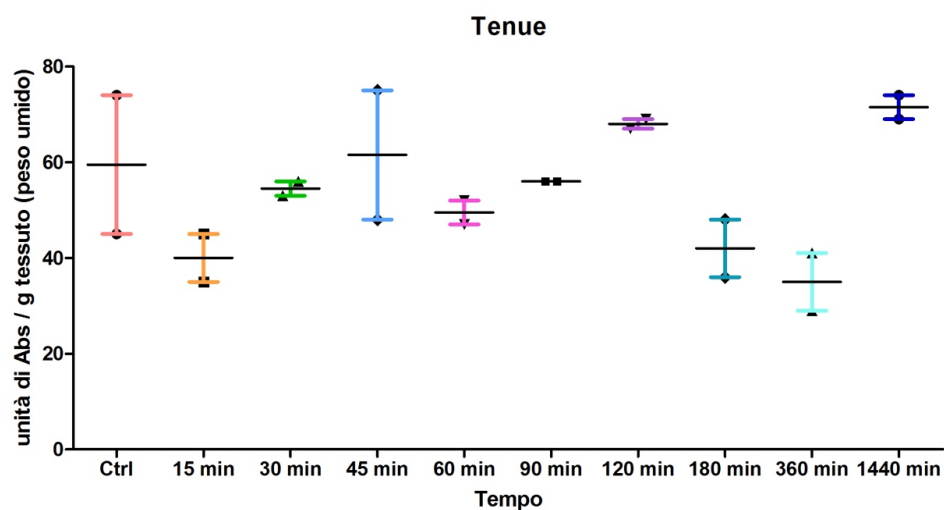


Figura 4.3-3 Analisi FRAP degli estratti in acetone dell'intestino tenue dei topi trattati a diversi intervalli di tempo. I dati sono rappresentati come la media +/- l'errore standard.

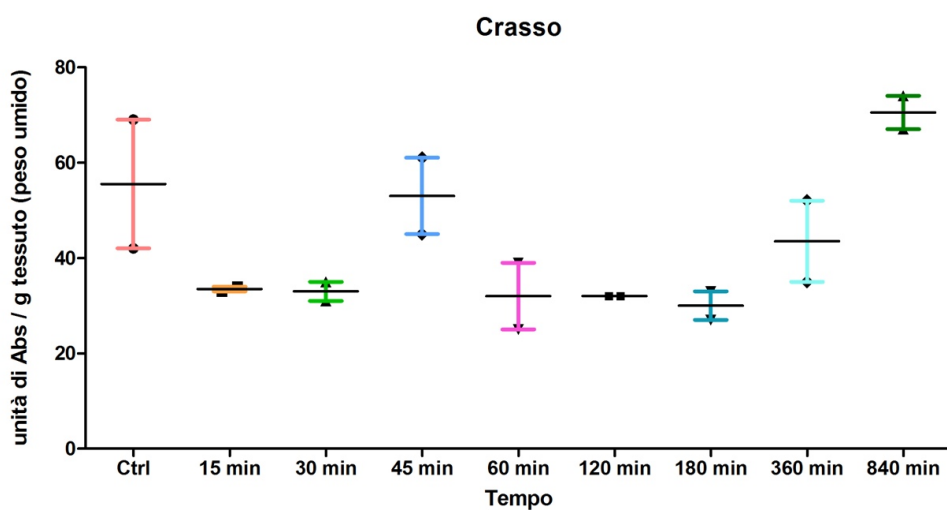


Figura 4.3-4 Analisi FRAP degli estratti in acetone dell'intestino crasso dei topi trattati a diversi intervalli di tempo. I dati sono rappresentati come la media +/- l'errore standard.

I campioni mancanti “fegato 45 minuti”, “muscolo 360 minuti”, “tenue 840 minuti” e “crasso 90 minuti” sono stati eliminati perché ritenuti non significativi in quanto troppo divergenti dagli altri valori riportati. Il campione “crasso 1440 minuti”, invece, non ci è stato fornito.

#### 4.3.1 FRAP e spettrofluorimetria dei campioni di tessuto dei topi trattati a intervalli di tempo diversi nell'arco delle 24 ore

I dati ottenuti con il saggio FRAP su muscolo e fegato sono stati messi a confronto con l'analisi spettrofluorimetrica degli estratti in acetone per valutare con precisione la clorofillina nei tessuti, per questo è stato allestito un parallelismo fra i risultati ottenuti con la spettrofluorimetria e risultati relativi al potere antiossidante ottenuti con il saggio FRAP.

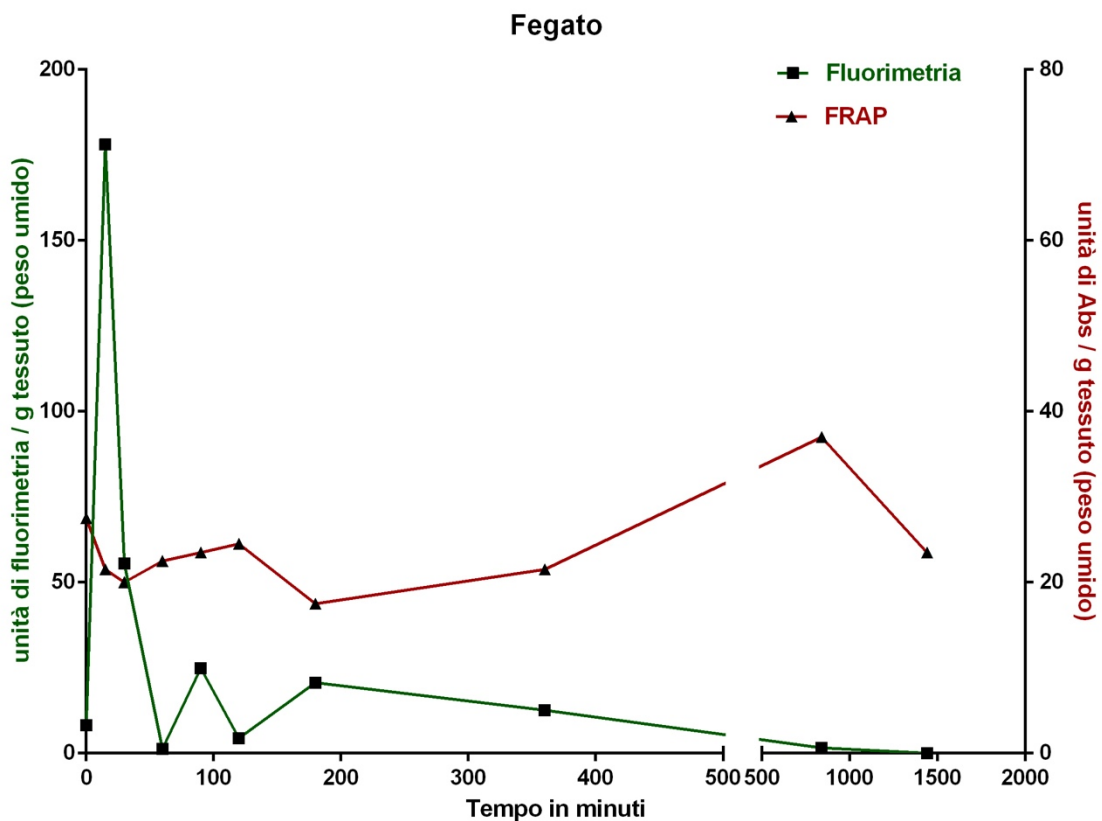


Figura 4.3-5 Analisi FRAP e spettrofluorimetrica degli estratti in acetone del fegato dei topi trattati a intervalli di tempo diversi nelle 24 ore. I dati sono presentati come media dei valori.

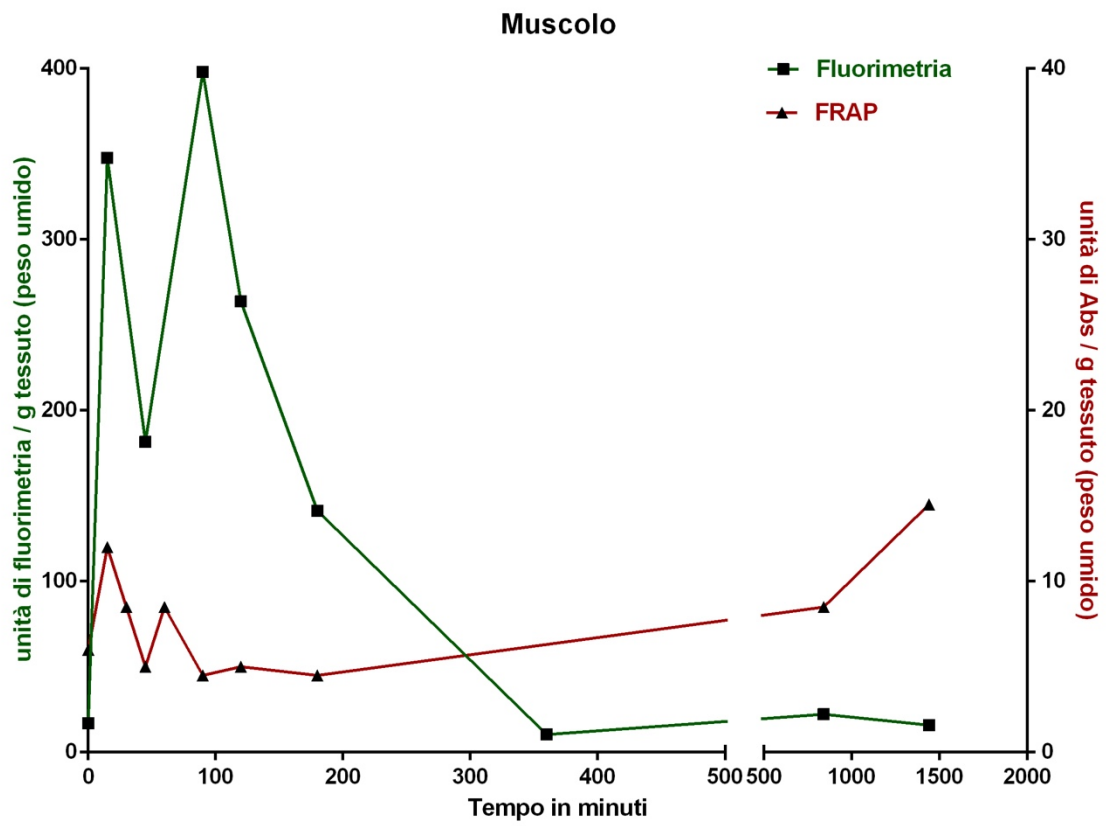


Figura 4.3-6 Analisi FRAP e spettrofluorimetrica degli estratti di fegato dei dei topi trattati a intervalli di tempo diversi nelle 24 ore. I dati sono presentati come media dei valori.

## 5 CONCLUSIONI

### 5.1 Saggio TBARS

Basandoci sui risultati dell'analisi TBARS si può dire che la clorofilla non è un composto proossidante. Infatti l'unico valore che indica una perossidazione lipidica significativamente più elevata secondo il test ANOVA è quello del campione di fegato "clorofilla 30". Il livello di stress ossidativo più alto trovato nel fegato può essere dovuto all'attività di disintossicazione e quindi al suo ruolo nello smaltimento della soluzione idroalcolica e della soluzione idroalcolica di clorofillina somministrati. In particolar modo l'alcol somministrato per un tempo così lungo potrebbe essere causa di una lieve steatosi epatica. Considerando lo stato di stress ossidativo dei tessuti dei topi trattati con clorofillina in relazione allo stato di stress ossidativo dei campioni trattati con solo alcol, ovvero il veicolo, la differenza di risultato non è più significativa.

Ultima nota può essere fatta relativamente all'analisi dei risultati del rene: qui notiamo un miglioramento nello stato di stress ossidativo dei topi trattati con 30µL di alcol al giorno. Questo risultato è in linea con studi condotti su dei topi per verificare l'effetto positivo che comporta l'assunzione di alcol sull'eliminazione di radicali liberi nei reni<sup>8</sup>. Grazie a questi studi si è stato evidenziato che l'assunzione di etanolo promuove l'attività della Superossido Dismutasi (SOD).

### 5.2 Saggio FRAP sui tessuti dei topi trattati per 21 giorni

Basandoci sull'analisi dei risultati possiamo dire che la presenza della clorofillina nei tessuti è provata da un aumento del segnale ottenuto con il saggio FRAP. Per tutti i tessuti, infatti, gli

---

<sup>8</sup> Q. Yuan et al., Preconditioning with Physiological Levels of Ethanol Protect Kidney against Ischemia/Reperfusion Injury by Modulating Oxidative Stress, PLoS One (2011)

estratti dei campioni trattati con clorofillina presentano una maggiore resistenza allo stress ossidativo.

L'unico risultato non atteso è quello del muscolo controllo, ma è ragionevole pensare che ci sia stato un errore nell'estrazione o che fosse contaminata la cuvetta, in quanto i risultati dei campioni di tessuto trattati con alcol danno il segnale atteso.

La presenza di clorofilla è apprezzabile in tutti i tessuti analizzati se somministrata in quantità di 30µL al giorno. Al contrario con il trattamento di 10 µL il segnale è apprezzabile solo a livello di milza e reni. Questi risultati sono confermati dall'analisi spettrofluorimetrica, con la quale è stato possibile quantificare solo la clorofillina presente nei tessuti dei topi trattati con 30µL/die di soluzione idroalcolica di clorofillina. La quantificazione nel muscolo e nel fegato è la seguente:

- $5,00 \times 10^{-5}$ % g di clorofillina / g di muscolo (peso umido)
- $7,73 \times 10^{-6}$ % g di clorofillina / g di fegato (peso umido)

Interpolando le assorbanze ottenute con la curva standard del saggio FRAP troviamo conferma dell'attività antiossidante dell'estratto in acetone. Tuttavia l'estratto in acetone non può contenere unicamente clorofilla in quanto i campioni di controllo presentano a loro volta un'attività antiossidante. Probabilmente nei tessuti sono presenti altre sostanze solubili in acetone la cui attività viene rilevata dal saggio. Per esempio alcune vitamine, come la vitamina E, sono estraibili in acetone.

### ***5.3 Saggio FRAP sui tessuti dei topi trattati a intervalli di tempo diversi nell'arco delle 24 ore***

Il saggio FRAP degli estratti in acetone dei tessuti dei topi trattati a intervalli di tempo diversi nell'arco delle 24 ore ha rilevato uno scarso segnale in tutti i campioni. Questo potrebbe indicare la poca efficacia di un trattamento acuto con soluzione idroalcolica di clorofillina, che probabilmente non si accumula nei tessuti se somministrata in quantità così bassa.

Tuttavia i risultati sono coerenti con quanto evidenziato dall'analisi spettrofluorimetrica. A livello epatico non notiamo alcun segnale e anche dai dati ottenuti allo spettrofluorimetro non si evince presenza di clorofilla nel tessuto, se non a 15 minuti dalla somministrazione.

Oltre allo scarso assorbimento delle sostanze naturali da parte dei tessuti, il motivo di segnali così bassi in entrambi i saggi potrebbe essere che il fegato sia in grado di metabolizzare la clorofilla. Se così fosse non sarebbe più visibile in spettrofluorimetria e probabilmente neanche con saggio FRAP. A livello muscolare vi è invece un iniziale incremento della quantità di clorofillina nel tessuto, che a partire dai 90 minuti dopo la somministrazione inizia a calare fino a scomparire. Il saggio FRAP conferma questa tendenza, tuttavia presenta un incremento del segnale in corrispondenza dei tempi più lunghi. Questa tendenza è comune a tutti gli organi analizzati e potrebbe essere dovuta alla presenza di metaboliti della clorofillina magnesiana solubili in acetone o altre sostanze la cui sintesi viene promossa dalla clorofillina. Questa ipotesi andrebbe approfondita con ulteriori analisi.

Sono stati analizzati in maniera più approfondita i risultati dei campioni di fegato e muscolo in quanto quelli dei tratti intestinali sono largamente influenzati dal contenuto ancora presente nel tubo digerente.

#### **5.4 Conclusioni**

Per riassumere la clorofillina non è proossidante e quindi non causa uno stress ossidativo ai tessuti di topi trattati. Con un trattamento cronico di 21 giorni con 30 $\mu$ L di soluzione idroalcolica di clorofillina, essa si accumula in tutti i tessuti analizzati e presenta capacità riducente. Tuttavia, con un trattamento acuto, la presenza della clorofillina è al limite della rilevabilità e solo nell'arco dell'1-2 ore successive al trattamento. Ciò indica l'incapacità dei tessuti di assorbire la clorofillina se assunta in quantità così basse.

In qualità di integratore alimentare potrebbe avere effetto solo se assunta giornalmente per un periodo di tempo sufficientemente lungo.

## 6 REFERENZE BIBLIOGRAFICHE

### 6.1 Testi

David L. Nelson, Michael M. Cox, *I principi di biochimica di Lehninger*, Zanichelli (2014) sesta edizione

### 6.2 Articoli

C. Ulbricht et al., An evidence-based systematic review of chlorophyll by the Natural Standard Research Collaboration, *Journal of dietary supplements (Online)* (2014), Volume 11, 198-239

Rosenbach-Belkin et al., Serine Conjugates of Chlorophyll and Bacteriochlorophyll: Photocytotoxicity in vitro and Tissue Distribution in Mice Bearing Melanoma Tumors, *Photochemistry and Photobiology* (1996), 174-181

Benzie et al., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry* (1996), Volume 239, 70-76

B Sure, Solubility of the reproductive dietary complex (vitamin E) in various organic solvents, (1925)