

TRA I CINQUE FINALISTI AL PREMIO ASSOENOLOGI-VERSINI 2017

APPROCCIO ELETTROANALITICO PER LO STUDIO DI ANTIOSSIDANTI AD USO ENOLOGICO

La voltammetria ciclica è una potente tecnica elettroanalitica per lo studio di molecole antiossidanti. Questa tecnica è stata utilizzata per valutare il comportamento di alcuni antiossidanti enologici. Anidride solforosa, acido ascorbico, glutatone e derivati di lievito sono stati confrontati in diverse concentrazioni, per valutare la loro capacità di proteggere la (+)-catechina, in vino modello. I prodotti testati hanno dimostrato attività diverse, legate non solo alle loro specifiche caratteristiche antiossidanti, ma anche alla concentrazione media che hanno nel vino. Il lavoro svolto dimostra il potenziale di questa tecnica analitica per lo studio dei meccanismi di ossidazione in ambito enologico.



Di
Piergiorgio Comuzzo¹
Sezione di Tecnologia delle Bevande Alcoliche
Università degli Studi di Udine,
Dipartimento di Scienze Agroalimentari,
Ambientali ed Animali Udine

Rosanna Toniolo²
Sezione di Chimica
Università degli Studi di Udine,
Dipartimento di Scienze Agroalimentari,
Ambientali ed Animali Udine

INTRODUZIONE

● Le tecniche elettroanalitiche sono una famiglia di tecniche di analisi che sfrutta la misurazione di grandezze elettriche (potenziale, corrente, carica) per ottenere informazioni quali-quantitative su determinate specie chimiche presenti in soluzione. Alcune di queste sono ben note al mondo enologico: basti pensare alla semplice misurazione del pH in cantina, o all'altrettanto nota determinazione del potenziale redox, entrambe basa-

te sulla misura di un potenziale elettrico (tecniche potenziometriche). Anche la valutazione della conducibilità, utilizzata nei classici test di stabilità tartarica, è molto conosciuta nel settore del vino e rientra nel campo delle determinazioni conduttimetriche.

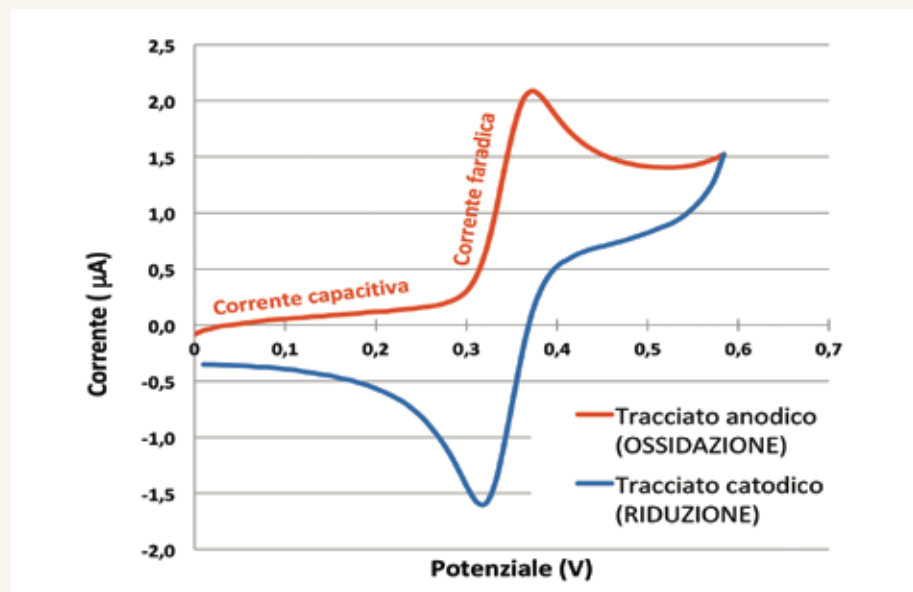
● Meno note al settore, sono invece una serie di tecniche analitiche basate sulla misura della corrente. Fra queste, una in particolare è stata applicata solamente nell'ultimo decennio allo studio dei vini, con risultati decisamente inte-

ressanti dal punto di vista pratico e applicativo (Makhotkina e Kilmartin, 2009; 2010). Questa tecnica prende il nome di voltammetria ciclica.

LA VOLTAMMETRIA CICLICA

● La voltammetria ciclica è una tecnica elettroanalitica che misura la corrente che attraversa un elettrodo immerso in soluzione, quando allo stesso viene

Fig.1 - Esempio di voltammogramma ciclico di una soluzione modello [alcol 12 % v/v; pH 3.2] di (+)-catechina a 50 mg/L, acquisito in un intervallo di potenziale compreso fra 0 e 600 mV, utilizzando un elettrodo in grafite vetrosa.



applicata una scansione di potenziale "triangolare".

● La **Fig. 1** riporta, a titolo di esempio, il voltammogramma ciclico di una soluzione modello di (+)-catechina, registrato in un intervallo di potenziale compreso fra 0 (E_i) e 600 mV (E_f). Durante la misurazione, il potenziale iniziale (E_i) viene variato, ad una data velocità di scansione, fino al valore finale (E_f) e successivamente riportato al valore E_i (scansione triangolare). Inizialmente, si osserva una corrente di fondo denominata corrente capacitiva. Se, in soluzione sono presenti specie elettroattive, suscettibili cioè di dare reazioni di ossidazione o riduzione nell'intervallo di potenziale applicato, si osserverà un repentino aumento della corrente misurata, che risulterà proporzionale alla concentrazione della specie stessa.

● In **Fig. 1**, questo fenomeno, diventa evidente a partire da un potenziale prossimo ai 300 mV. Il tracciato superiore del voltammogramma (curva rossa di **Fig. 1**) prende il nome di tracciato anodico e il picco di corrente (corrente faradica) che viene misurato corrisponde, come vedremo, all'ossidazione a chinone del gruppo o-difenolico della nostra catechina. A questo punto, una volta raggiunto il valore E_f, il potenziale viene nuovamente riportato linearmente al valore iniziale (E_i). Il tracciato di ritorno (evidenziato in blu in **Fig. 1**), viene chiamato curva catodica ed il picco che viene registrato cor-

risponde alla riduzione a catechina del chinone generato durante la scansione anodica (reazione reversibile).

● La voltammetria ciclica, su sistemi reversibili, ci consente di ottenere informazioni quali-quantitative su un sistema redox. Ad esempio, l'intensità della corrente di picco anodica (I_{pa}) è proporzionale alla concentrazione della catechina; il rapporto fra questa e l'intensità del picco catodico (I_{pc} / I_{pa}) ci dà delle informazioni sulla reversibilità di un processo redox; infine, dai potenziali di picco anodico (E_a) e catodico (E_c), è possibile ottenere informazioni sul potenziale formale della coppia redox che stiamo considerando.

Utilizzo della voltammetria ciclica per lo studio di antiossidanti ad uso enologico

● Da quanto detto finora, risulta evidente che la voltammetria ciclica può essere utilizzata per lo studio del sistema vino. In particolare, nella nostra esperienza, questa tecnica elettroanalitica è stata impiegata per la valutazione delle performance di alcuni antiossidanti ad uso enologico, fra cui l'anidride solforosa (SO₂), l'acido ascorbico (ASC) e il glutathione (GSH).

● In **Fig. 2**, si riporta il voltammogramma ciclico di una soluzione di (+)-catechina a 50 mg/L, acquisito in un intervallo di potenziale da 0 a 1300 mV (curva nera).

Come accennato in precedenza, il primo picco che si osserva nel tracciato anodico corrisponde all'ossidazione dell'anello o-difenolico del flavanolo (anello B); il secondo picco, invece, si evidenzia in seguito all'ossidazione dei due -OH in posizione *meta* dell'anello A della molecola.

● Per semplicità, soffermeremo la nostra analisi sul primo dei due processi. La curva rossa, rappresenta il voltammogramma della medesima soluzione di catechina, preparata in presenza di una quantità equimolare di SO₂, corrispondente ad un'aggiunta di circa 10 mg/L dell'additivo. La presenza di solfiti in soluzione provoca un innalzamento della corrente relativa al primo processo anodico della catechina (e ne sposta il massimo a potenziali leggermente più alti). Questo fenomeno si verifica in virtù della capacità dei solfiti di reagire con i chinoni (**Fig. 3**), rigenerando specie fenoliche o producendo degli addotti solfonici (Danilewicz, 2007; Danilewicz *et al.*, 2008; Makotkina & Kilmartin, 2009).

● In questo modo, la catechina viene rigenerata e può venire riossidata in corrispondenza della superficie dell'elettrodo. Se andassimo ad aggiungere al nostro flavanolo, una quantità superiore di SO₂ (ad esempio 110 mg/L), l'aumento di intensità del picco anodico sarebbe superiore e proporzionale all'aggiunta stessa, a conferma della maggior capacità da parte di dosi più elevate dell'additivo, di "rigenerare" la catechina medesima.

● L'intensità del picco anodico diventa quindi un indicatore della capacità della specie antiossidante di rigenerare molecole fenoliche dai chinoni. È interessante osservare che, a concentrazioni prossime ai 10 mg/L, l'anidride solforosa, da sola (in assenza quindi di catechina), non dà pressoché segnali all'analisi voltammetrica; bisogna salire con le concentrazioni a valori più elevati, per distinguere il picco anodico dell'additivo, corrispondente alla sua ossidazione diretta a solfato; questo processo diventa evidente a potenziali più elevati, prossimi ai 1100 mV (Comuzzo *et al.*, 2017).

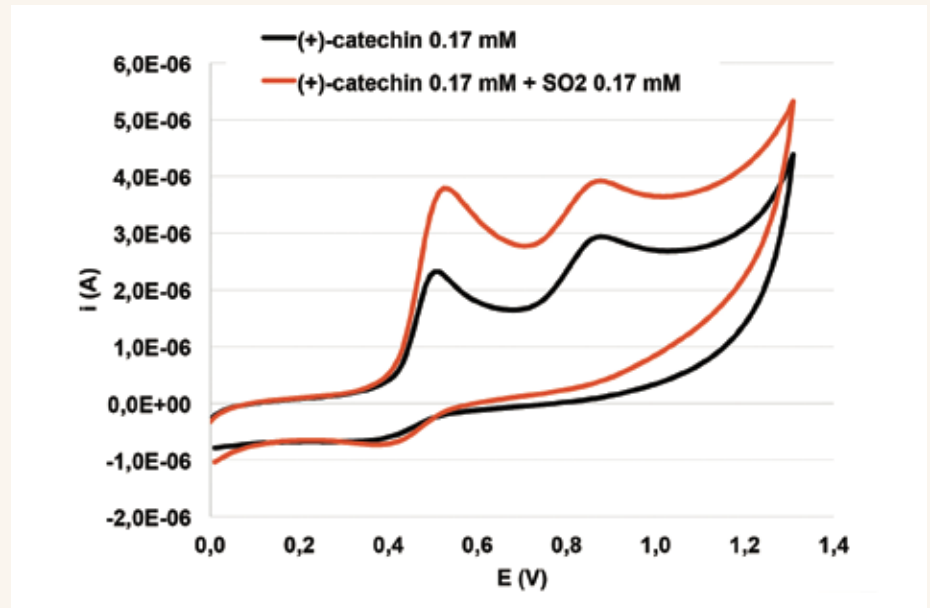
● Questo comportamento dell'SO₂ ci dà una conferma importante riguardo il suo meccanismo di azione, in linea con quanto evidenziato in letteratura (Danilewicz, 2007): in vino, l'ossidazione "diretta" dell'SO₂ a solfato è lenta e trascurabile; in presenza di specie fenoliche, infatti, l'azione prevalente dell'additivo

diventa la sua reazione con i chinoni a rigenerare specie fenoliche (aumento della curva anodica di Fig. 2). Questo spiega anche l'efficacia della solforosa nella riduzione delle cinetiche di imbrunimento dei vini bianchi.

- L'acido ascorbico presenta un meccanismo d'azione diverso rispetto a quello dei solfiti. Analizzando i tracciati voltammetrici di Fig. 4, infatti, la curva anodica dell'additivo puro (ASC 0.17 mM) presenta un picco ad un potenziale prossimo ai 300 mV. Questo picco corrisponde all'ossidazione dell'acido ascorbico a deidroascorbico ed aumenta all'aumentare della concentrazione dell'additivo stesso (ASC 1.70 mM). Il picco anodico dell'ASC, rimane visibile anche quando questo composto è aggiunto alla nostra soluzione di catechina (curva azzurra di Fig. 4) e precede, a potenziali più bassi, il primo processo anodico della catechina stessa. Questo ci dice che l'acido ascorbico, in presenza di polifenoli (es. in vino) si ossida prima di questi ultimi e questa azione determina la spiccata capacità di questo composto di agire come *oxygen scavenger* (Comuzzo *et al.*, 2015). In presenza di ASC, tuttavia, il primo processo anodico della catechina, non subisce alcun aumento di intensità, a differenza di quanto determinato da una quantità equimolare (0.17 mM) di SO₂ (si veda in proposito i tracciati di Fig. 2), e questo nonostante, anche per l'ascorbico, venga riportata la capacità di reagire con i chinoni, riducendoli a specie fenoliche (Bradshaw *et al.*, 2011).

- L'additivo sembra quindi essere meno attivo dei solfiti da questo punto di vista. La cosa interessante è che, all'aumento

Fig. 2 - Voltammogramma ciclico di una soluzione modello (alcol 12 % v/v; pH 3.2) di (+)-catechina a 50 mg/L (0.17 mM), acquisito in un intervallo di potenziale compreso fra 0 e 1300 mV (elettrodo in grafite vetrosa), in assenza (curva nera) ed in presenza di anidride solforosa (11 mg/L - 0.17 mM, curva rossa)



della sua concentrazione molare (catechina + ASC 1.70 mM - curva blu di Fig. 4), si osserva un processo anodico che, dalla forma, sembra essere dovuto alla sovrapposizione del processo di ossidazione diretta di ASC e del primo processo anodico della catechina, lasciando ipotizzare un'azione più evidente sulla riduzione dei chinoni, all'aumento della quantità aggiunta.

- L'acido ascorbico, dunque, potrebbe avere un'azione anti-imbrunimento più o meno pronunciata a seconda della quantità di ASC stesso che residua nel vino. Questa forte dipendenza delle performance dell'additivo dalla sua concentrazione è nota come effetto crossover

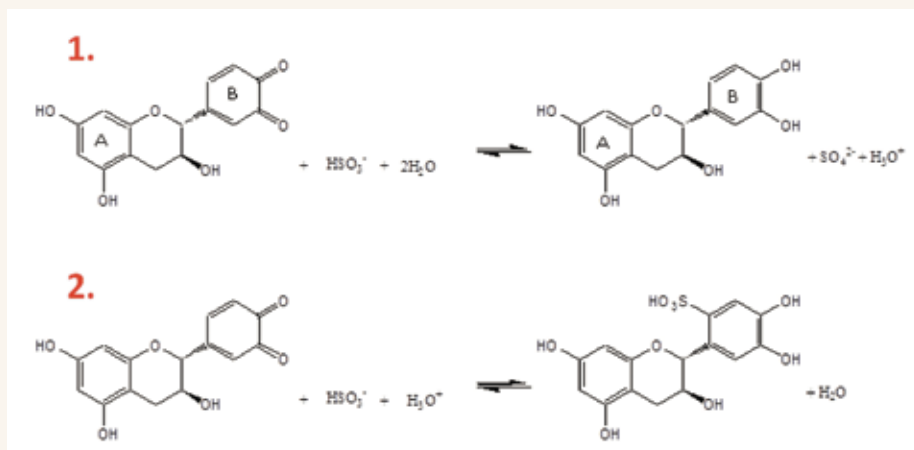
(Bradshaw *et al.*, 2001; 2003) e potrebbe spiegare alcuni fenomeni ben noti in enologia, come l'imbrunimento "da acido ascorbico" e la suscettibilità al *pink* dei vini bianchi prodotti in iper-riduzione.

- Dai dati presentati finora, è quindi chiaro come fra ASC e SO₂, quest'ultima risulti (a parità di concentrazione molare) l'additivo più performante dal punto di vista della capacità di ridurre i chinoni (azione anti-imbrunimento). Aggiungiamo ora un terzo attore alla nostra trattazione: il glutatone. Il glutatone è stato recentemente ammesso fra le pratiche enologiche autorizzate dall'OIV per il trattamento di mosti e vini, fino ad un limite massimo di 20 mg/L (Risoluzioni OIV-OENO 445-2015 e 446-2015 e Risoluzione OIV-OENO 571-2017).

- Come si osserva in Fig. 5, a parità di concentrazione molare, la capacità del GSH di innalzare il primo processo anodico della catechina (ovvero di rigenerare il flavanolo dal corrispondente chinone) è intermedia fra quella della solforosa (che rimane l'additivo più performante) e quella dell'acido ascorbico.

- Nella valutazione dell'efficacia di tali additivi, non basta però considerare solamente le caratteristiche intrinseche del singolo composto, ma anche le normali dosi di impiego dello stesso: in altre parole, le normali quantità in gioco in una solfitazione sono sicuramente

Fig. 3 - Schema della reazione fra solfiti e chinoni: 1. riduzione del chinone a specie fenolica; 2. formazione di un derivato solfonico (Danilewicz, 2007; Danilewicz *et al.*, 2008). In entrambi i casi si origina nuovamente un o-difenolo sull'anello B del flavanolo



superiori agli 11 mg/L di **Fig. 5**; il parziale rimpiazzo dell'additivo con GSH o ASC, ai fini di ottenere potenzialmente la stessa azione sull'evoluzione del colore, dovrà impiegare opportune quantità di tali sostanze "complementari". Anche le condizioni in cui i vini vengono stoccati hanno dimostrato importanti effetti sulla differenziazione dell'efficacia degli additivi testati.

- In un sistema chiuso (es. bottiglia) l'anidride solforosa rimane l'additivo più performante a distanza di un mese dall'aggiunta, mentre ASC e GSH, dopo tale intervallo di tempo hanno dimostrato perdere la propria capacità di reagire con i chinoni, provocando un maggior imbrunimento (Comuzzo *et al.*, 2017). In un sistema aperto, invece (es. bottiglia non chiusa, ma anche vasca non sigillata), nonostante la minor efficacia iniziale, il glutatione è apparso mantenere una certa capacità di proteggere il prodotto, in modo più duraturo rispetto ai solfiti; questo è dimostrato dal fatto che tale additivo, a distanza di quattro settimane, mantiene meglio dell'SO₂ la capacità di aumentare l'intensità del picco anodico della catechina, a riprova di una maggior capacità residua di reagire con i chinoni rispetto a quest'ultima (**Fig. 6**).
- Il GSH dunque potrebbe essere un ottimo complemento all'azione di SO₂ in vasca, prima cioè della messa in bottiglia, e ciò probabilmente in virtù della minor volatilità rispetto a quest'ultima in un sistema non perfettamente sigillato.

Utilizzo della voltammetria ciclica per lo studio di antiossidanti "non convenzionali"

- La voltammetria ciclica è stata utilizzata anche per valutare l'azione anti-imbrunimento di derivati di lievito commerciali, su una soluzione modello di catechina. Questi prodotti, sono stati recentemente studiati per le loro presunte potenzialità antiossidanti, con risultati che sono apparsi interessanti (Comuzzo *et al.*, 2015; 2017).
- Tali capacità sono state prevalentemente imputate alla capacità di rilasciare componenti solubili, quali GSH (Andújar-Ortiz *et al.*, 2010), altri composti solforati e peptidi contenenti metionina, triptofano e tirosina (Rodríguez-Bencomo *et al.*, 2014).

Fig. 4 - Voltammogramma ciclico (0-1300 mV, elettrodo in grafite vetrosa) di una soluzione modello [alcol 12 % v/v; pH 3.2] di (+)-catechina a 50 mg/L (0.17 mM, curva nera), e di acido ascorbico a diverse concentrazioni (30 e 300 mg/L - 0.17 e 1.70 mM, curve tratteggiate), da soli ed in miscela (curve azzurra e blu)

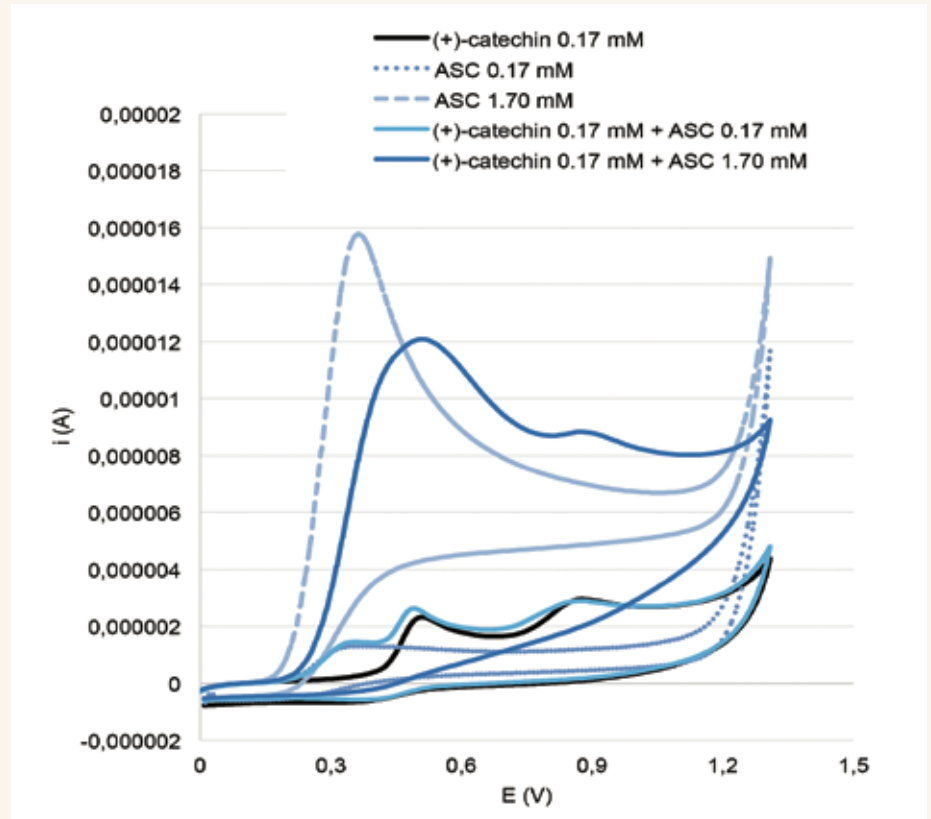
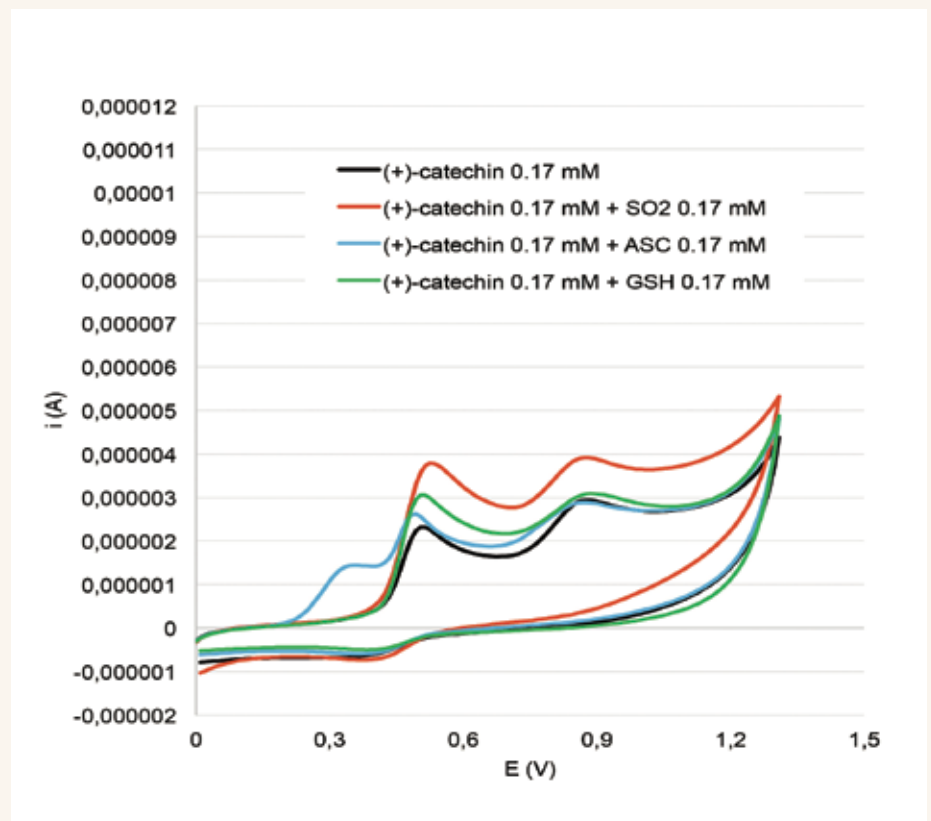


Fig. 5 - Voltammogramma ciclico (0-1300 mV, elettrodo in grafite vetrosa) di una soluzione modello [alcol 12 % v/v; pH 3.2] di (+)-catechina a 50 mg/L (0.17 mM, curva nera), pura ed in presenza di quantità equimolari di anidride solforosa (11 mg/L, curva rossa), acido ascorbico (30 mg/L, curve azzurra) e glutatione (52 mg/L, curva verde)



● Tuttavia, non si esclude un ruolo da parte della componente insolubile di questi prodotti, che dimostra avere un'importante azione anti-radicalica (Comuzzo *et al.*, 2015). Quello che è risultato osservabile mediante l'applicazione delle misure voltammetriche è che prodotti diversi dimostrano capacità protettive diverse nei confronti delle molecole fenoliche.

● Dei due autolisati di lievito riportati in Fig. 7, solo il derivato (a) sembra avere la capacità di agire sui chinoni, innalzando il picco anodico della catechina. Questa attività è risultata proporzionale alla con-

centrazione, nei preparati commerciali, di molecole tioliche, contraddistinte cioè da gruppi -SH, sia in forma solubile (es. GSH o altri peptidi ed amino acidi), che legate alla parete cellulare (residuo insolubile dell'autolisato).

CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

● Sulla base di queste esperienze, la voltammetria ciclica è risultata un interes-

sante strumento di indagine per la caratterizzazione dei principali antiossidanti ad uso enologico, in quanto consente di confrontare le performance dei singoli prodotti e di evidenziarne i comportamenti, in funzione delle concentrazioni molari e delle caratteristiche intrinseche. Si ritiene che questa tecnica analitica possa dare indicazioni tecnologiche utili anche applicata allo studio delle dinamiche di ossidazione dei vini.

BIBLIOGRAFIA

Fig. 6 - Voltammogrammi ciclici (0-600 mV, elettrodo in grafite vetrosa), acquisiti su soluzione appena preparata (a) e dopo 4 settimane in bottiglia aperta (b), di un vino modello (alcol 12 % v/v; pH 3.2) contenente (+)-catechina a 50 mg/L, pura (curva nera) ed addizionata di anidride solforosa (20 mg/L, curva rossa) e glutathione (50 mg/L, curva verde)

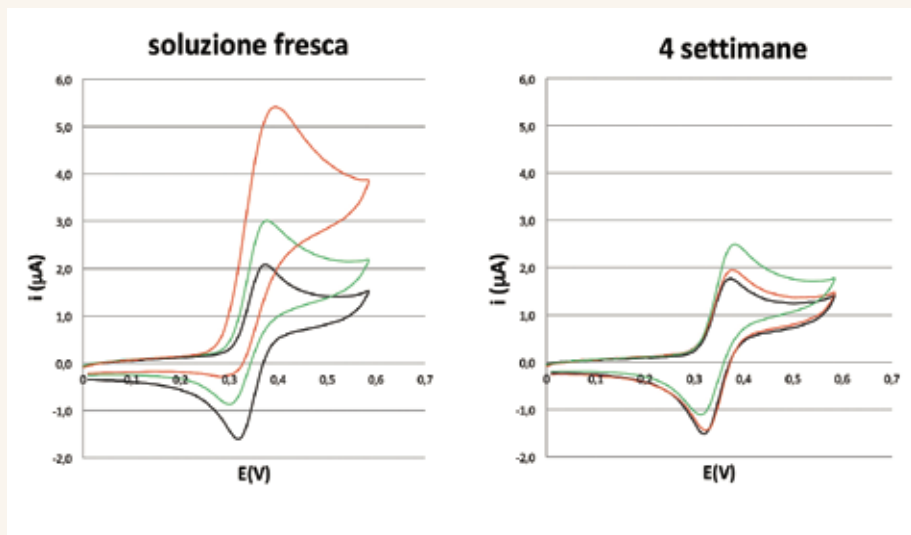
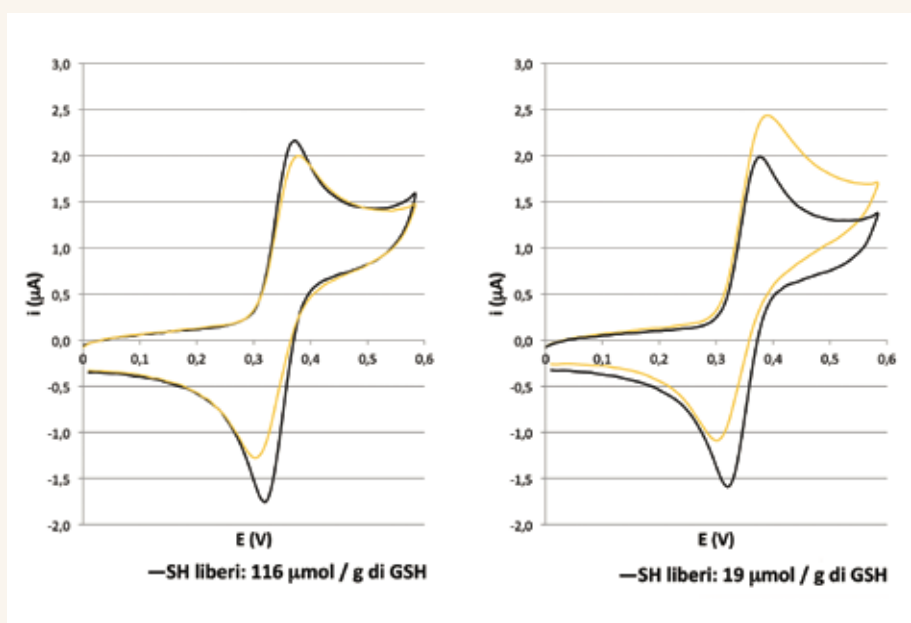


Fig. 7 - Voltammogrammi ciclici (0-600 mV, elettrodo in grafite vetrosa), acquisiti su soluzione modello (alcol 12 % v/v; pH 3.2) contenente (+)-catechina a 50 mg/L, pura (curva nera) ed addizionata di due diversi derivati di lievito, (a) e (b), entrambi aggiunti a 1 g/L (curve gialle)



● Andújar -Ortiz, I., Rodríguez-Bencomo, J.J., Moreno-Arribas, M.V., Martín-Álvarez, P.J., Pozo-Bayón, M.A., 2010. Role of glutathione enriched inactive yeast preparations on the aroma of wines. In Proceedings of 33rd World Congress of Vine and Wine - 8th General Assembly of the OIV (pp. 154-161). Tbilisi, Georgia, 20-25 Giugno 2010.

● Bradshaw, M.P., Prenzler, P.D., Scollary, G.R., 2001. Ascorbic acid-induced browning of (+)-catechin in a model wine system. *J. Agric. Food Chem.* 49, 934-939.

● Bradshaw, M.P., Cheynier, V., Scollary, G.R., Prenzler, P.D., 2003. Defining the ascorbic acid crossover from anti-oxidant to pro-oxidant in a model wine matrix containing (+)-catechin. *J. Agric. Food Chem.* 51, 4126-4132.

● Bradshaw, M.P., Barril, C., Clark, A.C., Prenzler, P.D., Scollary, G.R., 2011. Ascorbic acid: a review of its chemistry and reactivity in relation to a wine environment. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 479-498.

● Comuzzo, P., Battistutta, F., Vendrame, M., Páez, M.S., Luisi, G., Zironi, R., 2015. Antioxidant properties of different products and additives in white wine. *Food Chem.* 168, 107-114.

● Comuzzo, P., Toniolo, R., Battistutta, F., Lizee, M., Svigelj, R., Zironi, R., 2017. Oxidative behavior of (+)-catechin in the presence of inactive dry yeasts: A comparison with sulfur dioxide, ascorbic acid and glutathione. *J. Sci. Food Agric.* 97, 5158-5167.

● Danilewicz, J.C., 2007. Interaction of sulfur dioxide, polyphenols, and oxygen in a wine-model system: central role of iron and copper. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 53-60.

● Danilewicz, J.C., Seccombe, J.T., Whelan, J., 2008. Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *Am. J. Enol. Vitic.* 59, 128-136.

● Makhotkina, O., Kilmartin, P.A., 2009. Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *J. Electroanal. Chem.* 633, 165-174.

● Makhotkina, O., Kilmartin, P.A., 2010. The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide. *Anal. Chim. Acta* 668, 155-165.

● Rodríguez-Bencomo, J.J., Andújar-Ortiz, I., Moreno-Arribas, M.V., Simó C., González, J., Chana, A., Dávalos, J., Pozo-Bayon, M.A., 2014. Impact of glutathione-enriched inactive dry yeast preparations on the stability of terpenes during model wine aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 1373-1383.