

RELAZIONE TRA IL CONTENUTO FENOLICO, LA CAPACITÀ ANTIOSSIDANTE E LA VELOCITÀ DI CONSUMO DELL'OSSIGENO DI DIVERSE TIPOLOGIE DI TANNINO

Silvia Motta^a, Massimo Guaita^a, Claudio Cassino^b, Antonella Bosso^a

^a Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria - Centro di Ricerca Viticoltura ed Enologia, via P. Micca 35, 14100 Asti, Italy

^b Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica, Università degli Studi del Piemonte Orientale, Viale T. Michel 11, 15121 Alessandria, Italy

* Autore corrispondente: silvia.motta@crea.gov.it

Articolo estratto dalla presentazione di Silvia Motta in occasione della Enoforum Web Conference (23-25 febbraio 2021)

Introduzione

I tannini enologici possono essere suddivisi in due principali gruppi in base alla loro struttura chimica: tannini condensati e tannini idrolizzabili.

I tannini condensati sono oligomeri o polimeri dei flavan-3-oli, si differenziano tra di loro per la proporzione di unità monomeriche e per il grado di polimerizzazione. Sono chiamati anche proantocianidine perché, in ambiente acido e a caldo (reazione di Bate-Smith), liberano carbocationi fortemente instabili che si trasformano in pigmenti rossi (Celzard et al., 2015).

I tannini idrolizzabili includono i gallotannini (esteri glucosidici dell'acido gallico) e gli ellagitannini (esteri glucosidici dell'acido ellagico o esaidrossidifenico) (Versari, du Toit, & Parpinello, 2013).

In seguito a esterificazione o a crosslinking ossidativo dei gruppi ossidrilici si possono poi trovare forme più complesse (Hagerman, 2002).

I tannini enologici sono estratti da diverse parti della pianta (fusto, foglie, frutti, galle) e da diverse specie botaniche, tra cui: quercia, castagno, quebracho, tara, uva.

La composizione chimica dei tannini commerciali, e conseguentemente le loro proprietà chimiche e tecnologiche, sono fortemente influenzate dall'origine botanica, dalla parte della pianta utilizzata (Vivas, Vivas De Gaulejac, & Nonier, 2002) e dalla tecnica di estrazione (Bosso, Guaita, & Petrozziello, 2016).

Diverse sono le proprietà attribuite all'ampia gamma di tannini commerciali, recentemente è stato rivolto grande interesse all'attività antiossidante, qualità interessante, specialmente nell'ottica di produrre vini a ridotto contenuto di anidride solforosa.

Tuttavia, nonostante il grande interesse dimostrato dagli enologi riguardo a tale aspetto e le molte ricerche condotte, rimangono ancora degli aspetti da chiarire riguardo proprio all'azione benefica dei tannini utilizzati come antiossidanti.

L'assenza di un'informazione univoca deriva sia dalla variabilità dei tannini enologici presenti in commercio che dalla difficoltà nel testare la capacità antiossidante, dovuta all'assenza di un metodo standard, alla complessità del processo ossidativo e alla variabilità della matrice vino.

L'attività antiossidante è infatti dovuta a diverse proprietà: capacità di catturare i radicali superossido (Farhadi, Esmailzadeh, Hatami, Forough, & Molaie, 2016), capacità di consumare l'ossigeno disciolto (Pascual et al., 2017; Vignault et al., 2018), capacità riducente nei confronti del Fe(III), ed effetto chelante nei confronti del Fe(II) con la conseguente prevenzione dell'evoluzione ossidativa basata sulla reazione di Fenton (Perez, Wei, & Guo, 2009).

Quindi, dal momento che i diversi test antiossidanti disponibili si basano su diversi meccanismi relativi al processo ossidativo, spesso forniscono risultati diversi e qualche volta contraddittori tra loro (Magalhaes et al., 2014).

Per questo motivo, al fine di avere una completa e corretta caratterizzazione, è fondamentale utilizzare diversi test chimici basati su diversi meccanismi dell'azione antiossidante (Magalhaes et al., 2014), e supportare questi test con la misura del consumo dell'ossigeno (Pascual et al., 2017).

Scopo del lavoro

In questo lavoro sono stati confrontati sette tannini di diversa origine botanica, analizzando, tramite tecniche diverse, il loro contenuto polifenolico e la loro capacità antiossidante.

Lo scopo era studiare le correlazioni tra i diversi parametri studiati ed individuare i parametri maggiormente correlati con la cinetica di consumo dell'ossigeno.

Materiali e metodi

lo studio è stato condotto sui seguenti sette tannini:

- E1A: ellagitannino da rovere americana non tostata;
- E2F: ellagitannino da rovere francese non tostata;
- GT: tannino gallico da tara;
- Lb: tannino da legno di mimosa (non enologico);
- C1Sd: tannino condensato da semi d'uva;
- C2Sk: tannino condensato da bucce d'uva;
- C3Sd: tannino condensato ottenuto nel nostro laboratorio al CREA-VE di Asti da semi di uva Grignolino.

Il contenuto in polifenoli e tannini è stato determinato utilizzando metodi spettrofotometrici per polifenoli totali con il Folin Ciocalteu (GAE%), indice di polifenoli totali (TPI%), indice di proantocianidine totali (PC%) (Di Stefano et al., 1989); HPLC (floroglucinolisi) per misurare il contenuto in tannini condensati (CT%) il loro grado di polimerizzazione medio (mDP), e la percentuale di unità monomeriche (Guaita et al., 2017), e infine tramite analisi gravimetrica (OIV method%) in accordo con la risoluzione OIV 574-217.

La capacità antiossidante è stata determinata in termini di capacità di catturare i radicali liberi (DPPH%) (Carmona Jimenez et al., 2014), potere riducente nei confronti del ferro ferrico (FRAP) (Benzie and Strain, 1999), proprietà redox con la voltammetria a scansione lineare (LSV_{1200mV}, LSV_{600mV} and R600%) (Kilmartin et al., 2001; Sanchez-Arribaz et al., 2012). Questa tecnica elettrochimica applica al campione una rampa di potenziale crescente che provoca la progressiva ossidazione dei composti in funzione del loro potenziale d'ossidazione. Si misura la corrente che circola nel sistema dovuta all'ossidazione in questo caso dei polifenoli.

Dal momento che le proprietà antiossidanti dei polifenoli sono legate alla loro abilità di donare elettroni, integrando l'area sottesa dal voltammogramma, che si ottiene registrando l'intensità di corrente generata dalle ossidazioni in funzione della differenza di potenziale applicata, si può avere sia un'informazione sul contenuto in polifenoli totali (area da 0 a 1200 mV) che sul contenuto in polifenoli facilmente ossidabili (area da 0 a 600 mV), cioè quelli che contengono gruppi galloile e/o catecolo (Sanchez Arribas et al., 2012).

Per il test di consumo dell'ossigeno, è stata utilizzata una soluzione modello simil-vino (12% v/v EtOH; pH 3,5) contenente i metalli di transizione (5 mg/L Fe²⁺, 0,15 mg/L Cu²⁺) al fine di simulare al meglio il processo di ossidazione che realmente avviene nel vino.

Dopo aver ossigenato la soluzione modello fino alla saturazione, si sono aggiunti i sette tannini a tre diverse concentrazioni (250, 500, 1000 mg/L). All'imbottigliamento sono stati aggiunti 40 mg/L di SO₂. È stata preparata anche una tesi senza tannini (Control). Le bottiglie sono state quindi chiuse

con tappo a corona e conservate a 20°C. L'ossigeno è stato misurato nel tempo utilizzando una tecnologia non invasiva basata sulla luminescenza (NomaSense™ O2 Trace - PreSens GmbH, Regensburg, Germany).

L'aggiunta di SO₂ alla soluzione modello è stata dettata dalla necessità di accelerare la velocità di consumo dell'ossigeno e quindi di accorciare la durata del test. La SO₂ reagisce infatti con le forme ossidate dei polifenoli (i chinoni) riducendoli alla corrispondente forma fenolica, con la conseguente accelerazione della velocità di consumo dell'ossigeno (Danilewicz et al., 2008).

Risultati

In figura 1 sono riportate le cinetiche di consumo dell'ossigeno del Control e dei sette tannini alle tre diverse concentrazioni nel corso di tre settimane, il tempo impiegato dal tannino più rapido nel ridurre l'ossigeno a consumare tutto l'ossigeno disciolto.

Il tannino E2F si distingue da tutti gli altri per la più rapida velocità di consumo dell'ossigeno, mentre la velocità minore, tra i tannini enologici, si è osservata per il gallotannino, in accordo con la letteratura (Pascual et al. 2017).

Tre settimane dopo l'imbottigliamento, E2F è stata l'unica prova con un contenuto di ossigeno disciolto inferiore a 1 mg/L, sia per la dose media (0.50 g/L) che per la dose alta (1 g/L); nelle tesi con la dose maggiore il contenuto di ossigeno disciolto era prossimo a zero, mentre per la dose minore (0.25 g/L) il contenuto di ossigeno era di 1.2 mg/L. Nella prova con il gallotannino (GT), tre settimane dopo l'imbottigliamento l'ossigeno disciolto era rispettivamente di 1.8 mg/L per la dose maggiore, 2.5 mg/L per la dose media e di 3.0 mg/L per la dose minore. Per quanto riguarda i tannini con un comportamento intermedio, C1Sd e C2Sk sono stati più rapidi nel consumare l'ossigeno rispetto agli altri due, con un comportamento simile tra di loro, sovrapponibile a E2F alla dose di 1 g/L.

L'andamento del consumo dell'ossigeno in tutte le prove (Control e tutti i tannini studiati a tutte e tre le dosi) è descritto nell'arco dei 21 giorni di durata del test da un'equazione quadratica, e, solo per i primi 5 giorni, da un'equazione lineare. Sono stati quindi calcolati 3 indici per determinare il consumo dell'ossigeno per ciascuna dose: OCR₂₁ per i 21 giorni, OCR₅ per i primi 5 giorni e OCR_d come indice di velocità di consumo dell'ossigeno media giornaliera.

In generale, la velocità del consumo dell'ossigeno aumenta al crescere della dose di tannino, in accordo con quanto riportato in letteratura (Danilewicz et al., 2008). In particolare, l'influenza della dose di tannino sulla velocità di consumo dell'ossigeno, varia con l'origine botanica del tannino: si sono osservate interazioni significative tra la tipologia e la dose di tannino. Più precisamente: un incremento simile nella velocità di consumo dell'ossigeno si è osservato per tutti i tannini passando dalla dose di 0.25 a 0.5 g/L, al contrario, un piccolo incremento si è osservato passando da 0.50 g/L to 1 g/L, solo per alcuni tannini, mentre nessun aumento si è osservato per i due tannini ellagici E2F and E1A (Fig. 2).

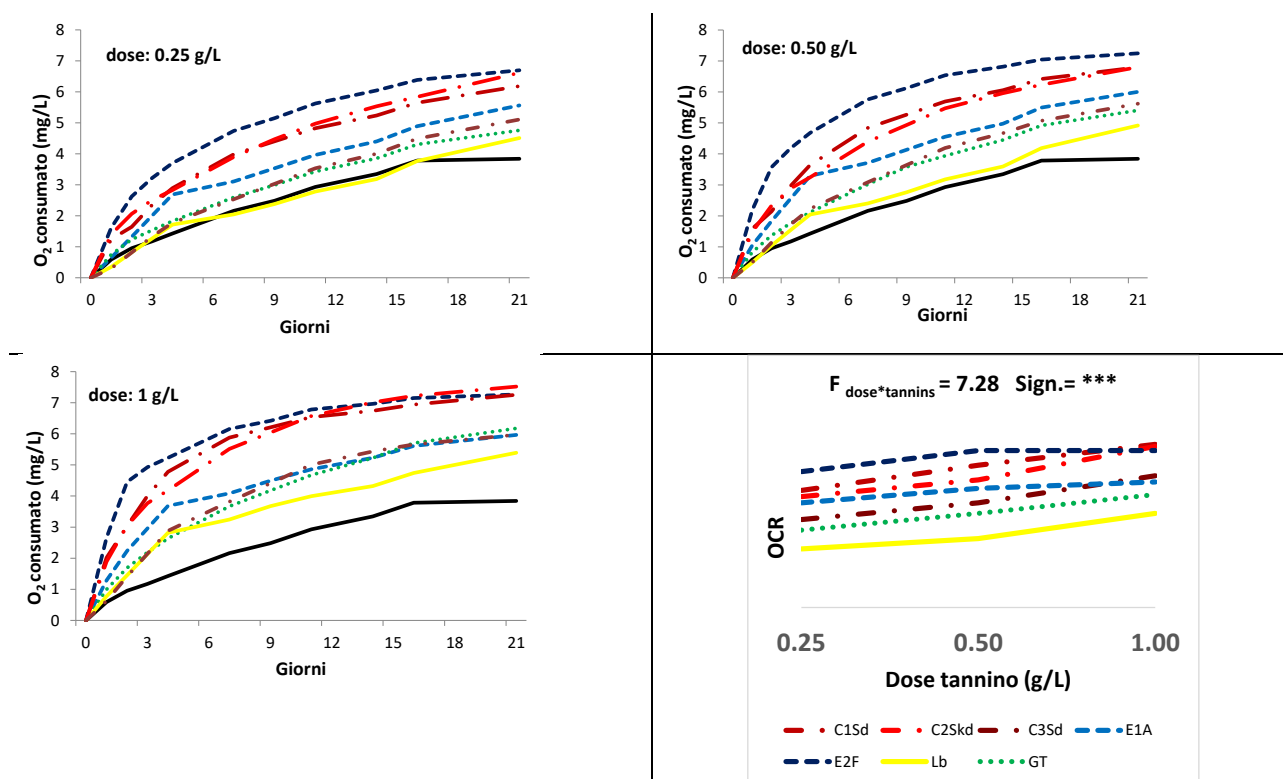


Figura 1: Andamento del consumo dell'ossigeno del Control e dei tannini alle tre dosi in una soluzione modello ossigenata alla saturazione e interazioni tra tipologia e dose di tannino sulla velocità di consumo dell'ossigeno.

In tabella 1 è riportata la correlazione tra tutti gli indici calcolati per esprimere la velocità di consumo dell'ossigeno nel corso dei 21 e dei 5 giorni (Tabella 1a), e la correlazione tra tutti i parametri studiati per determinare il contenuto in polifenoli e tannini, l'attività antiossidante e la velocità di consumo dell'ossigeno (Tabella 1b).

Tutti gli indici usati per esprimere la velocità di consumo dell'ossigeno, calcolati per ciascuna dose, sono altamente correlati tra loro: l'andamento osservato nei primi 5 giorni rivela cosa accadrà nel più lungo periodo di 21 giorni. Questo risultato suggerisce la possibilità di accorciare il test di consumo dell'ossigeno a 5 giorni.

Esaminando tutti i parametri studiati, si sono osservate significative correlazioni tra il contenuto polifenolico (GAE%, TPI% and OIV method%) e il potere antiradicalico (DPPH%), tra la velocità di consumo dell'ossigeno (OCRd_0.25, OCRd_0.5, OCRd_1) e le proprietà redox (LSV_{1200mV}), tra la capacità riducente nei confronti del ferro ferrico (FRAP) e le proprietà redox. Inoltre, buone correlazioni si sono osservate tra i risultati del FRAP e la velocità di consumo dell'ossigeno, probabilmente per il fatto che entrambi i test si basano sul processo di ossidazione dei polifenoli ad opera del Fe(III).

	OCRd_0.25	OCR21_0.25	OCR5_0.25	OCRd_0.5	OCR21_0.5	OCR5_0.5	OCRd_1	OCR21_1	OCR5_1	
OCRd_0.25	1									
OCR21_0.25	0.96 **	1								
OCR5_0.25	0.91 **	0.93 **	1							
OCRd_0.5	0.98 **	0.99 **	0.92 **	1						
OCR21_0.5	0.94 **	1.00 **	0.91 **	0.98 **	1					
OCR5_0.5	0.89 **	0.94 **	1.0 **	0.92 **	0.92 **	1				
OCRd_1	0.93 **	0.9 **	0.76 *	0.93 **	0.89 **	0.74	1			
OCR21_1	0.92 **	0.91 **	0.74	0.94 **	0.93 **	0.74	0.94 **	1		
OCR5_1	0.93 **	0.95 **	0.95 **	0.95 **	0.94 **	0.96 **	0.84 *	0.85 *	1	
	GAE %	TPI %	OIV method %	DPPH%	FRAP	LSV_{1200mV}	LSV_{600 mV}	OCRd_0.25	OCRd_0.5	OCRd_1
GAE %	1									
TPI %	0.88 ** ⁽¹⁾	1								
OIV method%	0.95 **	0.8 *	1							
DPPH%	0.89 **	0.921 **	0.9 **	1						
FRAP	0.7	0.33	0.78 *	0.44	1					
LSV_{1200mV}	0.44	0.24	0.63	0.33	0.78 *	1				
LSV_{600 mV}	0.38	-0.01	0.44	0.26	0.55	0.2	1			
OCRd_0.25	0.30	0.21	0.49	0.29	0.6	0.84 *	0.01	1		
OCRd_0.5	0.41	0.28	0.55	0.33	0.67	0.81 *	0.04	0.98 **	1	
OCRd_1	0.56	0.50	0.73	0.61	0.63	0.78 *	0.13	0.93 **	0.93 **	1

Tabella 1: indice di correlazione di Pearson tra le variabili che descrivono la cinetica di consumo dell'ossigeno, la composizione polifenolica e l'attività antiossidante dei tannini.

(1)*, ** rappresenta la significatività rispettivamente alla $p \leq 0.05$ e 0.01

L'analisi fattoriale calcolata con GAE%, TPI%, OIV method, PC%, CT%, DPPH%, FRAP, LSV_{600mV}, LSV_{1200mV}, R600%, OCR21_0.25 e OCRd_0.25 ha identificato tre cause di variabilità tra i tannini (3 Fattori) e i parametri analitici che li descrivono. La figura 2 mostra i loadings e gli scores nello spazio descritto dal primo e dal secondo fattore e dal primo e terzo fattore. Il primo fattore esprime il 34.02% della variabilità totale dei dati ed è associato alla ricchezza in polifenoli (OIV method, GAE%, TPI%) e alla capacità antiradicalica (DPPH%). Il secondo fattore esprime il 27.4% della variabilità di tutti i dati, è associato alla tipologia di tannino e distingue i tannini condensati dagli idrolizzabili. Il secondo fattore è positivamente correlato con il contenuto in tannini condensati (PC% e CT%), mentre è negativamente correlato con i risultati della voltammetria a scansione lineare che esprimono il contenuto in molecole facilmente ossidabili (LSV_{600mV} e R600%), più abbondanti nei tannini idrolizzabili. Il terzo fattore esprime il 30% della variabilità totale dei dati ed è associato alla cinetica di consumo dell'ossigeno. Il terzo fattore è positivamente correlato con gli indici che esprimono la cinetica di consumo dell'ossigeno (OCRd_0.25 and b_0.25), la LSV_{1200mV} e il FRAP. La velocità di consumo dell'ossigeno è quindi associata con la capacità dei polifenoli di ridurre il Fe(III) a Fe(II) (indice FRAP) e al contenuto totale di molecole elettroattive (LSV_{1200mV}).

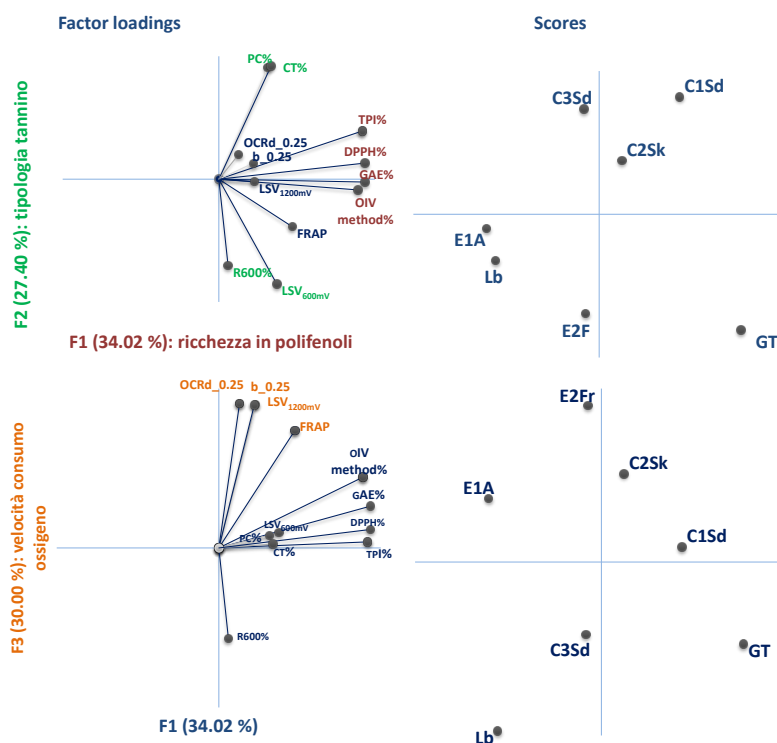


Figura 2: rappresentazione dei loadings (variabili) e degli scores (tannini) nello spazio definite rispettivamente dal primo (F1) e secondo (F2) fattore e dal primo (F1) e terzo (F3) fattore.

Conclusioni e prospettive future

In generale, questi dati confermano che test antiossidanti diversi producono risultati diversi (Magalhaes et al., 2014), non sempre correlati con la velocità di consumo dell'ossigeno (Pascual et al., 2017). In accordo con la letteratura (Magalhaes et al., 2014; Ricci et al., 2016), si è osservata una correlazione significativa tra il contenuto in polifenoli (GAE%, TPI%, OIV method %) e la capacità antiossidante determinata dal test DPPH, probabilmente dovuta al fatto che tutti e quattro i test misurano il numero totale di gruppi fenolici presenti nel campione, piuttosto che la loro reattività. Il parametro maggiormente correlato con la velocità di consumo dell'ossigeno è risultato essere LSV_{1200mV} , proposto da Kilmartin et al. (2001) per determinare il contenuto di polifenoli totali ossidabili presenti nel vino. Questa evidenza suggerisce la possibilità di utilizzare questo indice come test rapido per misurare la capacità di consumo dell'ossigeno. Contrariamente, non si sono osservate correlazioni significative tra l'OCR e l'indice di contenuto in polifenoli totali determinato con il metodo del Folin-Ciocalteu (GAE%), probabilmente perché la velocità di consumo dell'ossigeno è influenzata dal contenuto in polifenoli suscettibili all'ossidazione, mentre il GAE% non è specifico per questi composti, dal momento che ossida, quindi quantifica, anche i gruppi fenolici che non sono ossidabili all'aria (Danilewicz, 2015).

Si possono infine ottenere alcune informazioni riguardo alle proprietà antiossidanti dei tannini oggetto di questo studio: gli ellagitannini (tannini di rovere) sono eccellenti consumatori di ossigeno con un'elevata capacità riducente nei confronti del ferro ferrico, i gallotannini (estratti da tara) hanno una scarsa capacità di consumare ossigeno ma elevato potere antiradicalico e buona capacità riducente nei confronti del ferro ferrico, i tannini condensati (da uva) sono buoni consumatori di ossigeno con elevato potere antiradicalico.

La prospettiva futura è quella di estendere questo studio ad un più ampio numero di tannini e di studiarne contemporaneamente la capacità antiossidante nel vino.

Bibliografia

- Benzie, J. F., & Strain, J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in Enzymology*, 299, 15–27.
- Bosso, A., Guaita, M., & Petrozziello, M. (2016). Influence of solvents on the composition of condensed tannins in grape pomace seed extracts. *Food Chemistry*, 207, 162–169.
- Carmona-Jimenez, Y., Garcia-Moreno, M. V., Igartuburu, J. M., & Garcia Barroso, C. (2014). Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by-products. *Food Chemistry*, 165, 198–204.
- Celzard, A., Szczurek, A., Jana, P., Fierro, V., Basso, M. C., Bourbigot, S., Pizzi, A. (2015). Latest progresses in the preparation of tannin-based cellular solids. *Journal of Cellular Plastics*, 51, 89–102.
- Danilewicz, J. C. (2015). Folin-Ciocalteu, FRAP, and DPPH. assays for measuring polyphenol concentration in white wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66:4, 463–471.
- Danilewicz, J. C., Secombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen, and sulfur dioxide in model wine and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59: 2, 128–136.
- Di Stefano, R., Cravero, M. C., & Gentilini, N. (1989). Metodi per lo studio dei polifenoli nei vini. *Enotecnico*, 25, 83–89.
- Farhadi, K., Esmailzadeh, F., Hatami, M., Forough, M., & Molaie, R. (2016). Determination of phenolic compounds content and antioxidant activity in skin, pulp, seed, cane and leaf of five native grape cultivars in West Azerbaijan province Iran. *Food Chemistry*, 199, 847–855.
- Guaita, M., Petrozziello, M., Panero, L., Tsolakis, Christos, Motta, S., & Bosso, A. (2017) Influence of early seeds removal on the physicochemical, polyphenolic, aromatic and sensory characteristics of red wines from Gaglioppo cv. *European Food Research and Technology*, 243, 1311–1322. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2842-1>
- Hagerman. (2002). The tannin hand book. Available from <http://chemistry.muohio.edu/Hagerman>.
- Kilmartin, P. A., Zou, H., & Waterhouse, A. L. (2001). A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1957–1965.
- Magalhaes, L. M., Ramos, I. I., Reis, S., & Segundo, M. A. (2014). Antioxidant profile of commercial oenological tannins determined by multiple chemical assays. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20, 72–79.
- OIV, International Oenological Codex – Oenological tannins - E-COEI-1-TANINS. (2019) Annex 3 method for the estimation of total polyphenols content. Available from <http://www.oiv.int/public/medias/6550/codex-2019-en.pdf>.
- Pascual, O., Vignault, A., Gombau, J., Navarro, M., Gomez-Alonso, S., Garcia-Romero, E., Zamora, F. (2017). Oxygen consumption rates by different oenological tannins in a model wine solution. *Food Chemistry*, 234, 26–32.
- Perez, C. A., Wei, Y. B., & Guo, M. L. (2009). Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 326–332.
- Sanchez Arribas, A., Martinez_Fernandez, M., & Chicharro, M. (2012). The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine. *Trends in Analytical Chemistry*, 34, 78–96.
- Versari, A., du Toit, W., & Parpinello, G. P. (2013). Oenological tannins: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19, 1–10.

Vignault, A., Gonzalez-Centeno, M. R., Pascual, O., Gombauc, J., Jourdesa, M., Moined, V., Teissedre, P. L. (2018). Chemical characterization, antioxidant properties and oxygen consumption rate of 36 commercial oenological tannins in a model wine solution. *Food Chemistry*, 268, 210–219.

Vivas, N., Vivas De Gaulejac, N., & Nonier, M. F. (2002). Mise au point sur les tanins enologiques et bases d'une nouvelle definition qualitative. Setting up enological tannins and bases for a new qualitative definition. *Bulletin de, l'OIV*, 853–854, 175–185.

Questa ricerca è stata condotta grazie a una Borsa di Studio OIV, finanziata dall'Organizzazione Internazionale della Vigna e del Vino nel 2017