

EVOLUZIONE OSSIDATIVA DI UNA SOLUZIONE MODELLO IN FUNZIONE DI ALCUNI COADIUVANTI TECNOLOGICI

Giuseppe ARFELLI, Andrea PIVA, Gloria DIMITRI e Stefano BALDINI

Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Università degli Studi di Teramo

Lavoro presentato alla 8ª edizione di Enoforum, Arezzo, 7-9 maggio 2013

INTRODUZIONE

La crescente attenzione da parte del consumatore di alimenti dotati di caratteristiche naturali, di elevata qualità nutrizionale, stabili microbiologicamente e minimamente manipolati, ha spinto le aziende produttrici ad adottare nuove tecniche di trasformazione in alternativa a quelle tradizionali.

L'anidride solforosa è impiegata dalla fine del diciottesimo secolo e è attualmente utilizzata dall'industria alimentare per la produzione di varie tipologie di alimenti, specialmente per quelli a basso valore di pH, quali succhi di frutta e bevande fermentate.

L'anidride solforosa è considerata l'additivo per eccellenza in campo enologico, per la sua efficacia e per la sua funzione versatile che esplica nella matrice vino.

Tale composto, infatti, ostacola lo sviluppo di batteri lattici e lieviti indesiderati e, in misura minore, dei batteri acetici. La sua azione previene le alterazioni da parte di lieviti, fermentazioni secondarie non volute, lo sviluppo di *Brettanomyces* e deterioramenti da parte dei batteri. Oltre alla proprietà antisettica, di non secondaria importanza, ricordiamo il suo importante ruolo svolto nel vino in qualità di antiossidante.

L'anidride solforosa ha però anche aspetti negativi quali reazioni allergiche a carico di alcuni consumatori. Soggetti sensibili all'anidride solforosa sono sottoposti a sintomi che si delineano in seguito a ingestione della stessa per quantità anche basse (20-50 mg). Per questo motivo è obbligatorio indicare la sua presenza al di sopra dei 10 mg/L, mediante la dicitura in etichetta: "Contiene solfiti".

Per questo motivo sono già da anni in atto in tutto il mondo sperimentazioni per l'elaborazione di vini in assenza dell'additivo sopra menzionato. Per tale motivo è sempre più crescente il numero di aziende vitivinicole che hanno sposato la volontà di diminuire o eliminare del tutto il contenuto di anidride solforosa.

In questo lavoro, sono state considerate metodiche analitiche rapide per la determinazione di coadiuvanti alternativi o sostitutivi all'anidride solforosa. Tali ausiliari tecnologici sono utilizzati per rendere più stabile nel tempo il prodotto e preservarlo da possibili decadimenti qualitativi in termini di ossidazione delle catechine.

I coadiuvanti tecnologici utilizzati sono rappresentati dall'acido ascorbico, il tannino di galla e il metabisolfito di potassio.

Questa sperimentazione rappresenta, dunque, un punto di inizio per lo sviluppo di metodologie analitiche caratterizzate da rapidità e facilità di esecuzione, nonché economicità dei costi di realizzazione. Inoltre, funzionale potrebbe essere la loro trasferibilità presso gli stabilimenti produttivi, con vantaggi importanti per le aziende del settore.

MATERIALI E METODI

La sperimentazione è stata condotta su soluzioni modello aggiunte di diverse concentrazioni di acido ascorbico, tannino di galla e metabisolfito di potassio. I campioni sono stati analizzati attraverso misure spettrofotometriche per la determinazione di acido ascorbico e catechine.

Tale approccio sperimentale è stato utilizzato al fine di poter applicare metodi rapidi di analisi e, nello specifico, per la determinazione di acido ascorbico proporre tale metodo come valida alternativa a tecniche analitiche molto costose e lente. Inoltre, valutare la possibilità di vinificazione in assenza, o con dosi molto limitate, di anidride solforosa, sfruttando l'azione sinergica dei tre coadiuvanti in concentrazioni diverse.

Piano Sperimentale

La costruzione del piano sperimentale è stata effettuata utilizzando STATISTICA8 per Windows (StatSoftTM, Tulsa, OK), attraverso un experimental design, central composit, a 3 variabili e tre livelli. L'applicazione della statistica, nell'impostazione di un piano sperimentale, permette di massimizzare l'informazione voluta, con un minimo di campioni da analizzare, risparmiando tempo e denaro.

Questi aspetti organizzativi potrebbero essere messi a punto anche da aziende del settore, le quali potrebbero sviluppare *ex novo*, ovvero potenziare, il proprio settore di ricerca e sviluppo. Tale fattore rappresenterebbe una potenziale innovazione dell'organizzazione aziendale, comportandone un valore aggiunto per la stessa azienda e un risparmio in termini economici nel medio-lungo periodo.

Tabella 1: Piano sperimentale.

Campioni sperimentali	Ac. Ascorbico	Tannini di galla	SO ₂
	mg/L	mg/L	mg/L
C1	0	0	0
C2	0	200	50
C3	100	200	0
C4	100	0	100
C5	200	200	100
C6	200	100	0
C7	0	100	100
C8	200	0	50
C9	100	100	50
C10	100	100	50
C11	100	100	50

La Soluzione Modello

La soluzione modello è stata ottenuta aggiungendo ad una soluzione idroalcolica (12% v/v di etanolo) 5 g/L di acido tartarico, 5 mg/L di (+)catechina e saturando con tartrato acido di potassio. La soluzione così ottenuta è stata aggiunta di piccole concentrazioni di idrossido di sodio concentrato per portare il pH a 3.2.

Preparazione campioni sperimentali

La soluzione modello, è stata trasferita all'interno di provette in pyrex con tappo a vite da 20 mL, aggiunte di diversi volume di soluzioni concentrate di:

- acido ascorbico;
- tannino di galla;
- metabisolfito di potassio.

L'utilizzo del metabisolfito, come coadiuvante tecnologico, equivale poi alla metà di anidride solforosa aggiunta (1 g di metabisolfito di potassio equivale a circa 0,5 g di anidride solforosa).

Il volume finale ottenuto in provetta è stato pari a 10 mL, con una concentrazione di tutti i coadiuvanti di 50 (per la sola anidride solforosa), 100 e/o 200 mg/L.

Piano di campionamento

Tutti i campioni contenenti i coadiuvanti tecnologici sono stati posti in termostato a 40 e 50 °C per 15 giorni, per un totale di n.6 campionamenti, rispettivamente a 0, 2, 4, 7, 10 e 14 giorni.

In accordo con il piano sperimentale su base statistica e con il piano di campionamento, sono stati preparati n. 6 provette (1 per ogni prelievo) per ognuno degli 11 campioni, per un totale di 66 campioni analizzati.

Durante il singolo campionamento, infatti, è stata prelevata una delle repliche al fine di assicurare le medesime condizioni analitiche, in termini di spazio di testa e superficie libera esposta all'ossigeno ivi contenuto.

Metodo per la determinazione dell'acido ascorbico

La determinazione dell'acido ascorbico è stata effettuata secondo la metodica precedentemente illustrata da Dimitri *et al.*, 2013

Metodo per la determinazione dello stato ossidativo delle catechine

La misura analitica è stata effettuata utilizzando uno spettrofotometro 20 LambdaBio (Perkin Elmer, Massachusetts, USA) a doppio raggio. Sono state impostate 2 diverse lunghezze d'onda pari a 420 e 440 nm, affinché si potesse valutare il massimo di assorbanza di composti bruni, conseguenti all'ossidazione delle catechine presenti, che hanno un massimo di assorbanza nel range delle lunghezze d'onda sopra indicate.

Le cuvette utilizzate sono state del tipo standard in vetro, con un percorso ottico di 1 cm. L'azzeramento strumentale è stato effettuato utilizzando la soluzione modello senza catechine e sottraendo, durante la misura, l'assorbimento della soluzione modello a quello del singolo campione.

Sono state inoltre preparate soluzioni a concentrazione nota di (+)catechina per la costruzione della retta di calibrazione. Al fine di ottimizzare il metodo analitico scelto, sono state anche ottenute 2 differenti curve di calibrazione della (+) catechina, rispettivamente ad alte e basse concentrazioni dello standard.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Acido ascorbico

I campioni analizzati mostrano un'evidente diminuzione, sin dai primi giorni 4 giorni di conservazione, alle due temperature studiate (40 e 50 °C), come conseguenza di una quasi completa degradazione dell'acido ascorbico, come riportato da Dimitri *et al.* (2013).

Catechine

Le determinazioni analitiche dei campioni sperimentali sono state effettuate attraverso le letture spettrofotometriche a 420 e 440 nm, in quanto alcuni Autori riportano la misura dell'imbrunimento tra 400 e 440 nm (Bradshaw M. P. *et al.*, 2001; Peng G. Z., 1998).

I risultati sperimentali hanno evidenziato come la lunghezza d'onda a 440 nm sia quella che dà variazioni strumentalmente percepibili di assorbanza nei campioni, mentre quella a 420 nm non mostra alcun tipo di variazione del valore di assorbanza.

La lettura a 440 nm, inoltre, dà informazioni utili relativamente allo stato di ossidazione del sistema, che di fatto è strettamente legato all'aumento della componente gialla del colore e quindi dell'imbrunimento, come conseguenza dell'ossidazione delle catechine presenti.

In tabella 2 (a) e (b), sono riportati i valori di assorbanza a 440 nm dei campioni nel tempo, rispettivamente alle temperature oggetto di studio, 40 e 50 °C.

Tabella 2: valori di assorbanza dei campioni conservati a 40 °C (a) o a 50 °C (b).

Assorbanza a 440 nm alla temperatura di 40 °C						
	0	2	4	7	10	14
C1	0.0106	0.0104	0.0075	0.0098	0.0124	0.0134
C2	0.0096	0.0100	0.0041	0.0040	0.0058	0.0081
C3	0.0132	0.0145	0.0123	0.0198	0.0302	0.0376
C4	0.0057	0.0050	0.0045	0.0012	0.0055	0.0061
C5	0.018	0.0108	0.0050	0.0022	0.0113	0.0153
C6	0.0118	0.0071	0.0070	0.0089	0.0247	0.0319
C7	0.0084	0.0078	0.0008	0.0012	0.0079	0.0078
C8	0.0073	0.0017	0.0024	0.0052	0.0131	0.0226
C9	0.0076	0.0095	0.0015	0.0014	0.0071	0.0192
C10	0.0082	0.0080	0.0025	0.0007	0.0099	0.0083
C11	0.0085	0.0078	0.0020	0.0027	0.0109	0.0102

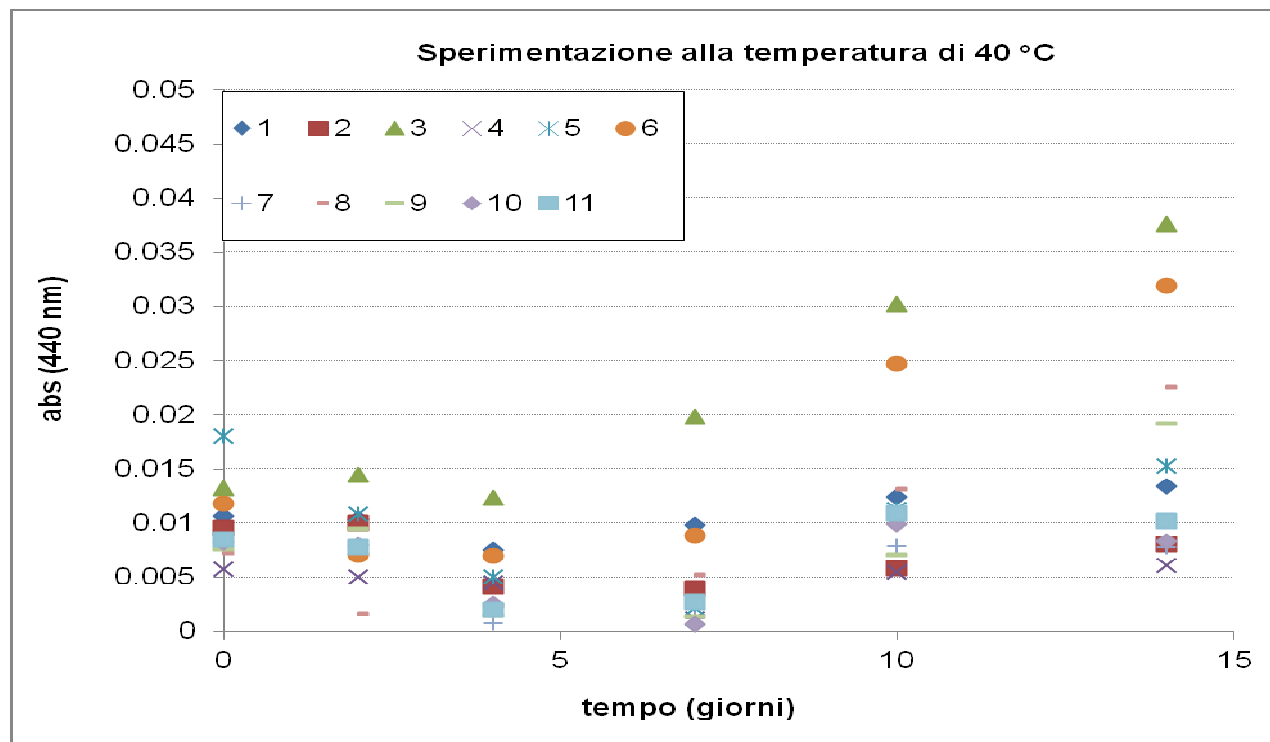
(a)

Assorbanza a 440 nm alla temperatura di 50 °C						
	0	2	4	7	10	14
1	0.0106	0.0102	0.0059	0.0118	0.0098	0.0148
2	0.0096	0.0062	0.0032	0.0064	0.0056	0.0071
3	0.0132	0.0135	0.0127	0.0311	0.0369	0.0317
4	0.0057	0.0033	0.0011	0.0050	0.0047	0.0032
5	0.018	0.0078	0.0062	0.0161	0.0149	0.0158
6	0.0118	0.0070	0.0103	0.0242	0.0306	0.0387
7	0.0084	0.0042	0.0050	0.0042	0.0033	0.0035
8	0.0073	0.0074	0.0094	0.0169	0.0241	0.0276
9	0.0076	0.0057	0.0074	0.0090	0.0139	0.0123
10	0.0082	0.0070	0.0035	0.0092	0.0110	0.0100
11	0.0085	0.0053	0.0047	0.0111	0.0047	0.0086

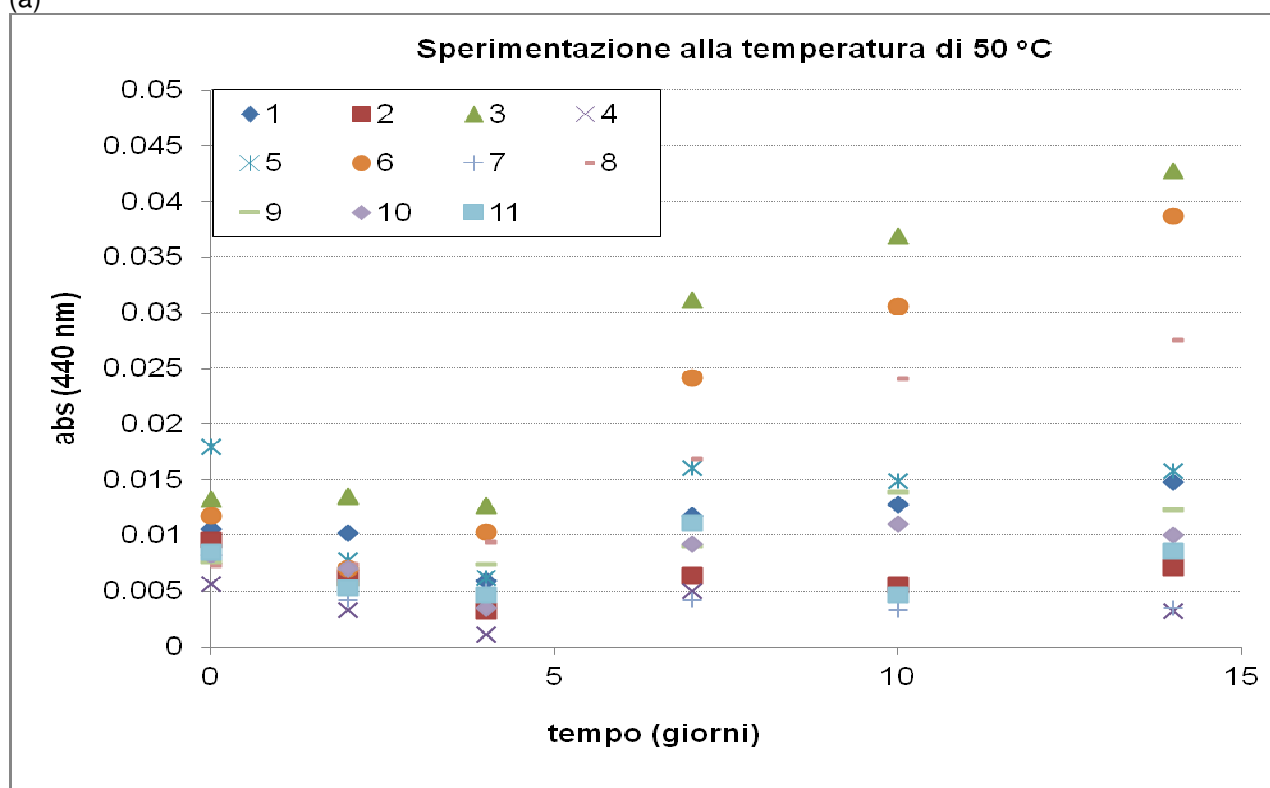
(b)

Dai dati analitici, risultano non chiaramente evidenziabili differenze tra i campioni.

Rappresentando, invece, i dati analitici graficamente è possibile visualizzare l'andamento dell'ossidazione del sistema nel tempo (Fig. 1).



(a)



(b)

Figura 1: evoluzione della densità ottica a 440 nm dei campioni conservati a 40 °C (a) o a 50 °C (b)

L'andamento dell'assorbanza risulta abbastanza stabile nei primi 3 campionamenti, corrispondenti a circa 7 giorni di conservazione, mentre si assiste a un successivo aumento dei valori di assorbanza nella seconda settimana di sperimentazione.

Nell'ottica di una maggiore chiarezza, è stata effettuata una valutazione matematica del set di dati, attraverso l'individuazione delle funzioni di interpolazione dei dati. È stato possibile individuare funzioni di tipo polinomiale di secondo grado, che meglio rappresentano tutti i campioni osservati. Di seguito, in tabella 3 (a e b), sono riportate le equazione delle funzioni polinomiali di secondo grado ed il relativo valore di R^2 . Quest'ultimo, fornisce utili informazione circa la qualità del grado di interpolazione dei dati. Infatti, tanto più il suo valore tende a 1, tanto più la funzione rappresenta una buona stima statistica dell'andamento dei dati reali in funzione del tempo.

Campioni sperimentali	Funzioni - 40 °C	R^2
1	$y = 5E-05x^2 - 0.0004x + 0.0103$	$R^2 = 0.698$
2	$y = 0.0001x^2 - 0.0015x + 0.0104$	$R^2 = 0.724$
3	$y = 0.0001x^2 + 0.0004x + 0.0124$	$R^2 = 0.954$
4	$y = 6E-05x^2 - 0.0008x + 0.006$	$R^2 = 0.512$
5	$y = 0.0003x^2 - 0.0036x + 0.0169$	$R^2 = 0.818$
6	$y = 0.0002x^2 - 0.0012x + 0.0099$	$R^2 = 0.901$
7	$y = 0.0001x^2 - 0.0016x + 0.0084$	$R^2 = 0.499$
8	$y = 0.0002x^2 - 0.0013x + 0.0056$	$R^2 = 0.958$
9	$y = 0.0002x^2 - 0.0027x + 0.0097$	$R^2 = 0.881$
10	$y = 0.0001x^2 - 0.0014x + 0.0082$	$R^2 = 0.379$
11	$y = 0.0001x^2 - 0.0012x + 0.0081$	$R^2 = 0.475$

(a)

Campioni sperimentali	Funzioni - 50 °C	R ²
1	$y = 5E-05x^2 - 0.0003x + 0.0099$	R ² = 0.610
2	$y = 7E-05x^2 - 0.001x + 0.0085$	R ² = 0.529
3	$y = 6E-06x^2 + 0.0024x + 0.01$	R ² = 0.906
4	$y = 1E-05x^2 - 0.0002x + 0.0043$	R ² = 0.038
5	$y = 8E-05x^2 - 0.0009x + 0.0136$	R ² = 0.221
6	$y = 7E-05x^2 + 0.0014x + 0.0079$	R ² = 0.917
7	$y = 8E-05x^2 - 0.0009x + 0.0136$	R ² = 0.221
8	$y = 1E-05x^2 + 0.0015x + 0.0056$	R ² = 0.956
9	$y = -2E-07x^2 + 0.0005x + 0.0061$	R ² = 0.730
10	$y = 2E-05x^2 - 1E-05x + 0.0069$	R ² = 0.374
11	$y = 2E-05x^2 - 0.0002x + 0.0072$	R ² = 0.049

(b)

Tabella 3: valori di assorbanza dei campioni conservati a 40 °C (a) o a 50 °C (b).

Osservando, inoltre, le funzioni relative alla temperatura di conservazione più bassa (40 °C), tutti i campioni sembrano essere ben stimati, con valori di R² relativamente alti.

Considerando, invece, gli stessi campioni conservati a 50 °C, è possibile notare una diminuzione del valore di R² per la maggior parte dei campioni studiati. Ciò indica come, cambiando le condizioni di conservazione, vi sia un'effettiva influenza della temperatura.

Inoltre, per entrambe le temperature, è possibile notare distintamente come i campioni possano essere raggruppati in due cluster, il primo comprendente tutti i campioni che mostrano un maggiore incremento dell'assorbanza e quindi maggiormente ossidati, il secondo comprendente i campioni che minimamente si ossidano nel tempo.

All'interno del cluster poco ossidato rientrano anche i campioni di riferimento, il cui stato di ossidazione è direttamente connesso all'ossidazione delle catechine presenti.

In accordo con quanto riportato da Peng *et al.* (1998), in una soluzione modello contenente catechine conservata a temperature elevate per circa 2 settimane, lo stato ossidativo del sistema risulta essere abbastanza stabile nel tempo e l'incremento del valore di assorbanza a 440 nm è minimo, determinato solo dall'ossidazione delle catechine.

In figura 2 vengono raffigurati gli andamenti del campione di riferimento, senza l'aggiunta di coadiuvanti, rispettivamente a 40 e 50 °C.

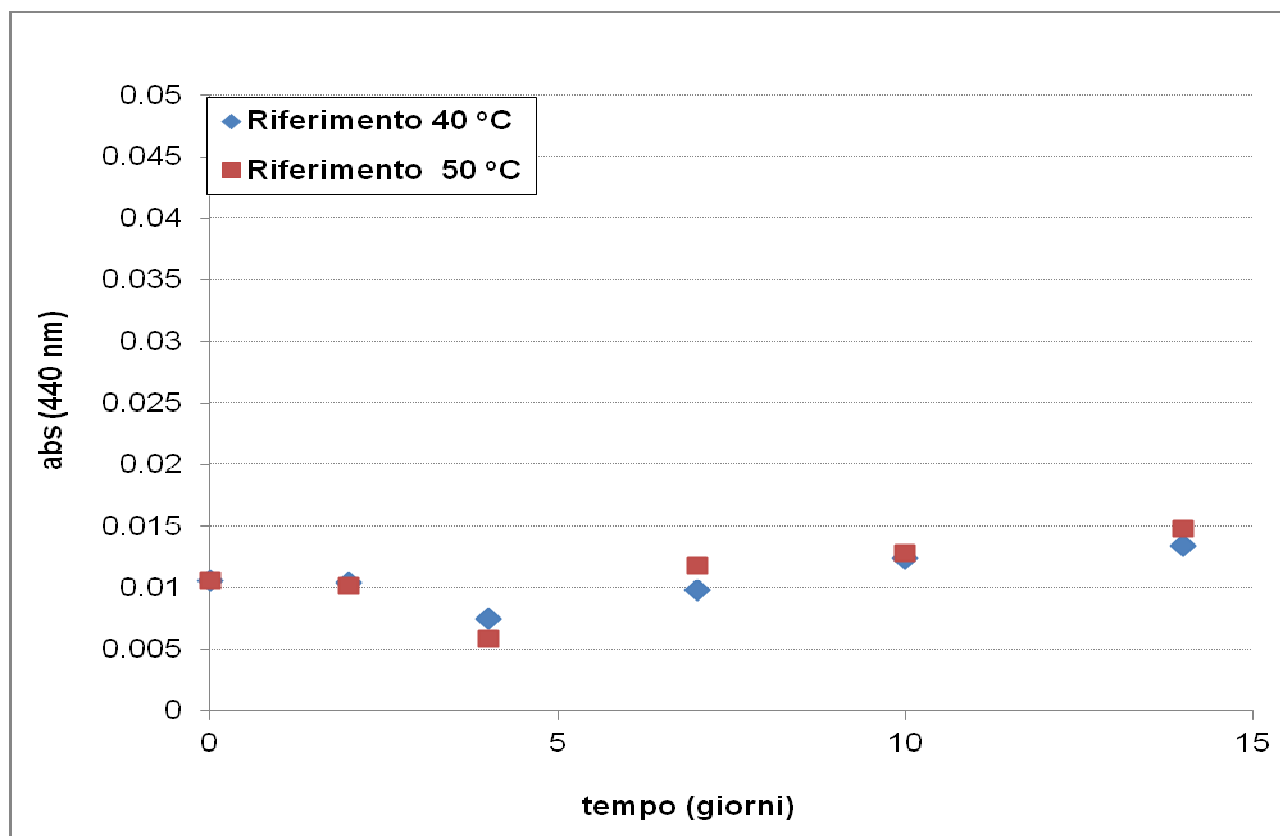
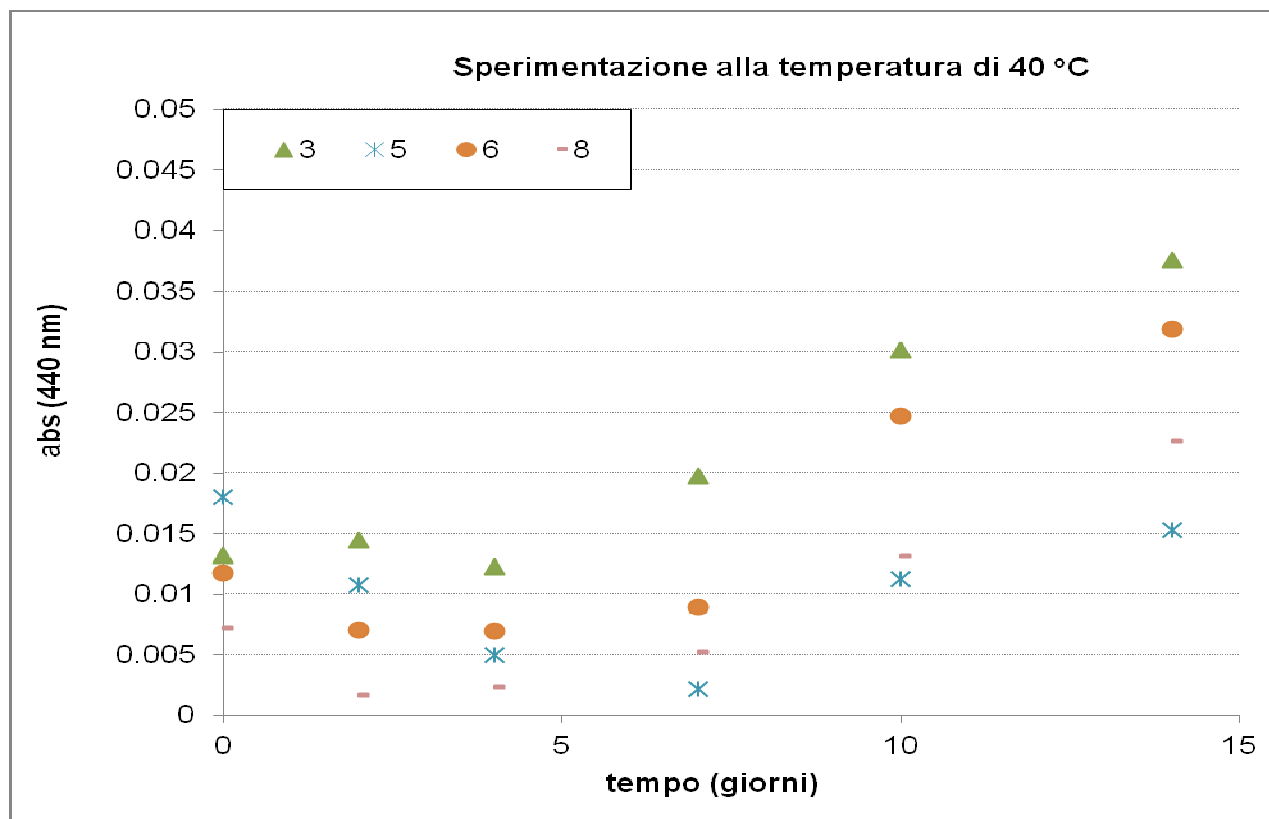


Figura 2: incremento del valore di assorbanza a 440 nm alla temperatura di 40 e 50 °C.

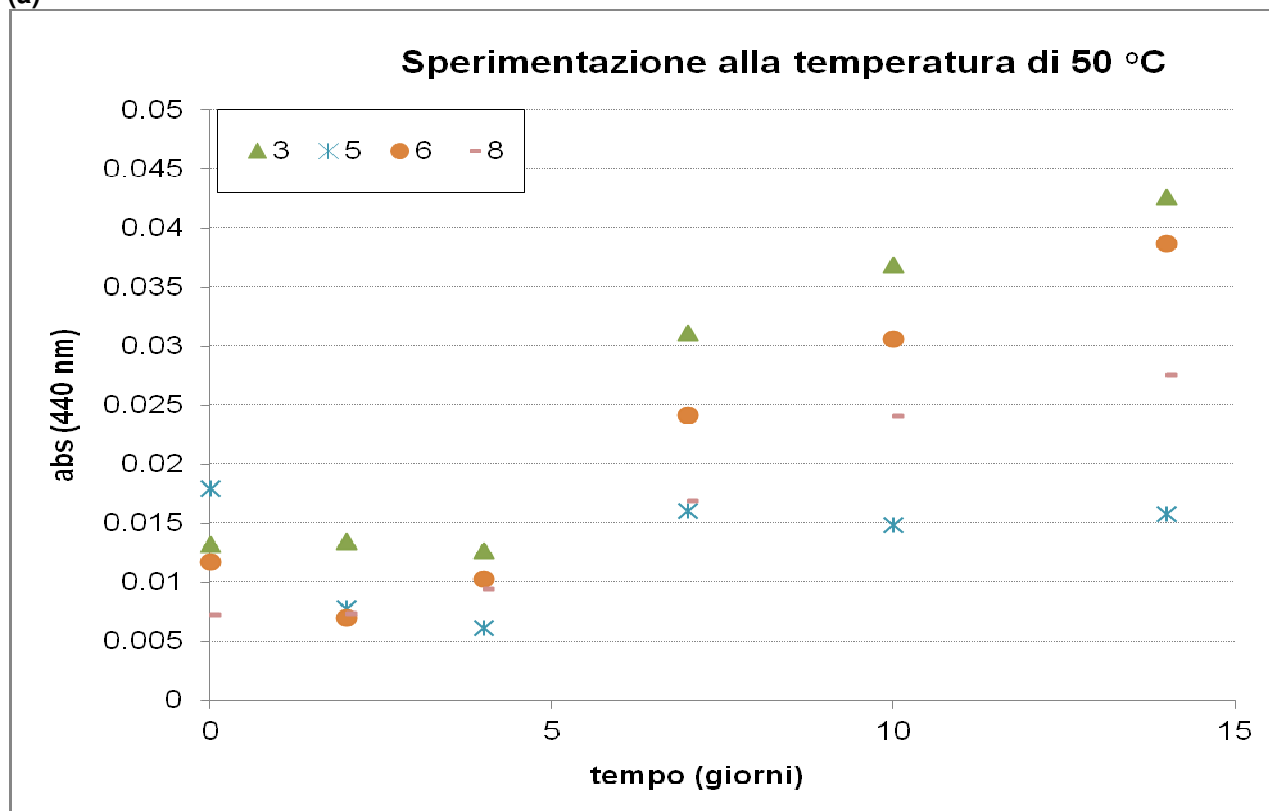
La temperatura di trattamento non permette alle catechine di ossidarsi in maniera spinta nell'intero periodo di conservazione, ma è evidente come, nella prima settimana, i campioni evolvono in maniera simile, con valori pressoché comparabili, mentre si differenziano i trattamenti nella seconda settimana, con valori leggermente maggiori per il trattamento a 50 °C.

Per questo motivo, i campioni studiati sono stati osservati in funzione del cluster di appartenenza, al fine di evidenziare differenze dovute alla temperatura.

In figura 3 (a e b) sono riportati i grafici relativi al cluster maggiormente ossidato, mentre in figura 4 (a e b) i grafici del cluster meno ossidato.

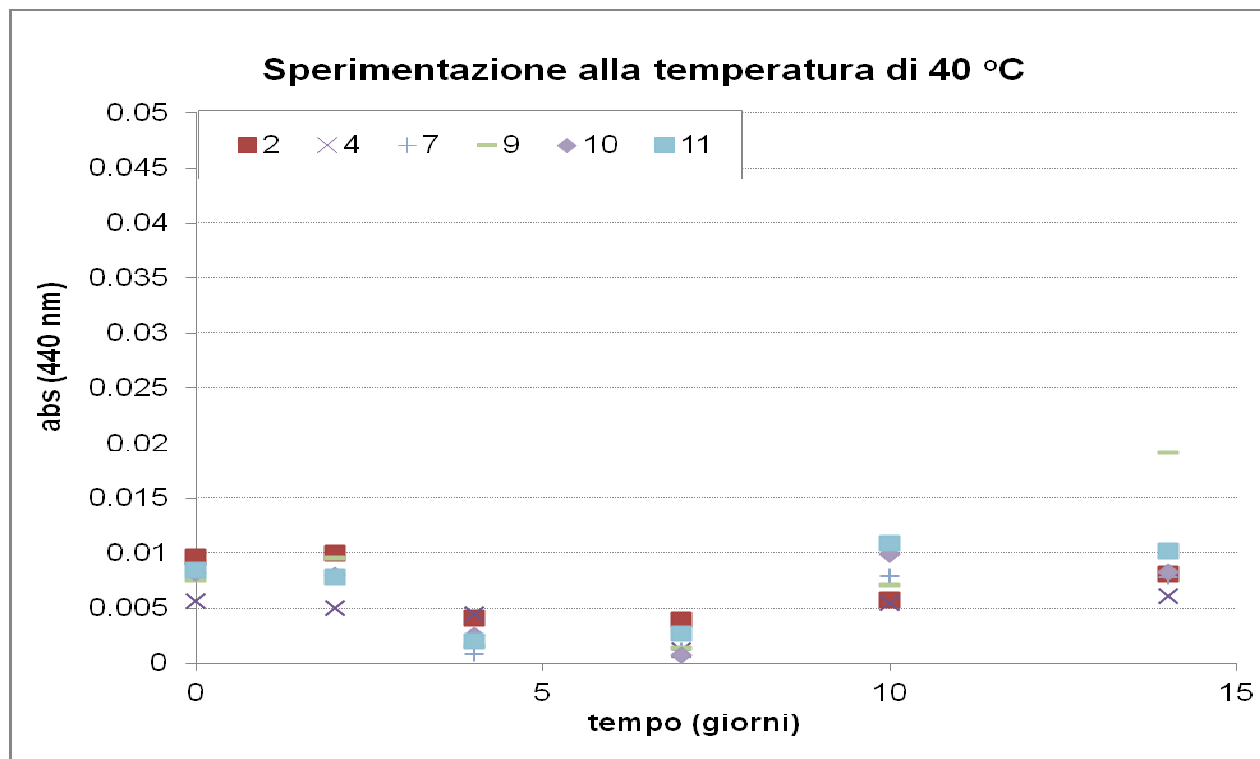


(a)

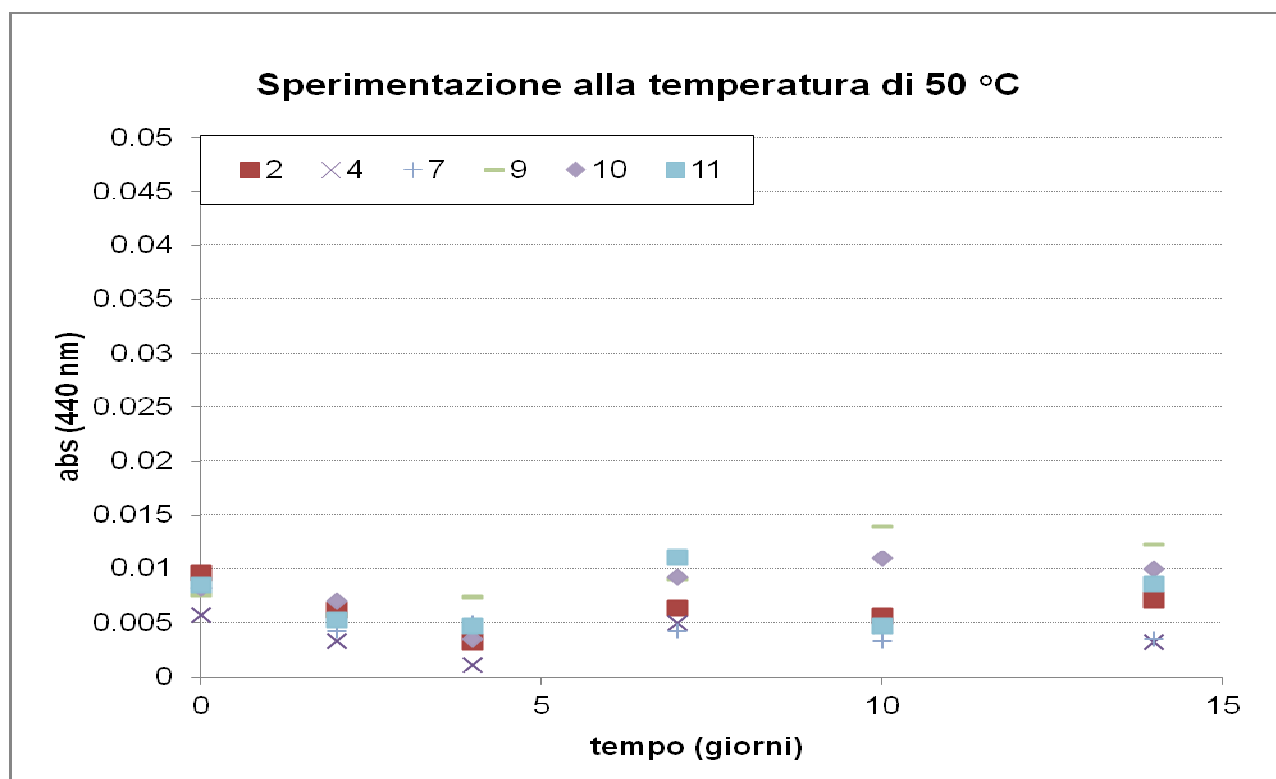


(b)

Figura 3: Incremento del valore di assorbanza a 440 nm alla temperatura di 40 °C (a) o alla temperatura di 50 °C (b).



(a)



(b)

Figura 4: Incremento del valore di assorbanza a 440 nm alla temperatura di 40 °C (a) o alla temperatura di 50 °C (b).

Per tutti i casi, si osserva un maggior incremento dei valori finali di assorbanza nella conservazione a temperatura più elevata, a indicare l'influenza della temperatura sullo stato ossidativo del sistema. Inoltre, per il cluster più ossidato, è possibile evidenziare un incremento maggiore dei valori dell'assorbanza nella seconda metà della conservazione, ancora più evidente nella conservazione a 50 °C.

Per il cluster minimamente ossidato, invece, risulta meno marcata la differenza tra primo e secondo periodo di conservazione, anche se, sempre per la temperatura di 50 °C, è possibile osservare valori leggermente maggiori di assorbanza.

La temperatura di conservazione influenza, dunque, l'evoluzione ossidativa dei campioni, indipendentemente dai coadiuvanti aggiunti.

I campioni 3 e 6, per entrambe le temperature studiate, mostrano una più spinta ossidazione del mezzo. Il diverso comportamento di questi campioni, tra la prima e la seconda parte della conservazione, potrebbe essere dovuto alla completa ossidazione dell'acido ascorbico che, come evidenziato dalla sua determinazione, si ossida completamente nei primi 5 giorni. La presenza della forma ossidata, l'acido deidroascorbico, inoltre, potrebbe incorrere in ulteriori modificazioni, con formazione di acqua ossigenata. Questa, poi, potrebbe influenzare il potenziale ossido-riduttivo del mezzo, provocando un'ulteriore ossidazione delle catechine nella seconda parte del trattamento.

Il tannino di galla non ha mostrato a pieno la sua effettiva capacità antiossidante nel corso delle sperimentazioni, mentre è ormai prassi comune il suo utilizzo nelle produzioni enologiche per i risvolti positivi, soprattutto nel caso dei vini bianchi, prolungando la shelf-life.

Tale comportamento potrebbe essere stato influenzato dalla contemporanea azione antiossidante dell'anidride solforosa, che avrebbe mascherato quasi interamente la reale azione del tannino. Inoltre, nella sperimentazione, trattandosi di un mezzo artificiale, la cui componente fenolica è rappresentata esclusivamente dalle catechine, la capacità antiossidante del tannino potrebbe essere stata difficilmente osservabile, comparandola invece con quella dell'anidride solforosa.

CONCLUSIONI

La sperimentazione ha permesso di evidenziare come, in generale, si debbano ampliare le conoscenze circa la giusta combinazione di coadiuvanti tecnologici alternativi, al fine di assicurare una efficace ed efficiente copertura antiossidante a carico della componente polifenolica che, specie in vini bianchi, potrebbe comportare decadimenti qualitativi del prodotto, durante la conservazione.

Ulteriori studi e approfondimenti, come la sperimentazione di una terza temperatura di conservazione, permetterebbero un completo studio tecnologico, per la valutazione dei diversi coadiuvanti, nonché l'influenza del tempo e della temperatura sulla shelf-life del prodotto.

BIBLIOGRAFIA

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

Dimitri G., Piva A., Arfelli G and Mengjia R. (2013) Atti *Enoforum 2013*. Arezzo, Italy.

Peng Z., Duncan B., Pocock K.F. and Sefton M.A. (1998). The effect of ascorbic acid on oxidative browning of white wines and model wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 127-135.

Riassunto

La qualità dei vini è strettamente legata alle caratteristiche sensoriali prontamente percepite dal consumatore, che è diventato sempre più attento alle caratteristiche del prodotto e all'assenza o ridotto contenuto di sostanze estranee aggiunte, premiando invece la naturalezza delle produzioni e dei relativi prodotti finali. Alcune prassi enologiche sono perciò cambiate, come l'utilizzo di alcuni coadiuvanti, soprattutto in termini di salubrità delle sostanze utilizzate, nonché le loro concentrazioni nel prodotto finito.

Il presente lavoro vuole proporre metodi rapidi per il monitoraggio dello stato ossidativo di soluzioni modello contenente catechine, aggiunte di tre coadiuvanti tecnologici: acido ascorbico, metabisolfito di potassio e tannino di galla e conservate per 15 giorni a 40 e 50 °C.

Dai dati sperimentali non è stato possibile identificare significative differenze tra i coadiuvanti. Pertanto, è necessario ampliare le conoscenze circa la concomitante efficacia di coadiuvanti tecnologici alternativi all'anidride solforosa, tale da assicurare un'efficace ed efficiente copertura antiossidante a carico della componente polifenolica. Il presente lavoro rappresenta dunque un punto di inizio per lo sviluppo di metodologie analitiche rapide, di facile esecuzione ed economiche, con possibili vantaggi per le aziende del settore.