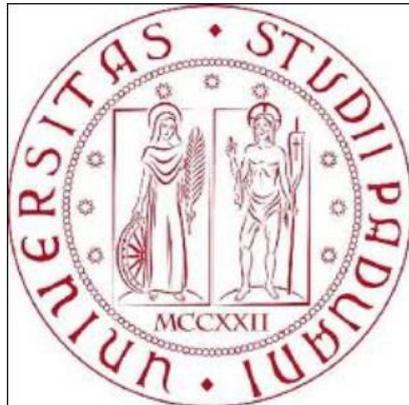


UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA



DIPARTIMENTO DI AGRARIA MEDICINA VETERINARIA

CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN ENOLOGIA E
VITICOLTURA

TESI DI LAUREA

LE NANOTECNOLOGIE IN AMBITO ENOLOGICO

RELATORE: Prof. SIMONE VINCENZI

LAUREANDO: Matteo Santin

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

LE NANOTECNOLOGIE IN AMBITO ENOLOGICO

INTRODUZIONE (le nanotecnologie applicata all' enologia)

1. ANALISI QUALITATIVA DEL VINO TRAMITE L' UTILIZZO DI UNA "LINGUA" ELETTRONICA DI EPOSSI-GRAFITE
2. UTILIZZO DI NANOTECNOLOGIE PER FILTRAZIONE VINI BIANCHI
3. NANOPARTICELLE DI ARGENTO PER CONTROLLO CRESCITA BATTERI LATTICI E ACETICI NEL VINO
4. BIOSENSORI ELETTROCHIMICI MONOUSO PER RILEVAMENTO CONTENUTO TOTALE DI LIEVITO ATTRAVERSO NANOPARTICELLE CORE-SHELL (soprattutto *Brettanomyces Bruxellensis*)
5. BIOSENSORI PER L' ANALISI DI SOSTANZE CONTAMINANTI
6. QUANTIFICAZIONE DELL' ISTAMINA ATTRAVERSO NANOPARTICELLE COME ELEMENTO DI RICONOSCIMENTO
7. DETERMINAZIONE ANIDRIDE SOLFOROSA NEL VINO ATTRAVERSO NANOPARTICELLE MAGNETICHE

RIASSUNTO

Negli ultimi anni le nanotecnologie stanno sempre più prendendo piede e stanno avendo un impatto enorme anche all'interno dell'industria alimentare.

Ormai queste tecnologie stanno iniziando a svolgere un ruolo anche nella produzione del vino e attraverso questo elaborato si vuole porre l'attenzione sul loro utilizzo in viticoltura e in enologia e sull'impatto che l'utilizzo di nanomateriali e nanobiosensori hanno sulla produzione del vino, sulla qualità e sulla sicurezza del prodotto finale.

Esistono molti nanomateriali, basati su oro, argento, nanoparticelle di ossido di ferro ecc.

Questi vengono utilizzati ad esempio per la degradazione e rimozione di inquinanti nel vino o ancora per l'immobilizzazione dei lieviti.

Nonostante tutti i vantaggi che la nanotecnologia potrebbe portare all'intera filiera produttiva, si tratta di un campo ancora nuovo e in via di sviluppo, quindi sono necessari diversi sforzi per superare ostacoli legislativi, scientifici e tecnologici per permettere il loro utilizzo in questo settore.

ABSTRACT

In recent years, nanotechnologies are increasingly growing in all producing sectors, and are having a huge impact also in the food industry.

By now these technologies are starting to take part also in the production of wine and this thesis want to focus on their use in viticulture and oenology and on the impact that the use of nanomaterials and nanobiosensors can have on wine production, on quality and on safety of the final product.

There are many nanomaterials, such as, for example those based on gold, silver, iron oxide etc.

These are used for example for the degradation and removal of pollutants in wine or for the immobilization of yeasts. Despite all the benefits of nanotechnology, it is still a new and developing field, therefore several efforts are needed to overcome legislative, scientific and technological obstacles to enable their use in the viticultural and enological sectors.

INTRODUZIONE

In tempi recenti la nanotecnologia si è sviluppata molto rapidamente in tutto il mondo dando enormi vantaggi a sempre più prodotti appartenenti ad aree anche molto diverse come ad esempio elettronica, ambiente, comunicazione e alimentazione, inserendosi anche nella produzione del vino.

La National Nanotechnology Initiative (NNI) dell'EEUU ha definito la nanotecnologia come "ricerca e sviluppo tecnologico su scala atomica, molecolare o macromolecolare che portano alla creazione e all'uso controllato di strutture, dispositivi e sistemi con una scala di lunghezza, normalmente inferiore a 100 nanometri (nm)." Ovvero simile alla dimensione di piccoli atomi e particelle.

Tale scienza si basa sul principio fondamentale che alcuni materiali su una scala nanometrica hanno proprietà molto diverse che su scale più grandi. Ciò è dovuto al maggior rapporto superficie/volume che permette una particolare interazione con la materia a livello fisico-chimico e biologico.

Tra gli utilizzi dei diversi nanomateriali in enologia i più studiati sono:

- Quantificazione di elementi costitutivi nel vino per risolvere problemi associati a tecniche che richiedono un grande dispendio di denaro e tempo.
- Nanomateriali come agenti antimicrobici per il mantenimento della materia prima ed evitare alterazioni del prodotto.
- Degradazione e rimozione degli inquinanti del vino.
- Immobilizzazione e veicolazione del lievito.

1.1 ANALISI QUALITATIVA DEL VINO TRAMITE L'UTILIZZO DI UNA "LINGUA" ELETTRONICA DI EPOSSI-GRAFITE

Il vino è una matrice che contiene al suo interno migliaia di composti che durante la produzione devono essere misurati analiticamente e rispettare determinati limiti per raggiungere la qualità del prodotto desiderata.

Normalmente, oltre alle analisi di base sulla composizione macromolecolare (zuccheri, alcol, acidità, ecc.), vengono effettuati diversi altri esami durante la produzione del vino, tra cui alcuni definiti come saggi di base che sono:

- Determinazione del contenuto di ferro e rame, causa della formazione di precipitati, oltre che catalizzatori di ossidazione.
- Stabilità all'ossidazione, che causa un deperimento della qualità, e che consiste nell'imbrunimento del vino nel momento in cui entra a contatto con l'aria, soprattutto nei vini bianchi.
- Stabilità microbiologica e contenuto in polisaccaridi.

Infine, oltre a queste analisi, i vini vengono sottoposti anche a delle analisi organolettiche da parte di un panel di persone istruite che cercano di fornire una descrizione del prodotto a livello sensoriale.

Mentre le analisi chimiche hanno raggiunto livelli di automazione tali da abbassare notevolmente tempi e costi di esecuzione, l'analisi sensoriale richiede ancora tempi relativamente lunghi (tra cui va incluso anche quello per istruire adeguatamente il panel) o può sussistere l'impossibilità di svolgere determinate analisi in loco.

Per ovviare a questo negli ultimi anni si sta sviluppando una nuova tecnologia, che potrebbe andare a sostituire la maggior parte delle tecniche, incluse quelle analitiche, utilizzate fino a questo momento per l'analisi del vino.

Questa consiste nell'utilizzo di una lingua elettronica che ha il compito di:

- Classificazione e riconoscimento dei campioni.
- Determinazione quantitativa del contenuto di sostanze nei vini.
- Previsione dei punteggi sensoriali umani per i campioni di vino.

Nell'analisi del vino è stato utilizzato un sistema composto da 23 sensori chimici potenziometrici e voltametrici ("mimano la lingua umana" *Winqvist et al. 1997*) i quali, mediante lo sfruttamento di reazioni chimiche, sono in grado di rendere questo strumento

alquanto sensibile a una moltitudine di stimoli differenti (C. Pérez-Ràfols et al. 2019) con un funzionamento rappresentato dalla Fig.1

I classici elettrodi di epossi-grafite normalmente utilizzati in questo tipo di tecnologia, sono stati modificati con nanoparticelle metalliche, perlopiù di rame, platino o polimeri conduttori.

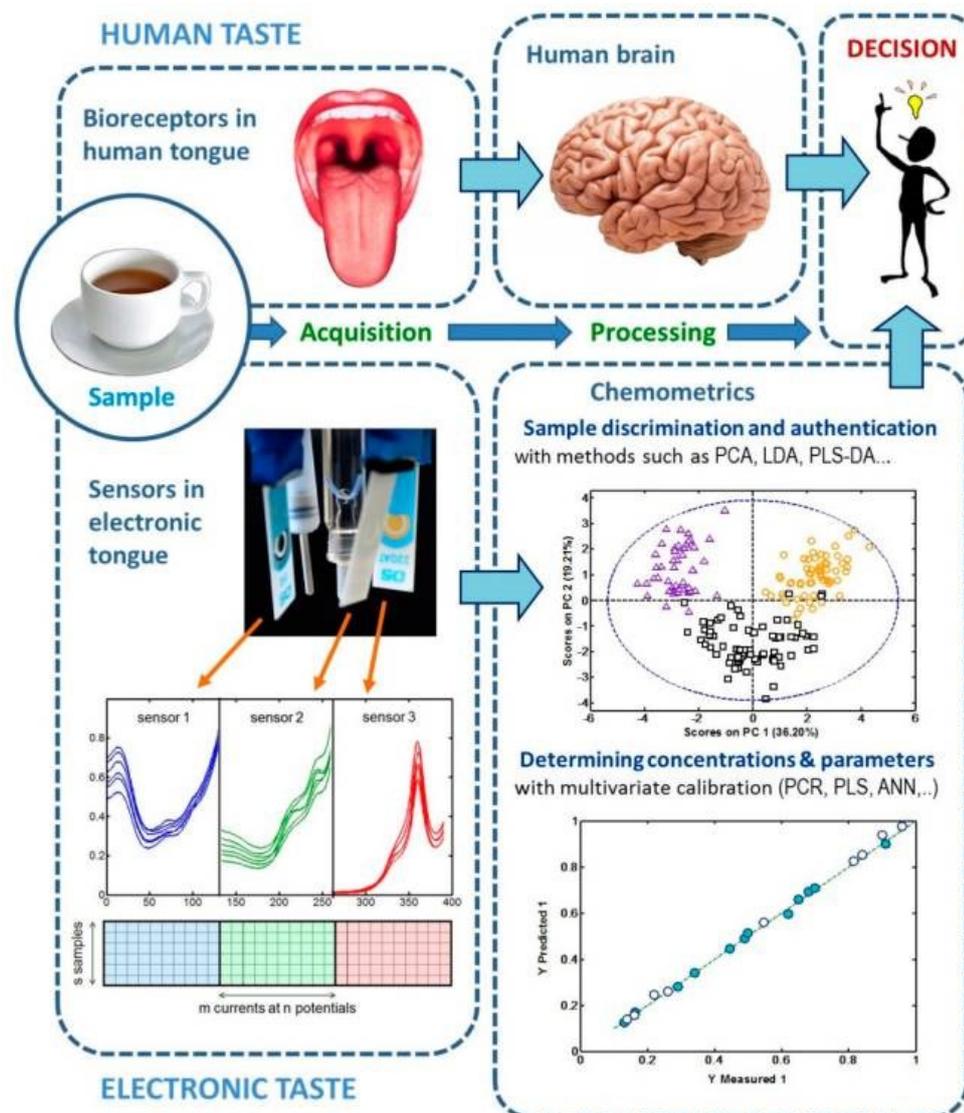


Fig.1: Schema del funzionamento della "lingua elettronica" utilizzata.

Il funzionamento della lingua elettronica, quindi, si basa su dei sensori chimici potenziometrici non specifici, cioè pensati per essere sensibili al maggior numero di composti in soluzione, e la loro risposta può essere dovuta a interazioni ioniche, molecolari o redox.

Sono stati fatti diversi esperimenti sul funzionamento di questo strumento; ad esempio, sono stati utilizzati campioni di Barbera d’Asti, campioni di vino Gutturmo e campioni di vini dei

Castelli Romani, tutti prodotti da uve della stessa annata, ma da agricoltori e vigneti diversi. Le misurazioni sono state effettuate senza trattamento o preparazione del campione e tra una misurazione e l'altra è stato previsto un momento di pulizia con acqua distillata degli elettrodi per evitare l'accumulo di impurità che potrebbero falsare i risultati.

L'elaborazione dei dati è stata effettuata tramite PCA (Analisi dei Componenti Principali), che permette di raggruppare i dati in base alla loro somiglianza e di spiegare meglio i fattori responsabili della varianza. L'analisi PCA, che di fatto fornisce solo una visualizzazione del raggruppamento dei dati, è stata affiancata ad una rete neurale (PCA-ANN) che aveva lo scopo di classificare i campioni e i dati ottenuti.

Questa tecnologia è stata testata per:

- 1) Classificazione e riconoscimento dei campioni in base alle proprietà del vino come i valori di pH
- 2) Determinazione quantitativa del contenuto di sostanze nei vini come glicerolo, polifenoli e anidride solforosa
- 3) Previsione dei punteggi sensoriali umani nei diversi campioni di vino come i sentori che si possono percepire al primo assaggio del campione.

Inizialmente è stata studiata la capacità della lingua di distinguere tra diverse tipologie di vino e differenziare campioni della stessa denominazione, ma provenienti da vigneti diversi, fattore necessario per controllare l'origine e la qualità dei prodotti: se fosse in grado di fare questo, tale strumento sarebbe facilmente utilizzabile per una identificazione rapida dei vini.

È stato dapprima eseguito uno studio quantitativo, dove sono state studiate sostanze organiche e inorganiche che compongono il vino e i valori estratti analiticamente sono stati usati come calibrazione per la lingua. È stato provato che la lingua è in grado di "misurare" il contenuto di acidi totali, il pH, e la presenza di acidi organici, mentre ad esempio non ha mostrato capacità di misurare la densità.

Successivamente tramite elaborazione con il metodo statistico SIMCA (*Soft Independent Modeling of Class Analogy*), che consiste nel costruire modelli di PCA singoli per ogni campione e successivamente utilizzarli per la suddivisione dei campioni in diverse classi di appartenenza, si è visto che già solo sulla base di questi parametri la lingua era in grado di distinguere e raggruppare correttamente i diversi campioni.

Inoltre, si è visto che tale "lingua elettronica" permette anche di rilevare altri composti quali il glicerolo, molto importante perché dà consistenza al vino in bocca, o i polifenoli e gli antociani, molto importanti perché danno colore, corpo e astringenza al vino. Questo è stato possibile tramite una modifica dei sensori, che sono stati rivestiti con vetro calcogenuro, che è direttamente sensibile a queste sostanze.

Altro parametro fondamentale che la lingua è stata in grado di misurare è la presenza di anidride solforosa che deve sempre essere al di sotto del limite di legge e questo è stato possibile grazie alla sensibilità dei sensori ad anioni e bisolfiti e alla sensibilità al pH.

Tutto questo insieme ha permesso la valutazione della anidride solforosa totale presente nel mezzo.

Ultimo e più complesso step è stato quello di usare la “lingua elettronica” per un’analisi sensoriale dei campioni. La difficoltà sta nel fatto che, oltre a non essere ancora nota la relazione che intercorre tra gusto e sostanze chimiche, perché più sostanze possono corrispondere ad un unico gusto, portando così ad una calibrazione errata dello strumento (senza tener conto che il “gusto” è relativamente soggettivo).

Dato che questo risulta il passaggio più limitante, si è cercata una possibile soluzione a tale problema.

In pratica è stato utilizzato un panel sensoriale composto da 10 persone, istruite e con esperienza quinquennale sul riconoscimento delle qualità del vino, con il quale si è cercato di tarare lo strumento in modo tale che i sensori fossero in grado di percepire e distinguere anche le più piccole variazioni chimiche all’interno del prodotto.

Lo scopo finale era di riuscire ad ottenere un unico sistema uniforme di qualificazione del vino molto più rapido, sensibile e oggettivo. Infatti, questa tecnologia permette di tradurre a “livello sensoriale” anche quelle caratteristiche che non sarebbero state percepite dal panel sensoriale perché al di fuori del campo percettivo del gusto e dell’olfatto.

Ad esempio, anche senza predisporre dei sensori ottici per analizzare il colore del vino, attraverso la sensibilità alle sostanze che lo determinano, ovvero i polifenoli, la lingua è stata in grado di distinguere in modo esatto tra un campione di colore rosso rubino e un campione di colore rosso violetto.

Sono stati analizzati molti altri parametri come riportato in Fig.2 che sono stati confrontati con i valori rilevati dal panel sensoriale.

Come si può notare c’è una perfetta sovrapposizione delle linee, che conferma l’attendibilità delle rilevazioni elettroniche.

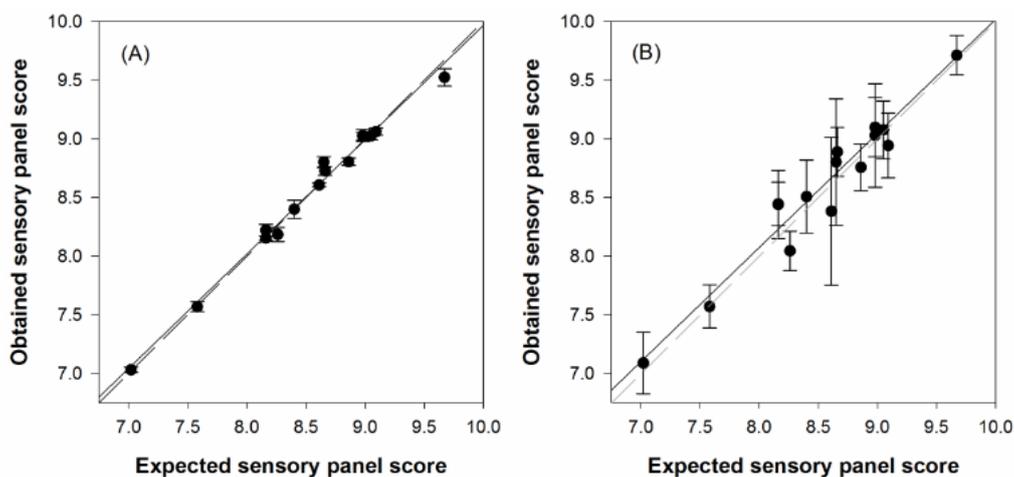


Fig.2: è stato eseguito sia per una prova con parametri settati (A) che con parametri nuovi (B). La linea tratteggiata corrisponde a quella rilevata dalla “lingua elettronica” mentre quella continua corrisponde a quella del panel sensoriale. Ogni singolo pallino deriva dalla media di 30 esperimenti eseguiti sempre sullo stesso parametro.

La facile procedura per l’esecuzione dell’analisi e la sua economicità rendono questo strumento un’ottima alternativa con un approccio non tradizionale per l’analisi quantitativa e qualitativa dei vini (X. Cetò et. al, 2016) in quanto porterebbero ad un enorme risparmio di tempo oltre che di denaro dato che questa nuova tecnologia sarebbe in grado di sostituire quasi interamente il panel degustativo riportando risultati attendibili analizzando anche caratteristiche non percepibili a livello sensoriale dall’ essere umano.

2.1 UTILIZZO DELLE NANOTECNOLOGIE PER LA STABILITÀ PROTEICA DEI VINI BIANCHI

L'instabilità proteica è uno dei difetti non microbici più comuni nell'industria del vino bianco e causa la formazione della torbidità o "haze".

Questa non è un problema per la salute umana, ma è un enorme problema a livello di marketing in quanto il consumatore associa alla torbidità uno stato di deperimento del prodotto non acquistandolo (*Hsu & Heatherbell, 1987*).

Solitamente la torbidità di un vino si viene a creare quando il prodotto è esposto ad alte temperature durante lo stoccaggio o il trasporto.

A livello chimico questo fenomeno dell'instabilità proteica si divide in due momenti, inizialmente le proteine vengono denaturate, ad esempio a causa di un aumento repentino di temperatura, per poi in un secondo momento riaggregarsi formando flocculi visibili ad occhio nudo che formano la "velatura" dei vini.

Le proteine, che sono considerate le attrici principali di questo fenomeno, sono le PRP (*Pathogenesis Related Proteins*) che sono perlopiù chitinasi e taumatine (TLP) e vengono sintetizzate dalla pianta in risposta ad un attacco patogeno (*Høj, P. B. et al. 2000*).

Nei vini bianchi le PRP danno problemi a causa del basso contenuto di procianidine, ovvero tannini dell'uva, che nei vini rossi sono invece in quantità sufficiente per flocculare e far precipitare le proteine instabili durante la vinificazione.

Attualmente per garantire la stabilità a lungo termine, la bentonite è uno dei pochi, se non il solo metodo per risolvere questo problema.

La bentonite ha un'azione elettrostatica sulle proteine, ma il suo impiego può influire negativamente sulla qualità del vino trattato, in quanto agisce eliminando non solo le proteine instabili, ma anche i composti che determinano colore e gusto, oltre che causare la perdita di una percentuale del volume di vino attraverso la formazione di fecce di bentonite.

Si aggiunge anche il problema che lo smaltimento di queste fecce crea a causa della sicurezza della salute sul lavoro, alla sicurezza dell'ambiente e alle problematiche legislative.

Sono state studiate anche altre tecniche da usare in alternativa alla bentonite, come ad esempio l'ultrafiltrazione, ma nessuna di queste ha dato risultati altrettanto soddisfacenti.

Una possibile alternativa proposta recentemente consiste nell'utilizzo di nanoparticelle magnetiche ricoperte di acido acrilico.

Attraverso il loro impiego, e sfruttando la loro proprietà di spostarsi in un campo magnetico, si potrebbero utilizzare per permettere un adsorbimento specifico delle proteine (causa della torbidità del vino), per poi essere eliminate facilmente in un secondo momento (*Mierczynska-Vasilev et al. 2017*).

Questa metodologia apporterebbe diversi vantaggi, in quanto è una tecnica veloce, può essere usata senza solventi, a bassa temperatura e senza un pretrattamento del campione.

Lo studio è stato svolto su nove vini diversi e i risultati sono stati analizzati tramite HPLC, controllando anche la differenza del contenuto fenolico dopo il trattamento.

Il processo di separazione è suddiviso in tre fasi:

1. La superficie delle nanoparticelle magnetiche viene arricchita con gruppi carbossilici (-COOH), tramite un rivestimento di acido acrilico;
2. Successivamente le particelle (CMNP) vengono aggiunte al vino;
3. Le particelle vengono rimosse dal vino tramite l'utilizzo di un magnete esterno (come mostrato in fig. 3).

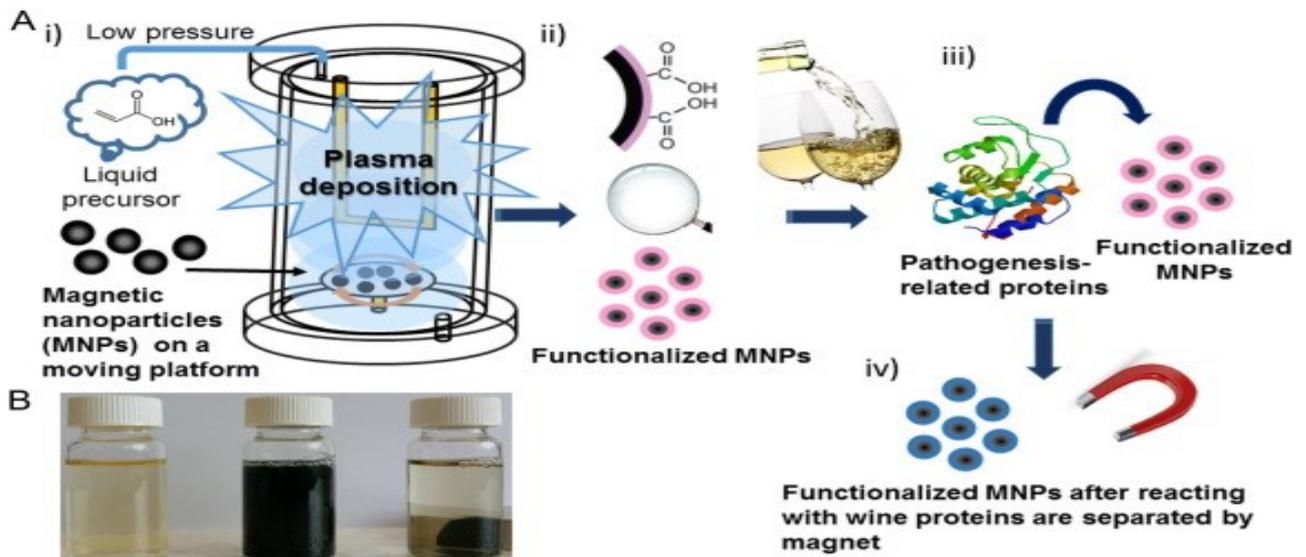


Fig.3: A. schema del processo di separazione magnetica; B. dimostrazione pratica della formazione, agglomerazione e precipitazione delle biglie CMNP

È stato visto che i risultati migliori sono stati ottenuti con le nanoparticelle magnetiche lasciate a contatto con il vino per 10 minuti ad una concentrazione di 1,66 vol.%, pari cioè a 13,3 g/L di CMNP.

Gli studi hanno dimostrato che in otto vini dei nove sperimentati le chitinasi sono state eliminate con successo, mentre nel nono vino (*Verdejo*) si è arrivati ad una concentrazione di 19,5 mg/L che è comunque un valore molto basso dato che corrisponde a solo il 10% circa delle chitinasi di partenza.

Per quanto riguarda le TLP, altra classe importante di proteine instabili, esse sono state eliminate con successo solo su sei dei nove vini.

Sul settimo e ottavo vino sono rimaste ad una concentrazione molto bassa, pari a 1,6 e 2 mg/L, mentre nel vino *Verdejo* sono rimaste ad una concentrazione superiore, comunque sufficiente per causare instabilità.

A causa dell'elevata concentrazione di proteine in quest'ultimo vino, la concentrazione di CMNP è stata raddoppiata ottenendo la completa eliminazione delle chitinasi e un minimo residuo di 3 mg/L di TLP.

Considerando che l'adsorbimento delle CMNP potrebbe essere aspecifico e rimuovere anche componenti utili del vino, è stata misurata la concentrazione di polifenoli nei vini trattati.

Si è visto che le CMNP non hanno diminuito il livello iniziale, confermando che non influiscono negativamente sulla qualità fenolica dei vini trattati.

Concludendo, questa può essere considerata una nuova tecnologia per la rimozione rapida e selettiva delle proteine che causano la torbidità nei vini bianchi.

Potrebbe diventare una valida alternativa al trattamento con bentonite, che porta con sé anche molti svantaggi, inoltre questa tecnologia potrebbe essere utilizzata anche in altri settori come il trattamento delle acque o le biotecnologie.

Un'altra metodica che propone le nanoparticelle per la stabilizzazione proteica è basata sull'utilizzo di materiali ceramici che hanno proprietà fisiche ed elettrostatiche che permettono di adsorbire ed eliminare le PRP attraverso un sistema a flusso continuo (*Vasilev et al. 2010*)

I materiali sono stati utilizzati sotto forma di nanopolvere (MC1 e MC2) o micropolvere (MCA1 e MCA2) con grandezza rispettivamente maggiore di 100 nm e maggiore di 800 nm. Queste polveri sono state testate su *Chardonnay* e *Muscatello Casauriense* a concentrazioni tra 0,1 e 0,4 g/L e sono rimaste a contatto con il vino per cinque giorni.

Durante l'esperimento sono stati misurati costantemente diversi parametri per valutare la presenza di possibili alterazioni della qualità del prodotto dovute all'interazione dei componenti chimici di quest'ultimo con i coadiuvanti sperimentali.

In primis si è valutata la densità ottica a 420 nm, usata per valutare lo sviluppo di fenomeni ossidativi, sia immediatamente dopo il trattamento a condizioni standard (5 giorni a temperatura ambiente) sia in condizioni di invecchiamento accelerato (5 giorni a circa 35 gradi).

Non si è notata nessuna particolare variazione tra controllo e campioni trattati per quanto riguarda questo parametro.

Altri parametri analizzati sono stati il pH, l'acidità e la quantità polifenolica; anche questi sono risultati tutti inalterati rispetto ai vini di controllo non trattati, indice che questi materiali non vanno ad intaccare la qualità del vino.

Infine, è stata valutata la capacità di rigenerazione delle biglie trattate dopo cicli di lavaggio con soluzioni alcaline, dimostrando un buon ripristino delle proprietà iniziali.

Dopo i risultati ottenuti, il materiale MC1 è risultato particolarmente idoneo alla rimozione delle proteine e quindi è stato utilizzato per creare una superficie nanostrutturata dove sono massimizzati i siti di legame.

In conclusione, anche i materiali ceramici in forma di nanoparticelle si sono dimostrati una valida alternativa alla bentonite, dando buoni risultati nella rimozione delle proteine senza intaccare la qualità dei vini.

Si sta studiando una metodologia per rendere questo sistema "autonomo", cioè, attraverso il trattamento delle particelle con lavaggi alcalini in flusso continuo, per utilizzarlo a livello produttivo, in quanto per il momento è solo stato testato per piccole dosi di prodotto portando comunque a risultati migliori rispetto a tutte le metodiche tradizionali, che vanno ad intaccare negativamente la qualità del vino, non essendo selettive come le nanoparticelle studiate che invece vanno ad agire solo sulle proteine instabili lasciando inalterati tutti gli altri valori.

3.1 NANOPARTICELLE DI ARGENTO PER IL CONTROLLO DELLA CRESCITA DI BATTERI LATTICI E ACETICI NEL VINO

Uno degli aspetti più importanti nell'industria del vino, è quello di presentare prodotti stabili che non si deteriorino nel tempo e che siano sicuri a livello sanitario.

A questo scopo è sempre stata usata l'anidride solforosa (SO₂), conosciuta per la sua attività antisettica nei confronti dei batteri acetici e lattici, oltre a favorire una ben specifica popolazione di lieviti, ovvero i lieviti ellittici, i quali hanno una maggior resistenza alla SO₂, attorno a 1200 mg/L (i lieviti apiculati vengono inibiti quasi del tutto con concentrazioni di SO₂ minori di 50 mg/L)

Altro effetto della SO₂ è la sua azione antiossidante, che permette di annullare gli effetti negativi che l'ossigeno porta ai prodotti (ad esempio l'imbrunimento dei vini bianchi), oltre che aumentare l'estrazione dei fenoli dalla buccia dell'uva e migliorare la stabilità del colore nel vino.

Nonostante tutti gli effetti positivi, l'anidride solforosa può dare anche degli odori sgradevoli a causa del metabolismo del lievito, come la formazione di mercaptani (che emanano un odore molto pungente ed intenso, assimilabile a quello del gas metano), e il suo uso all'interno di cibi e bevande è sempre più discusso anche a causa dei suoi effetti negativi sulla salute umana, in quanto è in grado di causare reazioni simil-allergiche, a tal punto che negli ultimi anni è stato messo un limite alla concentrazione utilizzabile oltre al fatto che i prodotti contenenti SO₂ devono avere un'etichetta specifica (*Santos et al., 2012*).

Per questo molto importante sta diventando la ricerca di sostanze alternative che abbiano effetti simili alla SO₂ senza creare rischi per la salute.

Uno dei migliori candidati, conosciuto fin dall' antichità per le sue proprietà, è l'argento (Ag) che ha un ampio spettro d'azione nei confronti di batteri Gram-negativi e Gram-positivi.

Attualmente i nanomateriali d'argento sono usati ad esempio per la purificazione dell'acqua (*Crespo et al., 2012*) e negli ultimi tempi si sta sviluppando una metodologia che permette di usare un complesso di argento colloidale (CSC), ovvero una sottile polvere grigia con grandezza di circa 10 µm composto da un materiale inerte di supporto, sul quale si depositano le nanoparticelle di argento (10 nm) che potrebbe andare a sostituire la SO₂ nella produzione di vini bianchi e vini rossi (*Taglietti et al., 2012*).

Come si evince da diversi studi i trattamenti con CSC hanno portato ad un miglioramento dei vini sotto molti aspetti come velocità di fermentazione, grado alcolico, acidità, componenti volatili e colore (*Izquierdo-Cañas et al., 2012; Garde-Cerdán et al., 2014*).

Per quanto riguarda la velocità di fermentazione, essa è pressoché uguale tra i mosti trattati con SO₂ e CSC, con la differenza che, usando il sistema CSC, la fermentazione dei vini bianchi è iniziata prima e mancava della fase di latenza, ma dopo il secondo giorno le due fermentazioni sono proseguite contemporaneamente, terminando entrambe dopo il tredicesimo giorno.

Ciò può essere dovuto probabilmente al fatto che i lieviti trattati con CSC consumano gli zuccheri della fermentazione più velocemente.

Un'ulteriore differenza è il grado alcolico; infatti, nei mosti trattati con CSC il contenuto alcolico è minore sebbene gli zuccheri siano completamente fermentati.

Ciò dimostra come l'argento ha modificato il metabolismo dei lieviti facendo diminuire la sintesi di etanolo, fatto positivo in quanto, a causa del cambiamento climatico, negli ultimi anni si producono vini con un più alto tasso alcolico.

Anche l'acidità è stata mantenuta a bassi livelli, e un suo controllo periodico dopo oltre un anno dall'imbottigliamento ha dimostrato la capacità del CSC di controllare i batteri acetici, rendendo tale trattamento molto più vantaggioso rispetto ad altre sostanze come il lisozima che agisce solamente contro i Gram-positivi o ai PEF (campi elettrici pulsanti), i quali riducono solamente la carica batterica iniziale nel mosto (*García-Ruiz et al., 2008; Santos et al., 2012*).

Il trattamento con CSC si è dimostrato anche compatibile con la fermentazione malolattica (fondamentale per migliorare la qualità del vino). Infatti, in un esperimento sui vini rossi trattati con le nanoparticelle, è stata svolta la fermentazione malolattica mediante inoculo con *Oenococcus oeni* (Gram positivi appartenente alla famiglia delle *Leuconostocaceae*).

Si sono testate diverse concentrazioni di CSC e si è notato che a basse concentrazioni (1 µg/ml) sono in grado di ostacolare la crescita di alcune classi batteriche (Gram -) a discapito di altre (vedi *Oenococcus oeni*, cioè Gram +). Infatti, la fermentazione è avvenuta senza problemi, anzi la concentrazione di acido lattico è risultata leggermente maggiore nei vini trattati con CSC.

Per quanto riguarda i composti volatili (acetaldeide, esteri e fenoli) i vini trattati con CSC hanno mostrato una concentrazione quattro volte più bassa di acetaldeide rispetto a quelli trattati con SO₂ e questo potrebbe avere dei risultati ottimali sull'aroma del vino, visto il carattere ossidato che contraddistingue l'acetaldeide. Questo è un dato atteso, dal momento che la solforosa è una sostanza tossica anche per i lieviti, che rispondono alla sua presenza proprio sintetizzando acetaldeide.

Nella valutazione degli esteri non ci sono state sostanziali differenze, che si sono invece riscontrate nel contenuto di fenoli volatili; infatti, si è notato che i vini bianchi trattati con CSC possedevano una quantità di fenoli volatili minore rispetto ai vini trattati con SO₂, la quale differenza è molto più accentuata, circa 36% inferiore, nei vini rossi trattati con CSC (pur rimanendo in entrambi i casi con valori talmente bassi da non influire sulla qualità finale del vino).

Tale differenza è spiegabile con il fatto che nel caso dei vini bianchi, il trattamento con CSC o SO₂ viene effettuato post-pressatura e quindi viene meno l'effetto sull'estrazione della componente fenolica dal grappolo; per quanto riguarda il vino rosso, nei quali il trattamento viene effettuato pre-pressatura, si è potuto manifestare, invece, il ben noto effetto macerante della solforosa, che ha evidentemente estratto più acidi fenolici dall'uva, a loro volta precursori dei fenoli volatili.

Dopodiché si sono valutati anche il colore ed i parametri sensoriali mediante un panel di degustatori.

Nei vini bianchi trattati con CSC il colore si è presentato meno leggero con una tendenza maggiore al giallo, fatto evitato con l'utilizzo della SO₂ grazie alla sua attività anti-ossidativa. Per quanto riguarda i vini rossi trattati con CSC, il mancato effetto estraente della solforosa ha determinato anche un contenuto nettamente inferiore di antociani (quasi la metà). Per questo tali vini hanno mostrato una minore colorazione rossa, ma meno marcata rispetto a quanto atteso sulla sola base della concentrazione di antociani liberi.

Probabilmente l'effetto decolorante della solforosa nei confronti degli antociani può essere ritenuto responsabile di questo effetto.

Infine, per quanto riguarda la componente olfattiva e gustativa, dopo un attento esame, fatto con calici scuri per non farsi influenzare dal colore del vino, non sono emerse differenze significative tra i due trattamenti.

Quindi, il nuovo trattamento CSC sui vini rossi è applicabile date le poche differenze rispetto al trattamento tradizionale con SO₂, tuttavia questo trattamento è ancora sotto studio nei vini giovani a causa della minore estrazione di componente fenolica che esso comporta.

Per quanto riguarda i vini bianchi, invece, si sta sperimentando l'associazione di altre sostanze, come l'acido ascorbico, al trattamento con CSC, per risolvere il problema del colore ossidato (*Villalonga et al. 2019*).

Sempre per quanto riguarda l'aspetto antimicrobico, un altro studio è stato effettuato attraverso la creazione di AgNP (*silver nanoparticles*), cioè nanoparticelle di argento (praticamente identiche a quelle del sistema CSC visto precedentemente), ma stavolta stabilizzate (in quanto in grado di superare l'attività enzimatica batterica) con glicole polietilenico (PEG-AgNP) o con glutatione (GSH-AgNP); è stata valutata la loro capacità antimicrobica nei confronti di batteri acido lattici (LAB), di *Escherichia coli*, di *Oenococcus oeni* e su *Staphylococcus aureus* (*García-Ruiz et al. 2014*).

L'attività antimicrobica di queste particelle è stata espressa come IC₅₀ (concentrazione di AgNP necessarie per eliminare il 50% della popolazione batterica) rispettivamente al livello della fase esponenziale e fase stazionaria.

Durante gli studi le PEG-AgNP (300 µg/ml) sono risultate molto più efficaci contro i Gram-negativi, quindi contro *Escherichia coli* e batteri LAB, rispetto ai Gram-positivi, ovvero *S. aureus* e batteri acetici (AAB) e *Oenococcus oeni*, con valori paragonabili al controllo positivo (cioè metabisolfito di potassio, intorno 500 µg/ml).

Per quanto riguarda le particelle di GSH-AgNP si sono mostrate particolarmente efficaci nei confronti solamente di *Oenococcus oeni*.

Una tale differenza di comportamento verso i differenti batteri si può associare alla diversa composizione della parete batterica tra Gram positivi e negativi, in quanto i primi presentano una parete molto spessa formata per la maggioranza da peptidoglicano, mentre i secondi hanno uno strato di peptidoglicano molto più sottile circondato da una membrana fosfolipidica che è caratterizzata dalla presenza di porine, piccoli canali che permettono l'entrata di antibiotici all'interno della cellula.

Inoltre, i due prodotti hanno un'efficienza così differente probabilmente a causa di una diversa interazione tra le superfici stabilizzanti e le porine del peptidoglicano.

È stato valutato anche il cambiamento di vitalità (rapporto tra batteri vivi e morti rispetto all'intera popolazione) dei ceppi batterici LAB e AAB dopo incubazione con i due derivati di AgNP.

Facendo riferimento alla figura 4, si sono incubati sia Batteri Gram + (fig A) che Gram - (fig. B) con complessi PEG-AgNP e GSH-AgNP.

Nel caso del complesso PEG-AgNP, il sistema mostra una maggiore attività antimicrobica nei confronti dei batteri Gram - (vedi confronto fig. 4A e 4B) come si può evincere da una acquisizione di colore rosso dei batteri nel caso della fig B (causata dal legame ad un colorante che si lega solo alle cellule morte).

Ciò è dovuto ad un'alterazione del sistema di trasporto o di produzione energetica e alla modificazione del pathway metabolico essenziale per la vitalità batterica (caratteristica di altri antimicrobici già conosciuti).

Nel caso del sistema GSH-AgNP, l'attività antimicrobica non ha evidenziato differenze di efficacia tra le classi batteriche, rendendolo non adatto al risultato finale ricercato.

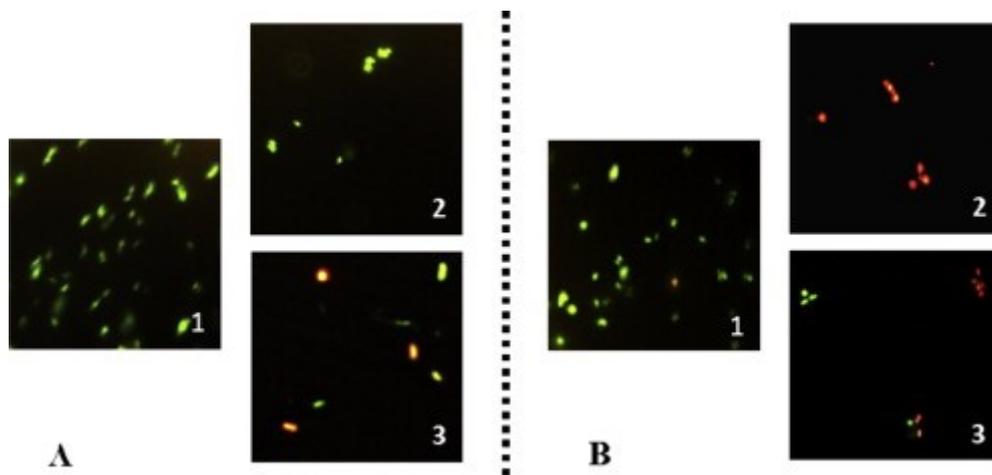


Fig. 4: Gram+ (controllo) non trattato 1A; trattamento Gram+ con complesso PEG-AgNP 2A; trattamento Gram+ con complesso GSH-AgNP 3A. Gram- (controllo) 1B; trattamento Gram- con complesso PEG-AgNP 2B; trattamento Gram- con complesso GSH-AgNP 3B

Colore verde corrisponde ad un'integrità della membrana batterica; rosso corrisponde ad una degradazione della membrana plasmatica associata a morte cellulare

Per concludere tutti questi risultati hanno confermato l'efficacia delle nanoparticelle d'argento associate a polimeri nel controllo microbiologico come sostituto dell'anidride solforosa, visto che hanno dimostrato un IC_{50} assimilabile al metabisolfito di potassio (commercialmente utilizzato come additivo), anche se per l'ultimo studio riportati serviranno altre valutazioni per assicurarsi che non influenzino negativamente la qualità sensoriale dei vini.

Inoltre, si stanno effettuando ulteriori studi per sviluppare tecniche per il recupero di tali particelle dopo la loro attività antimicrobica e prima della messa in commercio del prodotto.

4.1 BIOSENSORI ELETTROCHIMICI MONOUSO PER IL RILEVAMENTO DEL CONTENUTO TOTALE DI LIEVITO ATTRAVERSO NANOPARTICELLE CORE-SHELL

Il mondo del vino è un'industria in continua espansione e sta prendendo importanza sempre di più lo studio di nuovi metodi di analisi affidabili.

In particolare, si stanno studiando nuovi approcci per quantificazione, identificazione e rilevamento dei lieviti, soprattutto a quelli che concorrono in maniera negativa alla qualità del vino, cioè lieviti classificati come "inquinanti" che altererebbero le proprietà organolettiche del prodotto.

Nei vini rossi, la più comune fonte di contaminazione è *Brettanomyces bruxellensis* (*Brett*) in quanto già a basse concentrazioni può dare problemi olfattivi a causa della produzione di etilfenoli, molecole chimiche che ricordano l'odore del pelo bagnato di animale (nota Brett).

I metodi usati per identificare e quantificare la presenza di specifici lieviti, si basano su colture microbiologiche; il problema di tali metodi è che alcuni batteri come *Brett* crescono troppo lentamente e ciò non permette di prendere decisioni in tempi ottimali durante la fermentazione.

Per ovviare a tale problema, si sono costruiti dei biosensori amperometrici (strumenti economici, portatili e di facile utilizzo), potenziati mediante l'utilizzo di elettrodi serigrafati (superfici biosensibili in grado di catturare e identificare specifiche molecole associate a specifici lieviti. Si sfrutta la capacità magnetica dei sensori e da ciò si trae vantaggio perché sensibile a basse concentrazioni ed a soli specifici bioelementi).

In questo caso, i biosensori catturano delle cellule di lievito mediante l'uso di nanoparticelle core-shell supermagnetiche dette *NanoCaptors* ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) funzionalizzate mediante la copertura della superficie con specifici biorecettori, ovvero la Concavalina A (*Con A*) per l'interazione aspecifica con tutti i lieviti (permette di fare una stima della quantità dei lieviti nel vino in quanto interagisce con le mannoproteine presenti sulla superficie del lievito) o con anticorpi specifici contro il lievito Brett per avere invece un'interazione lievito-specifica. Per la rilevazione del segnale, vengono aggiunti dei complessi coadiuvati (*ConA* con enzima *horseradish peroxidase* (*HRP*)) che si legheranno alle particelle magnetiche in proporzione rispetto al numero di cellule di lievito fissate sulla loro superficie.

Una volta che le particelle sono state attratte magneticamente sulla *NanoCaptors*, si aggiunge il substrato H_2O_2 /idrochinone che grazie alla perossidasi rilascia un segnale luminoso rilevato da specifici amperometri.

Più è forte il segnale e più complessi *ConA*-lieviti sono presenti come riportato in figura 5.

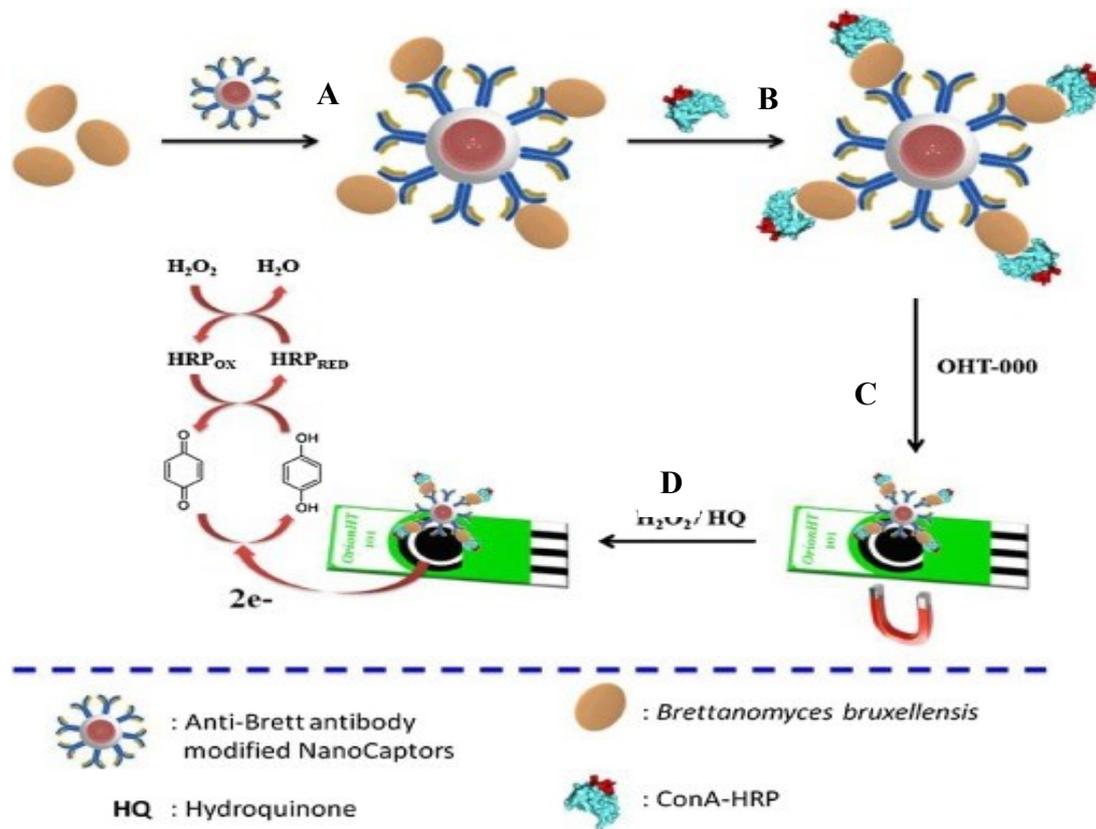


Fig. 5: descrizione del processo di cattura e rilevazione della quantità dei lieviti (in questo caso si fa riferimento ai Brett). Si può notare come ci sia l'interazione dei lieviti con gli anticorpi (A) e successivamente con il complesso ConA-HRP (B). Successivamente il complesso formatosi viene attirato magneticamente sulla superficie delle NanoCaptors sulla quale andrà a formare dei legami covalenti (C). All'aggiunta del substrato si sviluppa un segnale rilevato dagli amperometri (D)

L'utilizzo di NanoCaptor porta con sé molti vantaggi, come poter evitare di usare strumenti quali le centrifughe che molte volte influenzano negativamente i materiali biologici. Permettono inoltre di concentrare l'analita eliminando le molecole interferenti, facendo così aumentare la sensibilità e selettività dell'analisi.

Sono stati valutati i biosensori su campioni di vino rosso commerciale non diluito, tamponato (a pH fisiologico per permettere l'azione degli anticorpi) e filtrato con una membrana a 0,45 μm per evitare la presenza di lieviti autoctoni. Su questo vino sono state fatte aggiunte di quantità note di *Brettanomyces*.

È stato testato il sensore Ab-B (il biosensore per Brett) in 10 campioni diversi, prima in solo buffer di lavoro ottenendo un comportamento lineare. Successivamente è stato testato anche in campioni di vino rosso commerciale non diluito, ottenendo anche in questo caso un comportamento lineare (figura 6A).

Dato che non è presente una differenza al 95% di confidenza nella pendenza delle curve, si può dedurre che è non presente nessuna alterazione sui risultati a causa della matrice.

Inoltre, si è rilevato che il metodo presenta una sensibilità sicuramente inferiore alla soglia di 10^3 CFU/ml, livello al quale Brett causa danni al vino.

Quindi si può supporre che tali biosensori possano essere un valido strumento per la rilevazione di tale lievito nei vini commerciali.

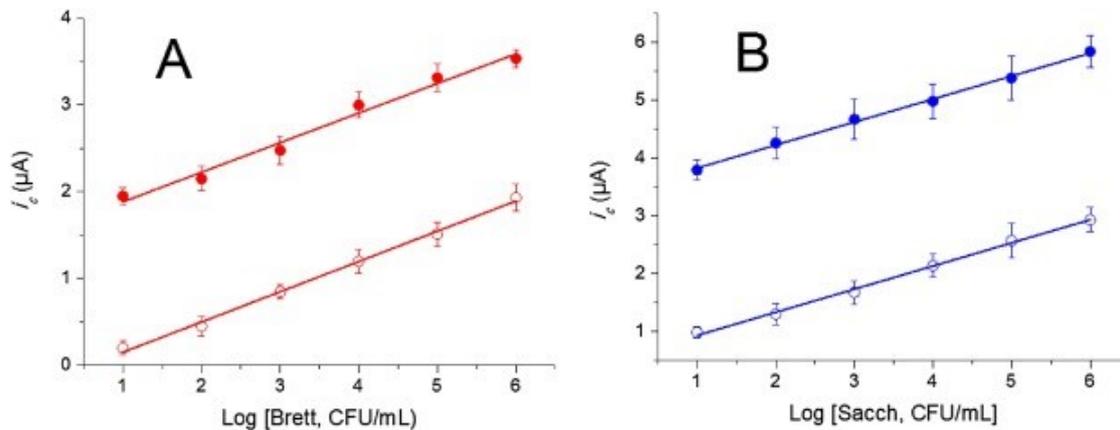


Fig. 6: curve di calibrazione ottenute con biosensori amperometrici in soluzioni tampone e in vino rosso commerciale per Brett (sensore Ab-B figura A) e per Saccharomyces (sensore ConA-Y, figura B). I pallini vuoti corrispondono al buffer di lavoro mentre quelli vuoti corrispondono al prodotto testato.

Nella figura B è riportato lo studio fatto questa volta con il sensore Con A-Y (usando come riferimento il lievito *Saccharomyces*) ottenendo gli stessi risultati che si erano registrati per l'altro sensore, confermando anche per questo la sua utilità.

Successivamente è stata valutata la capacità di questi biosensori di essere selettivi nei confronti di *Brettanomyces bruxellensis* anche in presenza di altri lieviti che interferiscono nelle misure.

Si è osservato che il sensore Ab-B ha riconosciuto perfettamente e in maniera selettiva il *Brettanomyces*, a conferma dell'efficacia dell'anticorpo immobilizzato su di esso.

D'altra parte, il sensore Con A-Y ha riconosciuto tutti i ceppi di lieviti allo stesso modo, questo a causa del fatto che questa lectina è in grado di riconoscere le mannoproteine presenti su tutte le superfici dei lieviti, dimostrando che quindi sarebbe adatto per la conta totale dei lieviti nei diversi campioni (Figura 7).

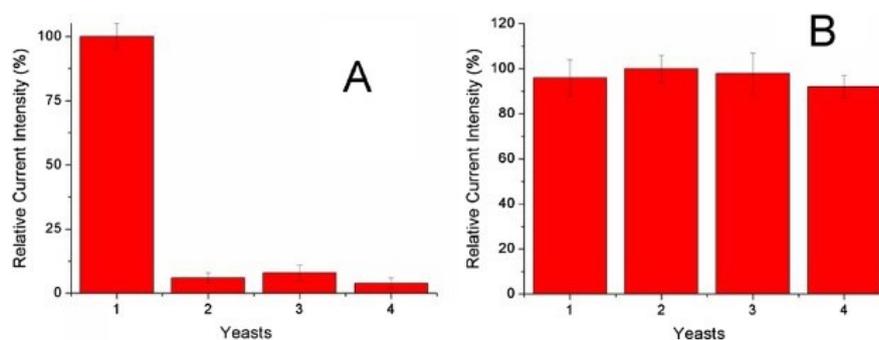


Fig. 7: Selettività biosensore Ab-B (A) e del biosensore Con A-Y (B) nei confronti di *B. bruxellensis* (1), *S. cerevisiae* (2), *thermal inactivated S. cerevisiae* (3) and *P. pastoris* (4)

5.1 BIOSENSORI PER L'ANALISI DI SOSTANZE CONTAMINANTI

Come già detto nel capitolo precedente, nell'industria del vino è sempre più importante cercare nuovi metodi per la rilevazione di sostanze specifiche, che siano selettivi, economici, sensibili e facili da usare.

Molto si sta facendo nel campo dei biosensori considerati come un'ottima alternativa ai metodi classici, e uno studio ha creato un nuovo aptasensore elettrochimico che usa elettrodi serigrafati per il rilevamento della micotossina ocratossina A (OTA) (Barthelmebs et al. 2011). Gli aptameri sono acidi nucleici funzionali (DNA o RNA), selezionati da librerie di oligonucleotidi, che sono in grado di legarsi a specifiche molecole come proteine o altri composti organici.

Sono sintetizzati *in vitro* e non richiedono colture cellulari o animali e inoltre la loro versatilità e le loro piccole dimensioni li portano ad avere dei vantaggi nei confronti degli anticorpi oltre che a consentire una maggiore densità superficiale rispetto all'utilizzo di recettori di tipo proteico.

L'ocratossina A è una micotossina prodotta da *Penicillium* e *Aspergillus* ed è considerata come un potenziale cancerogeno per l'uomo; infatti, nell'Unione Europea sono stati introdotti dei limiti di OTA nel vino intorno ai 2 µg/kg (EC legge 26 Febbraio 2005, n. 123: "Regolamento della Commissione Europea che modifica il regolamento (CE) n. 466/2001 per quanto riguarda l'ocratossina A)

Essendo una molecola molto piccola, è difficile creare degli anticorpi contro di essa, ma grazie alla tecnologia è stato possibile produrre degli anticorpi specifici che sono attualmente alla base dei principali sistemi di analisi dell'OTA.

Da poco sono stati sviluppati dei protocolli nei quali si sfruttano aptameri legati a degli enzimi competitivi (ELAA, *enzyme linked aptamer assay*) per la rilevazione di OTA nel vino.

Tali molecole sono state adattate per creare degli aptasensori che combinano i vantaggi del rilevamento elettrochimico, ovvero di essere semplice e veloce, con un monitoraggio in tempo reale del bioriconoscimento, robusto e stabile.

Da precedenti studi, si è dimostrato che l'aptamero del DNA 1.12, stabilizzato su nanosfere super magnetiche, può fungere da potente elemento di bioriconoscimento nei confronti di OTA.

Sono stati testati due approcci, quello diretto e quello indiretto (Barthelmebs et al. 2011).

Nelle prove indirette OTA-MB (OTA immobilizzato su nanoparticelle magnetiche) è stato immobilizzato all'interno di pozzetti.

Quindi è stata aggiunta una soluzione di Apt-HRP (molecola di aptamero coniugata a *horseradish peroxidase*) che lega specificatamente l'OTA immobilizzato, insieme con quantità crescenti di OTA in forma libera (test competitivo).

È stato osservato che l'assorbanza aumentava con l'aumentare di OTA-MB in rapporto con la diluizione di Apt-HRP, ed è stato deciso un rapporto di diluizione 1:8 di Apt-HRP su 150 µL di OTA-MB per ottenere i risultati migliori.

Nel test diretto invece sono gli Apt-HRP ad essere immobilizzati sulle nanoparticelle magnetiche all'interno dei pozzetti e la molecola OTA ad interagire con tale complesso. La misura è avvenuta grazie alla competizione per il legame con l'aptamero immobilizzato tra la OTA libera e una OTA-ALP (*alkaline phosphatase avidin*): in questo caso il rapporto di diluizione usato è stato di 1:4 di OTA-ALP su 100 μ L di Apt-HRP (figura 8).

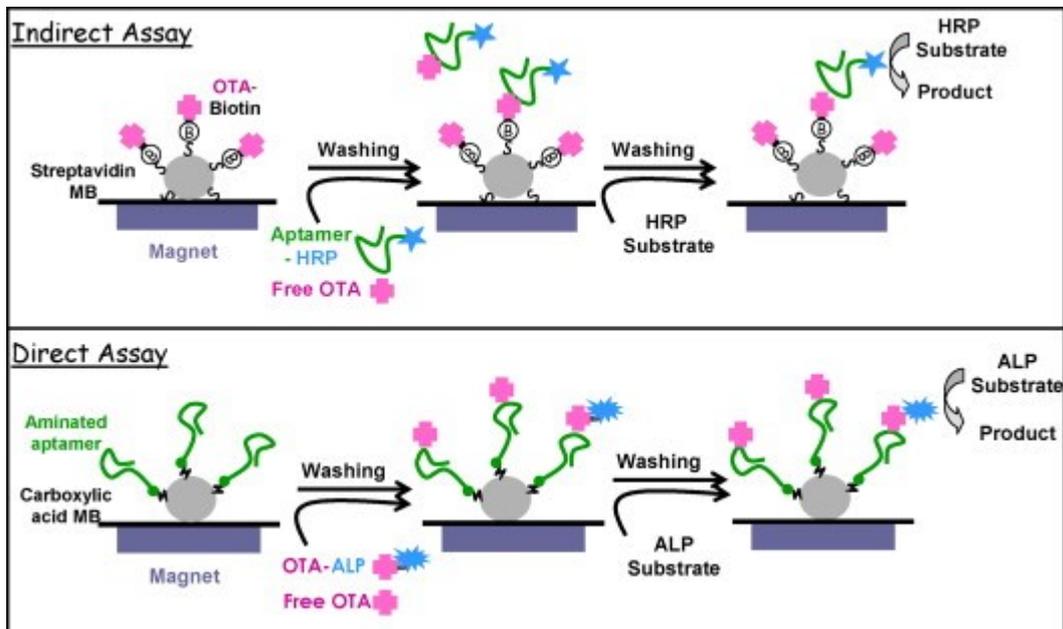


Fig. 8: Schematizzazione delle procedure indirette e dirette per determinazione dell'OTA: nel saggio indiretto si studia l'interazione tra OTA immobilizzato sulle biglie magnetiche, OTA libero e l'aptamero-HRP. Nel saggio diretto si studia l'interazione tra OTA-ALP, OTA libero e l'aptamero-HRP associato alle biglie magnetiche. In entrambi i casi si utilizzano enzimi marcatori (HRP e ALP) che sviluppano segnali rilevabili

Nella misurazione indiretta il segnale deriva dall'azione dell'enzima HRP e questo potrebbe costituire un problema, nel caso in cui esso fosse assorbito in maniera aspecifica dall'elettrodo serigrafato.

Quindi la sua riproducibilità è stata testata con cinque elettrodi diversi mantenendo costante la concentrazione di OTA (2 ng/mL). Sono stati rilevati in ogni caso valori inferiori rispetto ai metodi colorimetrici, a conferma della maggiore sensibilità dei metodi elettrochimici.

Nel metodo diretto invece a generare il segnale è l'enzima ALP e anche in questo caso, come in precedenza, è stata confermata la maggiore sensibilità degli aptasensori rispetto ai metodi colorimetrici.

Inoltre, è stato dimostrato come il metodo diretto con ALP rispetto all'indiretto con HRP sia migliore (IC_{50} attorno a 2,8 ng/mL), spiegabile con il fatto che nel caso diretto si può utilizzare una quantità inferiore di aptamero-HRP e di conseguenza si abbassa notevolmente la formazione di legami aspecifici.

Un ulteriore passaggio è stato studiare la stabilità dell'elettrodo, la quale si è dimostrata superiore alle 4 settimane senza perdita dell'attività, dimostrando una durata e una resistenza al calore molto più grande di un anticorpo.

Infine, gli aptasensori sono stati testati su campioni di vino, dimostrando che l'attività del ALP era simile se non uguale a quella misurata nelle prove con le soluzioni tampone confermando che la matrice vino non ha ripercussioni sugli aptasensori e quindi dimostrando la possibilità del loro effettivo utilizzo in questo campo (figura 9)

OTA added (ng/L)	OTA found (ng/L)	R.S.D. (%)	R.E. (%)	Recovery (%)
0.5	0.48	5	4	96
1	0.97	4.5	3	97
2	1.88	3	6	94
5	4.7	3.5	6	94
10	9.8	4.6	2	98

%R.E. (relative error) = [(true value – measured value)/true value] × 100; %R.S.D. (relative standard deviation) = standard deviation/mean × 100; n = 3.

Fig. 9: percentuale di recuperi di OTA mediante saggio diretto usando il sistema di aptameri stabilizzati su nanoparticelle magnetiche.

Per concludere quindi è stato dimostrato come gli aptasensori possano entrare nell'industria del vino, come alternativa per l'analisi di campioni contaminati portando benefici grazie alla possibilità di creare anticorpi specifici.

Altri fattori positivi sono la loro economicità, velocità, sensibilità e semplicità, rispetto a molte altre tecniche (*Barthelmebs et al. 2011*) come l'utilizzo di colonne di immunoaffinità che sono molto costose, e richiedono una certa preparazione e tempo per effettuare le analisi.

6.1 QUANTIFICAZIONE DELL'ISTAMINA ATTRAVERSO NANOPARTICELLE COME ELEMENTI DI RICONOSCIMENTO

Come già affermato nei due capitoli precedenti, negli ultimi anni è stato fatto molto, mediante l'aiuto delle nanotecnologie, per il miglioramento della sensibilità delle diverse tecniche nella ricerca e nella quantificazione di determinate sostanze contaminanti dei vini, per poterle utilizzare come alternative ai metodi tradizionali.

A tal proposito è stato creato un ulteriore sensore potenziometrico, oltre a quelli già citati, che utilizza nanoparticelle create attraverso *imprinting* in fase solida (cioè è stata creata una "tasca di alloggiamento" molecolare su una superficie solida), per il rilevamento dell'istamina.

L'istamina è un'ammina (N-R₃) biogena che si forma in conseguenza alla decarbossilazione dell'istidina attraverso enzimi decarbossilasi, e la sua presenza porta a un deperimento qualitativo del prodotto in cui si trova (vedi Fig. 10).

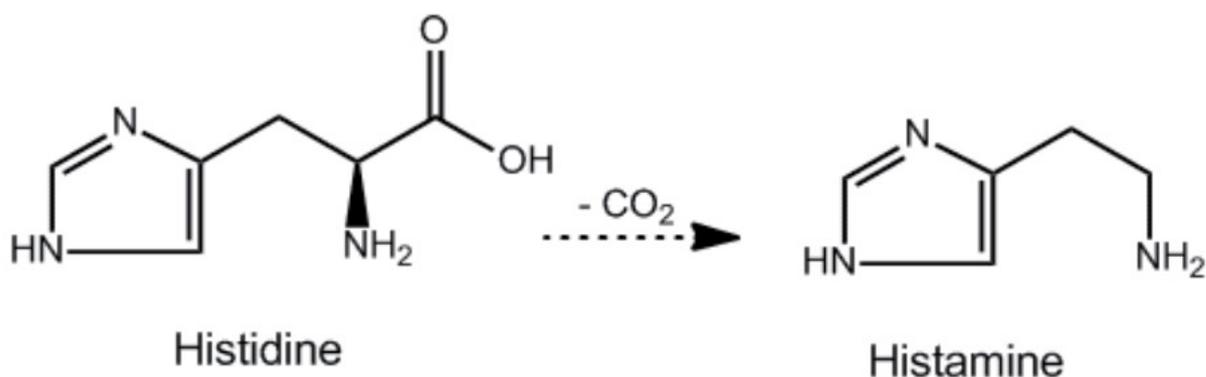


Fig. 10: decarbossilazione (-CO₂) dell'istidina per la formazione di istamina. (P. Cattaneo, 2011)

Le ammine biogene si trovano nei vini in conseguenza alla fermentazione malolattica o dall'invecchiamento del prodotto.

L'istamina in particolare è una sostanza che può causare intolleranza al vino e se si trova in alte concentrazioni negli alimenti può dare il cosiddetto *avvelenamento da istamina*.

Il controllo delle ammine biogene e dell'istamina richiede delle metodiche accurate e affidabili perché il suo livello può essere un indice di qualità e freschezza di determinati alimenti.

Solitamente sono i metodi cromatografici i più usati, ma necessitano di personale formato e apparecchiature da laboratorio (principale problema delle tecniche tradizionali).

A causa dell'elevato potenziale di ossidazione dell'istamina e dei problemi di stabilità, i biosensori finora erano ancora stati studiati poco, ma mediante l'ausilio della tecnologia di imprinting molecolare, si potrebbe aprire una finestra innovativa che permetterebbe di superare i problemi appena citati.

Infatti, i polimeri a impronta molecolare (MIP) posso essere usati per creare dei sensori che misurano l'istamina in tempo reale, ma presentano degli svantaggi come: processo di produzione molto lungo, distribuzioni eterogenee di siti di legame che aumentano la percentuale di legami aspecifici e quindi di risultati falsificati (*Gomez-Caballero et al. 2013*). Per ovviare a tali problemi si è sviluppata una nuova tecnica, sulla falsariga del metodo MIP, ma che sfrutta le nanoparticelle al posto dei polimeri (MIN) per aumentare notevolmente la specificità dato che mimano il ruolo dei recettori.

Nella sintesi delle MIN (come si vede nella figura 11) l'acido metacrilico è stato utilizzato come monomero funzionale grazie alla sua capacità a formare legami elettrostatici con composti come le ammine.

Inoltre, questa tecnica non si basa su molecole "stampo" libere in soluzione, come succede normalmente, ma fissate su delle perline di vetro che fanno da supporto solido.

Le particelle legate con bassa affinità vengono eliminate tramite lavaggio con acqua fredda e successivamente, mediante riscaldamento (diminuendo la forza di associazione), si eluiscono le molecole ad alta affinità dal complesso MIN.

Quindi grazie a questa separazione per affinità alla fine vengono raccolte solo quelle particelle con un'affinità particolarmente alta nei confronti della molecola bersaglio.

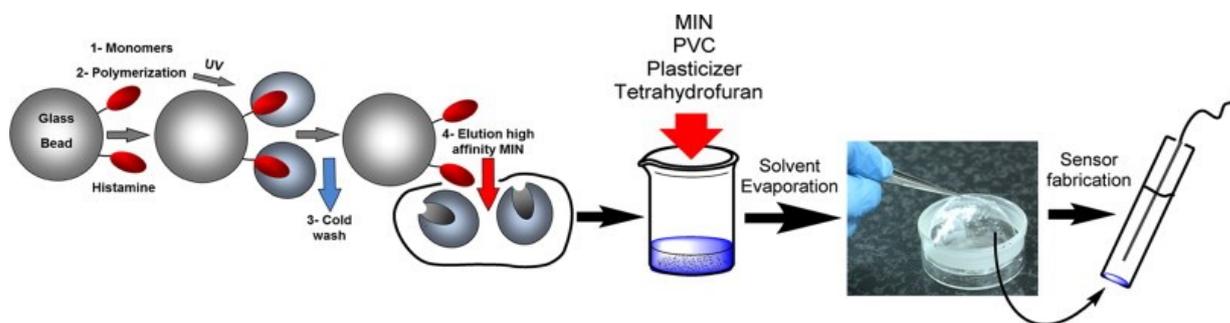


Fig. 11: Schematizzazione del processo di sintesi di MIN: il monomero viene polimerizzato sulla superficie delle biglie di vetro (1-2) mediante irradiazione con raggi UV. Si esegue un lavaggio con acqua fredda per eliminare le particelle con bassa affinità al complesso (3) e successivamente si eluiscono con riscaldamento (4). Le MIN vengono quindi incorporate in un film PVC che si utilizza direttamente come sensore.

Il rilevamento dell'istamina da parte del sensore si basa sulla sua forma cationica in quanto il sensore si basa su un principio elettrostatico; quindi, di fondamentale importanza per quest'analisi è il controllo del pH a valori ottimali.

Come è evidenziato dalla figura 10, i risultati migliori del sensore si ottengono con pH acidi (3 e 5), cioè quando la sostanza è ionizzata, mentre con valori più basici i valori potenziali ottenuti sono più bassi e questo molto probabilmente a causa della deprotonazione ($-H^+$) delle sostanze in gioco.

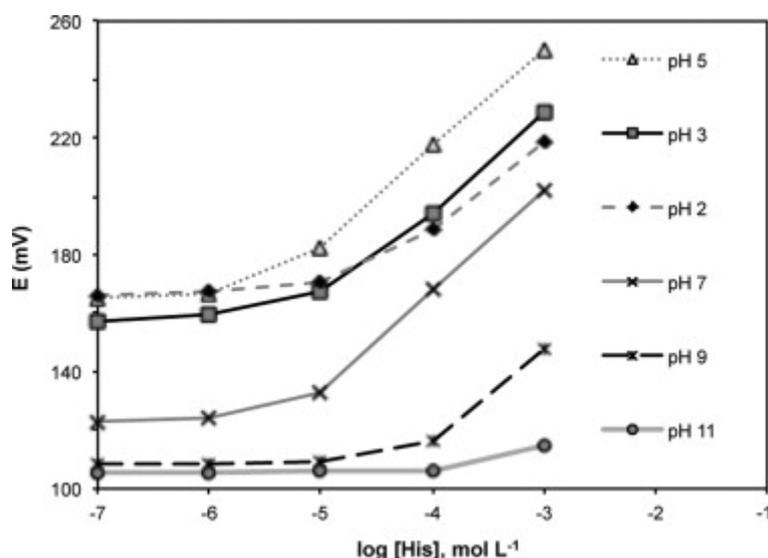


Fig. 12: Effetto del pH sulla rilevazione di istamina: segnale rilevato dal sensore (mV) su concentrazione di istamina in base al valore di pH

Uno dei vantaggi maggiori di questo sensore è quello di riuscire a misurare e valutare il livello di istamina in un campione anche se questo ha alti livelli di altre ammine biogene, come succede nel vino.

Per misurare l'effettiva selettività del sensore, si è utilizzato il metodo dell'interferenza fissa (FIM) definita dal sistema IUPAC e che utilizza una miscela di componenti, dove il segnale è misurato in una soluzione nella quale l'analita ha una concentrazione variabile mentre lo ione interferente presenta una concentrazione costante.

La selettività del sensore si è dimostrata migliore a pH 5 che a 3 e si è visto come la maggior parte delle specie non interferiscono con la risposta del sensore, anche se alcune ammine

hanno dimostrato blanda capacità di interferenza; bisogna però prendere in considerazione che nel vino è presente anche l'etanolo ad una quantità sufficiente per inibire le interazioni idrofobiche con questi composti e ridurre quindi la loro interferenza.

A livello pratico, nel vino, probabilmente a causa della presenza elevata di ioni carichi positivamente come il potassio, si è notato un effetto mascherante che porta ad un aumento del limite di rilevabilità e quindi si è optato per una diluizione 1:5 dei campioni per avere il giusto compromesso tra rivelazione di istamina e riduzione dell'effetto mascherante.

I risultati ottenuti su campioni a concentrazione nota, hanno dimostrato che sfruttando tale metodo si ha un recupero di istamina pari al 99% (*Basozabal et al. 2014*).

Quindi per concludere è stato creato un sensore potenziometrico basato su nanoparticelle a impronta molecolare, che è in grado di misurare il livello di istamina in campioni.

I risultati ottenuti hanno dimostrato la possibilità di usare nanoparticelle ad alta affinità che permettono un'analisi con tempi di risposta molto brevi, e la possibilità dei sensori robusti, portatili e soprattutto affidabili da poter utilizzare in campo agroalimentare.

7.1 DETERMINAZIONE ANIDRIDE SOLFOROSA NEL VINO TRAMITE NANOPARTICELLE MAGNETICHE

All'interno del vino la determinazione del solfito è di vitale importanza in quanto è utilizzato all'interno di molti alimenti e bevande come antiossidante e antibatterico.

Il solfito è causa anche di reazioni citotossiche, è in grado di interagire con alcune vitamine come la tiamina, oltre al fatto che nei mitocondri di tutti gli eucarioti è presente la solfito ossidasi (SOX), la quale può causare danni neurodegenerativi se stimolata in eccesso.

La Food & Drug Administration ha deciso che nei prodotti che contengono solfiti deve essere obbligatoriamente segnata la loro presenza quando la concentrazione è più di 10 mg/Kg nei cibi o più di 10 mg/L nelle bevande.

Per la determinazione dei solfiti sono presenti varie tecniche come spettrofotometria o HPLC, ma tutte queste tecniche mancano di sensibilità e precisione, oltre al fatto che richiedono una preparazione del campione costosa e complicata.

Molto importante diventa quindi trovare un metodo di biorilevamento di questa sostanza, in modo da avere un'analisi rapida, selettiva e non troppo costosa.

Le nanoparticelle, grazie al loro effetto su piccola scala e buone proprietà di biocompatibilità, stanno attirando molto l'attenzione per ovviare alle limitazioni sopra citate.

In questo particolare caso, dato che questi biosensori, normalmente basati su enzimi, presentano un basso limite di rilevamento a causa del basso flusso elettronico e della bassa stabilità enzimatica, si stanno prendendo in considerazione nanoparticelle magnetiche, cioè particelle rivestite da metalli ossidanti che incrementano la robustezza, la stabilità enzimatica, e aumentano la superficie di interazione (*Rawal et al. 2012*).

Tra i vari materiali, per le loro proprietà, sono molto interessanti le particelle di ferro ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GNPs}$) rivestite di oro, che sono più stabili all'aria in quanto l'oro protegge dall'ossidazione.

È stato quindi compiuto uno studio dove si mirava alla costruzione di un elettrodo $\text{SOX}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GNPs}/\text{Au}$.

Questo elettrodo si basa sull'immobilizzazione della solfito ossidasi (SOX) su $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GNPs}/\text{Au}$ con formazione di legami ammidici tra il $-\text{COOH}$ e i gruppi $-\text{NH}_2$ dell'enzima (come si vede in figura 13).

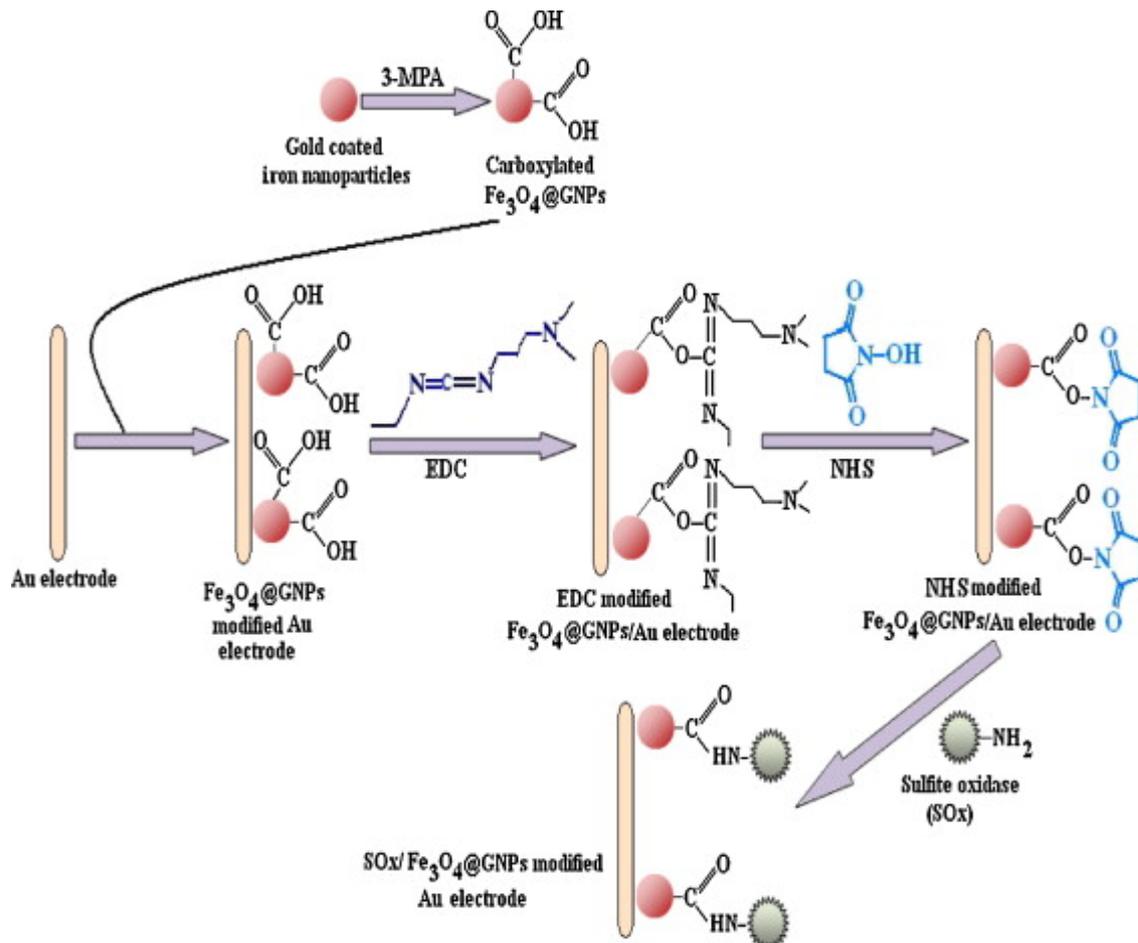


Fig. 13: Rappresentazione schematica della fabbricazione di $\text{SOX}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GNPs}/\text{Au}$ catalizzata dalla molecola EDC e NHS

Nella figura 14 è stata esaminata la deposizione elettrochimica di $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GNPs}$ sulla superficie di Au.

Si può notare che non vi è la presenza di nessun picco per l'elettrodo Au nudo (*curva a*), mentre sono presenti dei picchi di ossidazione per quanto riguarda $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GNPs}$ a +125 mV (*curva b*) e a +200 mV per $\text{SOX}/\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GNPs}/\text{Au}$ (*curva c*).

I picchi della *curva b* sono dovuti dall'aumento di corrente ottenuto dopo la deposizione di $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GNPs}$.

Mentre i picchi della *curva c* sono dovuti all'ossidazione del solfato, prodotto da idrolisi del solfito, dovuto all'azione della SOX immobilizzata e questi picchi dimostrano le proprietà analitiche dell'elettrodo modificato.

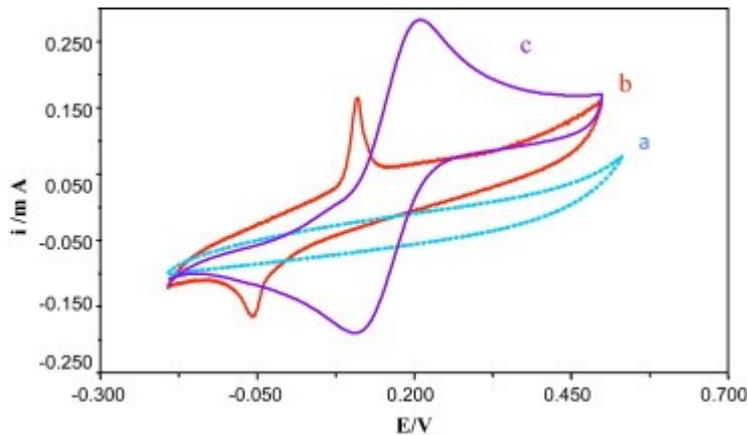
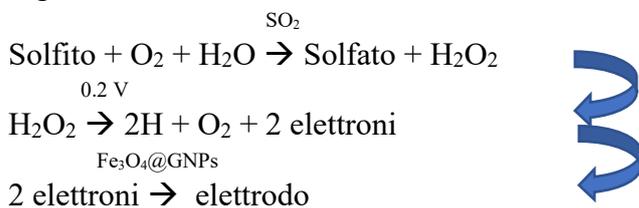


Fig.14: Rappresentazione grafica dei picchi dell'elettrodo modificato

Nella misurazione della risposta del biosensore di solfito amperometrico entrano in gioco le seguenti reazioni:



Attraverso il SEM (microscopio a scansione) è stata studiata la morfologia degli elettrodi.

L'elettrodo Au nudo si è mostrato con una superficie omogenea mentre l'elettrodo rivestito da Fe₃O₄@GNPs mostrava una superficie porosa granulare.

L'elettrodo ha presentato delle caratteristiche ottimali a pH 8,5 e a una temperatura di 35°C con limiti di rilevabilità attorno a 0.15 μM, valori minori rispetto ai metodi tradizionali a conferma della sensibilità ed efficacia di questo elettrodo.

Dopodiché è stato eseguito un confronto tra questo elettrodo e i metodi tradizionali nella determinazione del contenuto di solfiti su 15 vini rossi, ottenendo una regressione lineare pari a 0,96, a conferma dell'elevata precisione dell'elettrodo.

Lo studio è stato effettuato anche in presenza di sostanze interferenti, ottenendo interferenze trascurabili, dimostrando anche la notevole versatilità di questo elettrodo.

Per riassumere l'uso dell'elettrodo SOX/Fe₃O₄@GNPs/Au ha portato degli ottimi risultati in termini di risposta quasi immediata (2 s), più alta stabilità allo stoccaggio (120 giorni), nessuna interferenza da parte di altre sostanze e intervallo lineare maggiore (0,5 – 1000). Tutto questo dimostra la ottima capacità di questo elettrodo che potrebbe essere infine usato per migliorare le prestazioni di molti altri biosensori.

CONCLUSIONE

In questo elaborato sono stati riportati diversi esempi di come le nanotecnologie stiano sempre più prendendo piede nella nostra vita quotidiana, soprattutto nell'industria alimentare.

In particolare, sono state analizzate diverse tecnologie, che sfruttano le nanoparticelle nella analisi qualitativa, quantitativa e nella rilevazione di problematiche derivanti dallo sviluppo di microrganismi indesiderati che portano al deperimento della qualità del vino.

Tutte le nanotecnologie analizzate in questo elaborato si sono dimostrate efficaci nella loro funzione, a volte riportando anche risultati migliori rispetto a quelli ottenuti con le tecniche tradizionali, a conferma dei notevoli passi in avanti che hanno fatto gli studi in questo ambito. È stata dimostrata quindi la possibilità concreta del loro utilizzo all'interno della filiera produttiva e col passare del tempo si avranno sempre scoperte nuove e migliorie in questo ambito con nuove tecnologie che andranno sempre più a sostituire ed affiancare quelle tradizionali.

Bibliografia

1. Winqvist F., Wide P., Lundström I. **An electronic tongue based on voltammetry.** *Anal. Chim. Acta.* 1997;357:21–31.
2. C. Pérez-Ràfols, N. Serrano, C. Ariño, M. Esteban, and J. M. Díaz-Cruz. **Voltammetric Electronic Tongues in Food Analysis;** *Sensors (Basel)* 2019 Oct; 19(19): 4261.
3. X. Cetó; A. González-Calabuig; N. Crespo; S. Pérez; J. Capdevila; A. Puig-Pujol; M. Del Valle. **Electronic tongues to assess wine sensory descriptors.** *Talanta* 23 September 2016, S0039-9140(16)30725-1
4. A. Mierczynska-Vasilev, P. Boyer, K. Vasilev, P. A. Smith. **A novel technology for the rapid, selective, magnetic removal of pathogenesis-related proteins from wines.** *Food Chemistry I* October 2017; Volume 232, Pages 508-514
5. Høj, P. B., Tattersall, D. B., Adams, K., Pocock, K. F., Hayasaka, Y., van Heeswijck, R., et al. **The ‘haze proteins’ of wine – A summary of properties, factors affecting their accumulation in grapes, and the amount of bentonite required for their removal from wine.** *In Proceedings of ASEV 50th anniversary meeting, Seattle, Washington, USA* (pp. 149–154). (2000). Davis, California: American Society of Enology and Viticulture
6. Vasilev, K., Michelmore, A., Martinek, P., Chan, J., Sah, V., Griesser, H. J., et al. **Early stages of growth of plasma polymer coatings deposited from nitrogen-and oxygen-containing monomers.** *Plasma Processes and Polymers* (2010)., 7, 824–835.
7. Hsu, J. C., & Heatherbell, D. A. (1987). **Heat-unstable proteins in wine. Characterization and removal by bentonite fining and heat treatment.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 6–10.
8. G. P. Parpinello, **Nuovo dispositivo per la stabilizzazione in flusso continuo del vino bianco.** Università di Bologna (I), *infowine*. Pubblicazione: 04/12/2019
9. K. Jun Sung, K. Eunye, N. Y. Kyeong, K. Jong-Ho, P. Sung Jin, L. Hu Jang, K. So Hyun, P. Young Kyung, P. Yong Ho, H. Cheol-Yong, K. Yong-Kwon, L. Yoon-Sik, J. Dae Hong, C. Myung-Haing. **Antimicrobial effects of silver nanoparticles.** *Nanomedicine* 2007 Mar; 3(1):95-101.

10. A. García-Ruiz, M.C. Díaz-Maroto, M. S. Pérez-Coello, M.V. Moreno-Arribas. **Novel biocompatible silver nanoparticles for controlling the growth of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in wines.** *Food Control* April 2015; 50:613-619.
11. Santos, M.C., Nunes, C., Saraiva, J.A., & Coimbra, M.A. **Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: Review of their potentialities and limitations.** *European Food Research and Technology* (2012),234, 1-12.
12. Crespo, J., García-Barrasa, J., López-de-Luzuriaga, J.M., Monge, M., Olmos, M.E., Sáenz, Y., & Torres, C. **Organometallic approach to polymer-protected antibacterial silver nanoparticles: optimal nanoparticle size-selection for bacteria interaction.** *Journal Nanoparticle Research* (2012), 14, 1281-1293.
13. Taglietti, A., Diaz Fernandez, Y.A., Amato, E., Cucca, L., Dacarro, G., Grisoli, P., Necchi, V., Pallavicini, P., Pasotti, L., & Patrini, M. **Antibacterial activity of glutathione-coated silver nanoparticles against Gram positive and Gram-negative bacteria.** *Langmuir* (2012), 28, 8140-8148
14. Garde-Cerdán, T., López, R., Garijo, P., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A. R., López-Alfaro, I., & Santamaría, P. **Application of colloidal silver versus sulfur dioxide during vinification and storage of Tempranillo red wines.** *Australian Journal of Grape and Wine Research* (2014), 20, 51-61.
15. Izquierdo-Cañas, P.M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., & Gómez-Alonso, S.. **Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking.** *Food Control*, 23, 73-81
16. M. L.Villalonga, B. Borisova, C. B.Arenas, A. Villalonga,M. Arévalo-Villena, A. Sánchez, J. M.Pingarrón, A. Briones-Pérez, R. Villalonga. **Disposable electrochemical biosensors for *Brettanomyces bruxellensis* and total yeast content in wine based on core-shell magnetic nanoparticles.** *Sensors and Actuators B: Chemical V*, 15 January 2019, Volume 279 Pages 15-21
17. L. Barthelmebs, A. Hayat, A. Wis Limiadi, J.-L. Marty, T. Noguer. **Electrochemical DNA aptamer-based biosensor for OTA detection, using superparamagnetic nanoparticles.** *Sensors & Actuators: B. Chemical* 2011; 156: 932-937

18. L. Barthelmebs, J. Jonca, A. Hayat, B. Prieto-Simon, J.-L. Marty. **Enzyme-linked aptamer assays (ELAA), based on a competition format for a rapid and sensitive detection of ochratoxin A in wine.** *Food Control* 22 (2011) 737–743
19. García-Ruiz, A., Tabasco, R., Requena, T., Claisse, O., Lonvaud-Funel, A., Bartolome, B., & Moreno-Arribas, M.V. **Genetic diversity of *Oenococcus oeni* isolated from wines treated with phenolic extracts as antimicrobial agents.** *Food Microbiology* (2013), 36, 267-35 274.
20. I. Basozabal <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24632140/> - affiliation-1, A. Guerreiro, A. Gomez-Caballero, M Aranzazu Goicolea, R. J Barrio. **Direct potentiometric quantification of histamine using solid-phase imprinted nanoparticles as recognition elements.** *Biosens Bioelectron* 2014 Aug 15; 58:138-44
21. R. Rawal, S. Chawla, C. Shekhar Pundir. **An electrochemical sulfite biosensor based on gold coated magnetic nanoparticles modified gold electrode.** *Biosens Bioelectron* 2012 Jan 15;31(1):144-50.
22. Gomez-Caballero, A., Guerreiro, A., Karim, K., Piletsky, S., Goicolea, M.A., Barrio, R.J. *Biosens and Bioelectron.* 2013, 28, 25–32.