

LE TAPPE RECENTI NELLA STORIA DELLA DETERMINAZIONE DEL GRADO ALCOLICO

Enzo Cagnasso, Simone Giacosa, Susana Rio-Segade, Luca Rolle, Vincenzo Gerbi

La storia della determinazione del grado alcolico dei vini o titolo alcolometrico (TAV), come più correttamente dovremmo indicarlo attualmente, è stata una sfida affascinante nei secoli passati (cfr. Vitenda 2017) quanto variegata e interessante a partire dalla seconda metà del '900.

Consultando il "Compendium of international analysis of musts and wines", raccolta aggiornata annualmente dell'Organization Internationale de la Vigne et du Vin di Parigi (OIV, 2017), i cui metodi sono adottati come metodi ufficiali dall'Unione Europea (Regolamento 479/2008), sembrerebbe che non siano stati fatti grandi passi rispetto ai lavori fondamentali in materia del chimico francese Gay-Lussac e di altri ricercatori della prima metà dell'Ottocento. Infatti, i metodi per la determinazione del tenore alcolico dei prodotti enologici si fondano sulla valutazione densimetrica della miscela idroalcolica separata dal vino per distillazione. Il principio è rimasto immutato, confermando la validità di quanto era stato fatto in passato, mentre si sono affinate le tecniche per la misurazione della densità.

Attualmente sono previste tre tecniche di misurazione basate sull'impiego di: **picnometri, bilance idrostatiche e densimetri elettronici**. I primi strumenti sono dei "classici" della chimica



(B) - Karl Friedrich Mohr (1806-1879).



(A) - Bilancia idrostatica di Mohr-Westphal per la determinazione della densità relativa dei liquidi (Borgmann, 1884).

analitica. I picnometri permettono di ottenere misure molto accurate ma, per contro, richiedono una manualità e attenzioni operative che si potrebbero definire d'altri tempi. La bilancia idrostatica si basa, come anche gli alcolometri, sul principio di Archimede. Gli attuali strumenti sono l'evoluzione della famosa bilancia di Mohr-Westphal (A).

Karl Friedrich Mohr (1806-1879) (B), un chimico tedesco, la ideò e descrisse nel suo fondamentale trattato di chimica analitica "Lehrbuch der chemisch-analytischen Titrimethode" del 1877. Essa fu poi realizzata dalla ditta della Bassa Sassonia Westphal Präzisionstechnik (AAVV, 2017).

Le bilance idrostatiche elettro-meccaniche sono state per decenni lo strumento che ha semplificato e velocizzato la determinazione del titolo alcolometrico, rendendolo altamente riproducibile, e non poche generazioni di enologi ricorderanno le famose "Gibertini" con le quali si sono cimentati dapprima nei laboratori scolastici di chimica enologica e poi nei laboratori enologici.

L'ultima generazione di queste bilance non poteva che essere elettronica (C) ma, nei fatti, non ha avuto la fortuna delle precedenti versioni a causa anche dell'introduzione dei cosiddetti densimetri elettronici. Questi ultimi strumenti si basano sulla misurazione del periodo di oscillazione di una celletta oscillante, di piccolo e costante volume (U-tube) contenente il distillato alcolico. La celletta è sottoposta all'azione di un campo elettromagnetico che genera una oscillazione armonica (frequenza di risonanza) il cui periodo dipende dalla massa volumica del liquido contenuto.

La comparsa del primo densimetro digitale negli anni '80, prodotto dalla Anton Paar (Gratz, Austria), ha rivoluzionato la misurazione della densità dei liquidi e reso la determinazione del titolo al-



(C) - Versione recente della bilancia idrostatica



colometrico, nella fase di misurazione della densità, di particolare semplicità e rapidità a cui, più recentemente, è stato possibile associare sistemi di automazione che garantiscono la massima efficienza operativa (D).

Tra i metodi fisici esplorati per la determinazione del contenuto alcolico vi è anche quello **rifrattometrico**. Questo metodo, sebbene la differenza tra l'indice di rifrazione (n_D) dell'acqua e quello dell'etanolo sia minima, permette misurazioni accurate utilizzando un rifrattometro a immersione oppure un rifrattometro differenziale. Le misure di n_D sono particolarmente sensibili alle variazioni di temperatura e un controllo puntuale di quest'ultima è fondamentale. Nei primi anni '50 il metodo era considerato, per l'accuratezza e la rapidità di esecuzione, il migliore disponibile (Meloni, 1952). Successivamente ha perso rilevanza nel settore enologico pur rimanendo un metodo ufficiale dell'OIV fino almeno all'edizione 1990 del Compendium.

Se le determinazioni aventi scopi legali non possono esimersi dal rispetto puntuale delle procedure ufficiali, non sempre queste ultime risultano la soluzione migliore per controlli di processo sia a livello produttivo che sperimentale, dove la possibilità di ottenere risultati in tempo quasi reale, relativi anche a innumerevoli campioni, ha stimolato il mondo della ricerca ad esplorare un po' tutte le possibili applicazioni che nel tempo la chimica analitica strumentale ha offerto. Innumerevoli sono state le applicazioni proposte che sembrano tracciare quasi una evoluzione paralle-

la tra la nostra storia e quella dell'analisi strumentale. Non tutte le soluzioni proposte sono apparse ugualmente valide, sia dal punto di vista tecnico che economico, per una loro applicazione massiva, ma risultano un esempio dell'inventiva umana. Le principali applicazioni possono essere ricondotte alle seguenti tipologie di tecniche analitico-strumentali:

- ⇒ Spettroscopie;
- ⇒ Elettrochimiche;
- ⇒ Cromatografiche.

Prime applicazioni strumentali

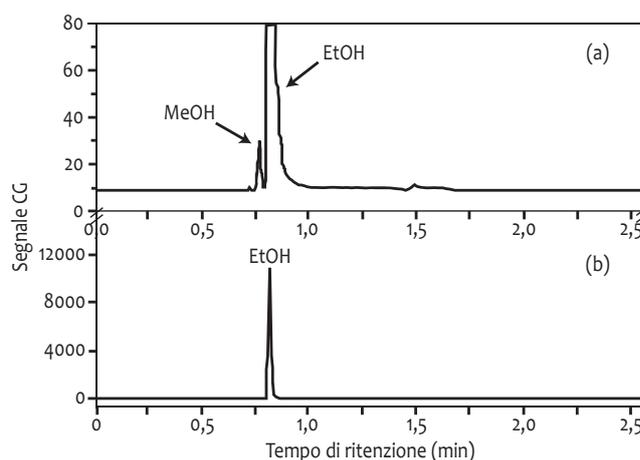
Fin dal 1929 Semichon e Flanzky descrissero un metodo chimico per il dosaggio dell'alcol nei vini basato sull'azione ossidante che il dicromato di potassio (K₂Cr₂O₇) esplica in ambiente acido. Anche in questo caso occorre operare sul distillato alcolico con una tecnica titrimetrica, di retrotitolazione del dicromato che non ha reagito, utilizzando una soluzione di Ferro (II) (sale di Mohr). La metodica è stata indicata per prodotti a basso tenore alcolico o quando sia disponibile un campione di esigua entità, in realtà è applicabile a prodotti con qualsiasi tenore alcolico. Nei decenni successivi molti autori si sono dedicati a questo metodo apportandovi migliorie, ma è negli anni '60 che, sfruttando lo stesso principio di ossidazione dell'etanolo, viene proposta una metodologia

spettrofotometrica nel visibile (operando a 600 nm) (Caputi et al., 1968). Il metodo spettrofotometrico (per ulteriori dettagli si veda di seguito) ha permesso di ovviare alle difficoltà legate alla individuazione del punto finale della titolazione oltre a rendere la determinazione nettamente più rapida.

Le prime applicazioni delle tecniche strumentali si indirizzarono verso quelle cromatografiche (tecniche di separazione che permettono di risolvere miscele anche molto complesse) sulla scia del successo riscosso dalla recente gas-cromatografia (GC) (Jones e Martin, 1952). La GC è una tecnica che permette di separare una miscela di sostanze volatili, sfruttando una successione di processi di adsorbimento e desorbimento in una fase stazionaria (liquida o solida), quando la miscela sia trasportata lungo una apposita colonna da un gas inerte (carrier). I componenti arrivano alla fine della colonna in tempi diversi (tempo di ritenzione) e vengono rilevati da un opportuno detector; generalmente viene usato il FID (Flame Ionization Detector) per rilevare l'etanolo. La sequenza temporale della rilevazione dei componenti pervenuti al detector produce il classico cromatogramma (E).

La valutazione del contenuto alcolico dei vini mediante la cromatografia gas-liquido (GLC) viene inizialmente proposta da Bouthilet et al. (1961) e Morrison (1961) a cui, nei decenni successivi, segue una serie rilevante di contributi sperimentali anche molto innovativi, ma che esulano dallo scopo di questo scritto.

(E) - Cromatogramma di un campione di vino ottenuto mediante FE HS-GC (full evaporation headspace gas chromatography) relativo alla determinazione simultanea di etanolo e metanolo, la sezione A è un ingrandimento della B (Zhang et al., 2015 - modificato).



Il metodo GC rientra attualmente tra quelli approvati dalla americana AOAC (*Association of Official Agricultural Chemists*) ed è caratterizzato da una accuratezza di $\pm 0,2$ % vol. (Sedding, 2015).

Anche la cromatografia liquida HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) è stata applicata per lo scopo. Questa tecnica è molto versatile poiché la separazione si fonda su diversi fenomeni (partizione, adsorbimento selettivo, scambio ionico, esclusione dimensionale e affinità) che possono agire anche contemporaneamente. L'HPLC sfrutta una fase mobile liquida che trasporta i componenti della miscela, in condizioni di elevata pressione, attraverso la matrice della fase stazionaria ospitata nella colonna. La separazione avviene, anche in questo caso, in base ad una successione di fenomeni di solubilizzazione e rilascio dalla fase stazionaria, regolati dall'affinità che i componenti hanno per le due fasi. Le molecole che fuoriescono dalla colonna vengono rilevate e quantificate mediante un apposito detector, usualmente per l'etanolo quello a indice di rifrazione (Morawski *et al.*, 1983). Le applicazioni in HPLC possono fornire un livello di accuratezza molto variabile in funzione del sistema cromatografico utilizzato e della presenza di interferenze dovute soprattutto a zuccheri e acidi organici (Spedding, 2015). Tutto ciò ha, di fatto, limitato l'impiego di questa tecnica per la valutazione del TAV a controlli rapidi, dove l'accuratezza richiesta è minore come nel caso del monitoraggio del processo fermentativo.

Quanto affermato non vuole certo sminuire l'importanza delle tecniche cromatografiche in enologia, consci del ruolo svolto da queste per la caratterizzazione dei componenti minori del vino quali, ad esempio, le sostanze fenoliche e odorose.

Metodi spettroscopici rapidi

L'avvento di computer, potenti e poco costosi, ha dato un impulso notevole sia all'automazione delle tecniche analitiche che all'applicazione delle tecniche chemiometriche a set di dati molto ampi. Infatti l'analisi multivariata, definita fin dalla fine degli anni '60, presentava un'oggettiva difficoltà pratica, che la disponibilità di adeguati software permette di superare aprendo la stra-

da alla definizione di metodi di analisi spettroscopici rapidi e multiparametrici.

I metodi spettroscopici sfruttano i fenomeni di interazione tra la materia e le radiazioni elettromagnetiche. Classicamente sono classificati in base alla tipologia di radiazione interessata. Oltre alle radiazioni del visibile, caratterizzate da lunghezze d'onda (λ) tra i 380 e i 780 nm, hanno assunto negli ultimi decenni una particolare rilevanza le tecniche che sfruttano la radiazione infrarossa (IR) a cui corrisponde una λ nel range 780 nm \div 1 mm. In realtà, non tutto lo spettro IR è risultato interessante e le applicazioni si sono concentrate sulle regioni del vicino infrarosso NIR (*near infrared*, 780 \div 2500 nm) e del medio infrarosso MIR (*middle infrared*, 2,5 \div 50 μ m). Le radiazioni IR sono meno energetiche di quelle visibili a causa della minore frequenza che le caratterizzano. Conseguentemente i fenomeni assorbimento della radiazione (transizione) da parte delle molecole provoca solamente fenomeni di rotazione e vibrazione delle molecole stesse, in particolare sono coinvolti i legami C-H, O-H e N-H presenti tipicamente nelle sostanze organiche naturali.

La tecnica NIR è stata applicata già negli anni '70 per il controllo di prodotti agricoli solidi (Watson, 1977), ma è nei primi anni '80 che viene introdotto sul mercato uno strumento NIR l'InfraAnalyzer® della Technicon adatto per la valutazione del contenuto alcolico di molte bevande (Cabanis *et al.*, 1983). Lo strumento richiede la calibrazione con almeno 30 vini che coprano l'intero intervallo di concentrazione di interesse analitico ed evidenzia una buona ripetibilità con valori della deviazione standard non superiori a 0,04 % vol. confrontabile con il metodo picnometrico adottato come confronto (Baumgarten, 1987).

Più recentemente sono state sviluppate tecniche che sfruttano solo le radiazioni fino a 1100 nm indicate con l'acronimo SW-NIR (*short wave*). La strumentazione presenta il vantaggio di utilizzare apparati non troppo costosi tipici degli strumenti che operano nel visibile anche se, in questo caso, il con-



(F) - Jean Baptiste Joseph Fourier (1768-1830) matematico e fisico francese noto per la sua trasformata.

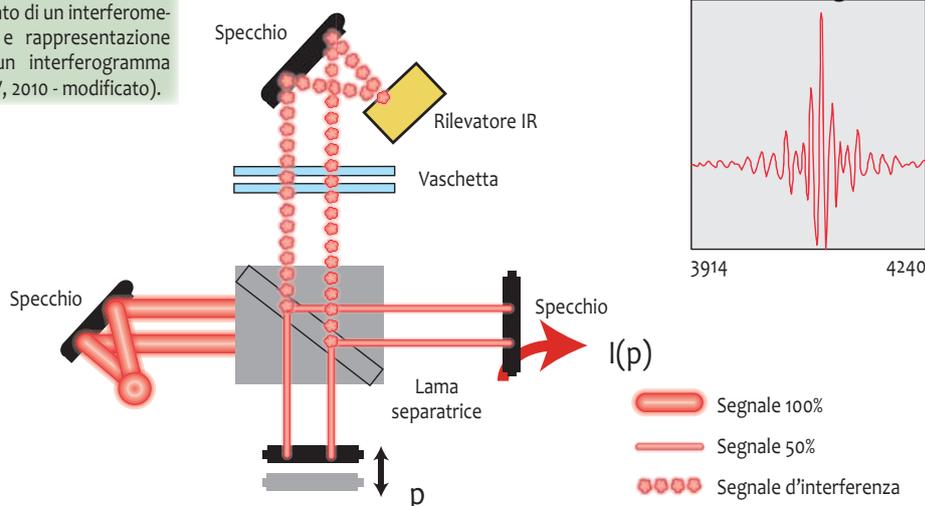
trollo della temperatura è notevolmente più rilevante. La misura del tenore alcolico ha evidenziato un errore standard in predizione pari a 0,13 % vol. (Barboza e Poppi, 2003). Questa tipologia di strumentazione appare particolarmente idonea per applicazioni *in-line*.

Sempre nello stesso periodo viene introdotto un nuovo strumento per la misura diretta del TAV: l'Alcolyzer® della Anton Paar (Austria) (Murer *et al.*, 2000). Lo strumento opera nella regione NIR tra 1150 e 1200 nm dove si verifica un assorbimento specifico dell'etanolo. Permette di operare su vini di diversa tipologia con una sola calibrazione indipendente, è richiesta una minima preparazione del campione e raggiunge valori di ripetibilità (*r*) e riproducibilità (*R*) confrontabili con il metodo di riferimento per distillazione (OIV, 2010).

Come sopra anticipato anche la regione del MIR è stata utilizzata per la valutazione del titolo alcolometrico dei vini, questo tipo di applicazione è stata possibile grazie allo sviluppo della spettroscopia FTIR, cioè l'implementazione della cosiddetta trasformata di Fourier (F) con la spettroscopia IR.

Questi strumenti funzionano sul principio dell'interferometro ideato dal fisico statunitense Albert Abraham Michelson (1852-1931) (G). L'interferometro permette di registrare, in un breve intervallo di tempo, uno spettro di assorbimento nel cosiddetto dominio del tempo rappresentato dall'interferogramma (H).

(H) - Schema di funzionamento di un interferometro e rappresentazione di un interferogramma (OIV, 2010 - modificato).



A questo punto è l'algoritmo della trasformata di Fourier che consente di passare dal dominio del tempo a quello delle frequenze e quindi delle lunghezze d'onda. La rilevante mole di dati che viene acquisita richiede un trattamento chemiometrico specifico, spesso viene applicata la regressione PLS (*partial least squares*). La tecnica FTIR (*Fourier transform infra red*) associata alla chemiometria permette l'effettuazione di analisi multiparametriche rapide e con minima preparazione del campione (eliminazioni di torbidi e del diossido di carbonio in eccesso) ma richiede una calibrazione robusta, cioè l'associazione dei valori di parametri analitici, valutati con metodi di riferimento, ai corrispondenti spettri MIR, per un numero consistente di campioni che rappresenti tutta la possibile variabilità esistente tra

i vini da analizzare.

La tecnica FTIR viene impiegata da Davenel *et al.* (1991) per studiare la fermentazione alcolica, ma solo alla fine del decennio troviamo studi mirati con strumenti dedicati al settore enologico (Patz *et al.*, 1999; Dubernet *et al.*, 2000). Con riferimento al titolo alcolometrico è stato rilevato un errore standard in predizione pari a 0,21 % vol. (Patz *et al.*, 1999), un più recente lavoro collaborativo tra laboratori di nazioni differenti ha evidenziato valori della riproducibilità intra- e interlaboratorio pari a 0,10 % vol. (OIV, 2010).

Friedel *et al.* (2013), comparando strumenti FTIR diversi, hanno constatato che per la determinazione dell'etanolo risultano migliori gli strumenti che sfruttano la tecnica ATR (*attenuated total reflection*) rispetto a quelli a trasmissione.

Conclusioni

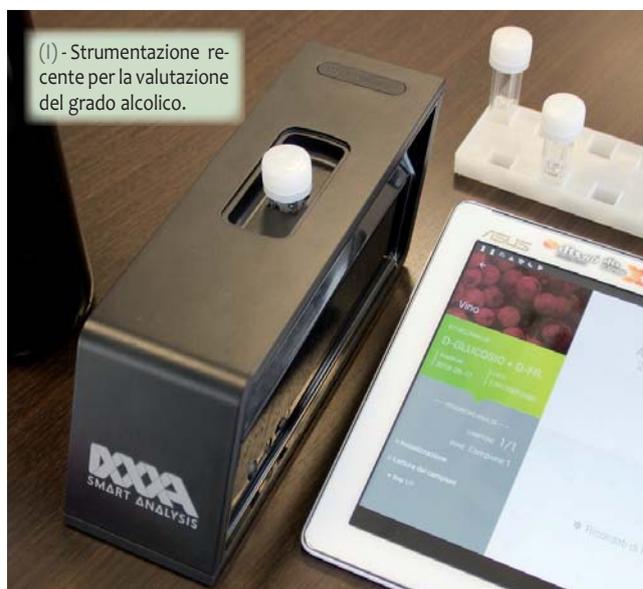
Siamo ormai al termine di questo viaggio, ma non possiamo esimerci dall'accennare ai metodi enzimatici di analisi (D).

In realtà, con questa espressione ci si riferisce a quei metodi che sfruttano l'azione specifica di uno o più enzimi ma

che, da un punto di vista analitico, fanno riferimenti a tecniche strumentali differenti. La reazione che viene sfruttata è l'ossidazione dell'etanolo, generalmente da parte dell'alcol-deidrogenasi in presenza del cofattore NAD^+ , quest'ultimo viene ridotto a NADH.

La prima applicazione è stata una tecnica spettrofotometrica nell'ultravioletto a 340 nm (Beutler e Michael, 1977), sono disponibili specifici kit dedicati che rendono la manualità di particolare semplicità (I). Il metodo è molto accurato e preciso, ma necessita di un processo di diluizione eseguito a regola d'arte per non vanificare la significatività dei risultati.

L'ossidazione enzimatica dell'etanolo è stata sfruttata anche per produrre biosensori elettrochimici, con enzimi (alcol-deidrogenasi o alcol-ossidasi) immobilizzati in opportune matrici po-



limeriche (Mason, 1983).

La storia non è sicuramente finita, perché essa è intimamente legata all'ingegno umano e questo non potrà che serbarci nuove puntate di questa appassionante storia, di cui abbiamo cercato di tratteggiare le principali tappe che l'hanno caratterizzata fino ai giorni nostri.

Enzo Cagnasso, Simona Giacosa, Susana Rio-Segade, Luca Rolle, Vincenzo Gerbi
Università di Torino, DISAFA - sede di Alba
enzo.cagnasso@unito.it



(G) - Abraham Michelson (1852-1931) ideatore dell'interferometro.