

INFLUENȚA ACIDULUI TARTRIC ASUPRA PROCESULUI DE ANIHILARE A RADICALILOR LIBERI DE CĂTRE ACIDUL ASCORBIC

DOI: 10.5281/zenodo.3842690
 CZU: 542.06:[547.476.3+547.473.2]

Doctorandă Crina VICOL
 Academician Gheorghe DUCA
 Institutul de Chimie

INFLUENCE OF TARTARIC ACID ON THE FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF ASCORBIC ACID

Summary. Tartaric acid (AT) is an organic acid found in grapes and wines and known as a good preventive antioxidant and a metal chelation agent, used to ameliorate the quality of grape products. To prevent the oxidation of the coloring and organoleptic fractions of musts, juices and wines, ascorbic acid (AA) is also used in oenology. However, less information is provided about the synergistic influence of AT on the free radical scavenging activity of common antioxidants like AA. In this study, the contribution of different concentrations of tartaric acid on the antioxidant activity of ascorbic acid (AA), tested through the DPPH assay, is presented. Three different mixtures of AA – AT showed a significant synergistic effect of 1.20, 1.17 and 1.13. With the increase of AA concentration, the additive effect (1 and 0.99) was noticed. One antagonistic combination was also found.

Keywords: tartaric acid, ascorbic acid, DPPH assay, synergism.

Rezumat. Acidul tartric (AT) este un acid organic care se conține în struguri și vinuri și este cunoscut ca un eficient antioxidant preventiv și un agent de chelare a ionilor de metale, întrebuintat pentru menținerea și îmbunătățirea calității produselor din struguri. Pentru prevenirea oxidării fracțiilor colorante și organoleptice ale musturilor, sucurilor și vinurilor, în oenologie se utilizează și acidul ascorbic (AA). Cu toate acestea, există puține informații despre influența sinergică a AT asupra activității de anihilare a radicalilor liberi de către antioxidanții primari precum AA. În acest studiu este prezentată influența acidului tartric asupra activității antioxidante a acidului ascorbic, testată prin metoda radicalului 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). Astfel, trei amestecuri diferite de AA-AT au prezentat un efect sinergic (ES) semnificativ de 1,20, 1,17 și 1,13. Odată cu creșterea concentrației de AA, a fost observată apariția efectului aditiv (1 și 0,99). De asemenea, a fost găsită o combinație cu efect antagonist.

Cuvinte-cheie: acid tartric, acid ascorbic, metoda DPPH, sinergie.

INTRODUCERE

Antioxidanții sunt substanțe chimice care pot influența reacțiile de oxido-reducere în lanț, prevenind sau inhibând reacțiile de oxidare [1]. Ca rezultat, are loc formarea unor specii oxidate de antioxidanți, care sunt de obicei mai puțin activi decât radicalii liberi. Astfel, anihilând speciile active prin donarea electronilor proprii, antioxidanții sunt catalogați ca aditivi în produsele alimentare, cosmetice și farmaceutice.

Acidul ascorbic, un valoros antioxidant, un bun agent de anihilare a radicalului DPPH, cu o putere antiradicalică egală cu 3,7 în metanol [2] și 4,7 în apă și etanol [3], este folosit împreună cu acidul sulfuros la stabilizarea vinurilor [4; 5] în cantități de la 50 mg/L până la 150 mg/L [4]. Fiind un antioxidant reversibil, acidul ascorbic, în absența unui acceptor ireversibil de oxigen, cum ar fi SO₂, se poate transforma într-o formă oxidativă (acidul dehidroascorbic), provocând oxidarea unor componente și înrăutățind proprietățile

organoleptice ale vinului. Prezența acidului tartric în vinuri ar putea spori activitatea antioxidantă a acidului ascorbic prin regenerarea acestuia, și, respectiv, ar diminua cantitatea necesară de SO₂ pentru reducerea AA și pentru stabilizarea produselor oenologice. În acest context, încercarea de a stabili prezența efectului sinergic dintre cei doi acizi organici capătă interes științific și aplicativ.

Acizii organici sunt antioxidanți preventivi care se conțin în mod natural în regnul vegetal, în special în fructe și legume, fiind utilizați pe scară largă în procesarea produselor alimentare datorită eficienței lor în conservarea produselor, în reglarea pH-ului și datorită capacității de chelare a metalelor [6]. Atunci când sunt combinați cu antioxidanți primari precum vitaminele, acizii organici pot determina apariția unui efect antioxidant sinergic, adică a unui efect combinat ce depășește suma efectelor antioxidante individuale aplicate separat [7; 8].

Interacțiunile sinergice dintre compușii naturali sunt foarte interesante și pot avea mai multe avantaje [1], ca de exemplu:

1. Eficacitate sporită, contribuind la îmbunătățirea calității și prelungirea termenului de valabilitate a alimentelor;

2. Cantitate redusă de antioxidanți necesară, deci un cost de producție mai mic;

3. Utilizare redusă sau înlocuirea totală a antioxidanților sintetici care au de obicei efecte negative asupra sănătății;

4. Efectele sinergice pot asigura o distribuție mai completă a antioxidanților în unele alimente.

Rolul acizilor organici în îmbunătățirea activității de anihilare a radicalilor liberi de către sistemele antioxidante a fost evidențiat în numeroase articole. Roberto Lo Scalzo, în lucrarea sa [3], a demonstrat că acizii acetic, malic și citric nu au manifestat activități antioxidante când au fost testați prin metoda DPPH[•], în timp ce acțiunea lor a fost semnificativă atunci când au fost utilizați în prezența acidului ascorbic. Aceiași acizi organici în combinație cu compusul α -terpinen au sporit activitatea antioxidantă a sistemului în raport cu radicalul DPPH, fapt care indică prezența unui efect sinergic, combinația cu acidul citric fiind cea mai eficientă [9].

Cercetările asupra unui șir de acizi organici naturali precum acidul oxalic, cis-aconitic, citric, piruvic, malic și fumaric, care au fost identificați în rădăcinile plantei medicinale *Brebenocului de Madagascar*, au arătat contribuția lor la sporirea efectului antioxidant al extractelor din planta dată [10]. Acidul *trans*-aconitic în combinație cu antioxidanții obișnuiți cum ar fi acidul ascorbic, acidul galic, acidul cafeic și trolox a manifestat o activitate antioxidantă crescută asociată cu efectele de sinergie sau de aditivitate [11] gallic acid, caffeic acid, trolox. Interacțiunea dintre 2, 3 și 4 acizi organici diferiți cu compușii fenolici, la concentrațiile similare cu cele din portocale, a generat un puternic efect sinergic [12]. Patru acizi organici principali identificați în pulpa de mango (acidul clorogenic, galic, protocatechuic și vanilic), testați prin metoda DPPH, au demonstrat un efect sinergic important atunci când au fost combinați între ei [13]. Amestecurile dintre flavonele polimetoxilate (FPM) din coji de portocale de Jincheng cu acizi organici și aminoacizi au manifestat un efect antioxidant mai ridicat decât activitatea flavonelor individuale [14].

Acidul tartric este principalul acid organic solubil nefermentabil din struguri și principalul acid din vinuri [4], având o contribuție semnificativă la reglarea unor aspecte importante ce țin de calitățile organoleptice și potențialul de îmbătrânire a produselor vinicole. Este prezent în struguri sub ambele forme: ca acid liber și legat cu cationi de calciu și potasiu, concentrația

sa variind de la 2-8 g/L în must și până la 0,3 - 4 g /L în vinuri [4]. Acidul tartric este utilizat pe larg la procesarea alimentelor [15] datorită capacității sporite de conservare și a posibilității de a lega metalele de tranziție [16]. Cu toate acestea, sunt insuficiente informații despre posibilele interacțiuni ale AT cu radicalii liberi (ex. DPPH[•]) și despre acțiunea sinergică a acestui acid combinat cu vitamina C.

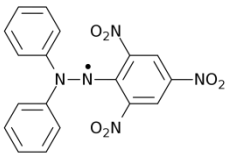
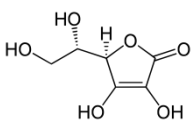
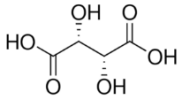
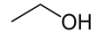
În prezenta lucrare sunt prezentate datele experimentale referitoare la activitatea de eliminare a radicalului DPPH de către acidul ascorbic, influențat de prezența acidului tartric ca antioxidant preventiv.

MATERIALE ȘI METODE

Reactivi și solvenți

Pentru realizarea părții experimentale au fost utilizați următorii compuși chimici de puritate analitică (tabelul 1):

Tabelul 1
Reactivi și solvenți

Reactivul	Formula chimică	Formula de structură
Radicalul DPPH 2,2-Difenil-1-picrilhidrazil, D9132, Aldrich	$C_{18}H_{12}N_5O_6$	
Acidul L - Ascorbic, > 99.0 %	$C_6H_8O_6$	
Acidul L - (+) Tartric, > 99.5 %	$C_4H_6O_6$	
Etanol, 95,6 %	C_2H_5OH	

Măsurări spectrofotometrice

Testarea capacității antioxidante a fost realizată cu ajutorul unui spectrofotometru UV-Viz Lambda 25 (Perkin Elmer), setat în domeniul 500-550 nm, folosind cuvețe de cuarț de 10 mm. Datele experimentale au fost obținute la temperatura camerei de 20 °C.

Metoda DPPH

Reacția de anihilare a radicalului DPPH [2; 17] este pe larg cunoscută ca o metodă ușoară și accesibilă de evaluare a capacității antioxidante a extractelor din plante, a produselor alimentare sau a compușilor chimici individuali [18; 19]. Transferul atomului de H de la un compus reducător la radicalul liber DPPH[•] determină o scădere a absorbanței la lungimea de undă

517 nm, care poate fi urmărită cu un spectrofotometru setat în regiunea vizibilă.

Toate soluțiile au fost proaspăt preparate conform datelor descrise de Scalzo [3] și Piang-Siong [12] gallic acid, caffeic acid, trolox. Astfel, au fost pregătite trei soluții etanolice de trei concentrații diferite de acid ascorbic: AA₁ (1,5 × 10⁻⁵ M), AA₂ (2,25 × 10⁻⁵ M) și AA₃ (4,5 × 10⁻⁵ M); două soluții etanolice de concentrații diferite de acid tartric: TA₁ (6,7 × 10⁻³ M) și TA₂ (2,23 × 10⁻² M); și o soluție etanolică de 9,5 × 10⁻⁵ M de DPPH*. Volume egale de 1,5 mL de fiecare soluție au fost amestecate împreună formând șase combinații diferite. Pentru probele formate din trei reactivi adăugați după cum urmează: acid ascorbic, DPPH*, acid tartric, măsurătorile au fost efectuate urmărind modificările absorbantei la 517 nm. Prin aceeași procedură au fost efectuate măsurătorile pentru proba martor preparată din 1,5 mL DPPH* în 3 mL etanol.

Activitatea antioxidantă a fost exprimată în Inhibiția în % (%I) și a fost calculată în funcție de valorile absorbantei [12]:

$$\% \text{Inhibiție} = 1 - \left(\frac{A_{\text{probă}}}{A_{\text{martor}}} \right) \times 100 \quad (1)$$

unde A_{martor} este absorbanta martorului și $A_{\text{probă}}$ corespunde absorbantei amestecului de antioxidanți, măsurată la lungimea de undă de 517 nm, după 1 h de stat la întuneric. Este important faptul că valoarea pentru %Inhibiție crește odată cu sporirea activității antioxidante.

Efectul sinergic al amestecurilor s-a calculat în funcție de raportul dintre valoarea experimentală a %Inhibiției amestecului (%I_{amestec}) și valoarea teoretică (%I_{teoretic}) [12; 20], gallic acid, caffeic acid, trolox:

$$ES = \frac{\%I_{\text{amestec}}}{\%I_{\text{teoretic}}} \quad (2)$$

unde

$$\%I_{\text{teoretic}} = \%I_{\text{antioxidant}} + \%I_{\text{acid}} - \frac{\%I_{\text{antioxidant}} \times \%I_{\text{acid}}}{100} \quad (3)$$

unde %I_{antioxidant} corespunde capacității antioxidante a acidului ascorbic și %I_{acid} – a acidului tartric. %I_{amestec} reprezintă Inhibiția în % manifestată de amestecul format din ambii acizi.

Pentru a putea compara contribuția (în procente) acidului tartric la activitatea de eliminare a radicalilor liberi de către diferite concentrații de acid ascorbic, a fost calculat câștigul în activitatea antioxidantă survenit la adăugarea acidului tartric folosind formula [12]:

$$\% \text{Câștig} = \frac{\%I_{\text{amestec}} - \%I_{\text{acid ascorbic}}}{\%I_{\text{acid ascorbic}}} \times 100 \quad (4)$$

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Conform datelor raportate de Brand-Williams [2], soluția alcoolică de acid ascorbic are valoarea stoichiometrică (EC50 × 2) = 0,54, respectiv, EC50 = 0,27, exprimată în (mol/L) AA/(mol/L) DPPH*. Prin urmare, o singură soluție de o concentrație anumită de DPPH* și trei soluții de concentrații diferite de acid ascorbic, menționate anterior, au fost create astfel ca în final să fie obținute trei raporturi molare AA/DPPH*: 0,158, 0,237 și 0,474.

Concentrațiile acidului tartric au fost stabilite în concordanța cu concentrațiile AT din struguri (2-8 g/L) [4]. În mod asemănător, concentrațiile acidului ascorbic au fost stabilite în funcție de cantitatea vitaminei C care se întâlnește în struguri – maxim 50 mg/L [4]. Astfel, raporturile molare AA_y/TA_x utilizate în experiment s-au aflat în limita valorilor 2,2 × 10⁻⁴ – 2,0 × 10⁻³.

Reacția dintre TA₁ și radicalul DPPH, analizată după 1h de stat la întuneric, nu a provocat schimbări semnificative ale absorbantei, astfel %I (TA₁) a fost de 1,8%. Soluția de o concentrație mai mare de acid tartric (TA₂) a manifestat o capacitate antioxidantă mai înaltă, având %I = 4,3, totuși, nerelevantă comparativ cu valorile %I calculate pentru acidul ascorbic caracteristice pentru fiecare dintre cele trei concentrații: 31,2%, 48,9% și 95,9% (tabelul 2).

Tabelul 2

%Inhibiție pentru diverse concentrații de acid ascorbic în combinație cu diferiți acizi organici și %Câștig calculat pentru amestecurile AA – AT

Conc. de AA	Martor (AA+DPPH•)	%Inhibiție				%Câștig	
		*Acid acetic 6,710 ⁻² M	*Acid citric 2,2310 ⁻² M	AT ₁ 2,2310 ⁻² M	AT ₂ 6,710 ⁻² M	AT ₁ 2,2310 ⁻² M	AT ₂ 6,710 ⁻² M
AA ₁ 1,5 × 10 ⁻⁵ M	31,2	32,6	33,8	39,0	38,6	25	24
AA ₂ 2,25 × 10 ⁻⁵ M	48,9	52,2	51,6	58,3	46,6	19	0
AA ₃ 4,5 × 10 ⁻⁵ M	95,9	92,0	90,9	95,9	95,6	0	0

*Rezultate experimentale descrise de Piang-Siong și col. [12] gallic acid, caffeic acid, trolox

Efectul sinergic și %Inhibiție pentru amestecurile de acid ascorbic și acid tartric

Concentrația de AA	AT ₁		AT ₂		ES	
	%I _{amestec}	%I _{teoretic}	%I _{amestec}	%I _{teoretic}	TA ₁	TA ₂
AA ₁ 1,5 × 10 ⁻⁵ M	39,0	32,4	38,6	34,2	1,20	1,13
AA ₂ 2,25 × 10 ⁻⁵ M	58,3	49,8	46,6	51,1	1,17	0,91
AA ₃ 4,5 × 10 ⁻⁵ M	95,9	96	95,6	96,1	1	0,99

Potrivit datelor prezentate în tabelul 2, adăugarea acidului tartric s-a dovedit a avea o influență deosebită asupra reacției dintre acidul ascorbic și DPPH[•], rezultând în sporirea puterii antioxidante a amestecului. Astfel, pentru soluția cu o concentrație mai mică de acid tartric – TA₁, a fost observată o creștere remarcabilă a %I de 39% și 58,3%, care corespund combinațiilor cu concentrațiile de acid ascorbic AA₁ și AA₂. În cazul adăugării soluției TA₂, o contribuție pozitivă a %Inhibiție - i de 38,6% a fost observată doar în amestecul cu proba de acid ascorbic de 1,5 × 10⁻⁵ M. Celelalte două amestecuri au demonstrat o scădere a capacității antioxidante la adăugarea soluției de acid tartric – AT₂, astfel, %I fiind de 46,6% și, respectiv, 95,6% – valori mai mici decât %I a probei martor.

Comparativ cu datele experimentale obținute de Piang-Siong și col. [12] gallic acid, caffeic acid, trolox referitoare la efectul acizilor acetic și citric asupra reacției dintre acidul ascorbic și radicalul DPPH, valoarea %I depistată pentru probele cu acid tartric s-a dovedit a fi mai mare, faptul dat accentuând eficiența AT ca sinergist pentru reacția dintre AA și DPPH[•].

Rezultatele corespunzătoare calculelor determinării prezenței efectului sinergic (ES) pentru cele șase probe sunt prezentate în tabelul 3. Raportând %I_{amestec} la %I_{teoretic}, a fost posibilă calcularea valorilor ES și evidențierea celor mai eficiente combinații dintre AA și AT. Este important faptul că efectul sinergic se identifică doar atunci când valoarea ES este mai mare decât 1. Trei amestecuri reactante: AA₁ – AT₁, AA₂ – AT₁ și AA₁ – AT₂, s-au dovedit a fi sinergice, având valorile ES de 1,20, 1,17 și, respectiv, 1,13. Pentru amestecurile cu o concentrație mai mare de AA, valorile ES au înregistrat o descreștere, excepție fiind combinația AA₂ – AT₁ care a demonstrat un puternic efect sinergic. Pentru combinațiile AA₃ – AT₁ și AA₃ – AT₂ a fost înregistrat doar un efect aditiv, având valorile 1 și 0,99. Un efect antagonist s-a observat în cazul amestecului dintre AA₂ – AT₂ (0,91), pentru care %I_{teoretic} a fost mai mare decât %I_{amestec}.

Cunoscând valorile pentru %I, a fost posibilă calcularea %Câștig-ului în activitatea antioxidantă a amestecurilor provocată de adăugarea acidului tartric (tabelul 2). Aceste date au fost utilizate pentru a determina concentrațiile eficiente de AT (2,23 × 10⁻² M) și de acid ascorbic, la care se produce cel mai mare efect sinergic. Astfel, s-a constatat o dependență direct proporțională a valorilor %Câștig-ului de concentrația AA, întrucât cel mai mare câștig, de 25 % și 24 %, a fost înregistrat pentru valorile cu un conținut de 1,5 × 10⁻⁵ M al acidului ascorbic.

CONCLUZII

Studiul efectuat a relevat prezența efectului sinergic pentru combinația de acid tartric și acid ascorbic, care are o semnificație teoretică și practică pentru procesele de conservare și procesare a produselor alimentare. Utilizarea metodei DPPH s-a dovedit a fi una potrivită pentru demonstrarea influenței acidului tartric asupra reacției AA – DPPH[•]. Cel mai mare efect sinergic a fost demonstrat de combinațiile AA₁ – AT₁, AA₂ – AT₁ și AA₁ – AT₂, având valorile ES de 1,20, 1,17 și, respectiv, 1,13. Pentru amestecurile cu o concentrație mai mare a acidului ascorbic, a fost înregistrată o scădere a efectului sinergic până la un efect aditiv, cu valorile 1 și 0,99, corespunzând amestecurilor cu un conținut de 4,5 × 10⁻⁵ M de AA. Combinația AA₂ – AT₂ a demonstrat un ușor efect antagonist.

BIBLIOGRAFIE

1. Tsao R. Synergistic interactions between antioxidants used in food preservation. Elsevier Ltd, 2015.
2. Brand-Williams W., Cuvelier M. E., and Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT - Food Sci. Technol., vol. 28, no. 1, p. 25-30, 1995.
3. Scalzo R. Lo. Organic acids influence on DPPH{radical dot} scavenging by ascorbic acid. Food Chem., vol. 107, no. 1, p. 40-43, 2008.
4. Cotea V. D., Zănoagă C. V. and Cotea V. V. Tratat de Oenochimie. București: Editura Academiei Române, vol. 1, and 2, 2009.

5. Bolocan S. N., Duca G., Vlad L., & Macaev F. Occurrence and chemistry of dihydroxyfumaric acid. In: Chem. J. Mold., 6(1), 2011, p. 29-44.
6. Maga J. A. and Tu A. T. Food Ad. Tox. New York: M. Dekker, 1995.
7. Pokorny J., Yanishlieva N., and Gordon M. Antioxidants in food. Woodhead Publishing, 2001.
8. Cornelli U. Antioxidant use in nutraceuticals. In: Clin. Derm., 27(2), 2009, p. 175-194.
9. Quiroga P. R., Nepote V., and Baumgartner M. T. Contribution of organic acids to α -terpinene antioxidant activity. Food Chem., vol. 277, no. July 2018, 2019, p. 267-272.
10. Pereira D. M., Faria J., Gaspar L., Ferreres F., Valentão P., Sottomayor M. & Andrade P. B. Exploiting *Catharanthus roseus* roots: Source of antioxidants. Food Chem., vol. 121, no. 1, 2010, p. 56-61.
11. Kawashima K., Itoh H., and Chibata I. Synergistic ternary antioxidant compositions comprising tocopherol, partially hydrolyzate of gelatin and organic acid. Agric. Biol. Chem., vol. 43, no. 4, 1979, p. 827-831.
12. Piang-Siong W., Caro P. De, Marvilliers A., Chasse-ray X., Payet B., Sing A. S. C. & Illien B. Contribution of trans-aconitic acid to DPPHrad scavenging ability in different media. Food Chem., vol. 214, 2017, p. 447-452.
13. Freeman B. L., Eggett D. L., and Parker T. L. Synergistic and antagonistic interactions of phenolic compounds found in navel oranges. In: J. Food Sci., vol. 75, no. 6, 2010, p. 570-576.
14. Hugo P. C., Gil-Chávez J., Sotelo-Mundo R. R., Namiesnik J., Gorinstein S., and González-Aguilar G. A. Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in 'Ataulfo' mango pulp: Chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids. Molecules, vol. 17, no. 11, 2012, p. 12657-12664.
15. Yao X., Xu X., Fan G., Qiao Y., Cao S., and Pan S. Determination of synergistic effects of polymethoxylated flavone extracts of Jincheng orange peels (*Citrus Sinensis* Osberk) with amino acids and organic acids using chemiluminescence. Eur. Food Res. Technol., vol. 229, no. 5, 2009, p. 743-750.
16. Richards, M. F. (1990). U.S. Patent No. 4, 941, 995. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
17. Wong K. K., Lee C. K., Low K. S., and Haron M. J. Removal of Cu and Pb by tartaric acid modified rice husk from aqueous solutions. Chemosphere, vol. 50, no. 1, 2003, p. 23-28.
18. Gonta M., Duca G., and Porubin D. Establishment of the antioxidant/antiradical activity of the inhibitors using the DPPH - radical. Chem. J. Mold., vol. 3, no. 1, 2008, p. 118-126.
19. Lupascu T. and Gonta A. Studies on the antioxidant activity of the compound enoxil and its related forms. In: Chem. J. Mold., vol. 6, no. 2, 2011, p. 58-64.
20. Liu D., Shi J., Colina Ibarra A., Kakuda Y., and Jun Xue S. The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β -carotene mixtures on the DPPH free radical. LWT - Food Sci. Technol., vol. 41, no. 7, 2008, p. 1344-1349.



Maria Mardare-Fusu. *Natură statică cu pâine și sare*, 1968, acuarelă pe hârtie, 36,5 × 61 cm