

MATURITA' FENOLICA DEL VINACCIOLO: BASI CHIMICHE E SVILUPPO DI UN NUOVO INDICE

Laura RUSTIONI, Mara ROSSONI, Attilio SCIENZA, Osvaldo FAILLA

Università degli Studi di Milano, CIRIVE – Centro Interdipartimentale per la Ricerca e l'Innovazione in Viticoltura ed Enologia

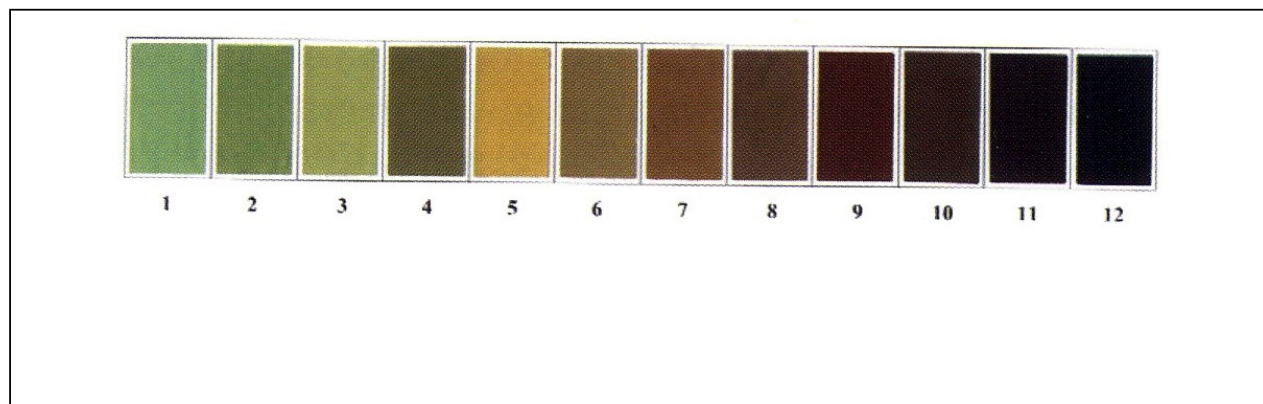
Autore corrispondente: Laura Rustioni, Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Produzione Vegetale, via Celoria 2, 20133 Milano, Tel. 025031 6556 Fax 02 5031 6553 laura.rustioni@unimi.it

Lavoro presentato alla 7ª edizione di Enoforum, Arezzo, 3-5 maggio 2011

INTRODUZIONE

"...Naturalis autem maturitas est, si cum expresseris vinacea, quae acinis celantur, iam infuscata et nonnulla praeter modum nigra fuerint. Nam colorem nulla res vinaceis potest adferre nisi naturae maturitas..." nella sua "De Re Rustica", Columella (4 – 70 ca. AD), ha indicato il cambiamento del colore dei semi come il miglior indice di maturazione. Attraverso i secoli, nel 2000, Kennedy *et al.* hanno descritto il cambiamento visivo del colore dei semi durante la maturazione, e, nel 2005, Ristic *et al.* hanno pubblicato una carta colorimetrica (fig. 1). Due secoli di coltivazione dell'uva e produzione del vino hanno sottolineato l'importanza di questo fenomeno sulla qualità del prodotto finito. Nonostante la sua importanza e l'incremento nelle conoscenze chimiche e fisiologiche, l'osservazione dell'imbrunimento del seme rimane il miglior metodo per valutare la maturazione fenolica dell'uva, anche se si tratta di un indicatore soggettivo, e non è facile discriminare le tonalità di marrone per la mancanza di omogeneità tra i semi e nello stesso seme, anche in relazione alla similitudine dei colori negli ultimi step della maturazione (i più importanti ai fini produttivi).

Fig. 1: Carta colorimetrica di Ristic *et al.*, 2005



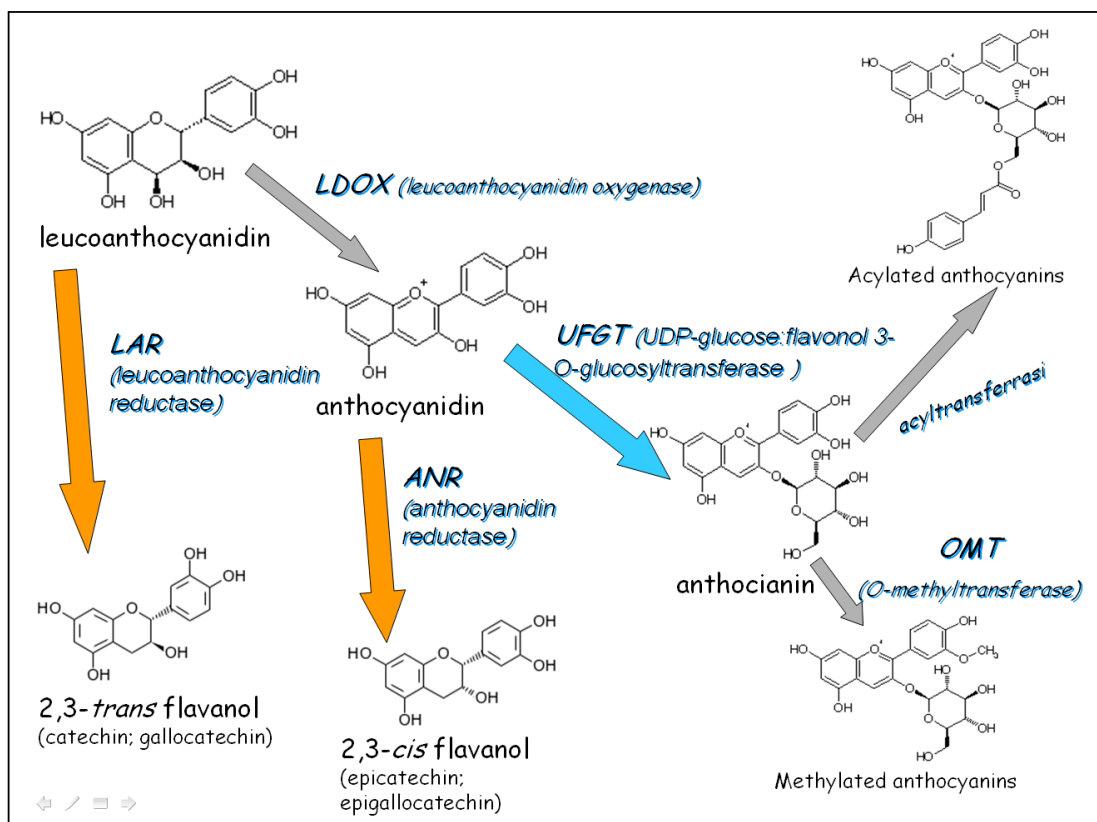
Fino a poco tempo fa, si credeva che il cambiamento nel colore fosse dovuto alla lignificazione dei tegumenti del seme, e che i fenoli dei semi diminuissero come conseguenza di una barriera fisica contro la loro estrazione (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). L'indurimento dei semi è però dovuto alla lignificazione degli strati interni dei tegumenti esterni (Ristic *et al.*, 2005), mentre i tannini si trovano nel parenchima molle del seme, tra la cuticola ed il rivestimento duro (Adams, 2006). Questa evidenza diminuisce l'importanza della lignificazione ai fini enologici.

Le auxine, l'etilene e la luce sono i principali stimoli che influenzano lo sviluppo della bacca. Pilati *et al.* (2007) osservarono inoltre uno scoppio ossidativo caratterizzato da un rapido accumulo di H₂O₂ in invaiatura e dalla modulazione dei principali enzimi della via dei ROS. L'ossidazione dei fenoli può anche spiegare alcuni risultati relativi al rendimento della catalisi acida in presenza di floroglucinololo. In uno studio iniziale sul metodo, riguardante l'evoluzione delle proantocianidine in vinaccioli di Shiraz, il rendimento variava consistentemente in relazione alla maturità del frutto. Per le proantocianidine isolate a pre-invaiatura la resa media era del 89%, dopo l'invaiatura questa diminuiva progressivamente per arrivare a valori inferiori al 69% alla maturità commerciale. Questa osservazione, insieme ad altre (cambi nella composizione dei flavan-3-oli monomeri, aumento nei radicali organici

liberi e cambiamento del colore esterno del seme) suggeriscono che le proantocianidine siano ossidate dopo l'invasatura (Kennedy e Jones, 2001).

I tannini sono molto importanti per la qualità dei vini rossi. Il loro impatto sensoriale cambia durante la maturazione, ma questo non è legato a particolari fenomeni di accumulo o degradazione. Solitamente i tecnici del settore utilizzano il contenuto antocianico per valutare la maturità fenolica, ma osservando la via biosintetica si può notare una specie di competizione tra la sintesi dei pigmenti (che avviene dopo l'invasatura) e quella dei flavan-3-oli (considerati come sub unità formanti i tannini che vengono accumulati principalmente prima dell'invasatura).

Fig. 2: Ultimi step del pathway biosintetico dei flavonoidi.



L'obiettivo di questo lavoro è stato quindi quello di sviluppare un nuovo indice di maturità dei vinaccioli relativo all'ossidazione delle molecole fenoliche, utilizzando semplici e veloci metodi spettrofotometrici.

MATERIALI E METODI

Un primo piano sperimentale è stato svolto nel 2008, dimostrando l'importanza dell'estrazione: deve essere svolta su semi freschi, e solo gli estratti possono essere successivamente conservati a basse temperature.

Utilizzando le viti della collezione ampelografica del centro sperimentale di Riccagioia (Torrazza Coste, Oltrepò Pavese), abbiamo lavorato su due varietà, Pinot Nero e Merlot nel 2009, con l'aggiunta di Croatina per l'annata 2010. Iniziando dalla chiusura del grappolo, i campioni venivano raccolti settimanalmente, in tre repliche biologiche.

A causa delle differenze del numero medio di semi per bacca, ogni replica è stata ottenuta estraendo i semi contenuti in 20 acini di Merlot e Croatina o 15 bacche di Pinot nero. Prima dell'estrazione gli acini ed i semi sono stati pesati, ed i semi sono stati contati. Il colore medio dei semi è stato ottenuto usando la carta colorimetrica di Ristic *et al.* (2005). È stata fatta una doppia estrazione con metanolo puro in agitazione continua, per avere una buona solubilità senza modificare le proprietà antiossidanti. I semi

raccolti sono stati quindi estratti prima in 25 ml di metanolo per 20 ore, e successivamente per altre 4 ore in altri 25 ml di metanolo nuovo. Alla fine i due estratti sono stati mischiati, per ottenere 50 ml totali.

Diversi metodi sono stati testati ed in parte modificati, per sviluppare nuovi indici relativi all'ossidazione delle molecole fenoliche: il contenuto in polifenoli totali (Di Stefano *et al.*, 1989), l'indice di proantocianidine per catalisi acida (Makkar, 2000), l'assorbanza a 280 nm, la reazione con DPPH (Siddhuraju and Becker, 2003; Aqil *et al.*, 2006), la quantificazione dei sostituenti orto-diidrossilati (Duran *et al.*, 1991). Questi risultati sono stati misurati usando uno spettrofotometro Jasco 7800.

Alla fine quattro estratti per ogni varietà sono stati selezionati per studiare i cambiamenti nella composizione fenolica, secondo i metodi di Kammerer *et al.* (2004) e Monagas *et al.* (2005). Le analisi sono state eseguite con un HPLC Shimadzu LC-10 AD VP (Shimadzu Co. Tokyo, Japan) usando una colonna Nova-Pak C18 con precolonna SecurityGuard (300 mm, 3,9 mm, 4µm). Il flusso è stato impostato a 0.8 ml/min.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Un importante cambio di colore, secondo la carta colorimetrica di Ristic *et al.* (2005), è stato evidenziato appena dopo l'invasatura, quando i semi da verdi diventavano giallo/marroni. Il problema principale riscontrato con questo metodo era la soggettività e la difficoltà nella classificazione dei semi (soprattutto nelle ultime fasi di maturazione), a causa della disomogeneità di colore anche all'interno dello stesso vinacciolo, e della similarità dei colori marroni della scala. Comunque è stata rilevata una buona correlazione tra il cambiamento di colore dei semi e la data di campionamento (Fig. 3).

Un obiettivo del nostro lavoro era lo sviluppo di un indice utilizzabile per cultivar differenti, dovrebbe quindi rappresentare non la quantità, ma la qualità dei polifenoli dei semi. Di conseguenza abbiamo deciso di "pulire" il risultato utilizzando un rapporto, anziché un'indicazione diretta del contenuto. Questo ci ha permesso di ottenere valori dell'indice confrontabili anche lavorando con diverse varietà e con estratti di diverse concentrazioni di molecole fenoliche. Per sviluppare gli indici chimici, sono state seguite strade differenti. Abbiamo provato ad evidenziare i cambiamenti nella struttura dei tannini (indice di struttura), in relazione alle proprietà dei diversi legami nei polimeri tannici. Un metodo classico per la valutazione dei tannini è l'indice di proantocianidine: per catalisi acida, le unità di estensione unite da legami C4-C8 o C4-C6 sono convertite in antociani colorati (Xie e Dixon, 2005; Dixon *et al.*, 2005). D'altra parte, è dimostrato che le sostituzioni orto-diidrossilate sono i migliori siti per l'ossidazione nelle molecole di flavonoidi (Waterhouse e Laurie, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Per questa ragione, abbiamo usato l'abilità di complessazione di questi gruppi fenolici con i metalli per avere un'indicazione della quantità di gruppi catecolo impegnati in legami prodotti dall'ossidazione. Il metodo proposto da Maestro Durán *et al.* (1991) utilizza le proprietà complessanti del molibdeno.

L'indice così ottenuto, in pratica esprime il numero di sostituenti orto-difenolici liberi per sub unità di estensione proantocianidinica. Esso aumenta fino all'invasatura, a causa della sintesi di tannini, dopo di che decresce.

I risultati migliori, però, li abbiamo ottenuti con un indice del potere antiossidante medio per polifenolo, ottenuto dal rapporto della reazione al DPPH rispetto all'assorbanza rilevata a 280 nm (significativamente rappresentativa del contenuto in polifenoli totali, e molto più rapida).

La figura 3 mostra l'andamento dell'indice sviluppato (DPPH/280) durante la maturazione. La variabilità riscontrata è da considerare indice della disomogeneità dei semi durante la maturazione, comunque si noti come l'andamento rispecchia quello rilevato con la carta colorimetrica.

Come atteso, il potere antiossidante della soluzione aumentava all'aumentare dei gruppi orto-difenolici totali, ed il potere antiossidante delle molecole fenoliche era maggiore tanto più le i tannini erano polimerizzati. La correlazione negativa tra il nostro indice e il contenuto in polifenoli totali (fig. 4), potrebbe esser spiegata sia da un fenomeno di compensazione/saturazione, sia dal fatto che con l'avanzare della maturazione nei nostri campioni diminuiva il contenuto in polifenoli totali, ma aumentava il loro potere antiossidante medio. Infatti, contrariamente alle nostre aspettative, l'indice antiossidante aumentava progressivamente durante lo sviluppo del seme. Interessante è anche la correlazione negativa e non lineare tra i due indici studiati (fig. 5).

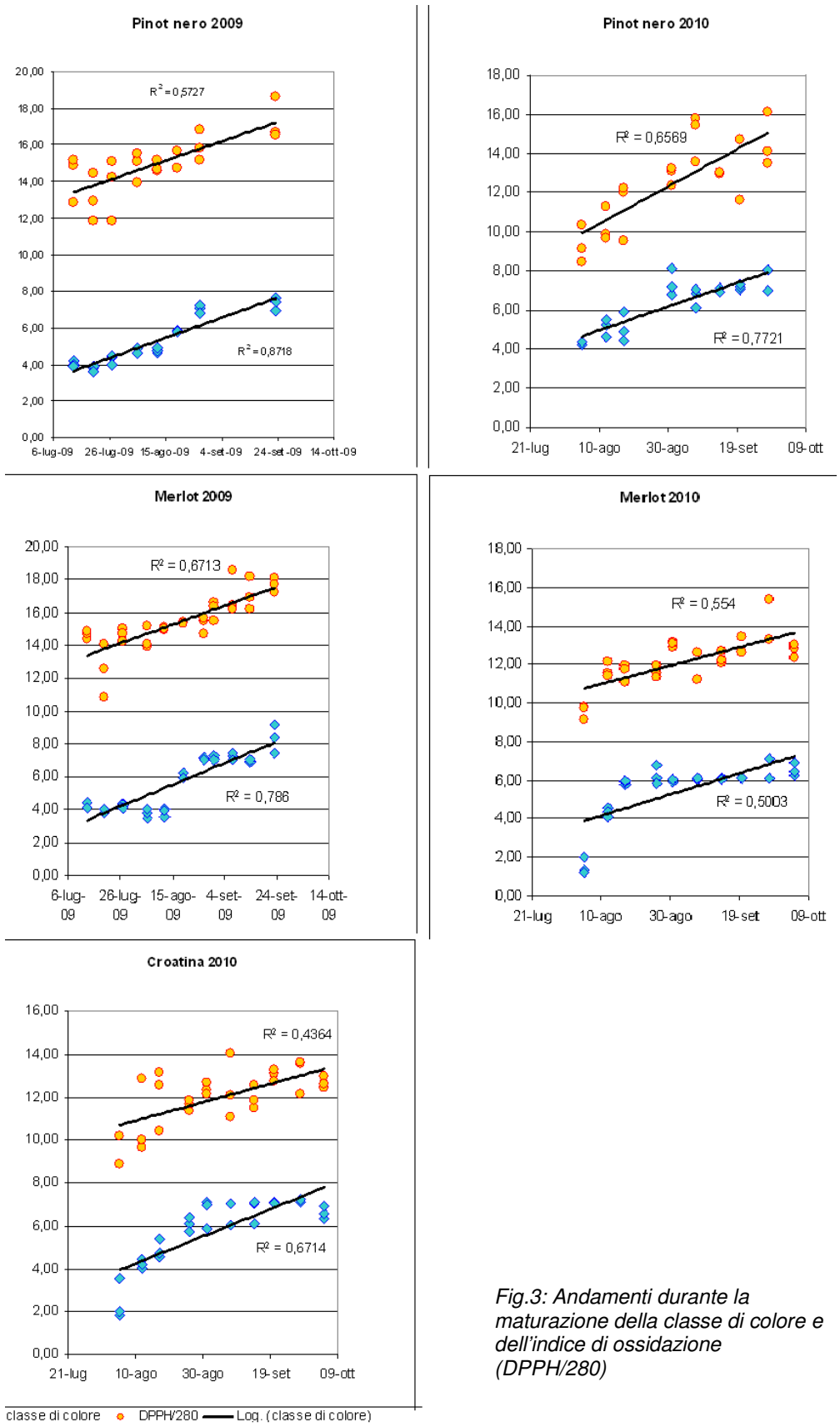


Fig.3: Andamenti durante la maturazione della classe di colore e dell'indice di ossidazione (DPPH/280)

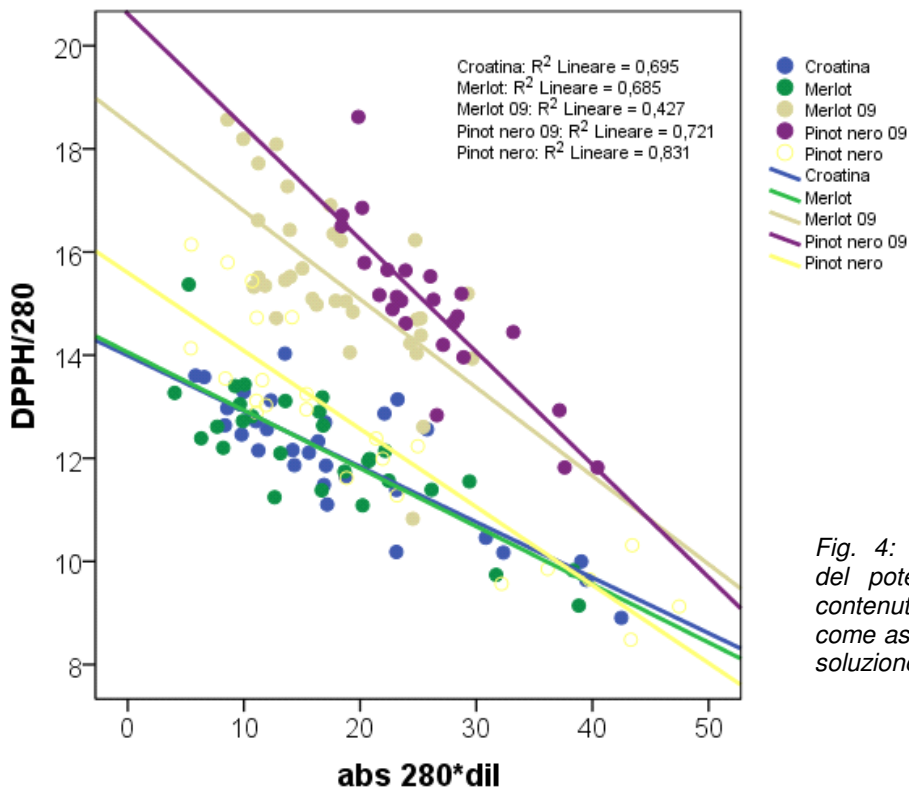
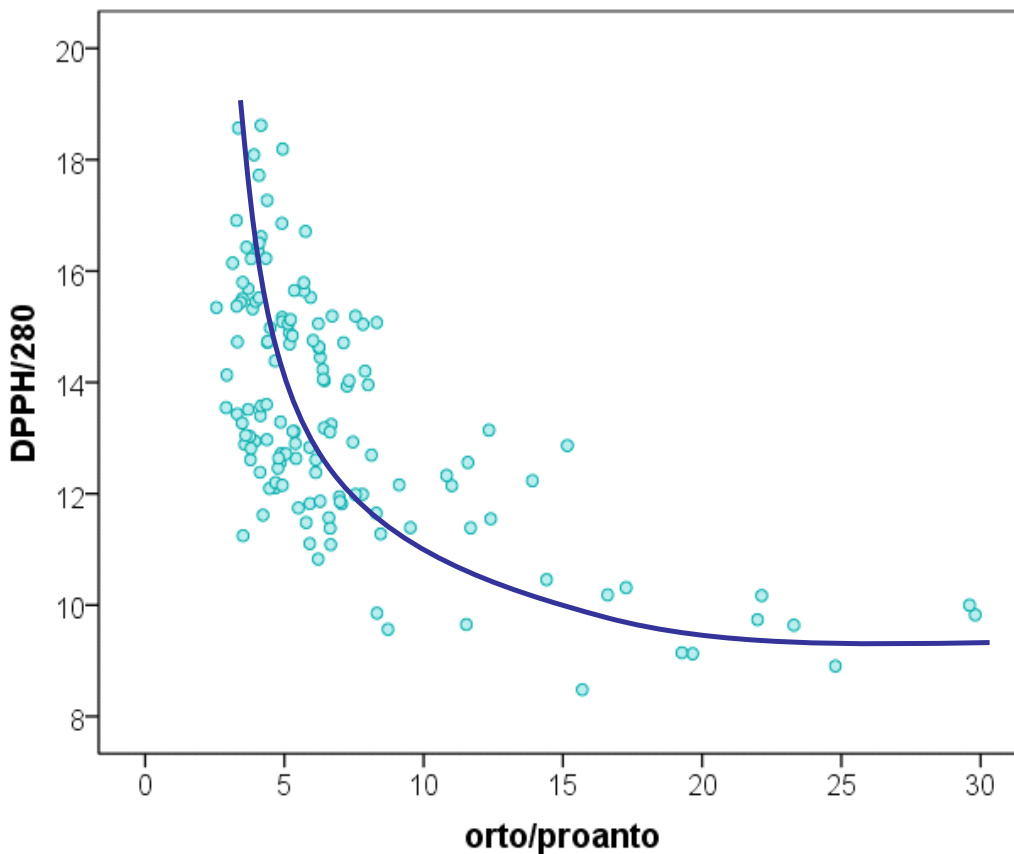


Fig. 4: correlazione tra l'indice del potere antiossidante ed il contenuto in polifenoli, espresso come assorbanza a 280 nm della soluzione

Fig. 5: correlazione tra i due indici proposti

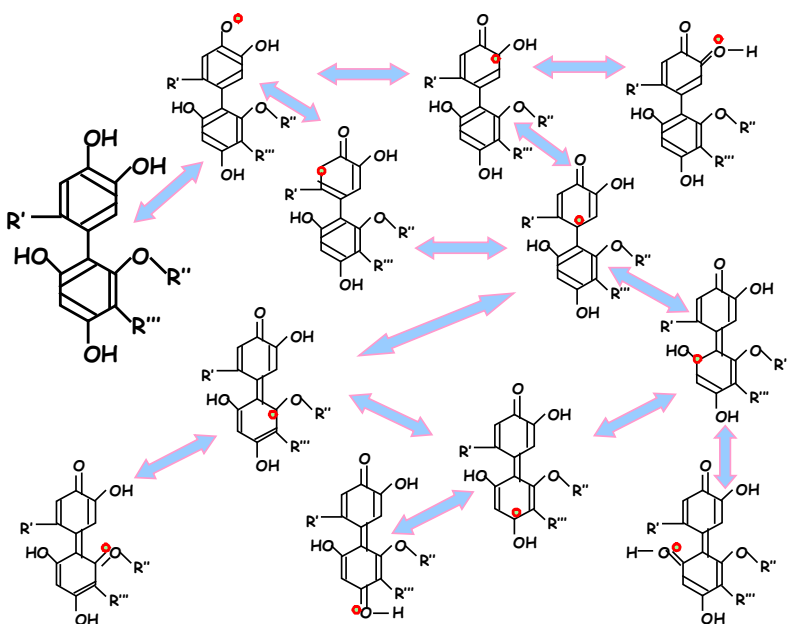


Questo teoricamente significa che i prodotti di ossidazione sono più antiossidanti dei loro precursori. Provando a spiegare questi risultati, abbiamo preso in considerazione le proprietà antiossidanti dei composti fenolici. Quando un fenolo reagisce con un ROS, la velocità di reazione di ciascuna molecola fenolica dipende dalla sua abilità a formare prodotti radicalici relativamente stabili.

I composti contenenti un gruppo 1,2,3-triidrossilico (pirogallolo), un anello aromatico 1,2-idrossilico (catecolo), o un anello aromatico 1,4-diidrossilico (assente nel vino) sono più facilmente ossidabili perché il radicale semichinonico fenoxile risultante può essere stabilizzato da un secondo atomo di ossigeno (Waterhouse e Laurie, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Prendendo ad esempio un prodotto di ossidazione di una proantocianidina proposto da Allen, 1998, possiamo osservare che la stabilizzazione degli intermedi è dovuta all'elevata delocalizzazione del radicale libero (figura 6).

Con questo punto di vista è possibile supporre che i prodotti di ossidazione possano essere più antiossidanti dei loro precursori.

Fig. 6: stabilizzazione del radicale libero di un prodotto di ossidazione



Infine abbiamo selezionato 4 campioni per ogni varietà rappresentativi del trend dell'indice. Dopo analisi HPLC, abbiamo trovato che il cambiamento principale nella composizione polifenolica era relativo alla diminuzione dell'epicatechina-3-O-gallato, in accordo con Kennedy *et al.* (2000) che trovavano un decremento di epicatechina-3-O-gallato dall'8% all'invasatura all'1% al momento della raccolta.

CONCLUSIONI

Durante la maturazione i tannini dei semi evolvono, come dimostrato dal cambiamento di colore e di "gusto". In questo lavoro abbiamo provato a sviluppare un indice obiettivo, facile e veloce (l'analisi richiede 15 minuti), utile per i produttori vitivinicoli.

In questa direzione abbiamo proposto due differenti indici spettrofotometrici, uno relativo alla struttura molecolare ed ai legami tra le sub unità flavanoliche, e l'altro legato alle proprietà antiossidanti. Specialmente il secondo ha dato risultati molto interessanti ed inaspettati. Anche se i polifenoli dell'uva si ossidano durante la maturazione, le loro proprietà antiossidanti aumentano.

Da non sottovalutare l'importanza della comprensione dei fenomeni che stanno alla base delle modifiche fisiologiche che avvengono durante la maturazione dell'uva, perché solo con la loro comprensione sarà possibile indirizzare o simulare i processi fisiologici proponendo tecniche viticole ed enologiche atte a migliorare la produzione vitivinicola. Ad esempio, se l'ossidazione potrà spiegare i cambiamenti sensoriali dei vinaccioli in maturazione, un'ossidazione controllata e mirata potrebbe risolvere alcuni problemi di astringenza, senza provocare la perdita di altri importanti componenti del vino.

RIASSUNTO

Nonostante l'importanza dei tannini nella produzione dei vini rossi, i meccanismi che stanno alla base della loro evoluzione durante la maturazione non sono ancora del tutto chiari. Per la valutazione della maturità fenolica, grazie alla semplicità analitica e all'accumulo progressivo, ci si limita spesso alla valutazione dell'accumulo antocianico, che però non è rappresentativo delle proantocianidine né per pathway né per tempi di sintesi. Inoltre l'evoluzione dei tannini durante la maturazione non è sempre correlata a modifiche quantitative, peraltro molto variabili tra le differenti cultivar. Ciò limita anche l'utilità di analisi chimiche quali il contenuto in polifenoli totali nell'identificazione del raggiungimento della maturità fenolica. Il metodo più semplice che da circa 2000 anni (da Columella a Ristic et al., 2005) si consiglia nella valutazione della maturità ai fini enologici, resta quindi l'osservazione del colore dei vinaccioli. Questo metodo, rapido ed efficace, è però piuttosto soggettivo, per l'elevata disomogeneità di colore sia tra i vinaccioli, che all'interno dello stesso seme. L'imbrunimento del vinacciolo sembra essere dovuto a fenomeni di ossidazione, anche perché l'idea diffusa di una lignificazione del seme con riduzione dell'estraibilità perde di importanza se si considera il fatto che l'indurimento del seme è dovuto alla lignificazione degli strati più interni del tegumento esterno, mentre i tannini si trovano nel parenchima localizzato tra la cuticola e lo strato indurito. L'obiettivo di questo lavoro, è quindi quello capire i fenomeni che portano alla modificazione dei tannini del seme durante la maturazione e di sviluppare un nuovo indice di maturità fenolica basato sull'ossidazione dei composti fenolici, che correla bene con il cambiamento di colore del seme, semplice e rapido, e valutabile con l'utilizzo di strumentazioni abbastanza diffuse. Gli indici sono quindi stati sviluppati con tecniche spettrofotometriche, con il supporto di alcune eluizioni in HPLC al solo scopo di evidenziare le molecole principalmente interessate in questi cambiamenti. L'esperimento si è svolto nel 2009 e nel 2010, in Oltrepò pavese, su due varietà nella prima annata, Pinot nero e Merlot, e con l'aggiunta di Croatina per il 2010, che venivano campionate settimanalmente in tre ripetizioni biologiche, i cui semi venivano immediatamente estratti. Una serie di protocolli analitici è stata testata per capire sia i contenuti, sia le proprietà dei composti fenolici. Particolarmente interessante l'andamento di un indice rappresentativo del potere antiossidante medio dei polifenoli che aumenta durante la maturazione, e che riporta valori simili in tutte le varietà/annate testate. Infine l'analisi HPLC degli estratti ha mostrato una diminuzione evidente di epicatechina-3-O-gallato, soprattutto nelle prime fasi di maturazione. Anche se ulteriori conferme dovranno essere raccolte durante la validazione del metodo, si ritiene che questi indici possano aprire un'interessante prospettiva nella valutazione della maturità fenolica delle uve, con importanti sviluppi applicativi in ambito viticolo/enologico.

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS D.O., 2006. *Phenolics and ripening in grape berries*. Am. J. Enol. Vitic., 57:3. pp. 249-256.
- ALLEN M., 1998. *Phenolics demystified*. Proceedings ASVO oenology seminar. Phenolics and extraction. Adelaide, 9 October 1997. Australian Society of Viticulture and Oenology.
- AQIL F., AHMAD I., MEHMOOD Z., 2006. *Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants*. Turk J Biol, 30. 177-183
- CASTAÑEDA-OVANDO A., PACHECO-HERNÁNDEZ M. DE L., PÀEZ-HERNÁNDEZ M.E., RODRÌGUEZ J.A., GALÀN-VIDAL C.A., 2009. *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Food Chemistry 113: 859-871.
- COLUMELLA. *De re rustica, liber undecimus*.
- DI STEFANO R., CRAVERO M.C., GENTILINI N., 1989. *Metodo per lo studio dei polifenoli nei vini*. L'Enotecnico. Maggio 1989. pp. 83-89.
- DIXON R.A., XIE D., SHARMA S.B., 2005. *Tansley review. Proanthocyanidins – a final frontier in flavonoid research?* New Phytologist, 165: 9-28.
- KAMMERER D., CLAUS A., CARLE R., SCHIEBER A., 2004. *Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (Vitis vinifera L.) by HPLC-DAD-MS/MS*. J Agric Food Chem 52:4360–7.
- KENNEDY J. A., JONES G. P., 2001. *Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol*. J. Agric. Food Chem. 49: 1740-1746.
- KENNEDY J.A., JONES G.P., 2001. *Analysis of Proanthocyanidin Cleavage Products Following Acid-Catalysis in the Presence of Excess Phloroglucinol*. J. Agric. Food Chem., 49: 1740-1746
- KENNEDY J.A., MATTHEWS M., WATERHOUSE A.L., 2000. *Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening*. Phytochemistry 55. pp. 77-85
- MAKKAR, 2000. *Quantification of tannins in tree foliage*. Joint FAO/IAEA, Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. FAO/IAEA Working Document. IAEA, VIENNA, 2000
- MONAGAS M., SUAREZ R., GOMEZ-CORDOVES C., BARTOLOME B., 2005. *Determination of Nonanthocyanin Phenolic Compounds in Red Wines by HPLC DAD/ESI-MS*. Am. J. Enol. Vitic. 56: 2.
- PILATI S., PERAZZOLLI M., MALOSSINI A., CESTARO A., DEMATTÈ L., FONTANA P., DAL RI A., VIOLA R., VELASCO R., MOSER C., 2007. *Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison*. BMC Genomics, 8: 428. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/428>
- RIBEREAU-GAYON P., GLORIES Y., MAUJEAN A., DUBOURDIEU D., 1998. *Trattato di enologia II - Chimica del vino Stabilizzazione Trattamenti*. Edagricole.: 141-204.

RISTIC R., ILAND P.G., 2005. *Relationships between seed and berry development of Vitis vinifera L. cv Shiraz: developmental changes in seed morphology and phenolic composition*. Australian Journal of grape and wine research, 11: 43-58

SIDDHURAJU P., BECKER K., 2003. *Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (Moringa oleifera Lam.) leaves*. J. Agric. Food Chem., 51, 2144-2155

WATERHOUSE A. L., LAURIE V. F., 2006. *Oxidation of wine phenolics: a critical evaluation and hypotheses*. Am. J. Enol. Vitic. 57:3: 306-313.

XIE D., DIXON R.A., 2005. *Review - Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers?* Phytochemistry 66: 2127-2144.