

DOCUMENTO  
TECNICO

T. M. Pellicanò

**\* Fortunato Vilasi**  
**\*\* G. Loredana La Torre**  
**\*\* Giacomo Dugo**  
**\*\*\* Teresa M. Pellicanò**

\* I.R.S.A. - Guarrato (TP)  
 \*\* Dipartimento di Scienze  
 degli Alimenti e dell'Ambiente,  
 Università di Messina  
 S. Agata di Messina (ME)  
 \*\*\* Dipartimento di Chimica,  
 Università della Calabria  
 Arcavacata di Rende (CS)

## CONTENUTO DI ANTIOSSIDANTI E TECNICHE COLTURALI E DI ALLEVAMENTO DELLA VITE

Il presente studio è volto alla determinazione dell'influenza delle tecniche colturali e di allevamento della vite sul contenuto di diverse sostanze antiossidanti in mosti e vini sperimentali da vitigni siciliani sia autoctoni che alloctoni. La determinazione è stata effettuata utilizzando un metodo HPLC-MS/ESI.

### Introduzione

I composti polifenolici, contenuti nel vino, sono ampiamente studiati per le dimostrate proprietà antitumorali, anticoagulanti, antiossidanti. Oltre ad influenzare il colore e le qualità organolettiche del vino, svolgono un ruolo importante nella sua evoluzione ed invecchiamento (1-4). Durante la vinificazione tali sostanze, estratte dalle differenti parti dell'acino d'uva, subiscono sensibili variazioni di strut-

tura nel corso dell'affinamento e dell'invecchiamento del vino.

La tipologia e la concentrazione dei polifenoli può dipendere da numerosi fattori: varietà dell'uva e stato di maturazione, suolo e condizioni climatiche, coltura della vite e trattamenti a cui questa è sottoposta (5).

Scopo della presente indagine, è verificare l'influenza delle tecniche colturali e d'allevamento della vite sul contenuto di sostanze polifenoliche in campioni di mo-

sto sperimentali durante l'intero periodo di vinificazione fino all'imbottigliamento.

Sono state studiate cinque varietà di vitigni sia autoctoni che alloctoni; i dati ottenuti per i mosti sono stati paragonati con quelli relativi ai corrispondenti vini effettuando considerazioni sull'andamento del contenuto in polifenoli durante l'intera fase d'estrazione.

La determinazione analitica è stata effettuata utilizzando un metodo HPLC-MS con interfaccia ESI.

Keywords: HPLC-MS, tecniche allevamento, vino, antiossidanti

**Tab. 1 - Campioni sottoposti ad analisi**

Varietà di uve	Tecniche colturali			Tecniche di allevamento		
	DRD	LED	CRT	CSP	ALB	
Nero d'Avola			X	X	X	
Cabernet Sauvignon			X	X	X	
Merlot	X	X	X	X	X	
Petit Verdot	X	X				
Cabernet Franc	X	X				

DRD: diradato; LED: non diradato; CRT: cortina; CSP: controspalliera; ALB: alberello

## Parte sperimentale

**Materiali.** I solventi utilizzati (acetone, acido formico e H<sub>2</sub>O per HPLC) e gli standard necessari sono stati reperiti dal commercio.

Le soluzioni standard sono state preparate dissolvendo 100 mg di ciascuno standard in una miscela di acqua (pH=3 per acido formico)/metanolo (90:10).

La soluzione standard di *cis*-resveratrolo è stata ottenuta irradiando a 366 nm una soluzione metanolica di *trans*-resveratrolo per 120 min (6).

Tutte le soluzioni sono state conservate a +4 °C e protette dalla luce e prima di essere iniettate sono state filtrate attraverso un filtro da 0.45µm (GMF Whatman).

**Campionatura.** Come riportato in Tab. 1, sono stati analizzati campioni di mosto e vino ottenuti con uve e tecnologie d'allevamento e colturali diverse.

La campionatura è stata effettuata prelevando i campioni di mosto all'inizio della fermentazione, al 2° e al 6° giorno di macerazione, dopo la svinatura e dopo la sfeccatura. A distanza di otto mesi dall'imbottigliamento è stato analizzato il vino ottenuto dal corrispondente mosto. I campioni sono stati conservati alla temperatura di -20° C fino al momento dell'analisi.

**Vinificazione.** All'uva appena pigiata e diraspata sono stati aggiunti 5 g/hl di

SO<sub>2</sub> e lieviti ed attivanti di fermentazione.

Sono state eseguite tre follature giornaliere per i primi due giorni, tre rimontaggi giornalieri con pompa fino al momento della svinatura. Giornalmente, sono stati effettuati i controlli dei parametri chimici ed enologici di fermentazione (alcol, acidità volatile, acidità totale, pH, SO<sub>2</sub> totale e acido malico). Una volta effettuata la sfeccatura, a fermentazione malolattica avvenuta, i vini ottenuti sono stati imbottigliati previa aggiunta di 3 g/hl di SO<sub>2</sub>.

**Analisi dei composti polifenolici mediante HPLC/MS.** Le analisi sono state effettuate senza alcun trattamento di purificazione del campione che, prima dell'analisi HPLC è stato filtrato attraverso un filtro GMF Whatman da 0.45µm.

Utilizzando una metodica HPLC/MS con interfaccia ESI (7), è stato possibile identificare e dosare 24 composti fenolici diversi per analisi diretta in meno di 60 min.

## Risultati e discussione

I composti ad attività antiossidante ricercati sono stati suddivisi in quattro tipologie: acidi idrossibenzoici, idrossicinamici ed esteri (polifenoli semplici); flavanoli; flavan-3-oli e stilbeni.

I polifenoli semplici sono espressi in mg/L di acido gallico, i flavan-3-oli totali in mg/L di catechine, i flavonoli totali in mg/L di mi-

ricetina mentre gli stilbeni sono riportati in mg/L di resveratrolo totale.

## Cultivar Cabernet Franc

I campioni di mosto ottenuti da uve da cv. Cabernet Franc, sottoposte alle tecniche DRD e LED, presentano un andamento simile per le classi di polifenoli considerate (Fig. 1).

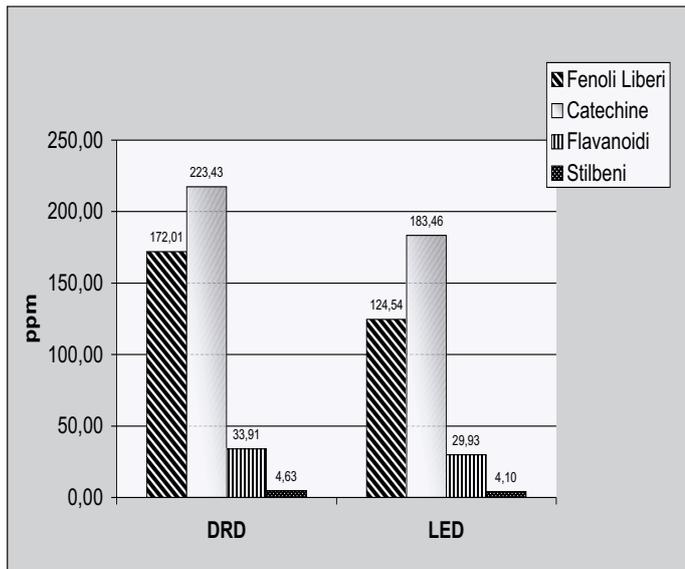
Una maggiore quantità di catechine totali (223.43 mg/L) e di fenoli liberi totali (172.01 mg/L) si osserva per il campione sottoposto alla tecnica DRD.

In particolare, il contenuto di polifenoli semplici totali, espresso in mg/L di acido gallico, varia da 7.76 mg/L all'inizio della fermentazione fino a 172.01mg/L (valore ottenuto nel vino dopo 8 mesi dall'imbottigliamento) per il mosto DRD e da 47.91 mg/L a 124.54 mg/L per il campione LED. L'acido gallico ed il tirosolo sono gli acidi presenti in maggiore quantità nei due campioni di mosto da vitigni Cabernet Franc; i livelli del primo aumentano da 3.30 mg/L a 81.13 mg/L e da 26.49 mg/L a 66.39 mg/L per i due campioni rispettivamente.

L'utilizzo della tecnica DRD sembra portare ad un aumento nell'estrazione dei polifenoli semplici dopo il 6° giorno; al contrario, la seconda (LED) permette un'estrazione maggiore ma costante nella seconda fase. Al 6° giorno dalla fermentazione si sono osservate concentrazioni simili per entrambi i campioni. Il contenuto di flavan-3-oli totali, espresso in mg/L di catechine, aumenta notevolmente nel corso della vinificazione per il mosto DRD fino ad un valore di 223.43 mg/L. Si è osservato, anche per questa classe di composti, un andamento simile a quello descritto per i polifenoli semplici totali con concentrazioni paragonabili al 6° giorno dall'inizio della fermentazione.

Composti quali rutina, isorhamnetina 3-O-glucosi-

**Fig. 1 - Andamento delle classi di polifenoli (mg/L) nei vini da cv. Cabernet Franc**



de, kaempferolo 3-O-glucoside, miricetina, quercetina, kaempferolo e isorhamnetina, non dosati all'inizio della fermentazione, sono stati ritrovati nei campioni con valori totali pari a 33.91 mg/L (DRD) e 29.93 mg/L (LED); in particolare miricetina, rutina e isoquercitrina sono i flavonoli presenti in maggiore quantità nei due campioni di mosto da uve da cv. Cabernet Franc.

Rispetto i precedenti andamenti, per questa classe di composti il profilo, per i due campioni, è simile per cui le due differenti tecniche non ne influenzano l'estrazione.

Riguardo al contenuto di composti stilbenici totali si sono ottenuti valori pari a 4.63 mg/L (DRD) e 4.10 mg/L (LED). Inoltre, all'inizio della fermentazione per il mosto DRD non sono stati dosati *trans*- e *cis*-resveratrolo presenti dal 2° giorno in poi in piccole quantità nel campione.

In base alle suddette osservazioni, anche se i due vini DRD e LED presentano un contenuto in sostanze polifenoliche paragonabile, sembrerebbe che, per la cv. Cabernet Franc, la tecnica colturale LED ne favorisce l'estrazione soprattutto nelle prime fasi successive alla fermentazione. Diversamen-

te, la seconda tecnica permette una maggiore estrazione di tali composti durante la svinatura.

## Cultivar Nero d'Avola

Le viti da cv. Nero d'Avola sono state allevate utilizzando tre diverse tecniche: cortina (CRT), contropalliera CSP) e alberello (ALB).

Come mostrato in Fig. 2 l'andamento evidenzia un livello di catechine totali (192.46 mg/L) maggiore per il campione ottenuto da viti allevate in CSP rispetto gli altri.

Il profilo relativo al contenuto di flavanoli totali, espresso in mg/L di miricetina, per i tre campioni è simile e crescente durante l'intero periodo considerato; in particolare, il campione CSP, presenta un aumento repentino nei primi due giorni e lineare fino alla fine della vinificazione.

La quercetina è il maggior flavonolo presente seguito dalla miricetina, l'isoquercitrina e la rutina. I campioni ottenuti da viti allevate in CSP presentano un contenuto di rutina maggiore rispetto quelli ottenuti da viti allevate in CRT e ALB che al contrario, presentano un maggiore contenuto di miricetina e quercetina. Tuttavia, per il campione ALB, dal 2° giorno in poi, il livello di flavonoli totali è leggermente maggiore rispetto ai rimanenti campioni.

Le concentrazioni di procianidina B1, ritrovate nei tre campioni, sono simili mentre, si sono ottenuti valori diversi di (+)- catechina e (-)-epicatechina per i campioni ottenuti da viti allevate con la tecnica dell'alberello. I valori ottenuti per il campione ALB si discostano leggermente, dal 6° giorno, da quelli relativi ai campioni CRT e CSP.

Da queste prime osservazioni, si evince che l'allevamento in ALB potrebbe portare ad una maggiore estrazione delle due classi di composti polifenolici fin qui

considerate.

Per i polifenoli liberi totali l'andamento osservato è simile per tutti i campioni; aumenta all'aumentare del periodo considerato e presenta concentrazioni simili al 6° giorno dall'inizio della fermentazione.

L'acido gallico, il tirosolo, l'acido vanillico e l'acido caffeico sono presenti in maggiore quantità rispetto gli altri composti appartenenti alla stessa famiglia; il valore più alto in acido gallico è stato riscontrato nel campione ottenuto da viti allevate con la tecnica dell'alberello (87.60 mg/L).

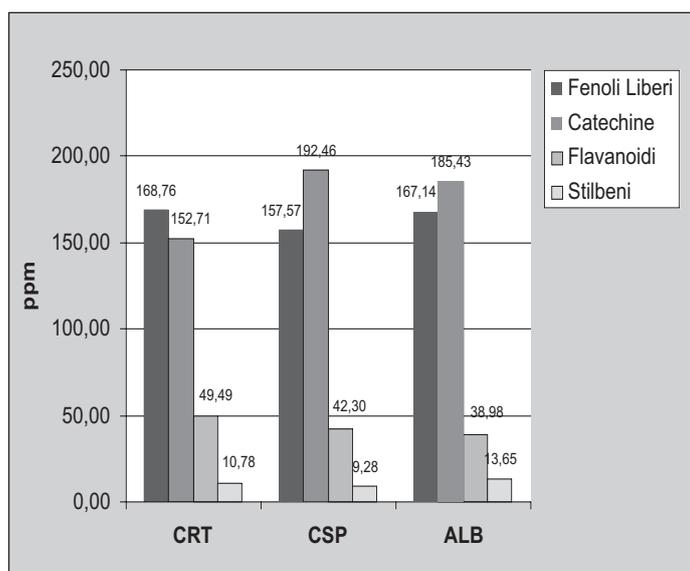
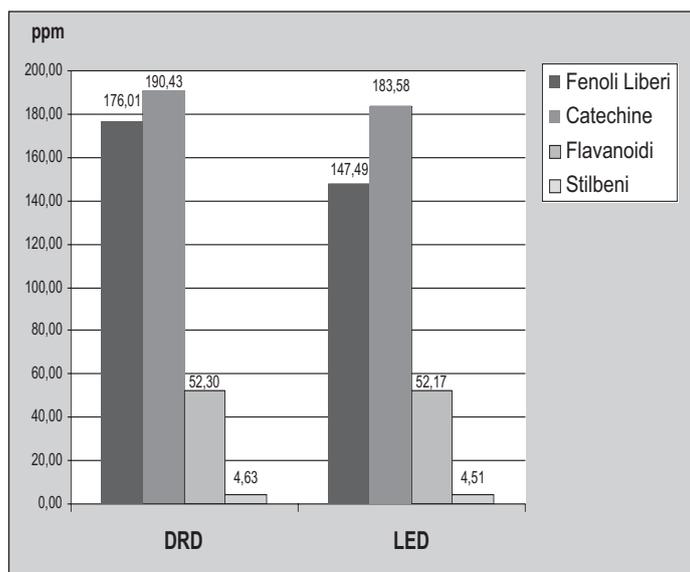
Il contenuto totale di composti stilbenici sembra subire leggere variazioni a seguito delle tecniche di allevamento adottate; fino al 2° giorno l'andamento per i tre campioni è simile successivamente, per il campione prodotto da viti allevate in alberello, si sono ottenuti i livelli più alti di *trans*-resveratrolo libero (6.75 mg/L) e legato (4.38 mg/L) e *cis*-resveratrolo libero (1.01 mg/L) e legato (1.52 mg/L). Dai dati raccolti si può concludere che il campione ottenuto da uve da cv. Nero d'Avola, allevate con la tecnica dell'alberello, il contenuto in composti polifenolici è superiore rispetto gli altri campioni.

## Cultivar Petit Verdot

La Fig. 3 mostra l'andamento osservato per i campioni di mosto ottenuti da uve da cv. Petit Verdot sottoposti, come i mosti Cabernet Franc, alle tecniche colturali DRD e LED.

I livelli delle quattro classi di composti polifenolici considerate sono paragonabili nei due campioni DRD e LED ad eccezione del contenuto di polifenoli semplici totali che è superiore nel primo (176.01 mg/L) rispetto il secondo (147.49 mg/L).

Infatti, durante la prima fase fino al 6° giorno, la tecnica di vinificazione non sembra influenzare l'estra-

**Fig. 2 - Andamento delle classi di polifenoli (mg/L) nei vini da cv. Nero d'Avola****Fig. 3 - Andamento delle classi di polifenoli (mg/L) in vini da cv. Petit Verdot**

zione di tali sostanze; nella seconda fase, dopo la svinatura, la tecnica DRD prevale sulla LED.

Come osservato per i campioni di Cabernet Franc anche in questo caso nel 6° giorno successivo alla fermentazione la concentrazione delle sostanze antiossidanti è simile ad eccezione dei composti stilbenici che, invece, presentano un aumento dal 2° giorno con valori più alti nel campione LED pur raggiungendo, nel vino (4.51 mg/L), quantità simili.

Riguardo al contenuto delle rimanenti due classi di sostanze questo, per la cv. Petit Verdot, non sembra essere fortemente influenzato dalla tecnica di vinificazione adottata in quanto i profili polifenolici presentano lo stesso andamento e valori paragonabili.

Concludendo, dai dati ottenuti si evince che, a parte lievi differenze, per la cv. Petit Verdot le due diverse tecniche colturali non comportano alcuna modifica nel contenuto in sostanze antiossidanti.

## Cultivar Cabernet Sauvignon

Tali vitigni, come quelli Nero d'Avola, sono stati allevati utilizzando tre diverse tecniche: cortina (CRT), controspalliera (CSP) e alberello (ALB).

L'andamento totale delle classi polifenoliche sembra essere influenzato dalla tecnica di allevamento, infatti per il campione ALB si sono ottenuti valori superiori (Fig.4).

Nei due giorni successivi alla fermentazione, i livelli di polifenoli liberi totali risultano paragonabili per i tre campioni, successivamente, il campione ottenuto da vitigni allevati con la tecnica dell'alberello si discosta notevolmente dagli altri fino al valore di 222.72 mg/L.

L'acido gallico, il tirosolo e l'acido caffeico sono presenti in maggiore quantità rispetto agli altri composti appartenenti alla stessa famiglia; il valore più alto in acido gallico è stato riscontrato, appunto, nel campione ALB (114.18 mg/L).

Il profilo relativo al contenuto di flavanoli totali, per i tre campioni, è debolmente crescente durante l'intero periodo considerato; in particolare, al 6° giorno di fermentazione, il campione CRT mostra un aumento repentino rispetto agli altri e successivamente diventa confrontabile nella seconda fase.

La miricetina, la quercetina e la rutina sono i flavonoli presenti in maggiore quantità; nel campione ALB il loro contenuto è pari a 18.58 mg/L, 17.92 mg/L e 10.99 mg/L.

I tre campioni presentano un andamento nel contenuto di flavan-3-oli totali discordante infatti, per i campioni CRT e CSP il profilo è crescente fino alla svinatura e dopo di essa decrescente. Diversamente, per il campione ALB l'andamento è crescente durante tutto l'arco di tempo considerato. I tre andamenti coincidono solo al 6° giorno; gli stessi vini presentano un diverso contenuto di tali composti.

L'influenza della tecnica di allevamento è ancora più evidente sul contenuto totale di composti stilbenici infatti, l'andamento relativo al campione ALB si differenzia notevolmente dagli altri due campioni che presentano i valori più bassi. Anche in questo caso, come per il campione ottenuto da uve da cv. Nero d'Avola, i valori ottenuti si discostano, dopo il 6° giorno, da quelli relativi ai campioni CRT e CSP.

Da tali osservazioni si deduce che anche per la cv. Cabernet Sauvignon, l'allevamento in ALB potrebbe portare ad una maggiore presenza delle classi di composti polifenolici considerate.

## Cultivar Merlot

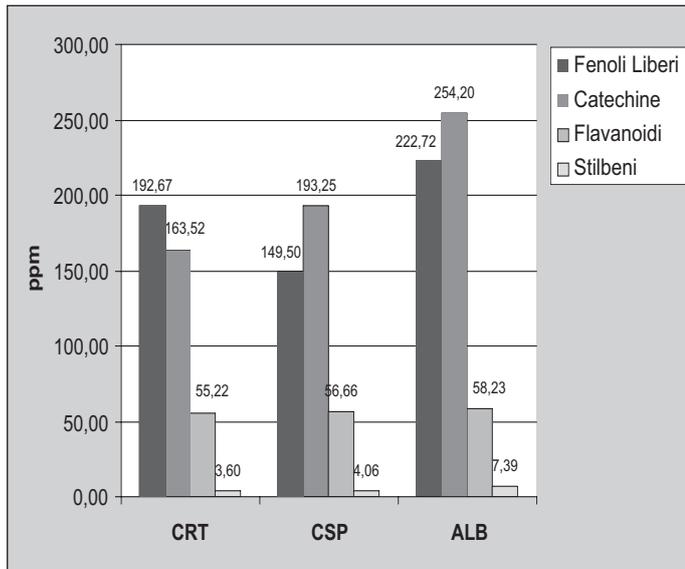
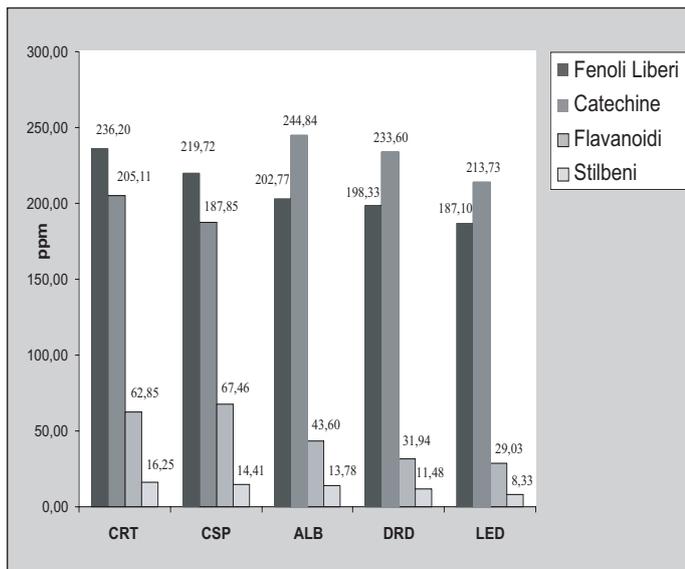
La Fig. 5 riporta l'andamento dei composti polifenolici dei mosti ottenuti da vitigni da cv. Merlot, sottoposti alle tecniche DRD e LED e dei mosti prodotti da vitigni Merlot allevati in CRT, CSP e ALB.

Escluso il contenuto di polifenoli liberi totali (236.20 mg/L) nel campione CRT; di flavan-3-oli totali (244.84 mg/L) nel campione ALB e di flavanoli totali (67.46 mg/L) nel campione CSP, i rimanenti valori risultano paragonabili. Dai dati ottenuti si potrebbe dedurre che la tecnica LED porti ad una minore estrazione di composti polifenolici.

In particolare, il contenuto di polifenoli semplici totali cresce in maniera proporzionale nei cinque campioni, tra questi i valori maggiori si sono ottenuti per il campione prodotto da viti allevate in cortina (236.20 mg/L nel vino).

L'andamento dei flavan-3-oli si differenzia dal precedente in quanto è il campione ALB a presentare il valore più alto (244.84 mg/L).

Le cinque curve hanno un andamento crescente durante la fase di fermentazione e macerazione, successivamente, presentano un abbassamento ad esclusione dei

**Fig. 4 - Andamento delle classi di polifenoli (mg/L) in vini da cv. Cabernet Sauvignon****Fig. 5 - Andamento delle classi di polifenoli (mg/L) in mosti da cv. Merlot**

campioni ottenuti con tecniche di vinificazione DRD e LED. Con la sfecciatura il livello di catechine per il campione ALB aumenta fino a raggiungere, come già detto, il massimo valore.

L'estrazione dei flavanoli totali sembra essere influenzata dalle diverse tecniche utilizzate infatti, mentre i campioni sottoposti alle tecniche di vinificazione DRD e LED presentano i valori più bassi, quelli ottenuti da vitigni Merlot allevati in contospalliera e cortina possiedono un contenuto su-

periore di tali composti. In questo caso è il campione CSP a presentare il valore più alto (67.46 mg/L).

Mentre per i precedenti andamenti, le tecniche non sembravano influenzare di molto il contenuto in sostanze polifenoliche nei campioni, l'ultimo sottolinea che la classe stilbenica subisce l'influenza della tecnica adottata infatti, le cinque curve non presentano punti in comune tranne che al 2° giorno dalla fermentazione dove i valori relativi ai campioni CRT, CSP e DRD risultano paragonabili. Il vino CRT presenta il valore più alto in composti stilbenici totali (16.25 mg/L).

I cinque vini prodotti da uve Merlot non presentano, quindi, valori paragonabili per le quattro classi di sostanze polifenoliche considerate.

## Considerazioni conclusive

Come è noto, il contenuto di composti a carattere antiossidante in campioni di mosto e vino può variare in relazione alle tecniche di vinificazione e alla varietà e qualità dei vitigni.

Questo studio ha permesso di verificare tale dipendenza considerando tre diverse tecniche di allevamento e due diverse tecniche colturali applicate sia su vitigni autoctoni che alloctoni.

La cv. Cabernet Franc, rispetto le altre, subisce l'influenza della tecnica colturale utilizzata; tra le due, qui considerate, la LED favorisce l'estrazione dei composti fenolici nelle prime fasi successive alla fermentazione.

I vitigni di cv. Nero d'Avola e Cabernet Sauvignon, se allevati con la tecnica dell'alberello, favoriscono una maggiore estrazione dei composti polifenolici considerati. Tra le famiglie di composti antiossidanti ricercate i polifenoli liberi e, più debolmente, i flavan-3-oli, sono influenzati dalle tecniche colturali infatti, tutti i campioni DRD hanno presentato i valori più alti. Inol-

tre la loro estrazione sembra anche essere legata a tecniche di allevamento quali la cortina e l'alberello.

Al contrario, la famiglia dei flavanoli sembra essere influenzata soprattutto dalle tecniche di allevamento infatti, i campioni ottenuti da vitigni allevati in contospalliera, alberello e cortina presentano valori superiori.

Infine l'estrazione dei composti stilbenici è fortemente influenzata dalla tecnica dell'alberello; lievemente influenzata dalla tecnica colturale LED e non influenzata dalle restanti tecniche.

## Riassunto

È noto come il contenuto di sostanze polifenoliche, presenti nel vino, sia influenzato da fattori diversi quali le condizioni pedoclimatiche, le tecniche di vinificazione, le varietà, le pratiche enologiche di conservazione e di stabilizzazione.

Lo studio è volto alla determinazione dell'influenza delle tecniche colturali e di allevamento della vite sul contenuto di sostanze antiossidanti in mosti e vini sperimentali da vitigni sia autoctoni sia alloctoni. La determinazione analitica è stata effettuata utilizzando un metodo HPLC-MS con interfaccia ESI.

## Bibliografia

- A.S. St-Leger, A.L. Cochrane, F. Moore, *Lancet* 1 (1979) 1017.
- L.A. Friedman, A.W. Kimbal, *Am. J. Epidemiol.* 124 (1986) 481.
- A.L. Klautsky, M.A. Armstrong, *Am. J. Epidemiol.* 73 (1993) 467.
- J.L. Robichaud, A.C. Noble, *J. Sci. Food Agric.* 53 (1990) 343.
- P. Viñas, C. Lòpez-erroz, J.J. Marin-Hernández, M. Hernández-Cordoba, *J. Chrom. A* 871 (2000) 85.
- B.C. Trela, A.L. Waterhouse, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 1253.
- G. L. La Torre, M. Saitta, F. Vilasi, T. M. Pellicandò, G.mo Dugo, *Food Chemistry*, (2006), 94, 240-250.