

DOCUMENTO
TECNICODa sinistra:
G. Nicolini
L. Larcher

Giorgio Nicolini
Roberto Larcher
Daniela Bertoldi
Christian Puecher

Fondazione Edmund Mach
Istituto Agrario di S. Michele
all'Adige Centro Sperimentale,
Dip. Qualità Agro-Alimentare,
San Michele all'Adige (TN)

FENOLI VOLATILI DEI VINI: METODI RAPIDI PER CONTROLLI ENOCHIMICI DI PROCESSO

I controlli enochimici di processo richiedono metodi accurati, precisi, ma soprattutto rapidi e economici. Nel caso dei fenoli volatili sono ora disponibili tre nuovi metodi HPLC privi di preparativa per l'analisi di 4-etilfenolo, 4-etilguaiacolo, 4-vinilfenolo, 4-viniguaiacolo e, per la prima volta, del 4-etilcatecolo.

Introduzione

Tra i composti responsabili di deviazioni organolettiche dei vini che, benché noti ai ricercatori da una quarantina d'anni (Webb, 1967; Dubois e Brulè, 1970), negli ultimi anni sono saliti all'attenzione di molti enologi ci sono i cosiddetti "fenoli volatili". Questi composti, solitamente presenti in concentrazioni variabili da qualche decina a diverse centinaia di microgrammi per litro, in vini indiscutibilmente ed irri-

mediabilmente difettati possono arrivare anche a tenori di qualche milligrammo determinando sentori che nel loro complesso vengono definiti come fenolici, da medicinale, da farmacia, da fumo, da spezie (Montedoro e Bertuccioli, 1986; Chatonnet *et al.*, 1992,1993; Rapp e Versini, 1996).

Nei "fenoli volatili" si includono solitamente composti che - in relazione al loro significato tecnologico, alla loro origine e presenza nelle diverse tipologie di vini -

possono essere ricondotti a 2 categorie, quella dei vinilfenoli e quella degli etilfenoli. La prima comprende principalmente il 4-vinilfenolo ed il 4-vinilguaiacolo, mentre la seconda comprende le rispettive forme ridotte 4-etilfenolo e 4-etilguaiacolo (Fig. 1).

Significato sensoriale. In termini di contributo sensoriale, il 4-vinilfenolo tende a mascherare le note fruttate dei vini bianchi anche quando presente al di sotto della

Parole chiave: vino, vinilfenoli, etilfenoli, 4-etilcatecolo, *Brettanomyces*

Fig. 1 - Struttura dei principali fenoli volatili responsabili di possibili off-flavour dei vini rossi (sopra) e bianchi (sotto)

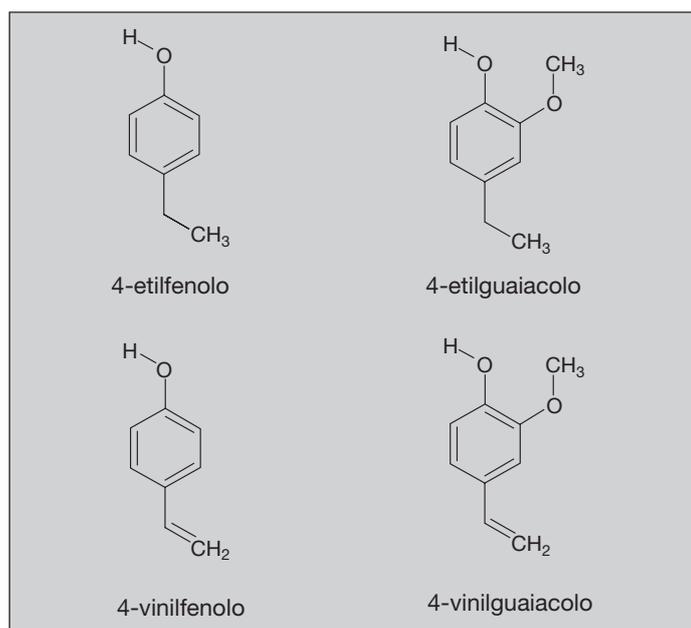
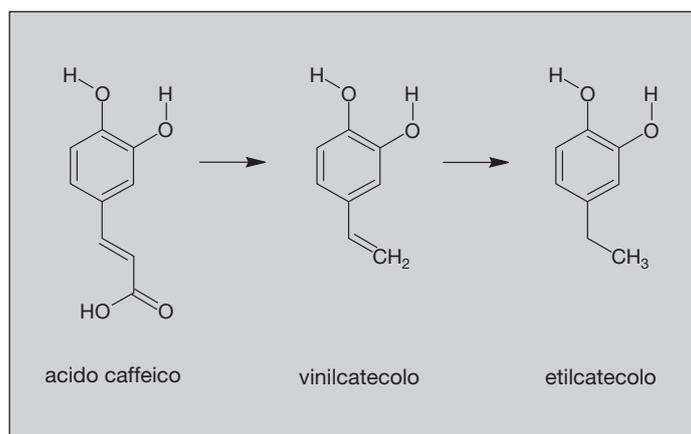


Fig. 2 - Biochimismo di formazione del 4-etilcatecolo



sua soglia olfattiva. Apporta odori che, nella letteratura internazionale, vengono descritti come “da band-aid” o “da pittura”, anche se, in funzione della sua concentrazione ed in combinazione con il 4-vinilguaiacolo, può contribuire alla note floreali tipo ginestra dei vini Chardonnay ed a quelle speziate del Traminer aromatico. Contribuisce inoltre alle tipiche note olfattive di alcune birre, ad esempio le Weizen bavaresi. Il 4-etilfenolo è invece responsabile di sentori “da scuderia”, “da cavallo”, “da cuoio”, e miscele dei 2 etilfenoli determinano odori “animali”, “da stalla” cui il 4-etilguaiacolo sembra con-

tribuire con una aroma definito, semmai, un po' più “dolciastro” (Etievant, 1991; Meilgaard, 1975).

Genesi. I vini bianchi possono presentare vinilfenoli e solitamente non hanno etilfenoli mentre l'opposto si verifica nei vini rossi e tale quadro compositivo è dovuto alla genesi delle 2 classi di fenoli volatili. I vinilfenoli infatti sono prodotti durante il processo fermentativo da lieviti detti POF+ (Phenolic Off Flavour positive) in grado di realizzare la decarbossilazione stereospecifica delle forme trans degli acidi p-cumarico e ferulico (Albagnac, 1975; Chatonnet et al., 1993; Grando et al., 1993). Le proantocianidine oligomere inibiscono la cinamato decarbossilasi dei *S. cerevisiae* (Chatonnet et al., 1990) e questa è la ragione per la quale si trovano solo limitati contenuti di vinilfenoli nei vini rossi. Gli etilfenoli sono invece prodotti per decarbossilazione enzimatica dei citati acidi cinnamici e successiva riduzione dei vinilfenoli esclusivamente da parte di lieviti del genere *Brettanomyces* / *Dekkera*, se si escludono piccole quantità che potrebbero essere formate, in particolari condizioni ambientali, da alcuni altri lieviti e batteri lattici (es. *Lactobacillus plantarum*) (Chatonnet et al., 1995; Couto et al., 2006; Barata et al., 2006). Diversamente dai *S. cerevisiae*, *Brettanomyces* è dotato di vinilfenolo riduttasi e le sue decarbossilasi non sono inibite dalle proantocianidine.

Approcci analitici. Dal punto di vista tecnologico l'incidenza dei fenoli volatili sulla qualità dei vini è ritenuta piuttosto importante. Un ampio campionamento realizzato su vini commerciali in Francia alcuni anni fa ha mostrato che circa un terzo dei vini rossi analizzati presentava contenuti di etilfenoli al di sopra della soglia organolettica (Chatonnet et al., 1993) e chi, anche in anni più recenti, ha assag-

giato molti rossi della regione bordolese può sicuramente confermarlo.

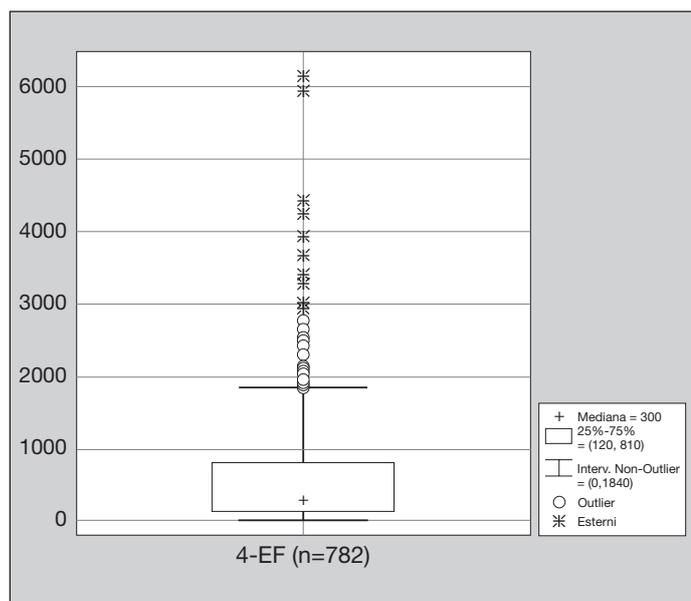
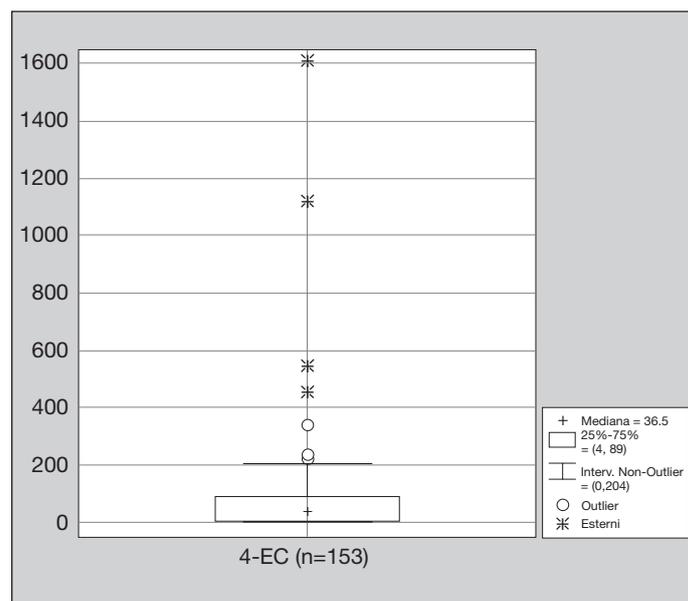
Tale situazione evidenzia come sia quanto mai opportuno disporre di uno stringente controllo analitico in cantina che si affianchi alle ormai note precauzioni enologiche (adeguati inoculi di lieviti e batteri, pulizia e sanificazione, sostituzione dei “legni” infetti, solfitazioni adeguate ...).

Gli approcci chimico-analitici per la misura dei fenoli volatili vedono in primo luogo la gascromatografia (GC) con vari detector - olfattometrico, a ionizzazione di fiamma (GC-FID) o a spettrometria di massa (GC-MS) - applicata a campioni preventivamente purificati e concentrati con processi di estrazione liquido-liquido o su fase solida (SPE), o con microestrazione (SPME) anche in spazio di testa (HS-SPME) (Chatonnet e Boiron 1988; Grando et al., 1993; Moio et al. 1994; Jaurata et al. 2005; Boido et al., 2003; Fariña et al. 2007). In alternativa è stata utilizzata anche la tecnica in cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) con i detector MS-MS, Diode Array e fluorimetro (Caboni et al. 2007).

Risultati e Discussione

Nuovi metodi. La possibilità di applicare metodiche chimico-analitiche nei controlli enologici di processo passa attraverso la disponibilità di metodi accurati e precisi, ma soprattutto rapidi e possibilmente economici. Poiché nel caso dei fenoli volatili tale possibilità era di fatto inesistente, l'Unità di Ricerca di Enologia ed il Laboratorio del Dipartimento Qualità Agro-Alimentare dell'Istituto Agrario di San Michele all'Adige, con la collaborazione di Cavit S.C., si sono mosse per ovviare a tale problema.

A riguardo, sono state messe a punto 3 metodiche analitiche in HPLC isocriati-

Fig. 3 - Distribuzione dei contenuti di 4-etilfenolo in vini rossi italiani**Fig. 4 - Distribuzione dei contenuti di 4-etilcatecolo in vini rossi italiani**

co, pubblicate o in fase di pubblicazione, per:

la determinazione congiunta di 4-etilfenolo (4-EF), 4-etilguaiacolo (4-EG), 4-vinilfenolo (4-VF) e 4-vinilguaiacolo (4-VG) (Larcher *et al.* 2007),

la determinazione del solo 4-EF (Nicolini *et al.* 2007),

la determinazione del 4-etilcatecolo (4-EC) (Larcher *et al.* 2008).

Analisi simultanea. La prima metodica usa una colonna Purospher C18e ed un detector coulometrico e consente la quantificazione simultanea dei 4 fenoli volatili in soli 15 minuti, senza alcuna preparativa del campione.

Validata secondo il protocollo previsto dall'OIV, è lineare fino a 2000 µg/L, con limiti di quantificazione di 3 µg/L ed elevati livelli di precisione testimoniati da RSD percentuali inferiori al 3% per concentrazioni dei composti maggiori di 4-7 µg/L.

L'utilizzo del detector coulometrico consente di risolvere elettrochimicamente i possibili problemi di coeluzione cromatografia, garantendo al metodo elevate prestazioni in termini di accuratezza e sensibilità, assicurando in ogni caso tempistiche di separazione molto strette.

La metodica trova applicabilità sia nel caso dei vini bianchi che in quello dei rossi poiché misura sia vinil che etil-fenoli.

Il solo 4-etilfenolo. La seconda metodica - anch'essa senza preparativa del campione - usa una colonna Zorbax Eclipse Plus C18 e misura senza problemi di coeluzione il solo 4-etilfenolo, ma in meno di 5 minuti.

Utilizza un detector fluorimetrico che, rispetto a quello della metodica precedente, è sicuramente meno costoso e di maggior diffusione nei laboratori enologici poiché routinariamente applicato nell'analisi di polifenoli, micotossine e, dopo derivatizzazione, di aminoacidi e ammine biogene.

La misura del 4-EF con questo metodo è lineare fino a 2000 µg/L, con detection limit di 4.0 µg/L e RSD percentuali inferiori al 3% per concentrazioni di 4-EF maggiori di 20 µg/L. Mirata all'analisi del fenolo volatile negativamente più impattante dei vini rossi, trova in questi il suo primario campo di applicazione.

Queste nuove metodiche HPLC riducono a circa un decimo, un quindicesimo i tempi normalmente necessari per quantificare gli stessi composti in GC.

Il 4-etilcatecolo. Questo fenolo volatile deriva dall'attività dei *Brettanomyces* sull'acido caffeico secondo un biochimismo analogo a quello noto per gli etilfenoli già citati (Edlin *et al.*, 1995; Porret *et al.*, 2004) (Fig. 2). In letteratura sono riportate solo poche informazioni sia relativamente al ruolo sensoriale di questo composto che alla sua presenza nei vini al commercio. La prima misura del 4-EC nei vini si è avuta infatti solamente per GC nel 2004 (Hesford *et al.* 2004) in conseguenza dei problemi analitici determinati dall'alta polarità del composto che causava allargamenti e scodamenti del picco cromatografico. Il metodo di Hesford prevedeva la derivatizzazione del fenolo con aldeide acetica dopo estrazione liquido-liquido. Nel 2007 Carillo e Tena hanno proposto una variante in GC-MS con utilizzo della microestrazione su fibra in spazio di testa.

La terza metodica da noi proposta per la quantificazione di fenoli volatili è mirata all'analisi diretta, per la prima volta, del 4-etilcatecolo per HPLC. La misura viene effettuata con strumentazione e condizioni sostanzialmente simili a quelle previste per l'analisi elettrochimica dei 4 principali fenoli volatili. La quantifica-

zione è accurata, rapida (6 min), e finalmente senza l'aggravio di fasi preparative di derivatizzazione ed estrazione previste dalle metodiche GC. Il metodo è lineare fino a 1500 µg/L, con detection limit inferiore ai 2 µg/L ed RSD% inferiori al 3%.

Vini italiani. La messa a punto di nuovi metodi rapidi ha permesso l'applicazione degli stessi all'analisi di un discreto numero di vini italiani, finalizzando i controlli ai vini rossi - giustamente considerati più a rischio rispetto alla presenza di off-flavours da fenoli volatili - ed in particolare al 4-EF. In letteratura questo composto è riportato incidere negativamente sulla qualità sensorialmente percepibile quando presente al di sopra dei 430 µg/L circa. Si deve pertanto dedurre dall'osservazione della Fig. 3 che una percentuale non irrilevante dei quasi 800 vini analizzati, pressoché esclusivamente a Doc ed Igt, era con molta probabilità sensorialmente interferita o penalizzata in modo più o meno marcato dalla presenza di 4-EF.

La prima indagine numericamente significativa mai realizzata sul 4-EC ci ha consentito di osservare (Fig. 4) che nei vini rossi questo composto è presente in quantità solitamente inferiori ai 200 µg/L circa, raggiungendo peraltro contenuti dell'ordine del µg/L in vini marcatamente difettati anche per presenza congiunta degli altri etilfenoli. È stato peraltro trovato anche in vini bianchi e passiti, benché più raramente ed in concentrazioni solitamente inferiori a qualche decina di µg/L. Dal punto di vista sensoriale è riportata in letteratura una soglia organolettica di ca. 50 µg/L; a questo riguardo, nostre osservazioni hanno evidenziato che erano percepiti come differenti vini bianchi e rossi nei quali il 4-EC era stato aggiunto in quantità minime varianti tra 100 e 400 µg/L, ragionevolmente in relazio-

ne con la minore o maggiore ricchezza e complessità aromatica dei vini di partenza. L'apporto aromatico del 4-EC non è apparso comunque essere particolarmente negativo, contribuendo piuttosto alla aromaticità complessiva - per concentrazioni attorno alla soglia di differenza o anche superiori, in qualche caso fino al µg/L, - con note speziate, balsamiche, legnose e talvolta lontanamente da fumo.

Considerazioni conclusive

La frequenza con la quale i fenoli volatili sono presenti a livelli tali da interferire nella qualità dei vini, in particolare rossi, giustifica un attento monitoraggio della presenza di tali composti e della loro eventuale evoluzione. Le prestazioni delle nuove metodiche rapide in cromatografia liquida sono adeguate sia per quantificare i fenoli presenti oltre le concentrazioni di soglia organolettica sia per mettere precocemente in evidenza inquinamenti da *Brettanomyces* non ancora sensorialmente individuabili, ossia quando i composti sono ancora presenti a livello di pochi microgrammi per litro.

La disponibilità dei nuovi metodi di sicuro interesse per l'industria enologica permette oggi di portare finalmente la quantificazione di vari fenoli volatili dal campo della ricerca applicata a quello del controllo di processo.

Riassunto

Si presentano le prestazioni analitiche di 3 metodi HPLC per l'analisi, senza preparazione dei vini, di 4-etilfenolo, 4-etilguaiacolo, 4-vinilfenolo, 4-vinilguaiacolo e, per la prima volta, 4-etilcatecolo. I metodi sono particolarmente rapidi (3-15 minuti) ed adatti a quantificare anche pochi µg/L consentendo, nel caso degli etilfenoli, l'individuazione precoce di inquinamenti da *Brettano-*

myces.

Misurato in circa 150 vini rossi, il 4-etilcatecolo è risultato essere presente in quantità solitamente inferiori ai 200 µg/L circa, raggiungendo peraltro contenuti dell'ordine del µg/L in vini marcatamente difettati. È presente talora anche in bianchi e passiti, benché in concentrazioni solitamente inferiori a qualche decina di µg/L. L'apporto aromatico del solo 4-etilcatecolo, con soglia olfattiva in vino tra 100 e 400 µg/L, non è apparso così negativo come quello di altri fenoli, contribuendo piuttosto alla aromaticità complessiva con note speziate, balsamiche, legnose e talvolta lontanamente da fumo.

Abstract

Volatile phenols in wine. Rapid chemical methods for process control.

Key words: wine, vinylphenols, ethylphenols, 4-ethylcatechol, *Brettanomyces*.

The paper presents the analytical performance of 3 new HPLC methods for the quantification of 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol, 4-vinylphenol, 4-vinylguaiacol and, for the first time, 4-ethylcatechol. No sample preparation is required. The methods are rapid (3-15 mins) and suitable for quantifying even a few µg/L. In the case of ethylphenols this allows early recognition of contamination by *Brettanomyces*. When measured in around 150 red wines, 4-ethylcatechol was usually below 200 µg/L, sometimes being 1-2 mg/L in defective wines. It was also present in white and raisin wines, at a level usually below a few dozen µg/L. When close to its sensory threshold in wine (100-400 µg/L), 4-ethylcatechol would appear to be less negative than other volatile phenols, contributing to the overall aroma of wine with spicy, balsamic, woody and vaguely smoky scents.

Bibliografia

- G. Albagnac (1975). La décarboxylation des acides cinnamiques substitués par les levures. *Ann. Technol. Agric.*, 24, 133-141.
- A. Barata, A. Nobre, P. Correia, M. Malfeito-Ferreira, V. Loureiro (2006). Growth and 4-ethylphenol production by the yeast *Pichia guilliermondii* in grape juices. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 133-138.
- E. Boido, A. Lloret, K. Medina, L. Fariña, F. Carrau, G. Versini, E. Della Cassa (2003). Aroma composition of *Vitis vinifera* cv. Tannat: the typical red wine from Uruguay. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5408-5413.
- P. Caboni, G. Sarais, M. Cabras, A. Angioni (2007). Determination of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in wines by LC-MS-MS and HPLC-DAD-Fluorescence. *J. Agric. Food Chem.*, 55 7288-7293.
- J. Carrillo, M. Tena (2007). Determination of ethylphenols in wine by in situ derivatisation and headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 387, 2547-2558.
- P. Chatonnet, J.N. Boidron (1988). Dosages de phénols volatils dans les vins par chromatographie en phase gazeuse. *Sci. Aliments*, 8, 479-488.
- P. Chatonnet, J.N. Boidron, M. Pons (1990). Elevage des vins rouges en fûts de chêne: evolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. *Sci. Aliments*, 10, 565-587.
- P. Chatonnet, D. Dubourdieu, J.N. Boidron (1995). The influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 463-468.
- P. Chatonnet, D. Dubourdieu, J.N. Boidron, V. Lavigne (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agric.*, 62, 191-202.
- P. Chatonnet, D. Dubourdieu, J.N. Boidron, M. Pons (1992). The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.*, 60, 165-178.
- J.A. Couto, F.M. Campos, A.R. Figueiredo, T.A. Hogg (2006). Ability of lactic acid bacteria to produce volatile phenols. *Am. J. Enol. Vitic.*, 57, 166-171.
- P. Dubois, G. Brulè (1970). Étude des phénols volatils des vins rouges. *C.R. Acad. Sci., Série D.*, 1797-1798.
- D.A.N. Edlin, A. Narbad, R. J. Dickinson, D. Lloyd (1995). The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 125 311-316.
- P. Etievant (1991). Ch. 14. Wine. In: *Volatile compounds in foods and beverages*, H. Maarse (Ed.), M. Dekker Inc., New-York.
- L. Fariña, E. Boido, F. Carrau, E. Dellacassa (2007). Determination of volatile phenols in red wines by dispersive liquid-liquid microextraction and gas chromatography-mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A*, 1157, 46-50.
- M.S. Grando, G. Versini, G. Nicolini, F. Mattivi (1993). Selective use of wine yeast strains having different volatile phenols production. *Vitis*, 32, 43-50.
- F. Hesford, K. Schneider (2004). Die Entdeckung eines dritten Ethylphenols als Mitverursacher des *Brettanomyces*-Fehltons. *Schweiz. Z. Obst- und Weinbau*, 13, 11-13.
- I. Jarauta, J. Cacho, V. Ferreira (2005). Concurrent phenomena contributing to the formation of the aroma of wine during aging in oak wood: an analytical study. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4166-4177.
- R. Larcher, G. Nicolini, Chr. Puecher, D. Bertoldi, S. Moser, G. Favaro (2007). Determination of volatile phenols in wine using high-performance liquid chromatography with coulometric array detector. *Anal. Chim. Acta*, 582, 55-60.
- R. Larcher, G. Nicolini, D. Bertoldi, T. Nardin (2008). Determination of 4-ethylcatechol in wine by high-performance liquid chromatography-coulometric electrochemical array detection. *Doi: 10.1016/j.aca.2007.12.038*.
- M.C. Meilgaard (1975). Aroma volatiles in beer: purification, flavour, threshold and interaction. In: *Geruch- und Geschmackstoffe*, F. Drawert (Ed.), H. Carl, Nürnberg.
- L. Moio, P. Schlich, P. Etievant (1994). Acquisition et analyse d'aromogrammes de vins de Bourgogne issus du cepage Chardonnay. *Sci. Aliments*, 14, 601-608.
- G. Montedoro, M. Bertuccioli (1986). The flavour of wines, vermouth and fortified wines. In: *Food flavours*, I.D. Morton e A.J. MacLeod (Eds.), Elsevier, Amsterdam.
- G. Nicolini, R. Larcher, D. Bertoldi, C. Puecher, F. Magno (2007). Rapid quantification of 4-ethylphenol in wine using high-performance liquid chromatography with a fluorimetric detector. *Vitis*, 46 (4), 202-206.
- N. Porret, K. Schneider, J. Hesford, J. Gafner (2004). Early detection of detrimental microorganisms in wine: *Brettanomyces bruxellensis*. *Schweiz. Z. Obst-Weinbau*, 6, 13-15.
- A. Rapp, G. Versini (1996). Flüchtige phenolische Verbindungen in Wein. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 92(2), 42-48.
- A.D. Webb (1967). Wine flavor: volatile aroma compounds of wines. In: *The chemistry and physiology of flavours*, H. W. Schultz, E. A. Day and L. M. Libbey (Eds.), The AVI Publishing Company Inc., Westport Co.

Ringraziamenti. Si ringrazia il Ch.mo Prof. Franco Magno dell'Università di Padova per la fattiva collaborazione e Cavit S.C. per il supporto finanziario.