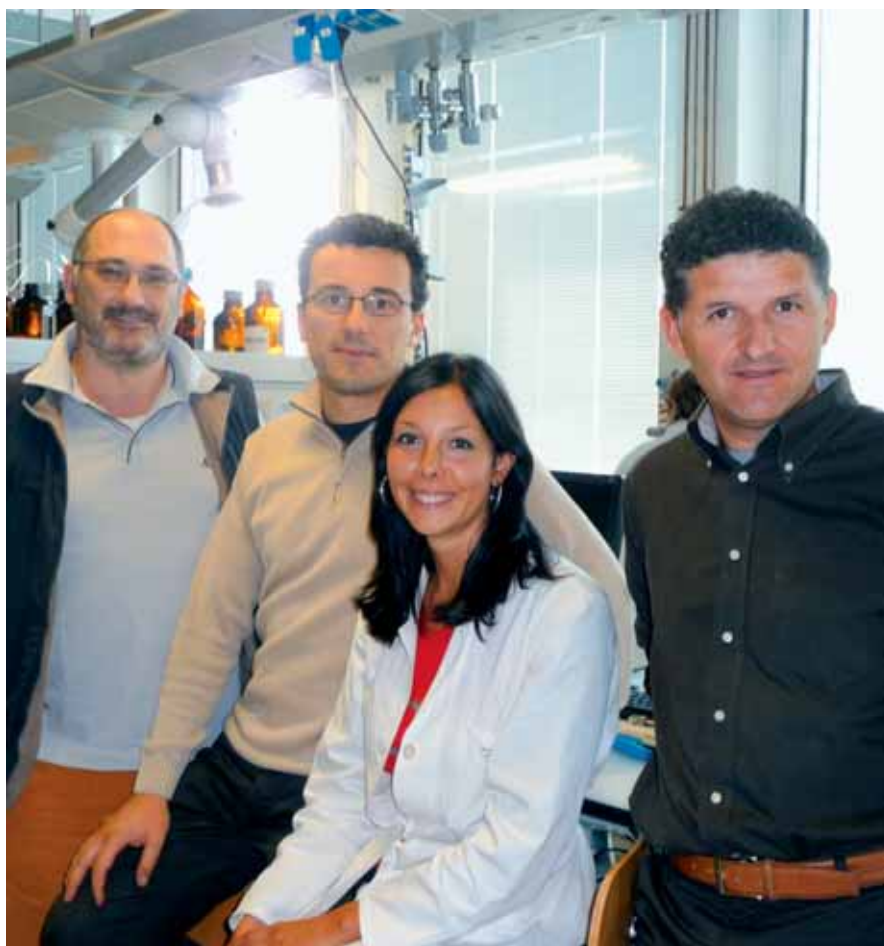


DOCUMENTO
TECNICO

Roberto Larcher
Giorgio Nicolini
 * **Luca Amaldi**
Mario Malacarne
Tiziana Nardin

*Laboratorio Chimico e Consulenza
 Enologica, FEM-IASMA,
 Centro Trasferimento Tecnologico
 San Michele all'Adige (TN)*

** Laurea in Viticoltura e Enologia*



*Da sinistra:
 G. Nicolini,
 M. Malacarne,
 T. Nardin,
 R. Larcher*

INDAGINE SULLE CESSIONI FENOLICHE DA TAPPI DI SUGHERO PRESENTI SUL MERCATO

Dei fenoli a basso peso molecolare analizzati con un nuovo metodo in HPLC-ECD, da tappi monopezzo o agglomerati si estraggono in quantità decrescente acido protocatechico, acidi ellagico e gallico, vanillina e acidi vanillico, caffeico e ferulico. Sensorialmente, le cessioni sono da ritenersi poco significative, vanillina e, talora, eugenolo esclusi.

Introduzione

Le problematiche più indagate legate ai tappi di sughero sono indiscutibilmente riconducibili ad aspetti meccanici e di tenuta - e relativi ben noti problemi di colatura, perdite di pressione, permeabilità all'ossigeno ... -, presenza di ossidanti-sbiancanti e residui di trattamenti, nonché cessione di odori anomali.

In relazione in particolare a quest'ultimo aspetto la letteratura è fiorente, peraltro

adeguatamente rivisitata in una *review* relativamente recente di Sefton e Simpson (2005).

A riguardo, questi autori riassumevano nella lista seguente - cui vanno aggiunti sostanzialmente solo alcuni bromoanisoli (Chatonnet et al., 2004) - i principali composti o classi di essi che, in qualche modo, contribuiscono a determinare le sensazioni da tappo-muffa-fungo-terra: 2,4- e 2,6-dicloroanisoli; 2,4,6-tricloroanisolo; 2,3,4,6-tetracloroanisolo

e pentacloroanisolo; geosmina; 2-metilisoborneolo; 1-octen-3-one e 1-octen-3-olo; guaiacolo; 2-metossi-3,5-dimetilpirazina e 2-metossi-3-isopropilpirazina; cis-1,5-octadien-3-one e cis-1,5-octadien-3-olo.

Naturalmente, vista l'importanza tecnologica dell'argomento, non mancano nella letteratura enologica anche studi sulle cessioni di composti fenolici dai tappi di sughero (Mazzoleni et al., 1998; Conde et al., 1998; Peña-Neira et al., 1999;

Tab. 1 - Condizioni strumentali: tempi, flussi e gradienti (SDS = sodio dodecil solfato)

| Time | Flow (mL/min) | Eluente A | | Eluente B | |
|------|---------------|--|----|---|----|
| | | 30 mM sodio fosfato 12 mg/L SDS pH 3.45 | | 100 mM sodio fosfato 12 mg/L SDS pH 3.45 | |
| | | %A | %B | %A | %B |
| 0 | 0,5 | 10 | 90 | | |
| 5 | 0,5 | 10 | 90 | | |
| 5,5 | 0,5 | 6 | 94 | | |
| 10 | 0,5 | 6 | 94 | | |
| 15 | 0,5 | 15 | 85 | | |
| 45 | 0,5 | 23 | 77 | | |
| 55 | 0,5 | 90 | 10 | | |
| 60 | 0,5 | 90 | 10 | | |
| 68 | 0,5 | 100 | 0 | | |
| 69 | 0,5 | 100 | 0 | | |
| 70 | 0,5 | 10 | 90 | | |
| 75 | 0,5 | 10 | 90 | | |

Tab. 2 - Performance del metodo. (RSD%: deviazione standard percentuale su 9 ripetizioni)

| Composto | Tempo di ritenzione (min) | Potenziale ossidativo massimo (mV) | Detection Limit (mg/L) | RSD % |
|------------------------|---------------------------|------------------------------------|------------------------|-------|
| acido gallico | 2,56 | 200 | 0,02 | 1,15 |
| acido protocatechico | 4,98 | 300 | 0,005 | 3,33 |
| acido gentisico | 6,03 | 200 | 0,02 | 4,13 |
| aldeide protocatechica | 8,07 | 500 | 0,01 | 1,83 |
| 4-idrossibenzoico | 9,55 | 700 | 0,06 | 5,15 |
| acido vanillico | 16,22 | 500 | 0,01 | 2,84 |
| esculetina | 16,7 | 300 | 0,03 | 3,70 |
| acido caffeico | 17,66 | 200 | 0,04 | 3,42 |
| acido siringico | 19,2 | 500 | 0,01 | 4,44 |
| vanillina | 21,71 | 500 | 0,005 | 1,14 |
| acido p-cumarico | 25,33 | 600 | 0,015 | 2,83 |
| guaiaacolo | 25,63 | 500 | 0,015 | 3,90 |
| siringaldeide | 26,16 | 500 | 0,01 | 4,74 |
| scopoletina | 29,7 | 500 | 0,005 | 2,23 |
| acido ferulico | 31,2 | 500 | 0,01 | 3,49 |
| acido sinapico | 33,8 | 300 | 0,02 | 7,86 |
| coniferaldeide | 37,92 | 500 | 0,005 | 3,28 |
| sinapaldeide | 41,58 | 300 | 0,01 | 3,86 |
| acido ellagico | 42,6 | 300 | 0,1 | 8,88 |
| eugenolo | 55,66 | 500 | 0,01 | 5,79 |
| isoeugenolo | 56,33 | 300 | 0,01 | 3,12 |

Varea et al., 2001).

Il lavoro presenta la messa a punto di una metodica HPLC con detector elettrochimico coulometrico e la sua applicazione all'analisi delle cessioni di composti fenolici a basso peso molecolare da tappi commerciali mono pezzo e agglomerati birondellati presenti sul mercato nazionale.

Materiali e metodi

In 12 diverse cantine sono stati prelevati 31 campioni di tappi delle tipologie mono pezzo (n=17) e agglomerato birondellato (n=14) commercializzati da 12 produttori.

Ciascun campione è stato ottenuto prelevando 25 tappi con criterio casuale da almeno 5 sacchi.

I tappi sono stati macinati e setacciati per avere granuli compresi tra 1,5 e 3 mm di diametro.

La strumentazione analitica ha visto l'uso di un HPLC con detector elettrochimico coulometrico (ECD) equipaggiato di un array di 8 elettrodi singolarmente settabili a diversi potenziali di ossidazione.

È stata utilizzata una colonna in fase inversa tipo LiChroCart 125-3 Purospher RP-C18, 5 µm, il tutto gestito dai softwares Empower Pro 5, Waters Corporation (USA) per l'HPLC e CoulArrayWin 31, ESA Inc. (USA) per l'ECD. Eluenti, tempi di iniezione, flussi e gradienti sono riportati in Tab. 1.

La Tab. 2 dettaglia - congiuntamente ai tempi di ritenzione ed al potenziale di ossidazione massimo applicato all'elettrodo (mV) - i 21 composti eluiti in 75 minuti e le performance del metodo, espresse attraverso il detection limit (DL, mg/L) valutato come 3σ e la ripetibilità della metodica analitica (espressa come RSD%) valutata iniettando consecutivamente 9 volte lo stesso campione.

Tab. 3 - Composti a basso peso molecolare estratti dai tappi di sughero

| composto (mg/100 g sughero) | Min | 10° percentile | Quartile inferiore | Mediana | Quartile superiore | 90° percentile | Max |
|--------------------------------|------|-------------------|-----------------------|---------|-----------------------|-------------------|-------|
| acido gallico | 1,14 | 1,71 | 3,15 | 4,00 | 4,93 | 5,43 | 11,08 |
| acido protocatechico | 5,68 | 6,80 | 7,70 | 9,38 | 10,63 | 12,83 | 19,90 |
| aldeide protocatechica | 0,62 | 0,67 | 0,93 | 1,13 | 1,69 | 1,82 | 2,07 |
| acido vanillico | 1,35 | 1,82 | 2,10 | 2,63 | 3,30 | 3,40 | 3,93 |
| esculetina | 0,16 | 0,25 | 0,27 | 0,32 | 0,37 | 0,39 | 0,58 |
| acido caffeico | 0,23 | 0,69 | 1,21 | 2,21 | 3,28 | 3,73 | 4,75 |
| acido siringico | 0,11 | 0,21 | 0,23 | 0,29 | 0,34 | 0,35 | 0,40 |
| vanillina | 1,84 | 2,04 | 2,27 | 2,85 | 3,13 | 3,50 | 5,80 |
| acido p-cumarico (*) | <DL | <DL | <DL | 0,06 | 0,10 | 0,13 | 0,25 |
| siringaldeide | 0,04 | 0,08 | 0,09 | 0,12 | 0,14 | 0,19 | 0,23 |
| scopoletina (**) | <DL | 0,03 | 0,03 | 0,05 | 0,05 | 0,09 | 0,13 |
| acido ferulico | 0,09 | 0,97 | 1,30 | 2,00 | 3,38 | 3,73 | 6,35 |
| coniferaldeide | 0,10 | 0,15 | 0,19 | 0,25 | 0,32 | 0,38 | 0,58 |
| acido ellagico | 0,06 | 1,00 | 1,56 | 6,30 | 9,93 | 15,33 | 18,50 |
| eugenolo | 0,03 | 0,06 | 0,06 | 0,07 | 0,08 | 0,08 | 0,15 |

*, ** = rispettivamente 13 e 1 campioni computati come uguali a metà del DL poiché < DL

Cinetiche di estrazione.

Al fine di ottimizzare le condizioni di estrazione dei composti fenolici dai tappi macinati è stato realizzato uno studio di cinetiche.

Sono stati utilizzati 6 grammi di campione macinato posti in estrazione in soluzione idroalcolica a tre livelli (15%, 45% e 90% vol.) mantenendo in agitazione costante per 360 minuti.

Sono state prelevate aliquote di 2 ml di soluzione dopo 5-15-45-90-180-360 min e dopo 22 ore. Le aliquote sono state filtrate con filtri PTFE 0,45 µm e successivamente analizzate per HPLC- ECD.

Si è potuto osservare che, rispetto al grado alcolico, i composti presentavano cinetiche estrattive diversificate delle quali si riportano in Fig. 1, a titolo esemplificativo, quelle degli acidi ferulico e vanillico. Come miglior compromesso tra le cinetiche dei composti e le condizioni enologiche di uso dei tappi, si è scelto di operare con 6 g di campione a 15% vol. alcol e 360 minuti.

Gi estratti dei tappi.

Negli estratti idroalcolici dei 31 campioni di tappi di sughero commerciali si sono potuti quantificare 15 composti. Come mostrato in Tab. 3, l'acido protocatechico è stato quello estratto in maggior quantità, con un valore mediano di 9.38 mg/100 g di sughero.

In ordine decrescente di quantità si osservano le estrazioni degli acidi ellagico e gallico con mediane di 6.30 e 4.00 mg/100 g rispettivamente.

A concentrazioni ulteriormente minori si collocano vanillina, acido vanillico, acido caffeico e acido ferulico, con mediane tra 2.85 e 2.00 mg/100 g sughero.

Confronto tra tipologie.

Dei 15 composti fenolici presenti in quantità misurabili negli estratti, dal confronto tra tappi mono pezzo (peso medio 3.7 g/tappo) e agglomerati birondellati (5.6 g/tappo) sono emerse differenze statisticamente significative - almeno con $p < 0.05$ sia al test di Tukey che al test U di Mann-Whitney -

per 7 di essi (aldeide protocatechica, acidi vanillico, siringico, p-cumarico, vanillina, scopoletina, coniferaldeide).

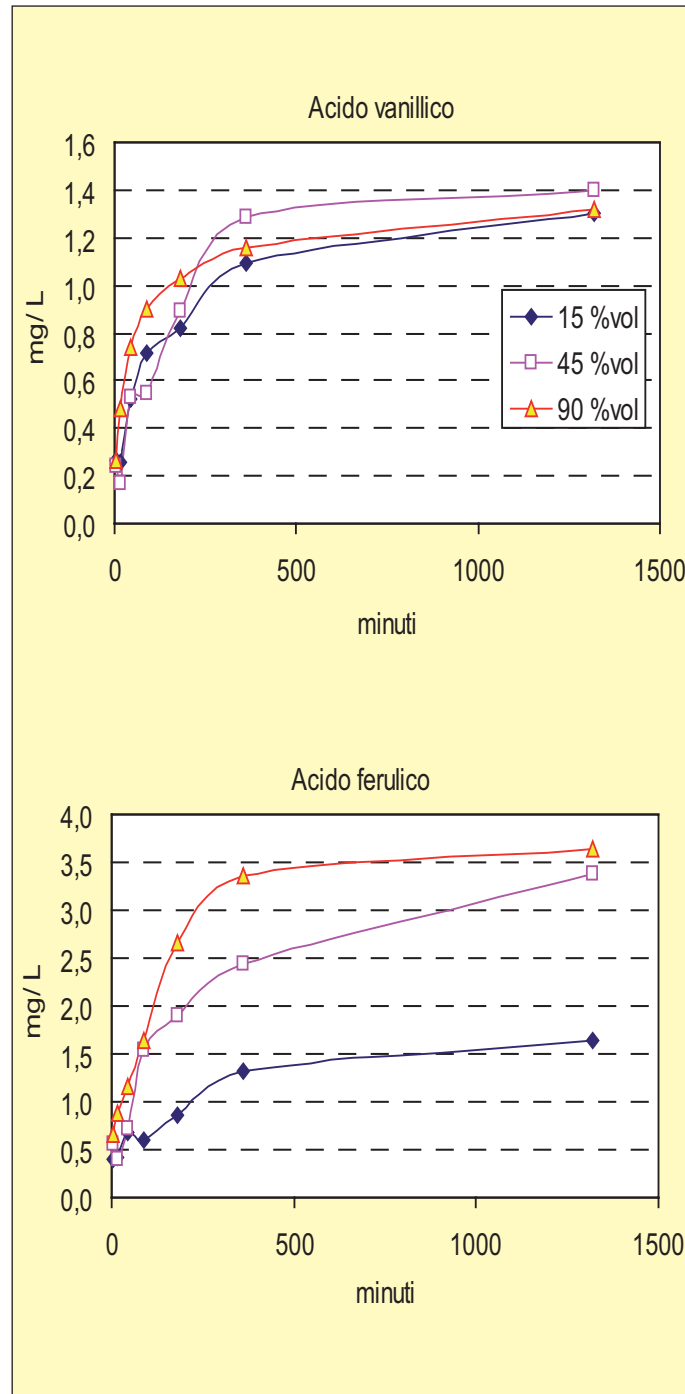
A parità di peso di sughero, le estrazioni sono risultate maggiori dai mono pezzo (Fig. 2), confermando precedenti risultati di Peña-Neira et al., (1999) e Varea et al., (2001).

Tuttavia nella malaugurata estrema ipotesi che l'intero tappo venga imbibito e ceda al vino quantità di composti fenolici analoghe a quelle che abbiamo riportato relativamente alla soluzione idroalcolica, le estrazioni ricalcolate per "tappo medio", potenzialmente, potrebbero essere maggiori dagli agglomerati birondellati.

Considerazioni conclusive

Fra i composti acidi analizzati nessuno sembra raggiungere, anche nella peggiore delle condizioni, valori cedibili dai tappi tali da avere un qualche significato tecnologico né rispetto alle

Fig. 1 - Cinetiche degli acidi vanillico e ferulico estratti da 6 grammi di tappo macinato posti in soluzioni idroalcoliche a diversa concentrazione



sensazioni acide correlate al pH, né rispetto ad ipotetiche trasformazioni a opera di microorganismi quali *Saccharomyces* (verso vinilfenolo) o *Brettanomyces* (a etilfenolo).

Un qualche ipotetico effetto potrebbe essere preso in considerazione relativamente al solo acido ferulico, nella lontana ipotesi di una

sua totale conversione a 4-vinilguaiacolo.

Relativamente all'eugenolo sono riportate soglie organolettiche di 15 µg/L in soluzione modello, ma più probabilmente prossime ai 100 µg/L nel caso di vini reali. Se ne deduce che raramente l'eugenolo dal tappo potrebbe influenzare da solo l'aspetto olfattivo.

Un qualche contributo olfattivo potrebbe invece arrivare dalla vanillina, confermando osservazioni di letteratura, mentre scopoletina ed esculetina non sono a concentrazioni potenziali tali da incidere sulle sensazioni amare. Relativamente a coniferaldeide e siringaldeide, estrapolando le soglie organolettiche di aldeidi a più basso numero di carboni riportate da Bertrand (2003), si ritiene che non abbiano rilevanza sensoriale apprezzabile. Ragionando quindi in termini tecnologici e sensoriali, si ritiene di poter concludere che, con l'esclusione della vanillina e - in casi del tutto particolari - dell'eugenolo, alla luce delle soglie organolettiche riportate in letteratura le eventuali cessioni sembrano essere sensorialmente poco significative.

Riassunto

Il lavoro presenta una nuova metodica estrattiva ed analitica in HPLC con detector coulometrico e colonna LiChroCart 125-3 Purospher RP-C18, 5 µm, in grado di quantificare 21 composti fenolici di basso peso molecolare negli estratti idroalcolici (15 % vol; 360 min) di tappi di sughero previamente macinati (diametro 1.25-3 mm; 6 g).

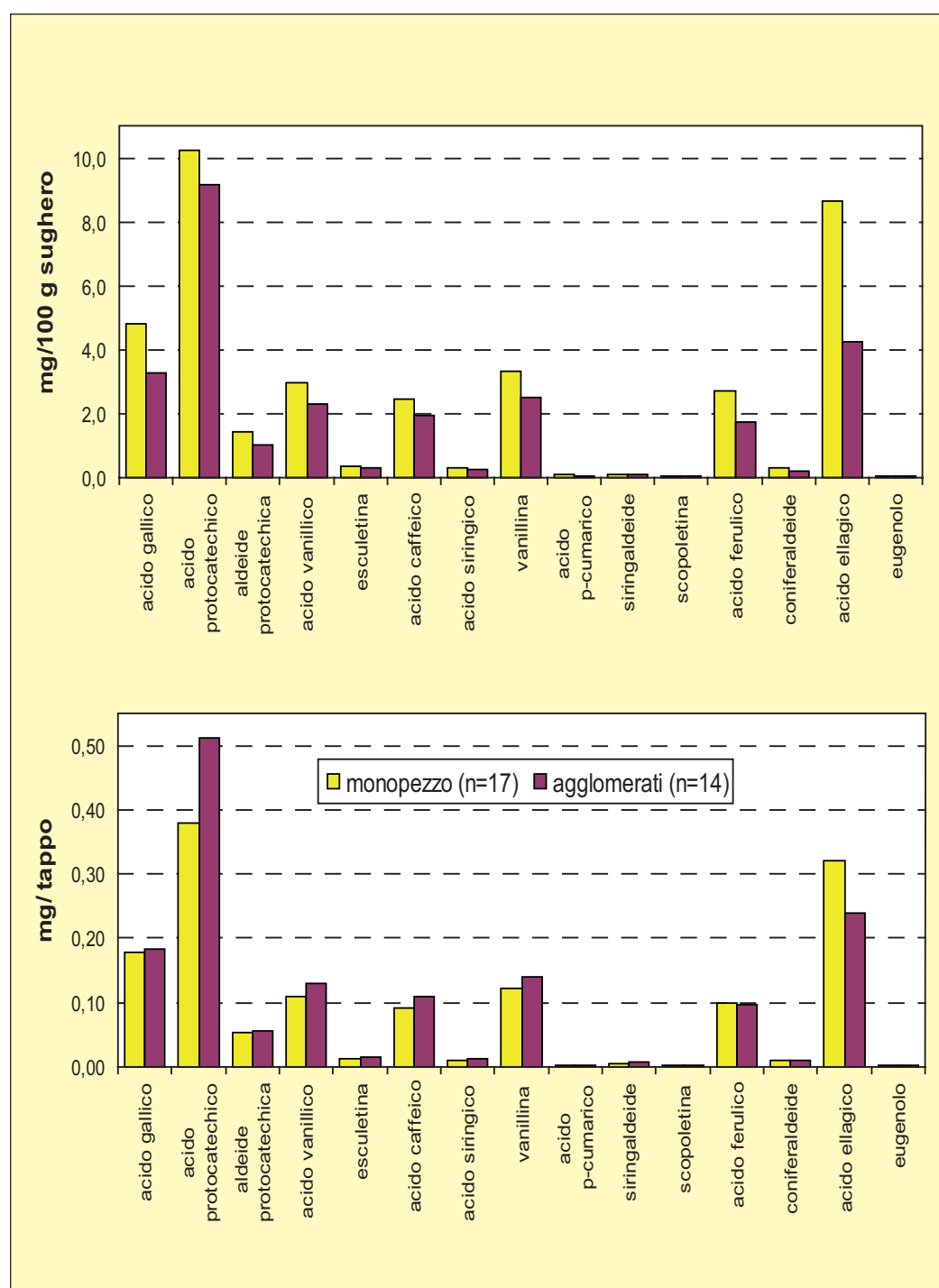
Sono stati analizzati gli estratti di 31 tappi commerciali di vari produttori e delle tipologie monopezzo (n=17) e agglomerato birondellato (n=14).

Indipendentemente dalla tipologia, i composti maggiormente estratti sono stati, in ordine decrescente, l'acido protocatechico, gli acidi ellagico e gallico, nonché vanillina e gli acidi vanillico, caffeico e ferulico.

I tappi monopezzo hanno ceduto, per unità di peso di sughero, quantità significativamente maggiori di 7 composti fenolici.

Le cessioni misurate sono da ritenersi sensorialmente poco significative, con la possibile esclusione della vanillina e, in casi del tutto particolari, dell'eugenolo.

Fig. 2 - Estrazioni medie dai tappi di sughero espresse come mg/100 g di sughero (sopra) e per "tappo" calcolate sulla base del peso medio di tipologia di tappo (sotto)



Summary

Survey on the extraction of phenols from corks available on the market.

A new method for the hydroalcoholic extraction (15 % vol; 360 min) of 21 low molecular weight phenols from ground cork (1.25-3 mm; 6 g) and analysis using HPLC with coulomet-

ric detector and LiChroCart 125-3 Purospher RP-C18, 5 μ m, column was established. The extracts of 31 samples of cork stoppers (17 all-in-one; 14 agglomerate) available on the market and from different producers were analysed.

Whatever the cork type, protocatechuic acid, ellagic and gallic acids, as well as

vanillin and vanillic, caffeic and ferulic acids in decreasing order of quantity were extracted. All-in-one type gave statistically significant higher extractions (mg/100 g cork) of 7 phenolic compounds. The extracted amounts can be judged as sensorially unimportant, with the possible exclusion of vanillin and, in very particular cases, eugenol.

Bibliografia

Bertrand A. (2003). Armagnac e Wine-Spirits. In: Fermented beverage production, A.G.H. Lea & J.R. Piggot (Eds.), Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York: 213-238.

Chatonnet P., Bonnet S., Bouton S., Labadie M.D. (2004). Identification and responsibility of 2,4,6-tribromoisole in musty, corked odors in wine. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1255-1262.

Conde E., Cadahía E., García-Vallejo M.C., J.R. González-Adrados (1998). Chemical characterization of reproduction cork from Spanish *Quercus suber*. *J. Wood Chem. Technol.*, 18(4): 447-469.

Mazzoleni, V., Caldentey P., Silva A. (1998). Phenolic compounds of wine stoppers as affected by storage and boiling of cork slabs. *Am. J. Enol. Vitic.*, 49: 6-10.

Peña-Neira A., Hernández T., García-Vallejo M. C., Cadahía E., Fernández de Simón B., Suárez J. A. (1999). Low molecular weight phenols in cork stoppers. *Am. J. Enol. Vitic.*, 50: 285-290.

Sefton M. A., Simpson R. F. (2005). Compounds causing cork taint and the factors affecting their transfer from natural cork closures to wine – a review. *Aus. J. Grape Wine Res.*, 11: 226-240.

Varea S., García-Vallejo M. C., Cadahía E., Fernández de Simón B. (2001). Polyphenols susceptible to migrate from cork stoppers to wine. *Eur. Food Res. Technol.*, 213: 56-61.