

DOCUMENTO
TECNICO

Fulvio Mattivi

*Istituto Agrario
di San Michele all'Adige (IASMA),
Centro Sperimentale, Dipartimento
Qualità Agro-Alimentare
San Michele all'Adige (TN)*

LA STIMA DELLA MATURAZIONE FENOLICA DELLE UVE ROSSE CON UN NUOVO METODO RAPIDO

Si descrive una procedura rapida ed economica per la stima del contenuto in polifenoli nella buccia delle uve rosse. Trova impiego per l'analisi delle cinetiche di maturazione delle uve, come pure per la classificazione del potenziale polifenolico dei vigneti prima della vinificazione, per differenziare la destinazione delle partite di diversa qualità.

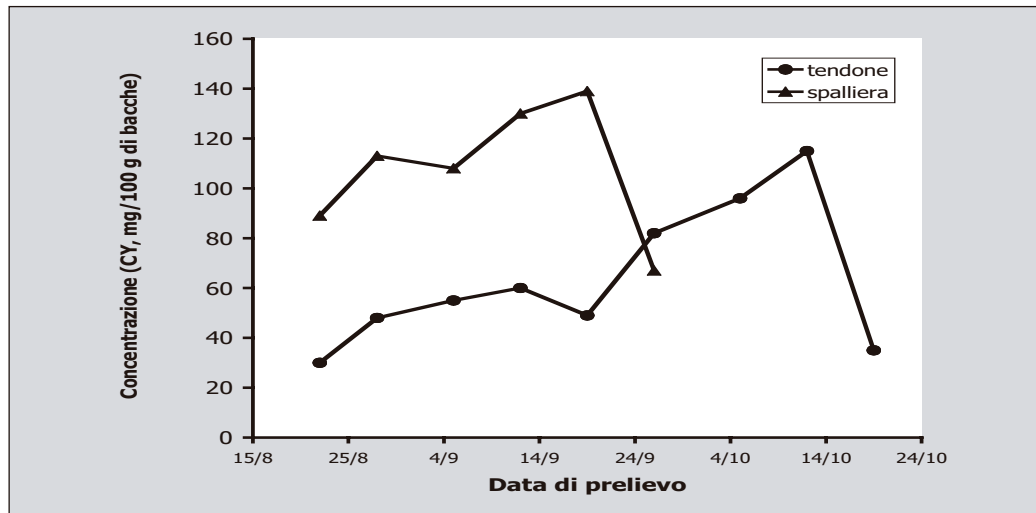
Introduzione

Focus sulla qualità delle uve. La costante attenzione verso l'incremento della qualità dei vini, in un contesto di crescente confronto e competizione sui mercati internazionali, ha determinato nell'ultimo decennio una forte integrazione delle attività tra campagna e cantina ed ha posto l'accento sulla qualità delle uve. Vi è consapevolezza che l'enologo può valorizzare con una attenta vinificazione la materia

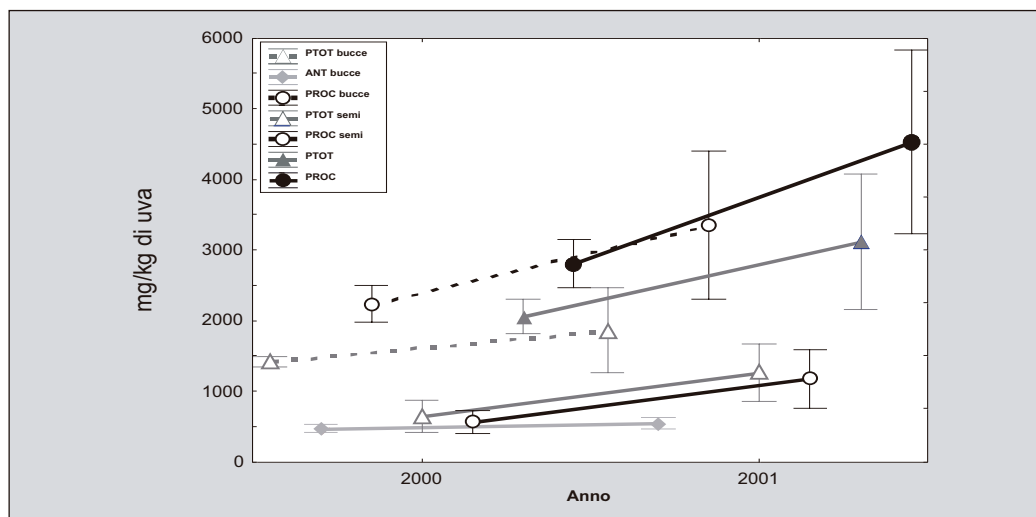
prima, ma entro un limite non superabile, legato alla qualità dell'uva. In generale, il processo di vinificazione può sicuramente attenuare ma non certo risolvere i problemi derivanti da una insufficiente qualità della materia prima. Questo è particolarmente vero per i vini di fascia alta e medio-alta, dove ormai una elevata qualità dell'uva è imprescindibile.

In tale contesto, l'enologo ha necessità di disporre di adeguati strumenti di conoscenza della composizione

delle uve, al fine di impostare una appropriata vinificazione. I parametri di base (zuccheri, acidi organici, potassio...) sono ormai da tempo diventati routinari e la ricerca ha trovato risposte soddisfacenti per la misura rapida di altri aspetti compositivi, come nel caso dell'azoto assimilabile e dei metalli. Per altri aspetti invece, quali il potenziale aromatico ed il potenziale polifenolico, che sono cruciali per il risultato enologico, il problema di realizzare una misura rapida

Fig. 1 - Andamento degli antociani

L'andamento degli antociani totali è in accumulo dalla invaiatura verso la maturazione. Vi sono casi di arresto e anche di crollo in sovraturazione, in particolare nei climi caldi, come nell'esempio relativo alle uve Cannonau, coltivate ad Alghero, nell'anno 1988. Dati rigraficati da Castia, Franco et al., 1992.

Fig. 2 - Comparazione del potenziale polifenolico di 5 vigneti di Nebbiolo nelle due annate 2000 e 2001

Comparazione del potenziale polifenolico di 5 vigneti di Nebbiolo nelle due annate 2000 e 2001. Composizione media e variabilità delle bucce, dei semi e complessiva della bacca (somma di bucce e semi). Legenda: PROC, proantocianidine; PTOT, polifenoli totali; ANT, antociani totali; dati in mg/kg di uva. Rigraficato da Mattivi e Valenti, 2004.

ed economica è ancora in larga parte irrisolto.

Quando i pigmenti antocianici crollano. Vi sono dei casi in cui la individuazione della giusta maturità fenolica delle uve è centrale per la qualità del vino. Un esempio, riportato in Fig. 1, è dato dalla curva di maturazione nell'anno 1988 degli antociani nelle uve Cannonau, coltivate ad Alghero (Castia et al., 1992). In generale, la biosintesi degli antociani totali nelle uve progredisce dalla invaiatura verso la ma-

turazione. Vi sono però casi, specialmente nei climi caldi, di arresto dell'accumulo e anche di crollo delle concentrazioni nella fase finale della maturazione. È un fenomeno che si osserva con entrambe le forme di allevamento, anche se in date diverse in funzione della diversa precocità di maturazione delle piante coltivate ad alberello ed a tendone. Questo fenomeno comporta la perdita di oltre il 50% dei pigmenti antocianici in una sola settimana! Si tratta probabilmente di una caratteri-

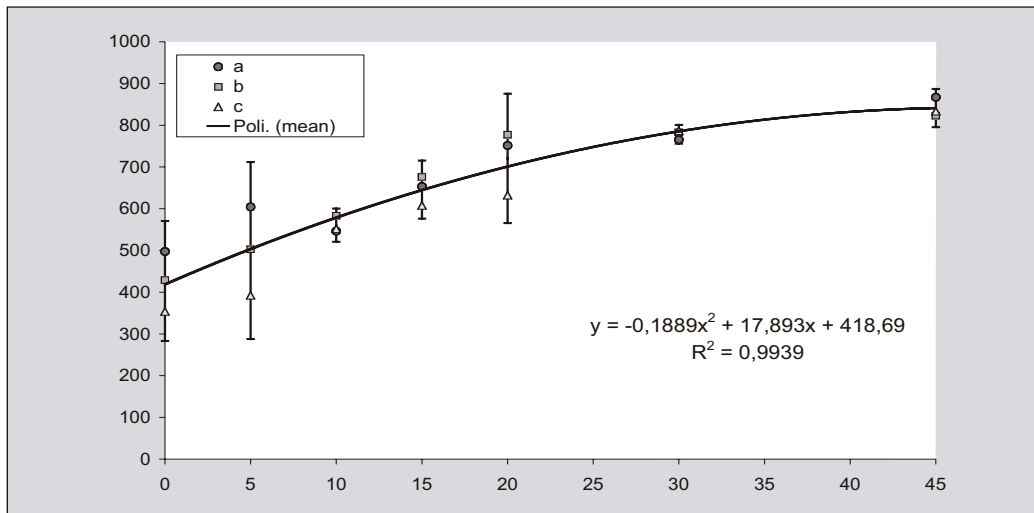
stica della varietà, perché ad esempio questo crollo non si era verificato nelle uve Cabernet Sauvignon, presenti nello stesso vigneto. Anche le uve della varietà Grenache nelle calde aree del Rodano meridionale, in particolare nello Châteauneuf-du-Pape, vanno incontro a fenomeni simili. In casi come questi, per prevenire un disastroso crollo della colorazione dell'uva e quindi del vino, non sono sufficienti le misure routinarie (Castia et al., 1992). È invece essenziale in prossimità della ma-

turazione misurare la concentrazione in pigmenti antocianici con un metodo rapido in grado di fornire risultati immediati, e con una frequenza di campionamento di 48 ore.

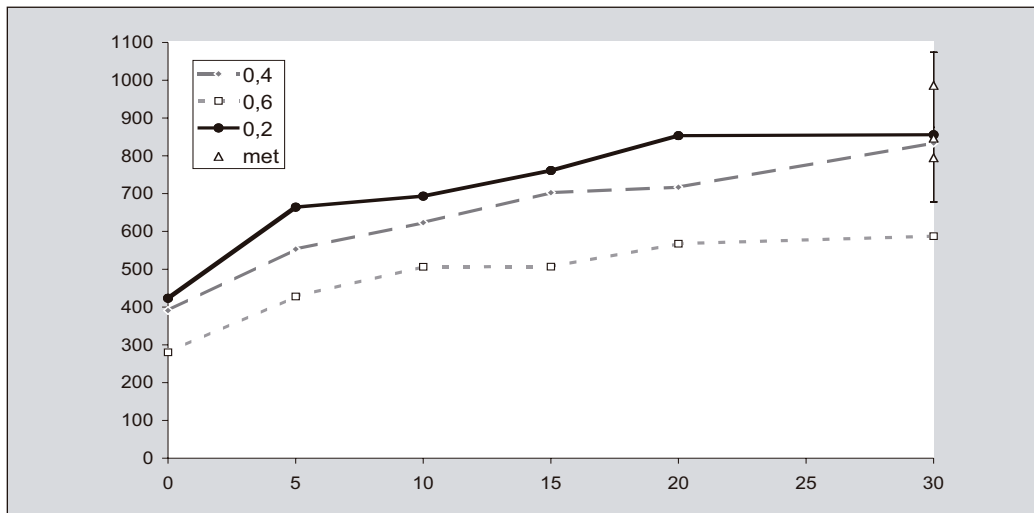
Va detto però che nella maggior parte delle varietà e delle annate non abbiamo riscontrato fenomeni così vistosi, ed in particolare nelle zone a clima fresco è probabile che sia più importante conoscere il potenziale polifenolico delle diverse partite, dipendente dall'andamento complessivo della annata, che non la maturità fenolica dipendente dall'epoca di raccolta.

Il potenziale polifenolico

Variabilità del potenziale polifenolico delle uve rosse. È dimostrato che la concentrazione degli antociani e dei tannini, e la localizzazione dei tannini tra bucce e semi, variano in maniera sostanziale tra le varietà, con fondamentali conseguenze per la cinetica di estrazione, per la possibilità di stabilizzare adeguatamente il colore, e per la possibilità di variare la composizione del prodotto finale (Mattivi et al., 2002a e 2003). Questo impone all'enologo, in particolare in Italia dove esistono centinaia di varietà autoctone, di conoscere a fondo e valorizzare le caratteristiche specifiche della materia prima. Se da un lato esistono delle caratteristiche generali tipiche di ciascun vitigno che permettono di evidenziare i punti critici della lavorazione di ciascuna varietà (Mattivi et al., 2003), è però stato osservato che il potenziale polifenolico delle uve varia in maniera importante nelle diverse zone ed annate. Un esempio della variabilità della composizione delle uve Nebbiolo nelle annate 2000 e 2001 è riportato in Fig. 2. Si vede che, nella media dei cinque vigneti studiati, provenienti da diverse zone viticole, le uve avevano concentrazioni simili di antociani

Fig. 3 - Cinetica di estrazione degli antociani da un campione di uve Merlot

Cinetica di estrazione degli antociani da un unico campione di uve Merlot, con rapporto pigiato/estraente = 0,2. Estrazione in triplicato a 7 diversi tempi. La curva indica la funzione di II grado che descrive l'andamento dei valori medi. Le barre indicano la dispersione delle misure (+/- 2 volte la deviazione standard).

Fig. 4 - Cinetica di estrazione degli antociani

Cinetica di estrazione degli antociani in funzione del rapporto pigiato/estraente = 0,2-0,4 e 0,6. La estrazione con elevati rapporti pigiato/estraente tende ad essere più limitata ($R=0,6$) e con valori intermedi ($R=0,4$) tende ad essere rallentata. Un rapporto pari a 0,2 permette di raggiungere in tempi relativamente brevi una estrazione equivalente a quella ottenibile con 30 minuti in metanolo.

Tab. 1 - Ripetibilità del metodo, valutata su 12 campioni di uve Merlot

	Tempo 0		Tempo 30	
	media	CV%	media	CV%
Antociani totali	254,93	14,06	602,11	8,31
Polifenoli totali	437,77	6,30	887,75	5,62

Ripetibilità del metodo valutata su 12 campioni di uve Merlot, con rapporto pigiato/estraente = 0,2 e per analisi al tempo zero o dopo 30 minuti dalla omogeneizzazione. La variabilità della misura degli antociani totali è maggiore rispetto a quella dei polifenoli totali.

nelle due annate. Per quanto riguarda invece i tannini, nel 2001 c'era un potenziale medio delle uve quasi doppio rispetto al 2000. Nel 2001 c'era il rischio di eccedere nelle estrazioni complessive di polifenoli, ed in particolare di tannini dai vi-

naccioli in caso di vinificazione con macerazione troppo lunga. Al contrario, nel 2000 era consigliabile una vinificazione più lunga ed una estrazione anche dei tannini dai vinaccioli per conseguire un vino adeguatamente strutturato.

Inoltre, in queste due annate c'erano differenze non marginali anche da vigneto a vigneto (Mattivi e Valenti, 2004). Sostanziali differenze di potenziale polifenolico sia tra le annate che tra i vigneti sono state documentate anche per molte altre varie-

tà, quali ad esempio il Teroldego nella piana Rotaliana in Trentino (Mattivi et al., 2004). Purtroppo, il metodo di misura del potenziale polifenolico utilizzato per questi studi, non permetteva di avere un risultato in tempi brevi, tale da permettere all'enologo di disegnare la vinificazione in funzione della annata.

Per questo motivo, ed in ragione delle diverse lacune evidenziate dai metodi proposti dalla letteratura (Mattivi et al., 2002b), si è ritenuto importante mettere a punto un metodo più rapido per la stima del potenziale polifenolico.

Un nuovo metodo rapido

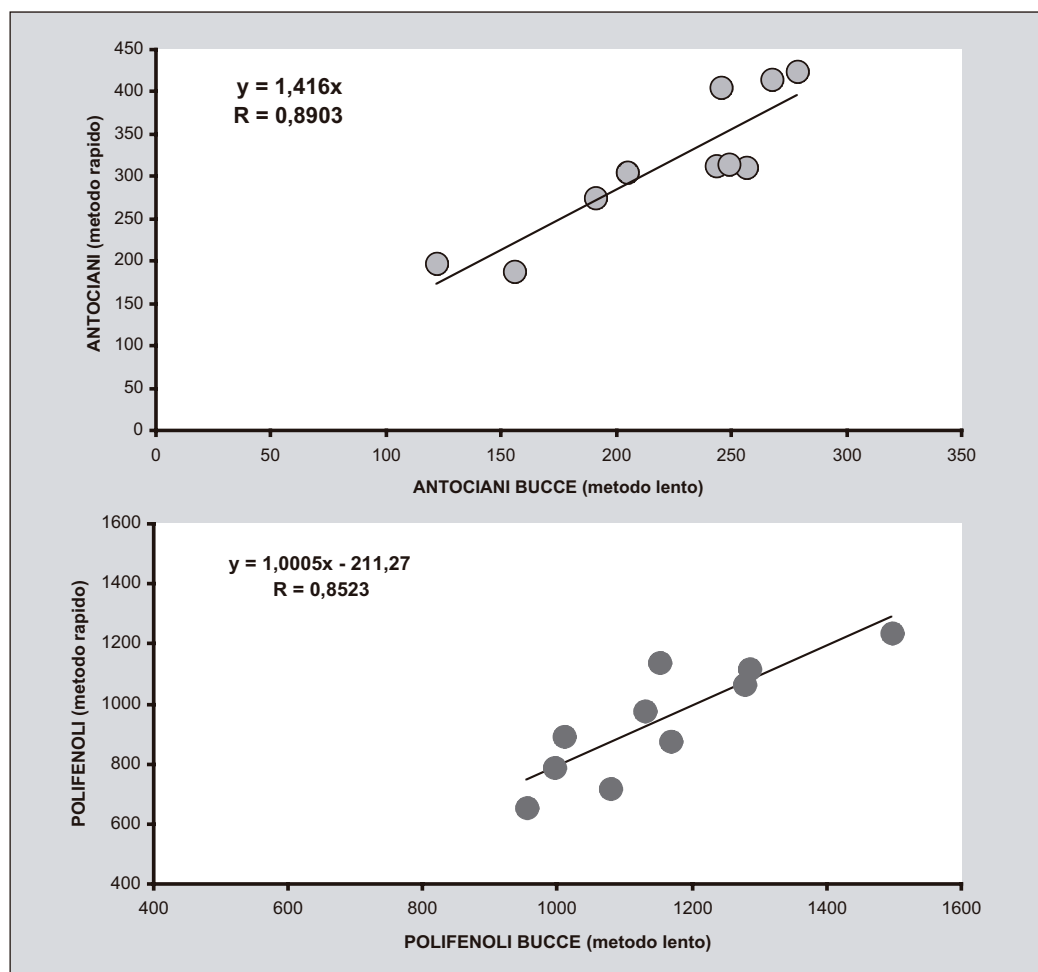
Sviluppo e validazione di un nuovo metodo rapido.

Questa nota descrive una procedura rapida ed economica per la stima del contenuto in antociani e polifenoli nella buccia delle uve. La preparazione del campione si può integrare facilmente nelle trafilerie standard delle analisi preventivedemiali.

Il metodo di estrazione dei polifenoli è derivato da una procedura utilizzata nel nostro laboratorio per lo studio degli antiossidanti polifenolici della frutta (Mattivi et al., 2002c), ed utilizza un estraente acquoso con una modesta concentrazione di acido minerale (HCl). L'estraente quindi non è problematico, richiede solo la ordinaria cautela per la manipolazione e lo smaltimento degli acidi.

I saggi spettrofotometrici per l'analisi degli estratti sono quelli suggeriti da Di Stefano (Di Stefano et al., 1989) eseguiti in condizioni ottimizzate (Rigo et al., 2000) e adattati come riportato in seguito, al fine della massima semplificazione. La metodica è stata specificamente ottimizzata per lo studio delle uve rosse da vino, e richiede solo una attrezzatura minimale, alla portata della maggior parte dei laboratori aziendali.

Fig. 5 - Confronto metodo rapido - metodo lungo di riferimento (Mattivi et al., 2002b) per l'analisi dei polifenoli estraibili dalla bucce di uve Nebbiolo della vendemmia 2003



Materiali e metodi

Attrezzature.

- 1) Bilancia tecnica
- 2) Pressa ad acqua da laboratorio che permetta di pressare a pressione costante.
- 3) Frullatore 200 Watt, 10 velocità, che può essere usato direttamente con vasi di vetro tipo contenitori per conserve per la lavorazione dei campioni. È utile installare il frullatore sotto un temporizzatore con un pulsante di avvio e stacco automatico al tempo di omogeneizzazione preimpostato (1 min).
- 4) Sistema di filtrazione sottovuoto. Utilizzare filtri di carta a basso assorbimento di antociani.
- 5) Spettrofotometro UV-VIS con cuvette in vetro ottico, oppure in plastica monuso, da 1 cm.

6) Vetreria di laboratorio (matracchi da 20 mL, provette da centrifuga od imbuto e filtri di carta, vasi di vetro da 1/2 litro, cilindro graduato 500 ml, boccettine vetro scuro 25-50 ml).

Reagenti. Estrante: acido cloridrico 0.18 N in acqua (15 ml di HCl 12N in 1 litro). Etanolo cloridrico: etanolo/acqua/HCl in proporzione volumetrica 70/30/1 (730 mL etanolo 96° + 270 mL H₂O + 10 ml HCl conc).

Campionamento. Si prelevano in vigneto non meno di 3 kg di uva e di 10 grappoli, prelevando un grappolo per ceppo, ad altezze diverse in funzione del sistema di allevamento, nelle diverse parti del vigneto (Mattivi et al., 2002b).

Pigiatura. Si diraspano 500 grammi di bacche, pesate su bilancia tecnica, si

pressa a pressione costante (2.5 bar) per 3 minuti cercando di ottenere un pigiato sufficientemente asciutto. Segnare il peso del pigiato ottenuto e conservarlo in un sacchetto ben chiuso (conservare max 2 ore prima dell'estrazione che va in ogni caso effettuata in giornata).

Va sottolineato che fino a questo punto la preparazione è compatibile con la procedura normale di analisi pre-vendemmiali, di cui si utilizza la parte solida residua dalla pressatura, mentre il mosto è destinato alle analisi routinarie.

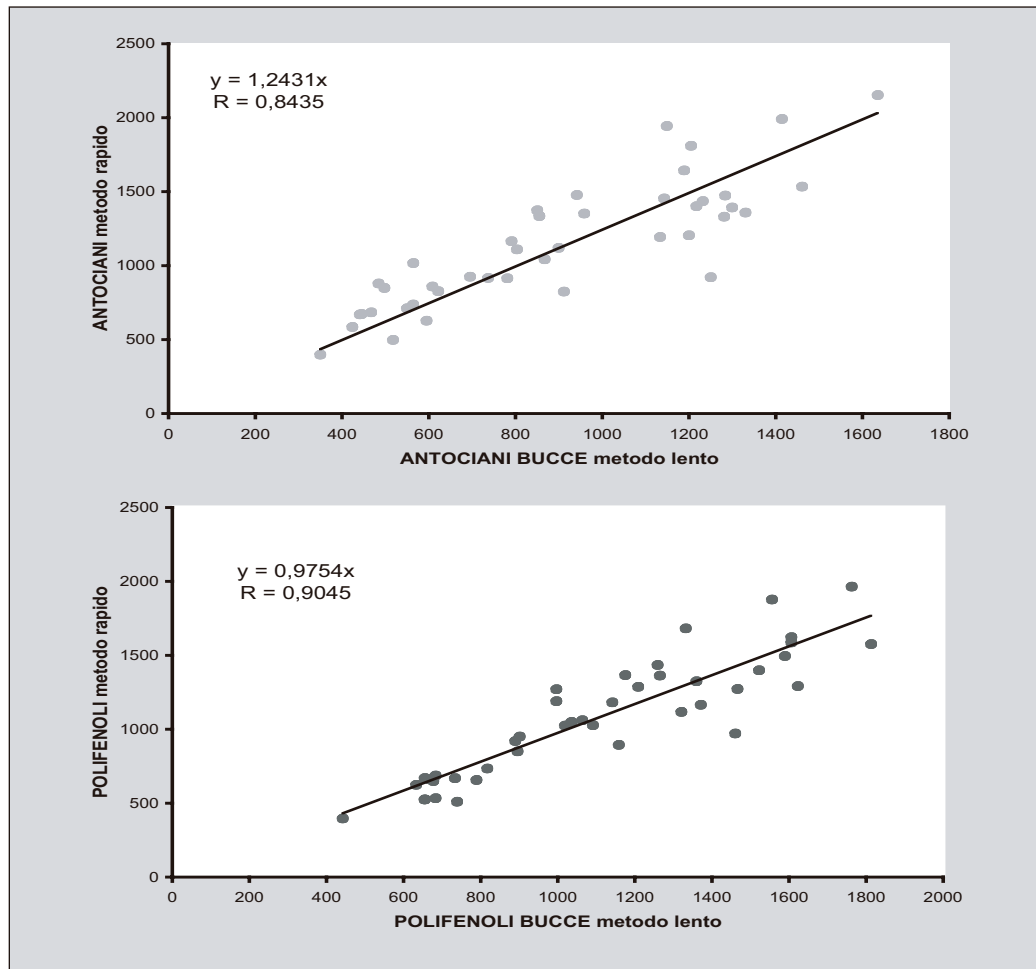
Estrazione ed illimpidimento del campione. Trasferire 45 grammi del pigiato dentro un vaso di vetro da 1/2 litro.

Aggiungere 225 mL di estraente e frullare per 60 secondi a velocità 1. Attendere 30 min, agitare, e filtrare su filtro di carta corrispondente al tipo sopra indicato, da noi selezionato come idoneo per queste classi di analiti. Raccogliere in boccettine di vetro scuro da 25-50 ml, avendo cura di riempirle completamente. Effettuare le analisi di antociani e polifenoli in giornata (in subordine, conservare in frigo a 4°C al massimo fino al gg. successivo).

Analisi degli antociani totali. Si diluisce il filtrato (da 20 a 50 volte) con etanolo cloridrico, al fine di avere una assorbanza a 540 nm, in cella da 10 mm, compresa tra 0.3 e 0.6 Unità di Assorbanza. Si misura l'assorbanza nel visibile a 540 nm e si calcola la concentrazione di antociani rispetto ad una curva di taratura effettuata con malvidina 3-monoglucoside cloruro. Si riporta la retta sperimentale ottenuta nel nostro laboratorio Formula 1.

Analisi dei polifenoli totali. Diluire il filtrato con H₂O. Prelevare 1 ml del diluito in un matraccio da 20 ml. Aggiungere 2 ml di metanolo, 5 ml di H₂O. Ag-

Fig. 6 - Confronto metodo rapido - metodo lungo di riferimento (Mattivi et al., 2002b) per l'analisi dei polifenoli estraibili dalla bucce di uve Lagrein della vendemmia 2003



Furmule 1 e 2

1) Antociani totali, mg/kg uva = $ABS * dil * 16.42 * (225/45) * (peso\ residuo\ pigiato/500)$

Dove: 225 = volume in ml di estraente; 45 = peso in grammi di pigiato messo in estrazione; 500 = peso in grammi degli acini pigiati; peso residuo pigiato = peso del pigiato derivato da 500g di acini d'uva.

2) Polifenoli totali, mg/kg uva = $ABS * dil * 186.5 * (225/45) * (peso\ residuo\ pigiato /500)$

giungere 1 ml di reattivo Folin-Ciocalteu e dopo 3 minuti 4 ml di Carbonato di Sodio (10%). Portare a volume con H₂O. Leggere a 700 nm dopo 90 minuti in cella da 10 mm. Il bianco è preparato allo stesso modo, con acqua al posto del campione.

Si calcola la concentrazione di polifenoli totali rispetto ad una curva di taratura effettuata con (+)-catechina, facendo attenzione a tenere conto del titolo e del grado di idratazione (attenzione: non sempre le schede tecniche fornite dai produttori

sono corrette), oppure (preferibilmente) si usa il coefficiente suggerito da Di Stefano (1989), secondo la Formula 2.

Risultati e discussione

Cinetica di estrazione. La validazione finale del metodo è stata completata nei mesi di settembre ed ottobre 2003. La cinetica di estrazione degli antociani da un unico campione di uve Merlot, provenienti dalla azienda IASMA in San Michele al-

l'Adige, estrazione effettuata con un rapporto di pigiato/estraente pari a 0,2, ossia con 45 mg di pigiato in 225 ml di estraente è mostrata in Fig. 3. La estrazione è stata condotta in triplicato a 7 diversi tempi. Come si vede, la cessione dall'uva omogeneizzata secondo la procedura descritta richiede almeno 30 minuti per andare a completamento. Con questi tempi si ottengono rese estrattive equivalenti a quelle ottenibili utilizzando metanolo come estraente (dati non riportati). Per tempi pari o superiori a 30 minuti la dispersione del dato degli antociani totali dovuta alla estrazione del campione è minima (Fig. 3). Nel caso di applicazioni che richiedono la risposta immediata (come nel caso di analisi di uve prelevate al conferimento prima dello scarico), è possibile effettuare immediatamente la misura. In questo caso si deve però mettere in conto una estrazione più bassa di circa il 50%, ed una maggiore dispersione delle misure (Fig. 3).

Grado di precisione. La ripetibilità complessiva del metodo (dal campionamento alla analisi) è stata verificata su 12 campioni di uve Merlot prelevati il 2 ottobre 2003, ed è risultata di nuovo essere migliore a 30 minuti rispetto alla lettura immediata del campione (Tab. 1). Inoltre, l'analisi dei polifenoli totali è risultata essere più precisa della analisi degli antociani totali.

Il giusto rapporto solido/liquido. La cinetica di estrazione degli antociani dipende dal rapporto pigiato/estraente.

Un rapporto pari a 0,2 permette di raggiungere in tempi relativamente brevi una estrazione equivalente a quella ottenibile con 30 minuti in metanolo.

La estrazione con elevati rapporti pigiato/estraente è stata scartata in quanto tende ad essere ridotta ($R=0,6$) o rallentata ($R=0,4$), vedi Fig. 4.

Confrontabilità dei risultati. Il confronto tra il metodo rapido ed il metodo lungo di riferimento che era stato validato per stimare il risultato ottenibile in vinificazione (Mattivi et al., 2002b) fornisce dei risultati molto incoraggianti. La Fig. 5 esemplifica la correlazione trovata per l'analisi con i due metodi dei polifenoli estraibili dalle bucce di uve Nebbiolo della vendemmia 2003 e la Fig. 6 il caso dei campioni di Lagrein. Come si vede, la correlazione tra i dati compositivi delle bucce è molto stretta. Gli antociani stimati con il metodo rapido sono più elevati rispetto a quelli dosati con il metodo di riferimento, in quanto nel primo metodo si evitano le perdite delle forme colorate dovute alle reazioni di condensazione a carico degli antociani, che si realizzano invece nella macerazione prolungata prevista dal metodo lungo, come pure nella vinificazione reale. I valori di polifenoli totali sono abbastanza vicini anche in termini assoluti tra i due metodi. Non c'è alcuna correlazione invece tra il contenuto in polifenoli dei semi ed i valori ottenibili con il metodo lungo (dati non riportati).

Va sottolineato infine che non in tutte le esperienze fatte le correlazioni sono risultate così strette come negli ultimi due esempi: tendenzialmente le correlazioni sono risultate migliori per le varietà con una elevata concentrazione di polifenoli nella buccia, e per set di campioni che mostrano una ampia variabilità, come quelli sopra esemplificati. Del resto, questo è proprio il tipo di campioni dove si prevede sia utile applicare il nuovo metodo rapido. In considerazione dell'ampio numero di varietà autoctone diffuse nelle diverse regioni italiane, è comunque consigliabile avere la cautela di verificare la bontà delle correlazioni tra metodo di riferimento e metodo rapido per ciascuna varietà, prima di una applicazione sistematica di quest'ultimo.

Considerazioni conclusive

La nuova procedura per la stima del contenuto in antociani e polifenoli nella buccia delle uve messa a punto nel corso della vendemmia 2003 ha tutte le caratteristiche desiderabili per l'impiego di routine nella valutazione del potenziale fenolico e della maturità fenolica delle uve rosse. Innanzi tutto è rapida ed economica. Pur partendo da uve omogeneizzate, ha una forte correlazione con il metodo lungo di riferimento per la stima del potenziale polifenolico estraibile in vinificazione. Quest'ultimo è un metodo molto oneroso che richiede la separazione di buccia e semi ed una estrazione di 5 giorni, senza omogeneizzare il campione. La correlazione trovata tra i due metodi è per certi versi sorprendente e porta a mettere in discussione la grande enfasi data negli anni recenti alla valutazione numerica del grado estraibilità degli antociani. In effetti, la estrazione a pH acido da uva omogeneizzata da noi proposta si avvicina molto di più ad una estrazione totale che ad una estrazione selettiva, ed infatti fornisce valori simili a quelli ottenibili con un estraente forte, quale il metanolo. Il fatto che questi valori siano correlati a quelli ottenibili con il metodo di riferimento che mima la vinificazione, porta a concludere che con i tempi e le temperature necessarie per condurre la vinificazione in rosso quello che determina il risultato è soprattutto la ricchezza assoluta di antociani e polifenoli nelle bucce. Questo semplifica la valutazione della maturità fenolica, che a mio avviso dovrebbe focalizzarsi soprattutto sulle differenze compositive assolute, piuttosto che sulla estraibilità, quanto meno per tutte le varietà destinate ad una vinificazione in rosso convenzionale con una macerazione sufficientemente lunga. Ovviamente non si vuole contestare il concetto

di diversa estraibilità la cui fondatezza è acquisita, ma si invita a ripensare la sua effettiva importanza rispetto al risultato enologico.

La celerità di ottenimento del dato e la buona precisione complessiva permette inoltre di impiegare questo metodo per la analisi delle cinetiche di maturazione delle uve, come pure per la classificazione del potenziale polifenolico dei vigneti prima della vinificazione, al fine di differenziare la destinazione delle partite di diversa qualità. Questo tipo di applicazioni è stato testato nella vendemmia 2004 in collaborazione con numerose cantine e su diverse varietà, sia in Trentino Alto Adige che nel resto d'Italia con risultati molto incoraggianti, in quanto ha fornito in generale risultati coerenti e ben interpretabili. Si ritiene quindi che la diffusione di questa metodica possa essere di pratico interesse per un grande numero di aziende, permettendo di ottimizzare la vinificazione in funzione della conoscenza del potenziale polifenolico della buccia.

Per una gestione completa della vinificazione, è consigliabile abbinarla ad una misura delle cinetiche di estrazione dei polifenoli ed alla degustazione se le macerazioni proseguono nella fase post-fermentativa, per tenere sotto controllo le estrazioni dai vinaccioli.

Bibliografia

- Castia T., Franco M. A., Mattivi F., Muggioli G., Sferlazzo G., Versini G. (1992) Valutazione mediante metodi statistici multivariati dell'evoluzione di alcuni parametri compositivi di uve Cabernet sauvignon e Cannonau allevate a spalliera ed a tendone in Sardegna. Riv. Merceol., 31(1), 81-94.
- Di Stefano R., Cravero M.C., Gentilini N. (1989) Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. L'Enotecnico, 5, 83-89.
- Mattivi F., Zulian C., Nico-

lini G. and Valenti L. (2002a) Wine, biodiversity, technology and antioxidants. In Alcohol and Wine in Health and Disease, Annals of the New York Academy of Sciences, Dipak K. Das and F. Ursini editors, vol.957, 37-56.

Mattivi F., Prast A., Nicolini G., Valenti L. (2002b) Validazione di un nuovo metodo per la misura del potenziale polifenolico delle uve rosse e discussione del suo campo di applicazione in enologia. Riv. Vitic. Enol., 2-3, 55-74.

Mattivi F., Tonon D., Sanchez C. (2002c) Gli antiossidanti polifenolici naturali. Laboratorio 2000, 3, 46-56; Imbottigliamento, 2002, 5, 48-60.

Mattivi F., Prast A., Nicolini G., Valenti L. (2003) Il potenziale polifenolico delle uve rosse e la sua applicazione in enologia. L'Enologo, 10, 105-114.

Mattivi F., Valenti L. (2004) Il potenziale polifenolico delle uve Nebbiolo: comparazione con le varietà internazionali ed italiane. Proc. Conv. Int. "Nebbiolo Grapes", Sondrio, Italy, 23-25 January 2004, in web (http://www.nebbiolograpes.org/2004/convegno_atti.htm).

Mattivi F., Prast A., Thieme A., Pichler U., Varner M. (2004) Caratterizzazione triennale del potenziale polifenolico delle uve Teroldego Rotaliano ed implicazioni per le proprietà enologiche e nutrizionali dei vini. Atti del convegno "Teroldego: un autoctono esemplare". Mezzolombardo, 07 maggio 2004, Cantina Rotaliana e Provincia Autonoma di Trento Ed., 2006, 90-105.

Rigo A., Vianello F., Clementi G., Rossetto M., Scarpa M., Vrhovšek U., Mattivi F. (2000) Contribution of the proanthocyanidins to the peroxy radical scavenging capacity of some Italian red wines. J. Agric. Food Chem., 48, 6, 1996-2002.

Ringraziamenti. Un vivo ringraziamento va ai colleghi che hanno collaborato alla messa a punto del nuovo metodo rapido, ed in particolare all'agronomo Silverio Pachioli, ed agli analisti Giuliano Cova, Domenico Masuero e Debora Trainotti.