



L'UTILIZZO DELLA METABOLOMICA PER STUDIARE IL RESVERATROLO ED ALTRI STILBENI NELL'UVA

Identificati 18 composti stilbenici e per la prima volta alcuni trimeri e tetrameri del resveratrolo nelle uve di Raboso e Primitivo grazie al metodo innovativo "suspect screening analysis".



Di
Luigi Bavaresco
Mirko De Rosso
Annarita Panighel
Riccardo Flamini

(Da sinistra nella foto)

Consiglio per la Ricerca e la
 Sperimentazione in Agricoltura
 Centro di Ricerca per la
 Viticoltura (CRA-VIT) - Conegliano (TV)

RIASSUNTO

■ Il resveratrolo ed i suoi derivati (gli stilbeni) sono fitoalessine presenti nell'uva, la cui sintesi nella vite è innescata principalmente da stress biotici e abiotici, ma anche influenzata da altri fattori quali la varietà, il portinnesto, il clima, il suolo, le pratiche culturali.

■ Il resveratrolo è noto per i suoi effetti benefici sulla salute umana quando assunto con l'uva ed il vino. In questo articolo è presentato

un metodo innovativo denominato "suspect screening analysis" che è stato sviluppato per lo studio dei metaboliti dell'uva e gli stilbeni in particolare.

■ La metodica prevede l'analisi mediante cromatografia liquida ad ultra prestazioni (UHPLC) accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione (QTOF), e l'utilizzo di un nuovo database appositamente costruito denominato *GrapeMetabolomics* per l'identificazione dei composti che attualmente contiene

un migliaio di metaboliti putativi dell'uva e del vino. In questo lavoro è riportato la caratterizzazione dei derivati stilbenici identificati in due varietà di uve autoctone italiane: Raboso Piave e Primitivo. Complessivamente sono stati identificati 18 composti stilbenici, ed alcuni trimeri e tetrameri del resveratrolo sono stati riscontrati nell'uva per la prima volta.

Parole chiave: uva, resveratrolo, stilbeni, metabolomica.



INTRODUZIONE

Fattori viticoli e stilbeni.

■ Il resveratrolo ed i composti stilbenici agiscono nelle foglie e nell'uva come fitoalessine e sono composti prodotti dalla pianta in risposta a stress biotici ed abiotici. I loro contenuti nell'uva sono però influenzati anche dai fattori viticoli, come la varietà (e il clone), il portinnesto, le condizioni meteorologiche, il suolo, le tecniche culturali (Bavaresco et al., 2012).

■ La varietà svolge un ruolo importante sulle concentrazioni degli stilbeni nell'uva: secondo quanto riportato da Gatto et al. (2008) nell'ambito di un numero elevato di varietà bianche e rosse studiate in Trentino, i più alti

livelli di stilbeni sono stati riscontrati nel Pinot Nero (tra i vitigni rossi) e nel Marsanne (tra i vitigni bianchi). In un altro lavoro di Vincenzi et al. (2013) condotto in Veneto su vitigni a bacca rossa, il Barbera si è dimostrato il più ricco di *trans*-resveratrolo, mentre il Franconia ed il Negroamaro hanno avuto i più alti valori di *trans*-piceide.

■ Anche il portinnesto può influire sui livelli di questi composti, ed è stato osservato che il Kober 5BB induce nel Pinot blanc un livello di resveratrolo nell'uva maggiore del SO4 e del 1103P (Bavaresco e Zamboni, 1990). Per quanto riguarda l'effetto del suolo, terreni calcarei inducono nell'uva concentrazioni di stilbeni superiori di quelli non calcarei (Bavaresco et al., 2005).

■ Anche fattori ambientali come l'altitudine del vigneto influenzano tali parametri. In una specifica prova condotta nel Piacentino, posizioni del vigneto fino ad altitudini di 320 m s.l.m. inducevano un incremento di stilbeni nell'uva (*trans*-resveratrolo e *trans*-piceide), anche se a quote ancora più elevate era stata osservata una loro diminuzione (Tab. 1, Bavaresco et al., 2007). Il livello di stilbeni nei tessuti della vite può essere determinato anche dalle pratiche culturali.

■ La Fig. 1 mostra l'effetto della fertilizzazione azotata (N) sui livelli di resveratrolo nelle foglie. In generale, si osserva un effetto negativo sul resveratrolo all'aumentare della quantità di azoto fornita, e questo è stato registrato anche nelle bacche mature (Bavaresco et al., 2001). È stato inoltre osservato che un alto carico produttivo e l'irrigazione diminuiscono la concentrazione di stilbeni nei vini, rispetto ad una bassa produzione e l'assenza d'irrigazione (Gebbia et al., 2003), mentre il diradamento dei grappoli (in Barbera) aumenta la presenza di resveratrolo nel vino (Gatti et al., 2011).

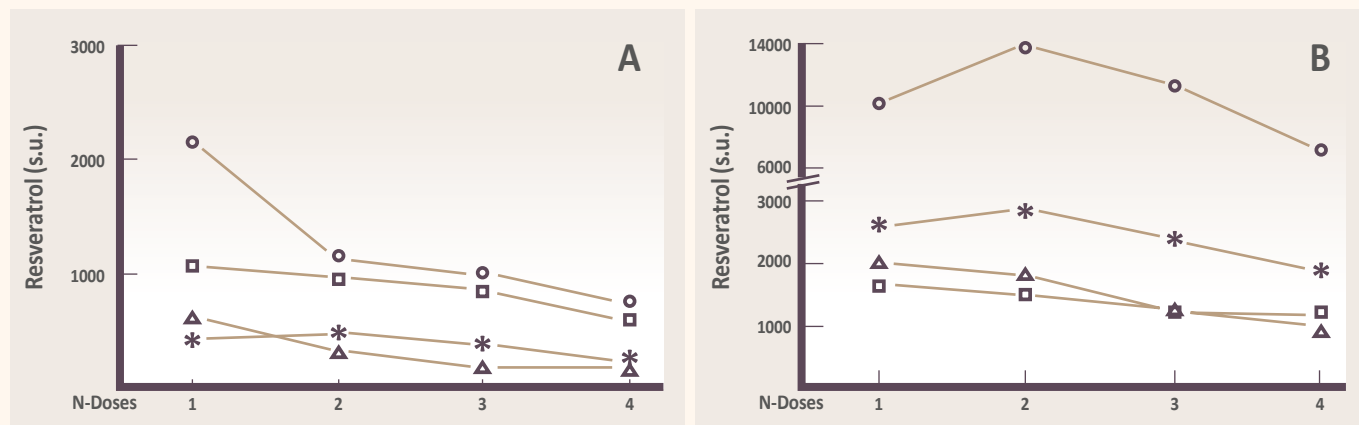
■ Data la complessa composizione dei derivati del resveratrolo nell'uva, per essere in grado di studiare in modo approfondito ed efficace gli effetti dei fattori viticoli sui loro contenuti nelle uve, e di conseguenza nei vini, è necessario disporre di uno strumento analitico che permetta l'identificazione di tutti questi composti. Attualmente, lo strumento che può rispondere più efficacemente a tale scopo è la metabolomica mediante analisi di spettrometria di massa ad alta risoluzione.

Tab. 1 - Effetto dell'altitudine del vigneto sulla concentrazione degli stilbeni nelle uve alla raccolta

Altitudine	<i>trans</i> -resveratrolo (mg/kg uva)	<i>trans</i> -piceide (mg/kg uva)
150 m s.l.m.	0.012 a	0.065 a
240 m s.l.m.	0.059 b	0.086 a
320 m s.l.m.	0.087 b	0.186 b
420 m s.l.m.	0.070 b	0.074 a

Dati medi per uve di Barbera, Croatina e Malvasia di Candia aromatica, vendemmie 2000-2002 (Bavaresco et al., 2007)

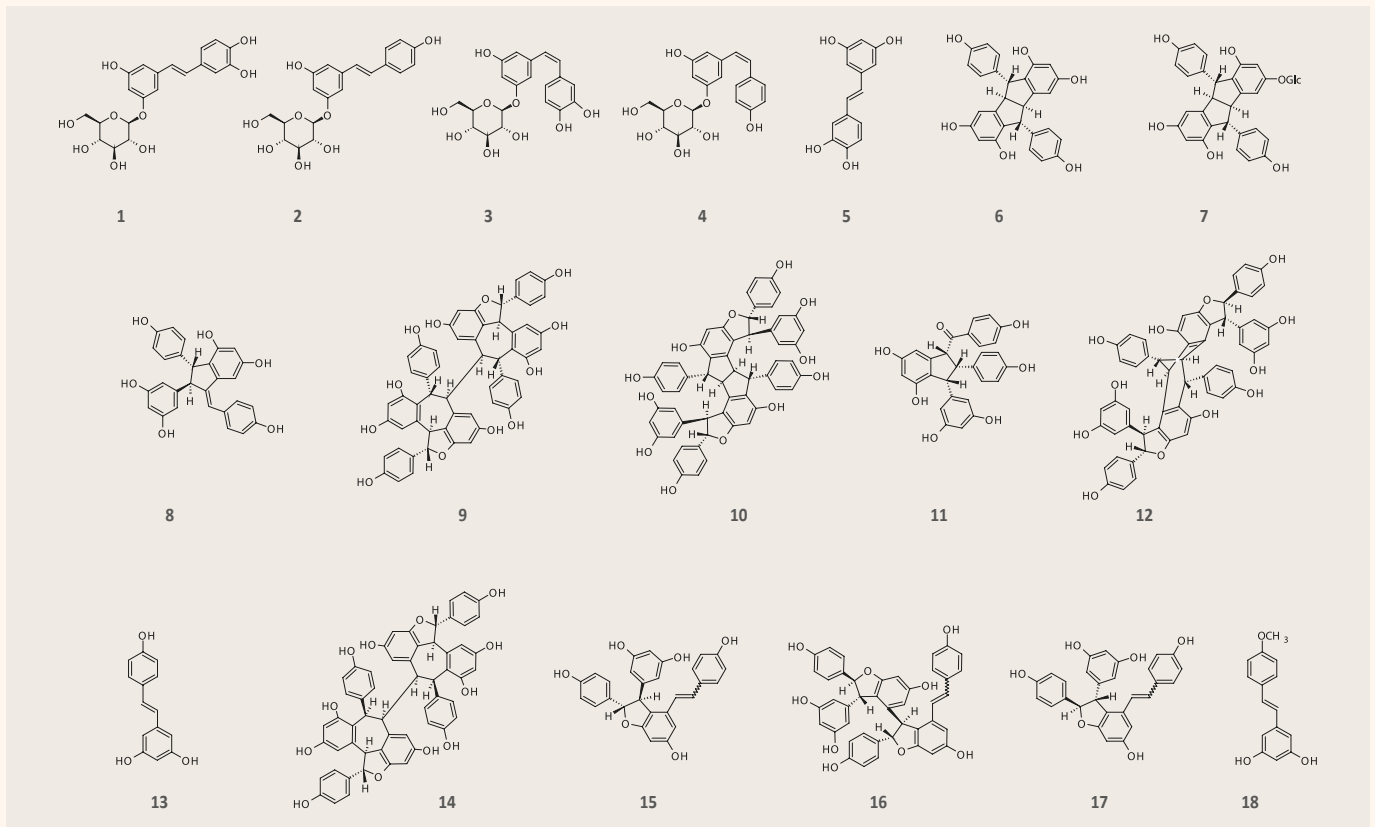
Fig. 1 - Effetto della fertilizzazione azotata sul contenuto di resveratrolo nelle foglie di quattro varietà di vite



(A) primo campionamento; (B) terzo campionamento; s.u.: scan units; ▲ Riesling; * Kerner (Trollinger × Riesling); ■ Merzling (Seyve - Villard 5 - 276×[Riesling × Ruländer]); ● Orion (Optima × Seyve - Villard 12-375) (Bavaresco e Eibach, 1987)



Fig. 2 - Strutture dei derivati stilbenici identificati nei campioni di uve Raboso Piave e Primitivo



(1) *E*-astringina, (2) *E*-piceide, (3) *Z*-astringina, (4) *Z*-piceide, (5) piceatannolo, (6) pallidolo, (7) pallidolo-3-*O*-glucoside, (8) parthenocissin A, (9) hopeaphenol, (10) ampelopsin H, (11) caraphenol B, (12) vaticanol isomero C, (13) *trans*-resveratrolo, (14) isohopeaphenol, (15) *E*- e *Z*- ϵ -viniferina, (16) *E*- e *Z*-miabenolo C, (17) *E*- e *Z*- ϵ -viniferina, (18) *trans*-resveratrolo-4'-metiletere (Flamini et al. 2013)

LA METABOLOMICA DI SUSPECT SCREENING ANALYSIS

■ I principali composti stilbenici attualmente identificati nelle uve sono *trans*- e *cis*-resveratrolo, piceatannolo, i loro derivati glucosidici (piceidi ed astringine), una considerevole gamma di dimeri (viniferine) ed oligomeri del resveratrolo (Vitrac et al., 2005).

■ I metodi più tradizionalmente utilizzati per operare una determinazione selettiva di questi composti sono mediante cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) registrando i segnali degli isomeri *cis* e *trans* rispettivamente a 285 nm e 325 nm (Di Stefano e Flamini, 2008).

■ Più recentemente, gli stilbeni dell'uva e dei vini sono stati studiati mediante la cromatografia liquida abbinata alla spettrometria

massa (LC/MS) operando la ionizzazione delle molecole sia in modalità negativa che positiva (Gamoh e Nakashima, 1999; Flamini e Dalla Vedova, 2004; Careri et al., 2004; Monagas et al., 2005; Buiarelli et al., 2007; Stella et al., 2008).

■ In generale, la metabolomica viene definita come lo studio quantitativo e qualitativo di tutti i metaboliti all'interno di una cellula, un tessuto o di un organismo (il metaboloma). L'approccio di metabolomica "mirata" viene utilizzato per eseguire studi quantitativi di composti specifici, ma la maggior parte delle informazioni sul metaboloma (in particolare di campioni complessi) viene persa (Cuadros-Inostroza et al., 2010; Vaclavik et al., 2011).

■ Al contrario, la metabolomica "non mirata" è uno strumento con un'elevata capacità identificativa, ed in una singola analisi è in grado di rivelare migliaia di segnali dei metaboliti pre-

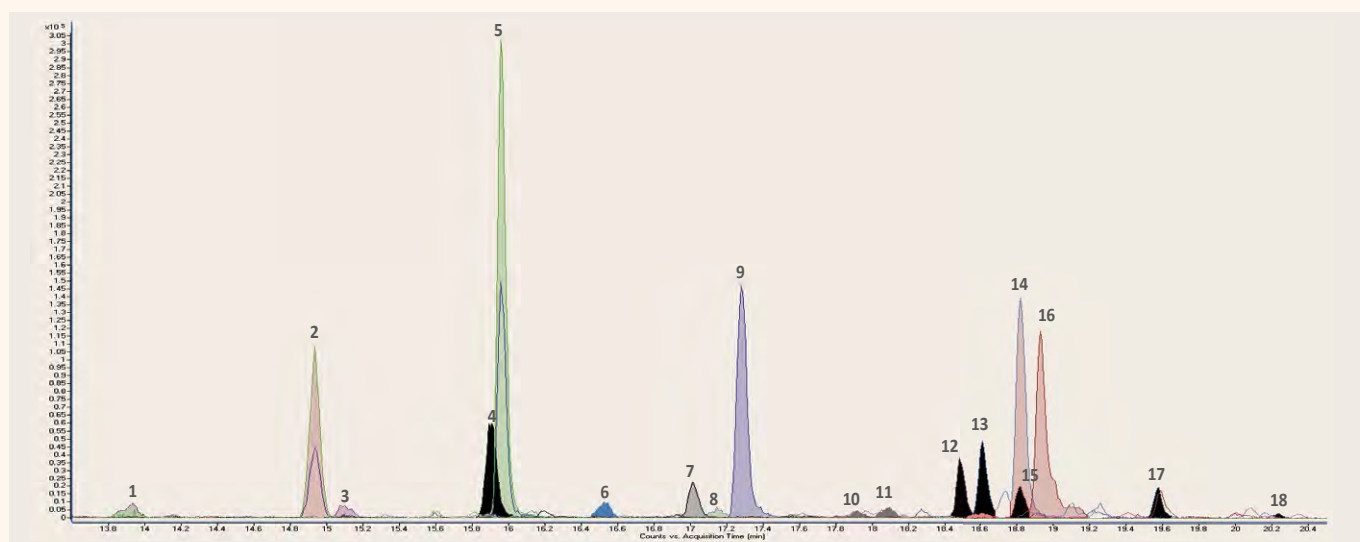
senti nei vini (Arapitsas et al., 2012).

■ L'analisi di "suspect screening" è un approccio intermedio. In questo caso l'identificazione dei metaboliti si basa sulla costruzione di un database specifico utilizzando le informazioni specifiche sui composti potenzialmente presenti nel campione reperibili in letteratura, come la loro formula e struttura molecolare (Krauss et al., 2010).

■ L'identificazione dei composti avviene mediante un trattamento dei dati grezzi con l'utilizzo di specifici algoritmi che risalgono alle formule molecolari dei composti sulla base di misure accurate delle loro masse mono-isotopiche e delle abbondanze relative dei segnali del profilo isotopico (Kueger et al., 2012; Sana et al., 2008). Effettuando la ricerca sul database i metaboliti sono poi associati alle formule molecolari (Hanhineva et al., 2008; Brown et al., 2009; De Vos et al., 2007).



Fig. 3 - Cromatogramma LC/QTOF degli stilbeni registrato in modalità di ionizzazione negativa nell'analisi dell'estratto d'uva Raboso Piave



(1) E-astringina, (2) E-piceide, (3) Z-astringina, (4) piceatannolo, (5) Z-piceide, (6) dimer 1 (pallidolo), (7) pallidolo-3-O-glucoside, (8) parthenocissin A, (9) *trans*-resveratrolo, (10) caraphenol B, (11) tetramero 1, (12) tetramero 2, (13) Z-ε-viniferina, (14) E-ε-viniferina, (15) Z-miabenolo C, (16) E-miabenolo C, (17) ε-viniferina, (18) *trans*-resveratrolo-4'-metil etere (Flamini et al., 2013)

MATERIALI E METODI

■ Esistono numerose banche dati elettroniche di spettrometria di massa commerciali e sul web contenenti anche metaboliti vegetali, ma nessuna è specifica per l'uva o il vino. Di conseguenza, quando queste sono state utilizzate per identificare i metaboliti in estratti d'uva, solo pochi dei composti attesi nei campioni sono stati identificati. È stato allora sviluppato un metodo di *suspect screening analysis* attraverso la creazione di un nuovo database di metaboliti dell'uva e del vino denominato *GrapeMetabolomics* (Flamini et al., 2013). Attualmente il database contiene un migliaio di composti con pesi molecolari di 100-1700 Da. L'analisi dei campioni è eseguita mediante cromatografia liquida ad ultraprestazioni (UHPLC) abbinata ad uno spettrometro di massa ad alta risoluzione a quadrupolo-tempo di volo (Q-TOF con risoluzione nominale 40.000), ed una sorgente di ionizzazione Jet Stream. I composti sono identificati mediante misure di massa accurata e la ricerca in *GrapeMetabolomics*. Esperimenti di frammentazione delle molecole (MS/MS) e l'analisi dei tempi di ritenzione relativi nella colonna cromatografica vengono utilizzati per confermare l'identificazione dei composti. Lo studio qui presentato è stato condotto sulle

Tab. 2 - Dati quantitativi medi degli stilbeni identificati nelle uve Raboso Piave e Primitivo (due repliche analitiche)

Composti	Formula	Raboso Piave	Primitivo
		µg/kg uva	
E-astringina (piceatannolo glucoside)	C20H21O9	106.0±5.8	884.2 ±3.4
E-piceide	C20H21O8	395.3±3.3	2332.1 ±48.9
Z-astringina	C20H21O9	101.7±3.3	121.4 ±1.0
piceatannolo	C14H11O4	41.8±0.5	281.5 ±10.2
Z-piceide	C20H21O8	1476.8±68.7	1776.2 ±47.4
dimer 1 (pallidolo)	C28H21O6	21.7±0.2	356.2 ±2.6
pallidolo-3-O-glucoside	C34H31O11	277.3±4.4	187.5 ±1.6
dimer 2	C28H21O6	16.8±1.2	131.0 ±1.1
<i>trans</i> -resveratrolo	C14H11O3	1134.8±33.8	1136.4 ±53.6
caraphenol B	C28H21O7	36.8±1.7	104.2 ±1.4
tetramero 1	C56H41O12	40.3±2.1	101.0 ±2.3
tetramero 2	C56H41O12	100.6±0.0	536.6 ±12.9
dimer 3 (Z-ε-viniferina)	C28H21O6	214.6±5.7	380.4 ±7.0
dimer 4 (E-ε-viniferina)	C28H21O6	592.5±11.6	702.1 ±3.4
trimer 1 (Z-miabenolo C)	C42H31O9	253.9±10.9	236.2 ±7.8
trimer 2 (E-miabenolo C)	C42H31O9	371.1±28.3	1357.8 ±11.9
dimer 5 (δ-viniferine)	C28H21O6	67.8±0.1	67.9 ±1.1
resveratrolo metil etere	C15H13O3	37.3±4.9	-

I contenuti di viniferine e resveratrolo oligomeri sono espressi in µg/kg di *trans*-resveratrolo, i derivati glucosidici in µg/kg di E-piceide (Flamini et al., 2013)



uve in due varietà a bacca rossa (Raboso Piave e Primitivo) vendemmiate nel 2011 presso la collezione di germoplasma viticolo del CRA-VIT.

RISULTATI E DISCUSSIONE

■ Eseguendo due analisi in modalità di ionizzazione positiva e negativa, in un estratto d'uva vengono mediamente identificati, a seconda delle varietà, 320-450 composti. Il metodo è stato focalizzato sullo studio dei derivati stilbenici delle uve dei due vitigni testati menzionati. La ricerca con l'utilizzo di *GrapeMetabolomics* ha portato all'identificazione complessivamente di 18 composti le cui strutture sono riportate in Fig. 2. In Fig. 3 è riportato il cromatogramma relativo all'analisi di un estratto di uva di Raboso Piave. Tutti gli analiti sono stati identificati con un punteggio identificativo (score) maggiore del 97% e nel caso del resveratrolo metil etere è risultato del 84.4% probabilmente a causa della bassa intensità del segnale. L'identificazione dei composti è stata confermata mediante esperimenti di frammentazione delle molecole (MS/MS) e la misurazione della massa accurata dei frammenti. I dati quantitativi medi dei composti stilbenici identificati nelle due varietà sono riportati in Tab. 2. Nell'uva di Primitivo sono stati riscontrati complessivamente valori di stilbeni più alti rispetto al Raboso, con un contenuto totale superiore a 10 mg/kg.

CONCLUSIONI

■ I fattori viticoli giocano un ruolo importante nel determinare il contenuto di resveratrolo e derivati nell'uva. L'approccio di metabolomica di *suspect screenings* si è rivelato particolarmente efficace per la caratterizzazione dei derivati stilbenici, fornendo identificazione ed informazioni quantitative di numerosi composti in una sola analisi. Ad esempio, con questo metodo sono stati identificati per la prima volta diversi trimeri e tetrameri del resveratrolo nell'uva. La profonda conoscenza della chimica del campione fornita da questo metodo può essere efficacemente applicata allo studio degli effetti dei fattori viticoli (varietà, portinnesto, suolo, pratiche culturali, condizioni meteorologiche) sui contenuti di questi composti di elevato interesse salutistico nelle uve, e per studiare gli effetti dei cambiamenti climatici. Il monitoraggio di queste fi-

tolessine nell'uva ed altre parti della pianta, può essere inoltre efficacemente utilizzato nello studio delle malattie della vite. Questa ricerca è finanziata dal Ministero Italiano delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (Mi-PAAF): progetto Vigneto, durata 2011-2013.

BIBLIOGRAFIA

- Arapitsas, P.; Scholz, M.; Vrhovsek, U.; Di Blasi, S.; Biondi Bartolini, A.; Masuero, D.; Perenzoni, D.; Rigo, A.; Mattivi, F. (2012). A metabolomic approach to the study of wine micro-oxygenation. *PLoS One* 7(5): e37783.
- Bavaresco L.; Eibach, R. (1987). Investigations on the influence of N fertilizer on resistance to powdery mildew (*Oidium tuckeri*) downy mildew (*Plasmopara viticola*) and on phytoalexin synthesis in different grapevine varieties. *Vitis* 26: 192-200.
- Bavaresco, L.; Zamboni, M. (1990). Influence of the rootstock and potassium fertilizer on phytoalexin synthesis in Pinot blanc grown on a calcareous soil. In: Proceedings of the 5th International Symposium on Grape Breeding, St. Martin/Pfalz, Germany, September 12-16, 1989; *Vitis Special Issue* 295-299.
- Bavaresco, L., Pezzutto, S.; Ragga, A.; Ferrari, F.; Trevisan, M. (2001). Effect of nitrogen supply on trans-resveratrol concentration in berries of *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Vitis* 40(4): 229-230.
- Bavaresco, L.; Civardi, S.; Pezzutto, S.; Vezzulli, S.; Ferrari, F. (2005). Grape production, technological parameters, and stilbenic compounds as affected by lime induced chlorosis. *Vitis* 44(2): 63-65.
- Bavaresco, L.; Pezzutto, S.; Gatti, M.; Mattivi, F. (2007). Role of the variety and some environmental factors on grape stilbenes. *Vitis*, 46(2): 57-61.
- Bavaresco, L.; Mattivi, F.; De Rosso, M. & Flamini, R. (2012). Effects of elicitors, viticultural factors and enological practices on resveratrol and stilbenes in grapevines and wine. *Mini-Rev. Med. Chem.* 12 (13): 1366-1381.
- Brown, M.; Dunn, W.B.; Dobson, P.; Patel, Y.; Winder, C.L.; Francis-McIntyre, S.; Begley, P.; Carroll, K.; Broadhurst, D.; Tseng, A.; Swainston, N.; Spasic, I.; Goodacre, R.; Kell, D.B. (2009). Mass spectrometry tools and metabolite-specific databases for molecular identification in metabolomics. *Analyst* 134(7): 1322-1332.
- Buiarelli, F.; Cocchi, F.; Jasonowska, R.; Merolle, M.; Terracciano, A. (2007). Analysis of some stilbenes in Italian wines by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* 21 (18): 2955-2964.
- Careri, M.; Corradini, C.; Elviri, L.; Nicoletti, I.; Zagnoni, I. (2004). Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of cis-resveratrol and trans-resveratrol: development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts. *J. Agric. Food Chem.* 52(23): 6868-6874.
- Cuadros-Inostroza, A.; Gialalisco, P.; Hummel, J.; Eckardt, A.; Willmitzer, L.; Peña-Cortés, H. (2010). Discrimination of wine attributes by metabolome analysis. *Anal. Chem.* 82(9): 3573-3580.
- De Vos, R.C.; Moco, S.; Lommen, A.; Keurentjes, J.J.; Bino, R.J.; Hall, R.D. (2007). Untargeted large-scale plant metabolomics using liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Nature Protocols* 2(4): 778-791.
- Di Stefano, R.; Flamini, R. (2008). Free and glycoside hydroxy-stilbenes in grape. In: *Hyphenated techniques in grape & wine chemistry*. R. Flamini (Ed.), Wiley & Sons Ltd. ISBN: 9780470061879.

■ Flamini, R.; Dalla Vedova, A. (2004). Fast determination of the total free resveratrol content in wine by direct-exposure-probe, positive-ion chemical ionization and collision-induced-dissociation mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* 18(17): 1925-1931.

■ Flamini, R.; De Rosso, M.; De Marchi, F.; Dalla Vedova, A.; Panighel, A.; Gardiman, M.; Maoz I.; Bavaresco, L. (2013). An innovative approach to grape metabolomics: stilbene profiling by suspect screening analysis. *Metabolomics* 9: 1243-1253.

■ Gamoh, K.; Nakashima, K. (1999). Liquid chromatography/mass spectrometric determination of trans-resveratrol in wine using a tandem solid-phase extraction method. *Rapid Commun. Mass Sp.* 13(12) 1112-1115.

■ Gatti, M.; Civardi, S.; Zamboni, M.; Ferrari, F.; Elothami, D.; Bavaresco, L. (2011) - Preliminary results on the effect of cluster thinning on stilbene concentration and antioxidant capacity of *Vitis vinifera* L. cv. "Barbera" wine. *Vitis*, 50 (1): 43-44.

■ Gatto, P.; Vrhovsek, U.; Muth, J.; Segala, C.; Romualdi, C.; Fontana, P.; Pruefer, D.; Stefanini, M.; Moser, C.; Mattivi, F.; Velasco, R. (2008). Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J. Agric. Food Chem.* 56(24): 11773-11785.

■ Gebbia, N.; Bavaresco, L.; Fregoni, M.; Civardi, S.; Crosta, L.; Ferrari, F.; Grippi, F.; Tolomeo, M. & Trevisan, M. (2003). The occurrence of the stilbene piceatannol in some wines from Sicily. *Vignevini* 30(5): 87-94.

■ Hanhineva, K.; Rogachev, I.; Kokko, H.; Mintz-Oron, S.; Venger, I.; Kärenlampi, S.; Aharoni, A. (2008). Non-targeted analysis of spatial metabolite composition in strawberry (*Fragaria 9 ananassa*) flowers. *Phytochemistry* 69(13): 2463-2481.

■ Krauss, M.; Singer, H.; Hollender, J. (2010). LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397(3): 943-951.

■ Kueger, S.; Steinhäuser, D.; Willmitzer, L.; Gialalisco, P. (2012). High-resolution plant metabolomics: From mass spectral features to metabolites and from whole-cell analysis to subcellular metabolite distributions. *Plant J.* 70(1): 39-50.

■ Monagas, M.; Suárez, R.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. (2005). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *J. Enol. Viticult.* 56(2): 139-147.

■ Sana, T.R.; Roark, J.C.; Li, X.; Waddell, K.; Fischer, S.M. (2008). Molecular formula and Metlin personal metabolite database matching applied to the identification of compounds generated by LC/TOF-MS. *Journal of Biomolecular Techniques* 19(4): 258-266.

■ Stella, L.; De Rosso, M.; Panighel, A.; Dalla Vedova, A.; Flamini, R.; Traldi, P. (2008). Collisionally induced fragmentation of [M-H]⁻ species of resveratrol and piceatannol investigated by deuterium labelling and accurate mass measurements. *Rapid Commun. Mass Sp.* 22(23): 3867-3872.

■ Vaclavik, L.; Laciná, O.; Hajslova, J.; Zweigenbaum, J. (2011). The use of high performance liquid chromatography - quadrupole time of flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety. *Anal. Chim. Acta* 685(1): 45-51.

■ Vincenzi, S.; Tomasi, D.; Gaiotti, F.; Lovat, L.; Giacosa, S.; Torchio, F.; Rio Segade, S.; Rolle, L. (2013). Comparative study of the resveratrol content of twentyone Italian red grape varieties. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 34 (1): 30-35.

■ Vitrac, X.; Bornet, A.; Vanderlinde, R.; Valls, J.; Tristan, R.; Delaunay, J.C.; Mérillon, J.M.; Teissédre, P.L. (2005). Determination of stilbenes (ε-viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol, ε-viniferin) in Brazilian wines. *J. Agric. Food Chem.* 53(14): 5664-5669. ■