



Università degli Studi di Napoli “Federico II”

Facoltà di Agraria

Dipartimento di Scienza degli Alimenti

**TESI DI DOTTORATO IN  
SCIENZE E TECNOLOGIE DELLE PRODUZIONI  
AGRO-ALIMENTARI  
XXII CICLO**

**“L’APPROCCIO *METABOLOMICO* NELLA CARATTERIZZAZIONE  
DELL’UVA E DEL VINO PALLAGRELLO”**

**Tutor:**

Chiar.mo Prof.

Lina Chianese

**Coordinatore:**

Chiar.mo Prof.

Giancarlo Barbieri

**Dottorando:**

Letizia Petrucci

*La chiave di tutte le scienze è senza dubbio il punto di domanda.*

*Honoré de Balzac*

Università degli Studi di Napoli “Federico II”.....	1
<b>1 PRESENTAZIONE DEL LAVORO.....</b>	<b>7</b>
1.1 Evoluzione del concetto di terroir.....	7
1.2 Metodi utilizzati per individuare indicatori associabili al territorio .....	8
<b>2 EVOLUZIONE DELLA COMPOSIZIONE POLIFENOLICA E AROMATICA DELL’UVA PALLAGRELLO NERO NELLA PRODUZIONE E NELL’INVECCHIAMENTO DEL VINO.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Introduzione.....</b>	<b>12</b>
2.1.1 Il Pallagrello e la provincia di Caserta.....	12
2.1.2 Miglioramento della qualità del vino.....	13
2.1.3 Metaboliti secondari: la teoria della co-evoluzione.....	14
2.1.4 I composti fenolici.....	15
2.1.4.1 Acidi fenolici.....	17
2.1.4.2 Antociani.....	17
2.1.4.3 Flavanoli.....	19
2.1.4.4 Flavonoli.....	20
2.1.5 Il ruolo dei polifenoli nella classificazione varietale.....	21
2.1.6 Evoluzione dei composti polifenolici durante la vinificazione.....	22
2.1.7 Evoluzione dei composti polifenolici durante la conservazione.....	23
2.1.8 La spettrometria di massa nello studio dei polifenoli dell’uva e del vino.....	25
<b>2.2 SCOPO.....</b>	<b>28</b>
<b>2.3 MATERIALI E METODI.....</b>	<b>30</b>
2.3.1 Campionamento.....	30
2.3.1.1 Protocollo di Vinificazione in Bianco.....	30
2.3.1.2 Protocollo di Vinificazione in Rosso.....	31
2.3.2 Analisi chimico-fisiche.....	31
2.3.2.1 Determinazione degli zuccheri.....	31
2.3.2.2 Determinazione del pH.....	32
2.3.2.3 Determinazione dell’acidità totale.....	32
2.3.2.4 Determinazione del grado alcolico (metodo ebulliometrico).....	32
2.3.2.5 Determinazione dei polifenoli totali.....	32
2.3.2.6 Determinazione degli antociani totali.....	33
2.3.2.7 Determinazione dei tannini totali .....	33
2.3.2.8 Analisi spettrofotometriche.....	34
2.3.3 Analisi delle sostanze fenoliche.....	34
2.3.3.1 Estrazione dei composti fenolici dal mosto/vino.....	34

2.3.3.2 Estrazione dei fenoli dalle bucce.....	34
2.3.3.3 Analisi LC/MS dell'estratto.....	35
2.3.3.4 Estrazione della frazione antocianica dalle bucce.....	35
2.3.3.5 Analisi LC/MS.....	36
2.3.3.6 Estrazione dei tannini dai vinaccioli.....	36
2.3.3.7 Analisi LC/MS.....	37
2.3.4 Indice di caseina.....	37
<b>2.4 Risultati .....</b>	<b>38</b>
2.4.1 Pallagrello Nero.....	38
2.4.1.1 Analisi chimiche - Uva.....	39
2.4.1.2 Analisi LC/MS - Uva.....	39
2.4.1.3 Analisi chimiche - Vino.....	41
2.4.1.4 Analisi del colore del vino mediante spettrometria.....	41
2.4.1.5 Analisi LC-MS - Vino.....	42
2.4.2 Pallagrello Bianco.....	43
2.4.2.1 Analisi chimiche - Uva.....	44
2.4.2.2 Analisi LC-MS -Uva.....	45
2.4.2.3 Analisi chimiche - Vino.....	45
2.4.2.4 Analisi LC-MS - Vino.....	45
<b>2.5 Conclusioni.....</b>	<b>47</b>
<b>2.6 Tabelle e figure.....</b>	<b>49</b>
<b>3 CARATTERIZZAZIONE AROMATICA DELL'UVA E DEL VINO PALLAGRELLO BIANCO E NERO E STUDIO DELL'EFFETTO DEL PROCESSO DI CHIARIFICA SUL PROFILO AROMATICO DEL VINO BIANCO .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Introduzione.....</b>	<b>59</b>
3.1.1 Gli aromi varietali.....	59
3.1.1.1 Ruolo degli aromi varietali nell'ecologia della pianta.....	61
3.1.1.2 I norisoprenoidi.....	62
3.1.1.3 La biosintesi dei norisoprenoidi.....	63
3.1.1.4 I Terpeni.....	65
3.1.1.5 Le Metossipirazine.....	67
3.1.1.6 I tioli volatili.....	67
3.1.2 I composti volatili da trattamenti prefermentativi.....	68
3.1.3 Aromi di fermentazione.....	68
3.1.4 Aromi di post-fermentazione.....	69
3.1.5 Aromi derivanti da affinamento in legno.....	70

3.1.6 L'illimpimento e la stabilizzazione.....	72
3.1.7 Chiarifica.....	73
3.1.7.1 Chiarifica spontanea.....	73
3.1.8 Il collaggio.....	74
3.1.8.1 Le gelatine.....	74
3.1.8.2 L'albumina.....	75
3.1.8.3 Il caseinato.....	76
3.1.8.4 La Bentonite.....	77
3.1.9 Effetto della chiarifica sul profilo aromatico.....	77
3.1.10 Microestrazione in fase solida dello spazio di testa statico (HS-SPME).....	79
3.1.10.1 Principio di funzionamento.....	79
3.1.10.2 Parametri che influenzano l'efficienza estrattiva del SPME.....	81
3.1.10.3 Tipi di fibre.....	81
3.1.10.4 Volume di campionamento.....	83
3.1.10.5 Temperatura e tempo di estrazione.....	84
3.1.10.6 Sale.....	84
3.1.10.7 Modalità di estrazione.....	84
3.1.10.8 Desorbimento degli analiti dalla fibra.....	85
3.1.10.9 Derivatizzazione.....	85
3.1.10.10 Applicazione agli alimenti.....	85
3.1.10.11 Applicazione al vino.....	85
<b>3.2 Scopo.....</b>	<b>87</b>
<b>3.3 Materiali e metodi.....</b>	<b>88</b>
3.3.1 Analisi delle sostanze aromatiche.....	88
3.3.1.1 Estrazione dei composti volatili con SPME.....	88
3.3.1.2 Analisi GC/MS.....	88
3.3.2 Prodotti chimici e reagenti.....	88
3.3.3 Composizione e preparazione delle soluzioni modello.....	89
3.3.4 Analisi GC/MS.....	89
<b>3.4 Risultati.....</b>	<b>90</b>
3.4.1 Determinazione aromatica dell'uva Pallagrello Bianco.....	90
3.4.2 Evoluzione del profilo aromatico del vino Pallagrello bianco durante l'affinamento.....	90
3.4.3 Determinazione della composizione aromatica del Pallagrello Nero mediante analisi GC/MS.....	91
3.4.3.1 Identificazione dei composti aromatici del vino Pallagrello Nero.....	92
3.4.4 Determinazione del livello quantitativo dei terpeni prima e dopo la "chiarifica in vitro" con i collanti commerciali.....	93
3.4.4.1 Soluzione modello1.....	93
3.4.4.2 Soluzione modello 2.....	93
3.4.5 Determinazione del livello quantitativo dei terpeni prima e dopo la "chiarifica in vitro" con le frazioni caseiniche $\alpha$ e $\beta$ .....	94

<b>3.5 Conclusioni.....</b>	<b>95</b>
<b>3.6 Tabelle e figure.....</b>	<b>96</b>
<b>4 BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>105</b>

# 1 Presentazione del lavoro

## 1.1 Evoluzione del concetto di *terroir*

Le due parole chiave di questo lavoro di tesi sono *tipico* e *territorio*, termini di uso ed abuso comune, ma di non facile definizione.

Da un punto di vista etimologico, il sostantivo greco *typos* significa impronta, sigillo; l'etimo di questo aggettivo evidenzia come esso sia utilizzato impropriamente per categorie di prodotti per i quali risulta difficile individuare e valutare attributi oggettivi e idonei a consentire una non equivoca attribuzione.

L'altro termine *territorio* è generalmente inteso nella variante elaborata dai francesi, di *terroir*, concetto astratto di territorio, non solo come produttore di beni (cibo, cultura, edifici, strutture), ma come centro di relazioni simboliche ed ecosistema caratterizzato da biodiversità sito-specifica e risorse materiali peculiari.

Il ruolo fondamentale del sito di produzione nel determinare la qualità di un vino era già nota nell'antico Egitto del III millennio a.C. come testimoniano, le iscrizioni riportanti il luogo d'origine, ritrovate su vasi vinari di terracotta e risalenti al 2400 a.C. Anche Ebrei, Greci e Romani erano ben consci dell'importanza della zona d'origine sulla gradevolezza delle produzioni enologiche tant'è che corredevano le anfore per il trasporto del vino con delle tavolette d'argilla, antesignane delle moderne etichette, che riportavano proprio il sito dove il vino era stato prodotto.

Ai Romani si deve anche la prima delimitazione di una zona ad alta vocazione viticola. Columella e Plinio descrivono, infatti, in dettaglio i confini e le caratteristiche della zona di produzione del Falerno, confermando il ruolo primario dell'ambiente pedoclimatico sull'espressione qualitativa della vite e del vino.

La tesi che vedeva, invece, nel vitigno il *genius* del vino si sviluppò nel XIX secolo ad opera di Galesio (1817-19) e venne poi ripresa dal Guyot (1866). Questi autori sostenevano che il ruolo principale nel determinare la tipicità di un vino non si poteva che attribuire al vitigno col quale era stato prodotto. Questa convinzione si basava sull'assunto che è la componente genetica a determinare le potenzialità di un vino.

Il parziale superamento della contrapposizione fra le due tesi, fu favorito dalla circolazione di vitigni, soprattutto di origine francese, diventata imponente a seguito della rivoluzione fillosserica. Le diverse varietà di vite mostravano di adattarsi bene solo a zone con caratteristiche pedoclimatiche simili ai luoghi d'origine, ma, d'altro canto, i vini prodotti in questi aree potevano competere, sotto il profilo organolettico e qualitativo, con quelli dei paesi di provenienza.

Le principali regioni vitivinicole decisero di difendere l'originalità dei propri prodotti dall'aggressione esterna, sottolineando il ruolo fondamentale svolto dal territorio nel determinare la qualità del vino.

Se nel genotipo si trovano codificate le potenzialità di un vitigno, è il *terroir*, componente unica e non trasferibile, definito come l'insieme delle condizioni naturali che influenzano l'attività biologica della vite e la composizione dell'uva, a modularne la risposta ed a determinare il livello di espressione di tale potenziale, ribadendo l'illusorietà di poter riprodurre lo stesso vino al di fuori della zona d'origine solamente trasferendovi il vitigno.

### ***1.2 Metodi utilizzati per individuare indicatori associabili al territorio***

Dopo questa premessa è necessario domandarsi se il territorio o *terroir* di origine abbia sui prodotti alimentari un effetto percepibile per lo meno a livello sensoriale.

Esiste una ampia letteratura su questo aspetto soprattutto per i vini. Infatti, in tale settore, il territorio è di estrema importanza per la determinazione delle aree viticulturali, l'applicazione di norme per l'appellazione di origine e l'idoneità di una particolare cultivar ad essere coltivata in una determinata regione.

Nonostante il generale scetticismo, esiste una documentazione oggettiva sulla possibilità di raggruppare alimenti soprattutto fermentati, quali vini e formaggi, sulla base dell'origine geografica, attraverso una combinazione di analisi sensoriali abbinate scientificamente a metodi statistici quali Step-wise Discriminant Analysis (SDA), Principal Component Analysis (PCA) (Vaamonde et al.,1997). Tali analisi descrittive abbinate all'analisi della Varianza Canonica (CVA) hanno portato, ad esempio, a separare vini Cabernet-Sauvignon da diverse regioni europee e non europee, sulla base di caratteri sensoriali specifici quali l'aroma di pepe e l'aroma di fenolo.

Tuttavia, anche se l'analisi sensoriale ha mostrato di poter fornire dati la cui elaborazione consente il raggruppamento dei campioni in funzione del territorio di origine, si tratta di uno strumento inadeguato per dimostrare su base oggettiva, accettabile anche a livello internazionale, quel legame stretto col territorio che è richiesto dalle norme relative alla protezione della denominazione di origine e della indicazione geografica.

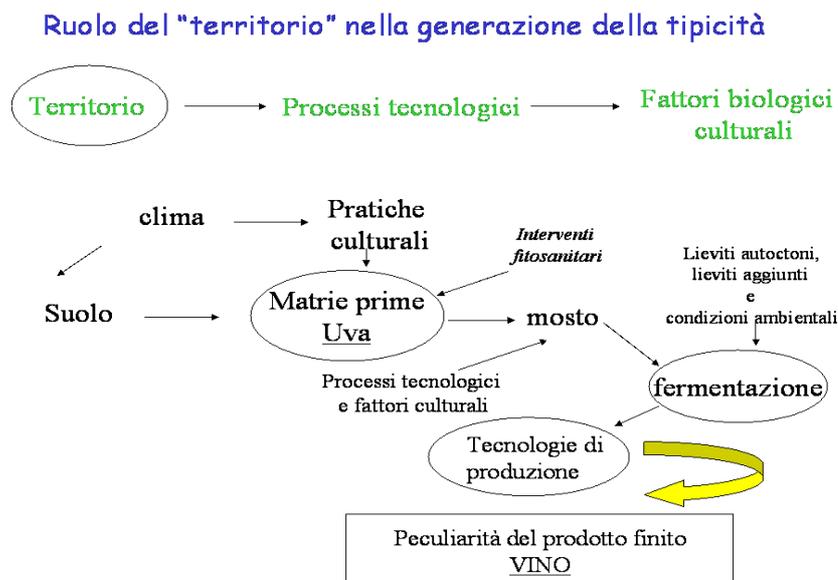
Il problema, dunque, si sposta da una riconoscibilità, che abbiamo visto sostanzialmente possibile anche a livello sensoriale, alla necessità di individuare marcatori oggettivi e misurabili.

Diverse tecniche analitiche in combinazione con l'analisi multivariata sono state proposte per l'individuazione su basi oggettive dei legami con il territorio di una serie di prodotti alimentari trasformati e non trasformati. Si possono selezionare alcuni approcci

metodologici proposti in grado di comprovare il legame con il territorio e del metodo analitico utilizzato per la loro determinazione:

- 1) Metodi spettroscopici come MIR, NIR, FTIR (Tzouros et al., 2001)
- 2) Metodi gascromatografici per la determinazione di:
  - a) componenti lipidici (trigliceridi per individuare l'origine geografica delle noci);
  - b) aromi (SPME, *solid phase micro extraction*). (Mateo et al., 1998)
- 3) Metodi ottici, per esempio, l'analisi microscopica del polline per individuare l'origine geografica del miele.
- 4) Metodi NMR per l'identificazione dell'origine geografica di succhi, prodotti fermentati e olii (Tzouros et al., 2001).
- 5) Metodi riguardanti l'analisi della struttura e della "texture" per identificare pasta di diversa origine geografica (Arvanitoyannis et al, 1992).

Fig.1.2.1 Ruolo del territorio nella generazione della tipicità



Il vino è il prodotto per il quale sono attualmente disponibili metodologie già ampiamente sperimentate per l'importanza che riveste nell'economia dei paesi produttori e per il numero di studiosi che si occupano specificatamente delle problematiche connesse con la sua produzione, riconoscimento e valorizzazione. Nella tabella 1 sono riportati alcuni metodi strumentali proposti e sono riportate le analisi multivariate utilizzate più idonee per individuare l'origine geografica (Arvanitoyannis I.S. et al, 1992).

Tab. 1.2.1 Metodi di analisi statistica per la classificazione dei vini rispetto all'origine geografica.

proprietà / caratteristica	Analisi	Bibliografia
<i>a) Elementi</i>		
K, Na, Ca, Mg, Rb, Li	PCA, CDA	Etievant P. et al. 1988 (a); 1988 (b)
Li, Rb	LDA, KNN, SIMCA	Latorre J.M. et al., 1994
Ba, St, Rb, Li (DH)	ANOVA, CDA	Day M. et al., 1995
Na, K, Rb, Cs, Cr, Fe, Co, Zn, Ag	CLA	Siegmund H. et al, 1977 (a); 1977 (b)
Mn, Li	MLRA, KNN, SIMCA	Gonzales-Larriaira M. et al., 1987
B, P	PCA, CDA	Baldi M. et al, 1984
Li, Rb	PCA, CDA	Medina B. et al, 1984
isotopi piombo	DA	Arhurst P.R. et al, 1996
Lantanidi	PCA, CDA	McCurdy E. et al., 1992
<i>b) Volatili</i>		
volatili totali	PCA	Medina B. et al, 1984
alcoli, acidi, esteri, terpeni	PCA, CLA, SIMCA, KNN	Garcia-Jares et al., 1995 (a); 1995 (b)
volatili totali	CLA, DA	Forcen M. et al., 1992
acido decanoico	PCA	Medina B. et al, 1984
<i>c) Fenoli</i>		
procianidina B2	PCA	Medina B. et al, 1984
antocianine, glucosidi,	PCA, DA	Gomez-Cordoves C. et al., 1995
agliconi flavo noli		
Fenoli totali	LDA	Palma M. et al., 1995
Fenoli totali	PCA, CDA	Siversten H.K. et al., 1999
<i>d) Aminoacidi</i>		
prolina, azoto totale	CLA, DA	Forcen M. et al., 1992
prolina, idrossiprolina, etanolamina,	PCA, CDA	Etievant P. et al. 1988 (b)
azoto totale		

Nonostante la ricchezza varietale del patrimonio campano, il limitato studio di identificazione e caratterizzazione varietale della realtà viticola locale, peraltro risalente alle descrizioni ampelografiche ottocentesche, ha portato fino ad oggi al riconoscimento ufficiale di poche varietà. Pertanto risulta assolutamente necessario l'applicazione di tecniche di nuova generazione per la identificazione, la valorizzazione e la conoscenza dei vitigni autoctoni e dei relativi vini della regione Campania.

In questo contesto questo lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la caratterizzazione di due vini autoctoni campani, Pallagrello Bianco e Pallagrello Nero, ottenuti dagli omonimi vitigni allevati nell'area casertana della IGT Terre del Volturno.

Infatti, nonostante il successo commerciale che questi vini hanno già ottenuto, mancano studi di caratterizzazione molecolare che possono contribuire alla valorizzazione e alla difesa della loro genuinità attraverso la conoscenza delle peculiarità compositive da cui scaturisce, tra l'altro, la qualità sensoriale.

A tal fine, nel Capitolo I è stata determinata la composizione fenolica, sia dell'uve che dei relativi vini Pallagrello Bianco e Nero attraverso l'uso dell'analisi LC/MS.

Nel Capitolo II è stata, invece, valutata la composizione aromatica delle uve e dei vini in esame attraverso l'applicazione della tecnica SPME accoppiata alla gas-cromatografia e alla rivelazione per mezzo della spettrometria di massa. Inoltre, in questa fase è stata anche valutato l'effetto di una fase importante della tecnologia di produzione dei vini bianchi, quale il processo di chiarifica, sul profilo aromatico del vino. A tale scopo sono stati confrontati diversi coadiuvanti tecnologici di origine animale (proteica) e minerale (argilla).

## **2 Evoluzione della composizione polifenolica e aromatica dell’uva Pallagrello Nero nella produzione e nell’invecchiamento del vino**

### **2.1 Introduzione**

#### **2.1.1 Il Pallagrello e la provincia di Caserta**

La provincia di Caserta si colloca all’ultimo posto per quanto riguarda la produzione di uva e di vino in Campania, nonostante il suo territorio sia tra i più fertili.

Infatti, la provincia risente dell’influenza del distretto vulcanico Vesuvio-Campi Flegrei-Roccamonfina: sulle colline intorno a Caiazzo, i terreni evidenziano materiale vulcanico misto ad argille, tufi gialli e grigi e nell’area aversana i terreni sono tipicamente alluvionali, sciolti e piuttosto leggeri (Boselli, 2003).

Originario della zona alifana e caiatina, il Pallagrello è un’uva autoctona, noto fin dal settecento con il nome di “pallarella” ovvero *piccola palla*, a causa della sfericità degli acini. Da qui il nome Pallagrello, con cui si designa una delle pochissime ampelovarietà in versione sia bianca che nera.

Un tempo veniva denominata anche Piedimonte, dal luogo di provenienza, annoverata come uva eccellente, presente sulle tavola del Re. Inoltre, faceva parte di una Vigna voluta da Ferdinando IV di Borbone dal nome leggendario Vigna del Ventaglio, a sud est dell’attuale Monte San Leucio.

Che il Re amasse tanto il Pallagrello è dimostrato da una lapide del 1775 nel fondo Monticello di Piedimonte Matese sulla quale fu inciso: "Ferdinando IV di Borbone, per grazia di Dio re delle Due Sicilie, fa noto a tutte e qualsivoglia persone di qualunque grado e condizione sia, che da oggi, non ardiscano né presumano di passare né ripassare per dentro la masseria di moggia 27 circa vitata..sita nella città di Piedimonte nel luogo detto Monticello tanto di notte quanto di giorno con lume o senza, né a piedi né a cavallo né con carretti o some, sotto pena di ducati 50". Ciò è avvalorato dal Dizionario geografico del 1759 alla voce Piedimonte in cui si legge: "I vini di questa contrada sono eccellenti, così i bianchi, come i rossi, e sono dei migliori del Regno così per la loro qualità, e natura, come per la grata sensazione, che risvegliano nel palato. Vanno sotto il nome di Pallarelli, e sono stimatissimi nei pranzi". Trutta (1776) rintraccia la *Pallagrella* nelle specie di uve riportate nei Saturnali di Macrobio con il nome di Pilleolata."così simile di nome e di fattezze alla nostra Pallagrella, avendo gli acini rotondi e piccioli, come tante palle, e così i bianchi come i neri suoi grappoli...quella che, coltivata ne' nostri poderi, ... e serve a dare quel bel

colore rubino". Anche il poeta Nicolò Giovo, con lo pseudonimo di Eupidio Siriano, nel Brindisi di Eupidio (1729) esalta il Pallagrello della località Monticello: "*Ecco premier già spillo il Pallagrello che da' suoi tralci stilla il Monticello. Ecco n'empio il bicchiere e mentre fuma e brilla, e tremula e zampilla, questo di buon sapore spiritoso licore, a te...volgo la fronte*".

Le epidemie di oidio e fillossera dei primi anni del novecento, assieme alla decadenza sociale e politica delle regioni meridionali ne decretarono una veloce scomparsa ed un sostanziale oblio nonostante le indubbie qualità ampelografiche. Rimaneva essenzialmente come uva da taglio nelle vigne dei contadini delle zone di produzione, sovente confuso con la Coda di Volpe o con cloni di Aglianico rinvenibili nell'area. È dalla metà degli anni '90 che ne è iniziata la valorizzazione, anche a scopo commerciale.

### **2.1.2 Miglioramento della qualità del vino**

La ricerca in viticoltura è indirizzata a migliorare la qualità delle uve attraverso lo studio della loro maturazione in relazione alle tecniche culturali, la selezione dei cloni e delle varietà con migliori potenzialità (selezione clonale) e lo studio dell'influenza ambientale sulla vigna (zonazione).

Nel campo dell'enologia, invece, l'obiettivo principale è ottimizzare i processi industriali, per ottenere prodotti con peculiari caratteristiche. In questo contesto, (i) l'inoculo di lieviti selezionati consente di regolare la fermentazione minimizzando gli effetti di fermentazioni secondarie indesiderate, (ii) l'uso di enzimi selezionati migliora l'estrazione dei componenti dell'uva, (iii) la macerazione delle bucce è condotta in condizioni controllate di temperatura e di atmosfera, (iv) la fermentazione malolattica è impiegata per migliorare le caratteristiche organolettiche e conferire stabilità microbiologica al vino, e, infine, (v) l'affinamento in barrique e in bottiglia rifinisce il prodotto finale.

Per raggiungere l'obiettivo fissato ed essere in grado di valutare la potenzialità della materia prima e come trasferirla al prodotto finale, è indispensabile una buona conoscenza della chimica dell'uva.

Per definire le caratteristiche e l'identità del prodotto, la ricerca in viticoltura tenta di individuare marcatori varietali. Per la caratterizzazione varietale (classificazione chemotassonomica) sono studiati DNA, ampelografia, isoenzimi e metaboliti secondari delle piante (Costacurta et al., 2001).

In particolare, i metaboliti secondari nelle uve sono composti (terpeni e terpenoli, metossipirazine, composti zolfovolatili, benzenoidi, norisoprenoidi, e polifenoli) legati principalmente alla varietà, ma non indispensabili per la sopravvivenza della pianta, anche

se le variabili ambientali e climatiche possono influenzare il loro contenuto nell'uva (Di Stefano, 1996; Flamini et al, 2001).

### 2.1.3 Metaboliti secondari: la teoria della co-evoluzione

Lo sviluppo della biochimica nel corso del XX secolo ha consentito la scoperta e lo studio di molecole “naturali” (aminoacidi, acidi grassi, nucleotidi, etc.) con uno specifico ruolo nella vita e nello sviluppo degli organismi viventi.

Gran parte di queste molecole sono derivano da processi metabolici a volte identici in molti organismi (sia animali che vegetali). Ad essi ci si riferisce con il termine di *metaboliti primari*.

A differenza di questi, esiste un grande numero di molecole di origine microbica o vegetale (come alcaloidi, terpeni, fenoli, micotossine, etc.), presenti sporadicamente in natura e che, dunque, costituiscono delle importanti informazioni di carattere tassonomico.

Sembrano non svolgere una funzione esplicita e diretta nell'attività di crescita dell'organismo; per questo motivo sono definiti *metaboliti secondari* (Bullock, 1965; Bate-Smith, 1984; Gottlieb, 1990).

Il confine tra le due aree metaboliche è spesso labile oltre che transitorio (nuove scoperte intervengono spesso a modificare le nostre conoscenze). L'evoluzione dei metaboliti secondari ha, come premessa fondamentale, la capacità della pianta, in risposta alle condizioni ambientali ed ecologiche, di evolvere uno stratagemma di biosintesi e differenziazione chimica in grado di far fronte meglio alla pressione ambientale.

Un aspetto particolare di questo concetto è rappresentato dalla teoria co-evolutiva di piante ed animali, che può essere così sintetizzato: la pressione selettiva esercitata dagli erbivori determina la biosintesi di prodotti secondari tossici o repellenti per gli erbivori stessi (Janzen, 1969) e buona parte della finalità della sintesi di composti (quali terpeni, alcaloidi e fenoli) è da ricercare nella funzione di agente protettivo impiegato dalla pianta nella sua lotta per la sopravvivenza (Harborne, 1977).

Inoltre, l'evoluzione non deve essere vista solo in termini di difesa, ma anche attrattivi. Infatti, i flavonoidi hanno un ruolo di primaria importanza nella pigmentazione dei fiori per attrarre impollinatori ed indurre la fecondazione per perpetuare la specie. (Winkel, 2001).

In una prospettiva evolutiva, si può notare come la pianta, anche da un punto di economia delle risorse energetiche, sfrutti una ampia ma unica classe di metaboliti secondari per differenti azioni (difesa, protezione e attrazione).

## 2.1.4 I composti fenolici

I polifenoli, prodotti del metabolismo secondario delle piante, costituiscono una famiglia di circa 500 molecole organiche largamente presenti nel regno vegetale.

Dal punto di vista chimico, sono molecole composte da più cicli fenolici condensati.

Nell'uva, possiamo classificare i composti polifenolici in due grandi gruppi: i polifenoli non-flavonoidi (acido benzoico, acido cinnamico e gli stilbeni) e i flavonoidi (antociani, flavanoli e flavonoli) (Fig. 1.6.1 e 1.6.2).

Fig. 1.6.1 Distribuzione dei polifenoli nei diversi compartimenti dell'acino

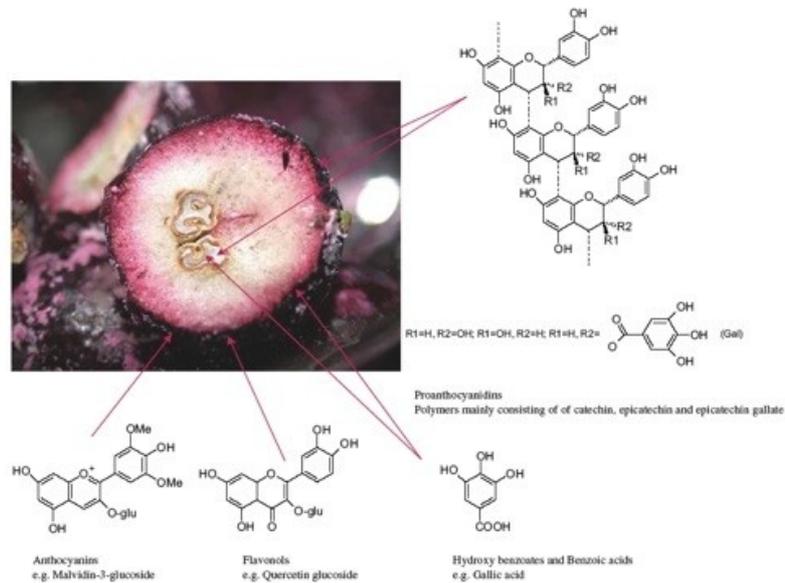
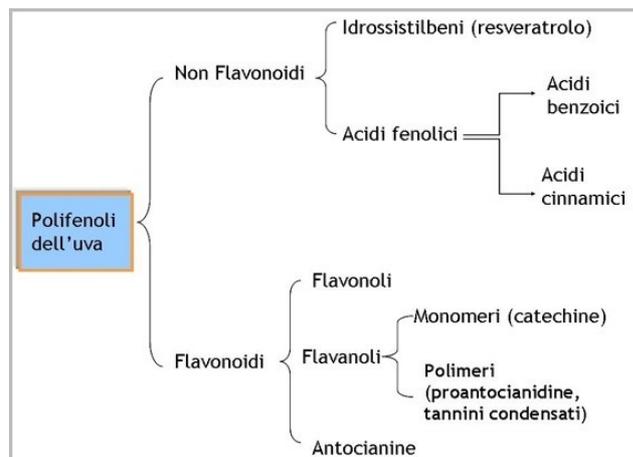


Fig. 1.6.2 Classificazione schematica dei componenti fenolici



La grande varietà strutturale delle molecole ha, tuttavia, una biosintesi comune (Fig. 1.6.3), che parte dallo scikimato; ha origine di gran parte dei fenoli delle piante, in particolare

attraverso la sua trasformazione in fenilalanina, realizzata dall'enzima chiave fenilalanina-ammoniaca liasi (PAL) (Fig. 1.6.4).

Fig. 1.6.3. Via dell'acido scikimico

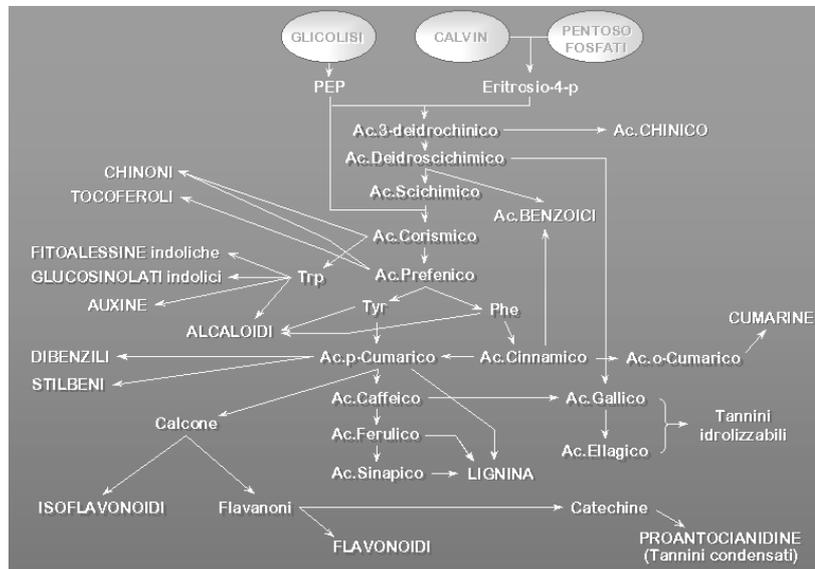
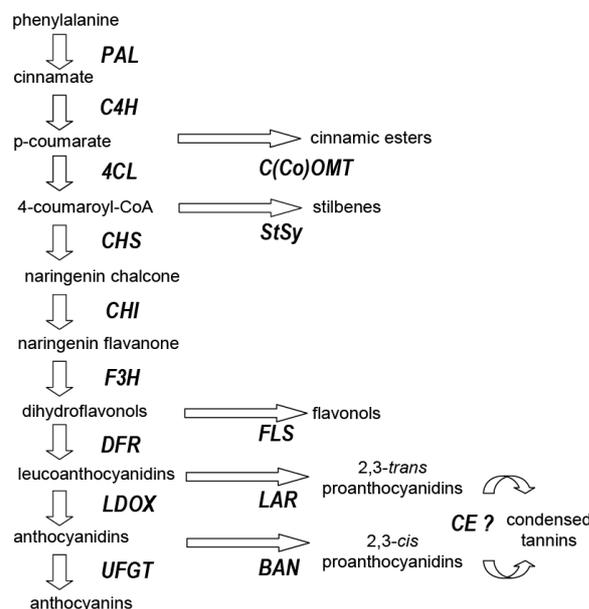


Fig.1.6.4. Schema della principale via biosintetica dei flavonoidi nell'uva, con gli enzimi chiave PAL (fenilalanina-ammoniaca liasi), CHS (calcone sintasi), StSy (stilbene sintasi).



Durante la vinificazione, i polifenoli, estratti dalle differenti parti dell'acino, subiscono sensibili variazioni strutturali, in quanto substrati di reazioni di polimerizzazione, di ossidazione, di condensazione e di idrolisi. Diversi sono i lavori finalizzati a definire la struttura di alcune classi di composti fenolici, a caratterizzarli e ad individuare le loro evoluzioni nel corso della vinificazione e dell'elaborazione del vino in relazione alle

reazioni cui essi vanno incontro (Bosso A. et al. 1999; Bosso A. et al. 2001; Escribano-Bailon G. et al., 1992).

### 2.1.4.1 Acidi fenolici

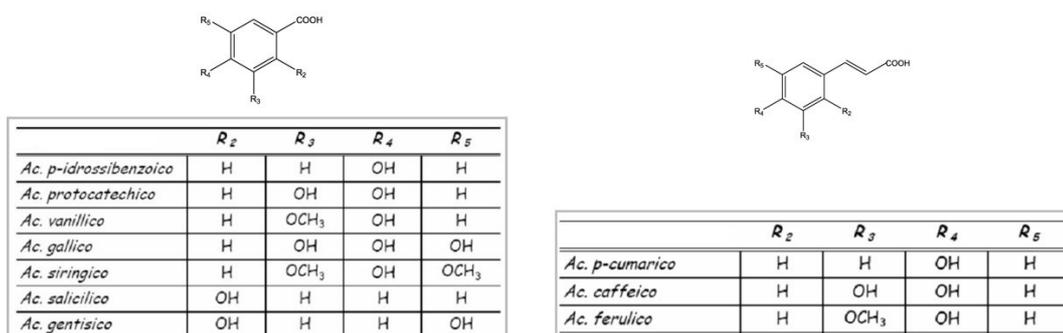
Le uve e i vini contengono acidi fenolici di tipo benzoico e cinnamico, la cui concentrazione varia da 100 a 200 mg/l nei vini rossi e da 10 a 20 mg/l nei vini bianchi. Le bucce sono più ricche da 2 a 100 volte della polpa, nelle prime vanno da 50 a 200 mg/kg, nella seconda da 20 a 170 mg/kg.

Sono noti sette acidi del tipo benzoico (C6-C1) (Fig. 1.6.1.1) che differiscono per il grado e la natura dei sostituenti nell'anello benzenico; si trovano nell'uva soprattutto sotto forma di eterosidi e di esteri (tannini gallici), legati alla parete delle cellule dei fasci fibrovascolari e delle buccia.

Gli acidi cinnamici (C6-C3) (acido caffeico, p-cumarico, ferulico) si trovano sotto forma esterificata essenzialmente con l'acido tartarico (come l'acido caftarico) o come eterosidi di glucosio e sono gli unici polifenoli presenti nella polpa.

Sul piano sensoriale, questi composti non presentano né un sapore né un odore particolare, sono soggetti all'ossidazione (imbrunimento) e, per azione di certi microrganismi, possono dare origine a fenoli volatili, come ad esempio il 4-etil-fenolo (soprattutto nei vini rossi) dal caratteristico odore di animale, e il 4-etil-guaiacolo. Nel caso di vini conservati in fusti nuovi di rovere, la tostatura del legno porta alla degradazione delle lignine e alla formazione di diversi fenoli volatili, che presentano differenti odori di fumè, grillè, brulé (Riberau-Gayon et al. 1998).

Fig.1.6.1.1 Gli acidi fenolici delle uve e dei vini



### 2.1.4.2 Antociani

Sono i pigmenti colorati della buccia delle uve rosse ed il loro contenuto varia da 500 a 3000 mg/Kg di bacche. Sono localizzati principalmente nei vacuoli delle cellule della

buccia, eccezionalmente nella polpa, ma sono anche presenti nelle foglie, in quantità tanto più importante quanto più la vite è alla fine del ciclo vegetativo.

Nelle uve e nei vini, si distinguono cinque molecole fondamentali (malvidina, cianidina, peonidina, petunidina, peonodina e delphinidina); comunemente indicate come antocianidine, esse sono presenti in forma eterosidica chiamate antocianine ed in queste forme sono molto più stabili che sotto forma di agliconi (antocianidine). Nelle uve della *Vitis vinifera* e nei vini corrispondenti sono state identificate solo le antocianidine monoglucosilate e i loro derivati acilati con l'acido p-cumarico, caffeico, e acetico (antociani acilati) (Fig 1.6.2.1).

Il colore di questi pigmenti è funzione della loro strutture e della composizione del mezzo (pH, SO<sub>2</sub>). Infatti, la molecola si compone di due anelli benzenici (A e B, come mostrato in fig 1.6.2.1) uniti per mezzo di un eterociclo ossigenato insaturo e dotato di carica positiva, lo ione flavilio. La sostituzione sull'anello B di gruppi -OH provoca causa uno spostamento della lunghezza d'onda del massimo assorbimento che si orienta verso il colore malva (shift batocromico) (fig 1.6.2.2), dall'altra la glucosilazione e l'acilazione spostano il colore in senso inverso, cioè verso l'arancio.

Gli antociani si trovano soprattutto nel succo vacuolare nelle cellule della buccia, insieme ad altri polifenoli (acidi fenolici, flavonoidi) che ne possono influenzare il colore attraverso il fenomeno della copigmentazione con spostamento verso il blu (Mazza et al. 1999, Vian et al. 2006).

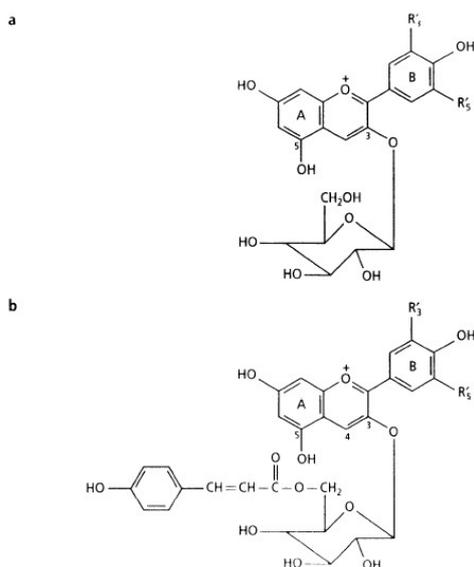


Fig. 1.6.2.1 Struttura: a) degli antociani-3-monoglucosidi; b) degli antociani-3-monoglucosidi acilati dall'acido p-cumarico sulla posizione 5 del glucosio (Riberau-Gayon et al. 1998)

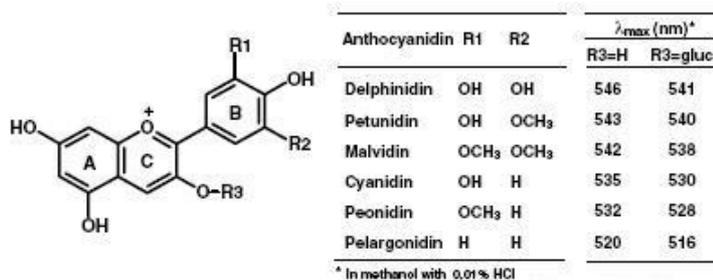


Fig1.6.2.2 Struttura delle principali antocianine e le rispettive  $\lambda$  massime di assorbimento nel visibile

### 2.1.4.3 Flavanoli

I flavan-3-oli (Fig. 1.6.3.1) sono presenti in tutte le parti solide dell'uva (bucce, semi, raspo) e passano nel vino durante la fase di macerazione. Il loro tenore nel vino dipende dalle condizioni di vinificazione ed è compreso fra 1 e 4 g/l (Gagnè et al. 2006). Sono sostanze in grado di originare combinazioni stabili con le proteine e con altri polimeri vegetali, quali ad esempio, i polisaccaridi. La loro ossidabilità e le loro proprietà sensoriali giocano un ruolo importante nel corso dell'affinamento dei vini rossi e dei vini bianchi in fusti di quercia. L'esistenza di molecole aventi le più diverse strutture e dimensioni nei vari tipi di uve e di vini spiega le differenti proprietà, in particolare sensoriali, di questi composti.

I flavan-3-oli e le loro forme condensate (procianidine, Fig. 1.6.3.2) sono responsabili dell'amaro e dell'astringenza, ma hanno anche potenti proprietà antiossidanti (Pannala et al., 2001) e altre attività biologiche benefiche (Bomser et al., 1999). Studi condotti sugli animali e sull'uomo suggeriscono che catechina, epicatechina, epicatechina gallato ed epigallocatechina gallato possono essere potenti anticarcinogenici ed agenti anti-aterogenici (Ahmad et al., 1999).

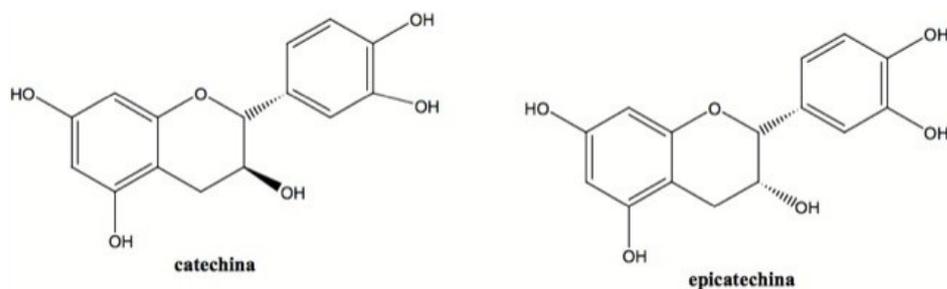


Fig.1.6.3.1 Struttura dei flavan-3-oli, precursori delle procianidine e dei tannini

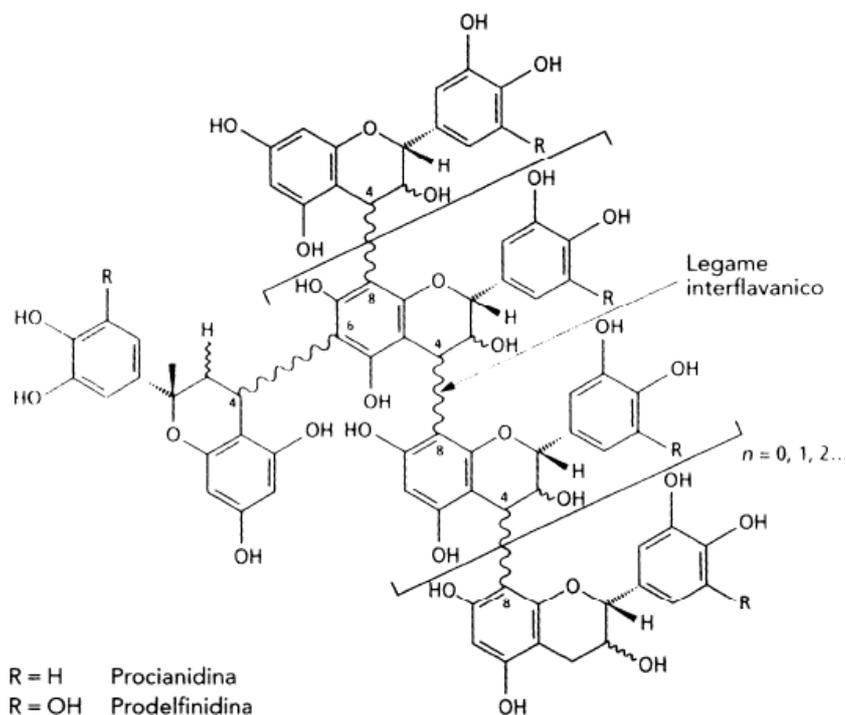


Fig.1.6.3.2 Struttura delle proantocianidine condensate (Riberau-Gayon et al. 1998)

#### 2.1.4.4 Flavonoli

Sono pigmenti gialli, con una struttura caratterizzata da due anelli benzenici, legati da un eterociclo ossigenato, derivato dal 2-fenil nucleo cromone (flavoni e flavonoli) o il 2-fenil cromanone (flavanoni e flavanonoli). Nell'uva sono stati identificati otto flavonoli monoglucosidi e tre flavonoli diglucosidi; essi derivano dal campferolo, quercetolo, miricetolo e isoramnetolo (Fig. 1.6.4.1). I flavonoli varia fra i 10 e i 100 mg/Kg di bacche, si trovano nelle bucce e sono caratterizzati da colore giallo. I flavanonoli sono, invece, caratteristici delle bucce dei vitigni bianchi (Castillo-Munoz et al. 2007, Makris et al.2006).

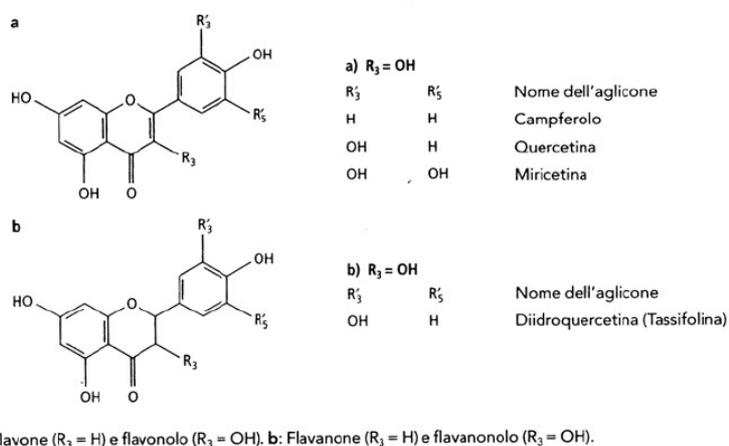


Fig.1.6.4.1 I flavonoli (Riberau-Gayon et al. 1998)

### 2.1.5 Il ruolo dei polifenoli nella classificazione varietale

I polifenoli sono importanti anche dal punto di vista tassonomico. (Calò et al., 1994; Cravero et al., 1990). Le loro quantità assolute risentono spesso di fattori stagionali e microclimatici, ma altre differenze e taluni rapporti sembrano correlabili alle specificità varietali e quindi al complesso patrimonio enzimatico.

Fra i composti fenolici presenti nell'acino d'uva, gli antociani sono stati quelli più utilizzati per scopi tassonomici (Eder et al., 1994; Scienza et al., 1989; Shiraichi e Watanabe, 1991; Asselin e Ballester, 1992; Baldi et al., 1993; Calò et al., 1993; Hmamouchi et al., 1995). Le differenze nei profili varietali degli antociani, infatti, sono tanto evidenti da consentire la suddivisione di tutte le varietà conosciute in classi di affinità. Risultano caratteristici:

- la presenza – assenza di antociani acilati;
- il rapporto antociani acetati–antociani cinnamati;
- la prevalenza di antociani disostituiti o trisostituiti sull'anello laterale (anello B);
- i rapporti fra i cinque antociani non acilati.

Per quanto riguarda, gli altri composti fenolici della buccia, Downey et al., 2003 hanno riportato il modello di accumulazione dei flavonoli nell'arco di tre stagioni; in conclusione, esso si mantiene pressochè costante all'interno di ciascuna varietà, mentre il rapporto quercetina/miricetina si è rivelata utile per discriminare vini Cabernet dai vini Merlot (Von Baer et al., 2005).

I rapporti tra monomeri ed oligomeri dei flavanoli (-)-epicatechina, (+)-catechina e quelli tra isomeri degli acidi idrossicinnamiltartarici (AICT) nelle bucce e/o nei semi (Calò et al., 1993) consentono di stabilire in modo accettabile alcune parentele e diversità tra le cultivar e tra cloni.

Le varietà a frutto colorato, infatti, si possono solo dividere in due gruppi, utilizzando i rapporti acido caffeil tartarico/acido p-cumaril tartarico (CTA/pCuTA) e quercetina/miricetina che, nella maggior parte delle varietà questo rapporto è minore di uno. La composizione in tannini della buccia è stata poco sfruttata finora per scopi tassonomici, anche se dai pochi lavori pubblicati, appare caratteristico il rapporto procianidine/prodelphinidine o epicatechina/epigallocatechina. (Escribano-Bailón et al., 1995; Souquet et al., 1996, 2000).

### **2.1.6 Evoluzione dei composti polifenolici durante la vinificazione**

Il processo di vinificazione determina cambiamenti qualitativi e quantitativi dei componenti fenolici. L'estrazione dei composti fenolici dalle parti solide dell'uva è minima nella vinificazione in bianco ed importante nella produzione del vino rosso per il processo di macerazione.

Le quantità di pigmenti e altri fenoli possono variare notevolmente in relazione alla varietà dell'uva, alla regione e alle pratiche culturali.

Il livello di composti fenolici mantenuto durante il processo di vinificazione determina il tipo di vino ed ha influenza sulla qualità del vino (Burns et al., 2001; Somers e Pocock, 1986).

La pressatura è la prima operazione della vinificazione che contribuisce ad incrementare il livello di polifenoli nel vino a causa del contatto del succo con le parti solide dell'uva che inevitabilmente si verifica in questa fase; infatti, la pressatura aumenta la superficie delle parti solide in contatto con il succo. Nei vini rossi, essa facilita la macerazione delle parti solide durante la fermentazione con l'aumento delle sostanze fenoliche. Tuttavia, l'eccessiva pressatura con la conseguente lacerazione delle parti solide (in particolare vinaccioli e raspi) può aumentare l'estrazione dei polifenoli astringenti nel succo con scadimento della qualità sensoriale del vino. A tal fine, le uve rosse sono di solito diraspate prima della pressatura per impedire che i raspi finiscano nel recipiente di fermentazione (Macheix et al., 1991).

Nel caso dell'uva bianca non viene effettuata la diraspatura e la pressatura viene fatta in maniera soffice con l'ausilio di una pneumo pressa, per ridurre lo schiacciamento dei raspi, che cedono pochi fenoli al mosto. Inoltre, lo schiacciamento dei semi e delle parti solide del frutto devono essere evitati in quanto livelli elevati di composti fenolici possono profondamente influenzare la qualità dei vini bianchi. I polifenoli, infatti, sono i principali responsabili dell'amaro e dell'astringenza nei vini bianchi ed inoltre, possono agire come substrati nei processi di ossidazione (Hartnell, 1987; Robichaud e Noble, 1990).

Il lungo contatto con le bucce, la polpa ed i semi, durante la fermentazione, causa una maggiore estrazione di fenoli a causa dell'etanolo prodotto. Vini con livelli più elevati di composti fenolici sono più astringenti e richiedono pertanto maturazione più lunga di quelli con minore contenuto fenolico (Somers e Pocock, 1986). Durante la fase iniziale della fermentazione, i composti fenolici diffondono costantemente dalle bucce al mosto (Bourzeix, 1971). Così, 4-5 giorni di macerazione sono sufficienti a produrre un vino colorato e con un basso tenore di tannino, di pronta beva come i vini Bordeaux. Tuttavia, nel caso dei vini da invecchiamento, le bucce devono stare più a lungo a contatto con il

mosto durante il processo di fermentazione per aumentare il livello di tannini (Ribereau-Gayon e Glorie, 1987).

Il processo di fermentazione determina cambiamenti qualitativi e quantitativi nella composizione fenolica dei vini.

Durante la fermentazione, i derivati tartarici degli acidi idrossicinnamici sono idrolizzati ad acidi idrossicinnamici, che poi possono essere ossidati (Cilliers e Singleton, 1989), convertiti in fenoli volatili ad opera degli enzimi decarbossilasi del lievito (Chatonnet et al., 1993; Dugelay et al., 1993), o adsorbiti dalle scorze di lievito (Schreier, 1979; Somers et al., 1987). Circa 27,6% degli idrossicinnammati si perdono nel processo di vinificazione (Beasts-Saura et al., 1996).

Durante il processo di fermentazione, il livello di antociani diminuisce a causa della polimerizzazione tannino-antocianine, (Macheix et al., 1990).

### **2.1.7 Evoluzione dei composti polifenolici durante la conservazione**

Dopo la fermentazione, di solito il vino è maturato prima in botti o serbatoi in presenza d'aria. Questo processo di affinamento, dal vino svinato all'imbottigliamento dipende dal vino. Il vino è quindi imbottigliato ed è protetto dall'aria. Nel corso di un anno di conservazione in botti, il vino può assorbire fino a 40 mg di ossigeno/L e tutto lascia pensare che l'ossigeno può anche penetrare nel vino conservato in bottiglie tappate (Ribereau-Gayon, 1974; Ribereau-Gayon et al., 1983).

La presenza di ossigeno induce la trasformazione chimica dei composti fenolici e influisce sulle qualità organolettiche del vino.

Questi cambiamenti dipendono da altre condizioni all'intorno tra cui pH, temperatura, contenuto di etanolo e concentrazione bisolfito, oltre che dall'ossigeno e dalla natura e composizione dei composti fenolici.

Durante l'invecchiamento in botte, il livello quantitativo dei composti fenolici del vino subisce cambiamenti per l'estrazione dei tannini del legno.

L'acido gallico, il cui livello è inizialmente basso nel vino (1,8 mg/L), aumenta di 4,0 mg/L dopo 12 settimane di affinamento in botti di rovere americano. D'altra parte, il contenuto degli acidi protocatechico, vanillico, caffeico, siringico e p-cumarico rimane relativamente costante. L'aumento di acido gallico può essere attribuita in alcuni casi all'idrolisi delle catechina e epicatechine gallate (Singleton e Essau, 1969).

La quantità dei composti fenolici dal legno, dipende dalla tecnologia di produzione delle botti come dal tipo di quercia, dalle dimensioni e dall'uso di barrique nuove o di secondo

passaggio (Rous e Alderson, 1983; Singleton, 1974). I fenoli estratti dal legno comprendono lignine, tannini idrolizzabili, acido gallico, acido ellagico, acidi carbossilici e aldeidi aromatiche. Nei vini Riesling trattati con trucioli di quercia, gli ellagitannini e l'acido ellagico costituiscono il 10% dei fenoli totale (Quinn e Singleton, 1985).

Durante l'affinamento del vino rosso, il contenuto di antociani diminuisce progressivamente e in modo irreversibile a seguito della formazione di pigmenti polimerici. Il colore di questi pigmenti è meno sensibile alle variazioni di pH (tra 2,2 e 5,5) e sono abbastanza resistenti alla decolorazione con biossido di zolfo (ad una concentrazione di fino a 200 mg/L).

La formazione di questi pigmenti è stata valutata in "sistemi modello" con vino sintetico. I risultati di questi studi ottenuti hanno permesso la proposizione di diversi meccanismi per la formazione di pigmenti polimerici.

Secondo Mistry et al. (1991) e Figueiredo et al. (1996), i pigmenti sono prodotti della copigmentazione intramolecolare tra molecole di antociani.

Altri ricercatori (Liao et al., 1992; Santos-Buelga et al., 1996; Somers, 1971) hanno suggerito, invece, che la formazione di questi pigmenti è il risultato della condensazione diretta tra antociani e flavanoli.

Un altro meccanismo plausibile è che le reazioni tra antociani e flavanoli siano mediate da acetaldeide (Bakker et al., 1993; Dallas et al., 1996; Escribano-Bailon et al., 2001, Francia-Aricha et al., 1997). L'acetaldeide è un precursore dell'etanolo, ma si può anche formare durante l'invecchiamento come risultato dell'ossidazione di quest'ultimo. Quest'ultima reazione comporta l'ossidazione di gruppi orto-difenoli portando alla formazione intermedia di ossido di idrogeno e alla successiva ossidazione di etanolo ad acetaldeide (Wildenradt e Singleton, 1974). Francia-Aricha et al. (1997) hanno segnalato la formazione di tre nuovi pigmenti a partire da malvidina-3-O-glucoside (Mv-3-glu) e procianidina B2 in presenza di acetaldeide. Due di questi pigmenti, di colore rosso-blu, sono identificati come enantiomeri di Mv-3-glu e procianidina B2 legati ai C-8 da ponti etilico. Il terzo è un pigmento di colore rosso-arancio che non contiene ponte etilico, ma la presenza di acetaldeide è necessaria per la sua formazione. Il meccanismo coinvolto nella formazione di questo pigmento rimane sconosciuto.

Infine, all'aumentare della taglia dei copolimeri possono avvenire reazioni di polimerizzazione che portano alla precipitazioni di pigmenti polimerici e la perdita di astringenza (Ribereau-Gayon et al., 1983; Timberlake e Briglia, 1976).

Un altro possibile meccanismo dell'evoluzione dei composti fenolici nella maturazione del vino rosso comporta reazioni di condensazione elettrofila tra proantocianidine oligomeriche

e acetaldeide (Haslam, 1989), nonché tra i flavanoli e acetaldeide (Es-Safi et al., 1999). Dimeri e trimeri di catechina legati da ponte etile sono stati identificati in campioni di vino rosso (Saucier et al., 1997) e si pensa che questi reazioni possono portare alla formazione di polimeri insolubili, determinando una diminuzione in astringenza (Tanaka et al., 1994) e variazioni di colore.

Inoltre, è stata segnalata la formazione di addotti tra antociani e acido piruvico. Questi composti sono stati isolati da vini di Porto (Fulcrand et al., 1998; e Mateus de Freitas, 2001; Mateus et al., 2001; Romero e Bakker, 1999).

### **2.1.8 La spettrometria di massa nello studio dei polifenoli dell'uva e del vino**

La Gascromatografia-Spettrometria di Massa (GC/MS) è stata applicata nel campo dell'aroma delle uve e del vino fin dagli anni Settanta; a causa della bassa volatilità dei polifenoli, tuttavia, non è possibile trovare in letteratura dati significativi sulla loro caratterizzazione, sia nell'uva che nel vino, con l'uso di questa tecnica. Per aumentare la volatilità di questi composti polari, bisogna realizzare la derivatizzazione del campione, ma spesso la struttura dei derivati è risultata di difficile determinazione attraverso la tecnica GC/MS. Inoltre, il loro elevato peso molecolare (MW) supera i range di massa disponibili per i più comuni sistemi GC/MS, rendendo quindi questo approccio inefficace. Inoltre, la derivatizzazione porta ad una frammentazione più difficile da interpretare anche per le procianidine monomeriche più semplici, con uno scheletro C15 (C6-C3-C6). Tra le prime metodologie analitiche applicate nella caratterizzazione strutturale dei polifenoli dell'uva e del vino va annoverata l'idrolisi o la tiolisi seguita dall'identificazione per cromatografia liquida (LC), analisi spettrofotometrica o cromatografia su strato sottile (TLC), (Wulf et al, 1978; Hebrero et al., 1988; Hebrero et al., 1989; Hong et al. 1990b; Lee et al. 1990).

In uno dei primi studi sui polifenoli dell'uva non derivatizzati con la spettrometria di massa, è stato usato il Fast Atom Bombardment (FAB) (De Pauw, 1986; De Pauw et al, 1991) in modalità positiva e negativa per effettuare analisi su campioni estratti da uva con glicerolo. In estratti da uve Niagara, sono stati identificate la catechina-gallata (identificazione di ioni  $[M-H]^-$  a  $m/z$  441, ioni a  $m/z$  151 e 137), dicatechina gallata (ioni  $[M-H]^-$  a  $m/z$  729, corrispondente agli ioni di  $m/z$  577 per la perdita di acido gallico) e gallo catechina-gallata (ioni a  $m/z$  460) (Lee et al, 1990).

Negli anni novanta, lo sviluppo e la disponibilità di sistemi Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) e dei sistemi multipli di Spettrometria di Massa (MS/MS e MSN) (Niessen et al., 1995; de Hoffman, 1996; Abian, 1999) hanno permesso di acquisire

conoscenze sempre più importanti sulle strutture dei polifenoli e di delineare i meccanismi più attendibili coinvolti nella formazione dei copolimeri durante la vinificazione e l'affinamento del vino. Sono stati caratterizzati i tannini (oligomeri e polimeri) in estratti di vinaccioli d'uva con un semplice sistema LC-MS dotato di una Sorgente di Ionizzazione Electrospray (ESI) (Cheynier et al. 1997; Fenn et al., 1990; Gaskell, 1997; Cook et al., 2000), operante in modalità negativa e dotato di analizzatore di massa a quadrupolo. Nel loro studio, gli autori hanno determinato una serie di picchi attribuiti a procianidine non-sostituite da trimeri ad esadecameri e dai loro derivati acilati contenenti uno, due o tre residui di acido gallico (Cheynier et al., 1997).

Le tecniche APCI (Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionization (Wachs et al., 1991) ed ESI (Electrospray-Ionization) sono state, inoltre, utilizzate per studiare una serie di fenoli a basso peso molecolare e polifenoli presenti nel vino, come vanillina, aldeide siringica, acido gallico, acido vanillico, acido caffeico, l'acido ferulico, acido p-cumarico, (+)-catechina, (-)-epicatechina, (-)-epigallocatechina, (-)-epicatechina-3-O-gallata, e epigallocatechin-3-O-gallata (Pérez-Magarino et al. 1999). Lo studio è stata eseguito con diverse valori di tensione al cono (60, 120, 180 e 210 V) in modalità positiva e negativa indicando nella tecnica ESI quella particolarmente efficace per l'analisi di flavan-3-oli in entrambe le modalità.

La cromatografia liquida a fase inversa e la rivelazione alla lunghezza d'onda di 520 nm è la tecnica comunemente impiegata nello studio del profilo antocianico dell'uva. Nei primi studi l'attribuzione dell'identità dei picchi è basata solo sul tempo di ritenzione e la sequenza cromatografica delle diverse componenti. Per ottenere la corretta identificazione, la spettrometria di massa si è rivelata molto utile.

Uno dei primi lavori sugli antociani dell'uva mediante spettrometria di massa è stato eseguito da Bakker e Timberlake (1985). In tale ricerca, 16 estratti da bucce di uva coltivate in Valle del Douro in Portogallo settentrionale ed utilizzate per la produzione del Porto sono stati analizzate mediante FAB-MS ed ha confermato l'identificazione ottenuto con LC.

Fino a pochi anni fa, la tecnica FAB è stata era la più usata per ottenere informazioni strutturali sugli antociani agliconi e glicosilati. Tuttavia, lo svantaggio di questa tecnica è la dissoluzione del campione in una matrice polare. Negli ultimi anni, la tecnica ESI ha dimostrato di essere idonea per l'analisi di composti polari in soluzione acquosa senza derivatizzazione del campione, e il metodo API a pressione relativamente basse (pressione atmosferica e temperatura ambiente) fornisce informazioni sui composti senza alcuna interferenza di segnali dovute a formazione di composti per degradazione termica. Di

conseguenza, diversi studi sugli antociani delle uve e del vino sono stati eseguiti mediante questi approcci.

Asenstorfer et al. hanno studiato i pigmenti oligomerici del vino negli estratti dalle vinacce e nel vino Shiraz invecchiato 4 anni mediante tecnica ESI in modalità positiva e negativa (Asenstorfer et al., 2001). Sono state determinate strutture di antocianidina sostituita al C-4 con un gruppo vinilico legati attraverso gruppo ossidrilico al C-5, vitisina B, MV-3-O-glucoside 4-vinilguaiacolo, MV4-vinilfenolo, anche con gruppo acetile o p-cumarile legato al glucosio, e una serie di strutture con malvidina vinilica monomera legata a catechine dimere e trimere.

Recentemente, Hayasaka e Asenstorfer hanno studiato l'evoluzione dei pigmenti in un vino Shiraz invecchiato tre anni mediante la tecnica ESI-MS/MS e la spettrometria di massa nanoelectrospray (Nano-ESI-MS/MS) (Hayasaka et al., 2002). Le strutture di antocianidina C-4 sostituito con il ponte vinilico proposte in precedenza sono state confermate assieme nuove strutture mai identificate.

## 2.2 SCOPO

La diminuzione complessiva della quantità di vino consumato e la contestuale crescita nel consumo dei vini di pregio in genere e dei vini DOC in particolare, hanno orientato la produzione verso i vini di qualità, preferibilmente se qualificati con un marchio, che ne attesti la provenienza, la tipicità e la base varietale. Ciò deriva dalla profonda modifica che ha subito dalla seconda metà degli anni ottanta in poi il prodotto vino nel ruolo delle abitudini alimentari, trasformandosi da alimento di base a bene voluttuario dell'alimentazione.

Un'analisi attenta sui gusti e sulle motivazioni del consumo nel mercato dei vini di pregio lascia intendere, inoltre, un'evoluzione del gusto a favore dei vini tipici. Il consumatore, infatti, è destinato ad intensificare il suo rapporto con il vino, introducendo nuovi riferimenti, come i vitigni autoctoni, la loro storia, la cultura e la bellezza dei luoghi di origine. Tale evoluzione di mercato apre importanti prospettive per le aree, come la Campania, che possono vantare un primato in ambito comunitario per la grande vocazionalità delle aree geografiche, per la storia delle proprie produzioni e per la ricchezza del patrimonio ampelografico, in grado di assicurare originalità ai vini prodotti.

I crescenti consensi che le produzioni enologiche campane riscuotono sui mercati più qualificati hanno avviato la viticoltura campana ad una stagione di rilancio. La qualità dei prodotti, la spiccata tipicità dei vini, derivanti dall'ambiente vocato e una base varietale estremamente originale sono gli elementi che rappresentano il presupposto della rinascita della vitivinicoltura campana.

Accanto a questo però la difesa dei vini DOC e DOCG dall'uso di cultivar e processi produttivi non previsti dai relativi disciplinari di produzione è basata solo sulla verifica di parametri analitici (acidità totale, grado alcolico) non discriminanti la *cv* impiegata.

Questo problema è emerso nel recente "scandalo" del Brunello di Montalcino, causato non dall'uso di coadiuvanti enologici nocivi per la salute umana, ma dall'aggiunta di uve di *cv* diverse da quella Sangiovese prevista nel processo di produzione del suddetto vino DOCG. A tal fine possono essere usati, quali marcatori varietali, i metaboliti secondari della cultivar come i polifenoli.

Negli anni novanta, lo sviluppo di sistemi LC/MS e di sistemi multipli (MS/MS e MSN) [Niessen et al.,1995; de Hoffman et al.,1996; Abian et al., 1999] sono risultate le metodologie analitico-strumentali più risolutive negli studi strutturali di tali molecole finalizzati all'individuazione di marker varietali e di processo per la definizione della qualità del vino [Mazzucca et al.,2005; Pati et al., 2006; Remy-Tanneau et al., 2003; Canto et al., 2002; Garcia-Beneytez et al., 2003]

In questo contesto il presente progetto di tesi di dottorato è finalizzato alla caratterizzazione di due vini autoctoni campani, Pallagrello Bianco e Pallagrello Nero. Di seguito vengono riportati i risultati relativi alla caratterizzazione polifenolica dell'uva e le modificazioni di tale profilo dall'uva al vino in relazione a diversi tempi di maturazione e modalità dell'affinamento (acciaio, legno, bottiglia).

## 2.3 MATERIALI E METODI

### 2.3.1 Campionamento

Le uve della varietà Pallagrello Bianco e Nero ed i relativi vini, prelevati a vari stadi della fermentazione e dell'affinamento, sono stati prodotti nell'azienda Agricola Poderi Foglia sita in Conca della Campania (CE) presso la quale sono stati realizzati anche i relativi processi di produzione.

Sono stati analizzati:

- campioni di uve mature prelevati in maniera random lungo i filari;
- campioni di mosto e vino prelevati nel corso della vinificazione: 8 campioni di vino Pallagrello Bianco prelevati a vari stadi della fermentazione (1g, 4 g, 7 g, 10 g) e dell'affinamento (1g, 70 g, 74 g, 6 mesi) così come i 4 campioni di vino Pallagrello Nero prelevati a 2 e 8 mesi di stoccaggio in acciaio, a ulteriori 17 mesi in barrique e a 24 mesi in bottiglia sono stati prodotti nell'azienda Agricola Poderi Foglia sita in Conca della Campania (Ce).

I campioni sono stati sottoposti ad analisi chimico-fisiche e di spettrometria di massa (LC/ESI/MS) come di seguito descritte.

#### 2.3.1.1 Protocollo di Vinificazione in Bianco

Brevemente, come riportato nello schema di produzione fig 2.3.1.1, la vinificazione è avvenuta *in riduzione*, con la presenza di gas inerti sia nella pressa che nel serbatoio di fermentazione. L'illimpidimento del mosto è stato realizzato con l'uso di enzimi pectolitici e con la decantazione statica ad una T compresa tra 10-12°C. L'inoculo è stato realizzato con lieviti secchi attivi selezionati; la fermentazione è stata condotta a T=20°. L'affinamento è continuato, dopo il travaso, in acciaio dove è avvenuta anche la fermentazione malolattica.

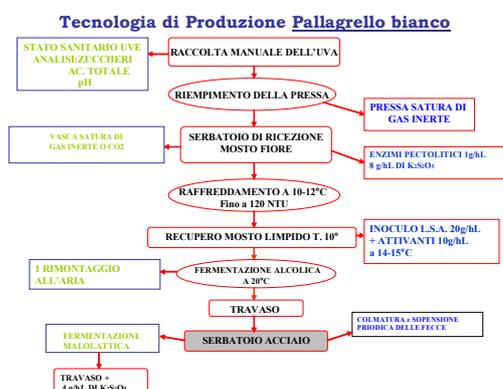


Fig.2.3.1.1 Schema della tecnologia di produzione del vino Pallagrello Bianco

### 2.3.1.2 Protocollo di Vinificazione in Rosso

In breve, come riportato in fig. 2.3.1.2 le uve, raccolte a maturazione tecnologica, sono state pigiodirasbate e il mosto ottenuto è stato posto in vasca di acciaio, dove sono stati aggiunti lieviti selezionati, enzimi pectolitici e biossido di zolfo. La fermentazione alcolica e la macerazione sono state eseguite a 35° per 24-36 ore e 28-30° per 6 giorni. Dopo la fermentazione malolattica, l'affinamento del vino in un contenitore di acciaio è continuata per 8 mesi. Successivamente, il vino è stato posto in barrique ed affinato per ulteriori 12 mesi ed infine imbottigliato e affinato per 12 mesi.

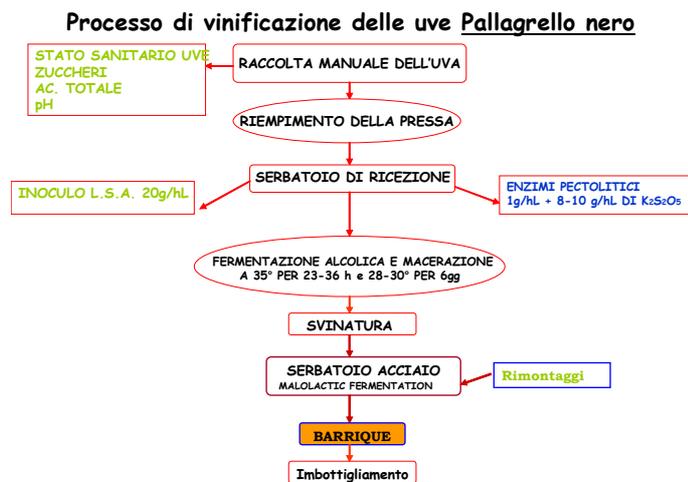


Fig2.3.2.1. Schema della tecnologia di produzione del vino Pallagrello Nero

## 2.3.2 Analisi chimico-fisiche

### 2.3.2.1 Determinazione degli zuccheri

- Determinazione rifrattometrica

E' stato utilizzato un rifrattometro manuale DIGITIS (CETI Optical Instrument). Dopo aver tarato lo strumento con acqua distillata, è stata effettuata la lettura del contenuto zuccherino di alcune gocce di mosto. Il residuo rifrattometrico (o ottico) è espresso in gradi Brix: 1°Brix = 1% sostanza zuccherina ~10g/L.

- Determinazione degli zuccheri riduttori nel mosto-vino

Tale metodo consiste in una titolazione a caldo del reattivo di Feeling (solfato di rame e tartrato sodico di potassio) con il mosto-vino previamente decolorato/diluito fino all'ottenimento del viraggio di colore dal blu al rosso mattone; aggiungere due gocce di bleu di metilene ed aspettare 2 minuti circa, dopodiché continuare ad aggiungere il mosto-vino fino ad ottenere di nuovo una colorazione rosso mattone acceso. I risultati ottenuti sono la media di 3 determinazioni.

### **2.3.2.2 Determinazione del pH**

Per la determinazione del pH è stato utilizzato un pHmetro Crison modello 2001. I risultati ottenuti sono la media di 3 determinazioni. (Regolamento CEE n.2676/90 della Commissione del 17 settembre 1990, Gazzetta ufficiale n. L 272 del 03/10/1990).

### **2.3.2.3 Determinazione dell'acidità totale**

Determinazione del quantitativo di acidi presenti nel mosto e nel vino espressi in g/L di acido tartarico.

L'acidità titolabile è stata effettuata per via potenziometrica (pH 7,00) seguendo la procedura riportata nel Reg. CEE n. 2676/90 (metodi di analisi comunitari da utilizzare nel settore vino).

I risultati ottenuti sono espressi come media di 3 determinazioni.

### **2.3.2.4 Determinazione del grado alcolico (metodo ebulliometrico)**

Tale metodo comporta l'assimilazione del vino ad una miscela idroalcolica di cui viene valutato il punto di ebollizione, sempre inferiore a quello dell'acqua (0° alcool). Per tale determinazione è stato utilizzato l'ebullimetro di Mulligand costituito da una caldaia troncoconica con refrigerante per i vapori di alcool, un sistema di riscaldamento a termosifone con camino ad anello ed un termometro fornito di una scala graduata per le gradazioni alcoliche corrispondenti alle rispettive temperature di ebollizione. I risultati ottenuti sono espressi come media di 3 determinazioni

### **2.3.2.5 Determinazione dei polifenoli totali**

L'insieme dei composti fenolici del vino viene ossidato dal reattivo di Folin-Ciocalteu. Tale reattivo è costituito da una miscela di acido fosfotungstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) e di acido fosfomolibdico ( $H_3PmO_{12}O_{40}$ ) che si riduce, con l'ossidazione dei fenoli, a una miscela di ossidi blu di tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) e di molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La colorazione blu prodotta ha un assorbimento massimo intorno a 765 nm, proporzionale al tenore in composti fenolici.

A 1 ml dei campioni opportunamente diluiti (i mosti vanno diluiti con acqua distillata nel rapporto 1:10), sono stati aggiunti 5 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu (Fluka 47641) e 10 ml di soluzione di  $Na_2CO_3$  al 20% (ottenuta impiegando  $Na_2CO_3$  anidro) e portati a volume di 100 ml con acqua distillata in un matraccio tarato. Dopo 30 minuti di incubazione è stata effettuata la lettura spettrofotometrica a 765 nm (Uvikon 930-Kontron Instrument). Il valore ottenuto, tenendo conto delle diluizioni effettuate, ha fornito i mg/L di polifenoli totali, espressi in acido gallico.

### **2.3.2.6 Determinazione degli antociani totali**

(metodo Ribéreau-Gayon, Stonestreet 1965)

Il metodo si basa sulla proprietà degli antociani di decolorarsi in presenza di eccesso di SO<sub>2</sub>. La differenza di assorbenza, letta allo spettrofotometro ( $\lambda$  520 nm), tra il campione tal quale e quello decolorato, riferita ad una curva di calibrazione preparata a partire da una miscela di antociani di *Vitis Vinifera* fornisce la concentrazione in antociani.

Sono stati preparati 2 campioni contenenti ciascuno 5 ml di una soluzione preparata con 1 ml di mosto-vino, 1 ml di alcol etilico al 95% acidificato con lo 0,1%v/v di HCl e 20 ml di HCl al 2%v/v. di questi, ad un campione sono stati aggiunti 2 ml di metabisolfito di potassio al 15%, mentre l'altro è stato diluito con 2 ml di H<sub>2</sub>O. Dopo 30 minuti è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro (Uvikon 930-Kontron Instrument) a 520 nm di entrambi i campioni e calcolata la differenza di densità ottica. Il valore, tenendo conto delle diluizioni effettuate, ha fornito i mg/L di antociani totali.

### **2.3.2.7 Determinazione dei tannini totali**

E' stato utilizzato il metodo di Bate-Smith che si basa sulla proprietà dei 3,4-flavandioli monomeri e condensati di ossidarsi in mezzo acido ed alcolico ad alta temperatura (100°C) per formare delle proantocianidine colorate. La differenza di assorbenza, letta allo spettrofotometro ( $\lambda$  550 nm), tra il campione tal quale e quello ossidato, riferita ad una curva di calibrazione preparata a partire da un leucocianidolo (massa molecolare = 684 Da), fornisce la concentrazione dei tannini. Tale metodo permette di valutare i flavandioli impegnati nelle catene dei polimeri, ma per contro non tutti i monomeri sono considerati con questo dosaggio.

A 2 ml di campioni previamente diluiti (i mosti-vini vanno diluiti con acqua distillata in rapporto 1:50) sono stati aggiunti 6 ml di una miscela di reagenti costituita da 100 ml di HCl 12N, 100 ml di n-butanolo e 30 mg di solfato di ferro. Di questi, 4ml sono stati riscaldati a bagnomaria a 100°C ed i restanti 4 ml lasciati al buio a T° ambiente. Dopo 30 minuti è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro (Uvikon 930-Kontron Instrument) a 550 nm di entrambi i campioni e calcolata la differenza di densità ottica. Il valore ottenuto, tenendo conto delle diluizioni effettuate, ha fornito i g/L di tannini totali.

### 2.3.2.8 Analisi spettrofotometriche

Metodo Glories, 1984

Lo spettro di un vino rosso presenta un massimo a 520 nm (colore rosso) e un minimo a 420 nm (colore giallo). Attualmente, però viene utilizzata anche la lettura a 620 nm per tenere conto del colore blu dei vini giovani; tali misure vengono effettuate sul vino diluito (1:50) e sul percorso ottico di 1 mm.

A partire da queste misure si calcolano diversi parametri, tra cui:

- Intensità colorante

Rappresenta una misura dell'intensità del colore e che varia largamente secondo i vini e la varietà di origine. È espressa dalla somma delle assorbanze a 420, 520 e 620.

$$[IC = ABS_{420} + ABS_{520} + ABS_{620}].$$

- Tinta

Corrisponde al livello di evoluzione del colore verso l'arancio. È espresso dal quoziente delle assorbanze a 420 e 520.

$$[T = ABS_{420}/ABS_{520}].$$

- Composizione del colore

Rappresenta il contributo percentuale di ognuna delle tre componenti al colore globale.

$$\% \text{ giallo} = ABS_{420}/IC \times 100$$

$$\% \text{ rosso} = ADS_{520}/IC \times 100$$

$$\% \text{ blu} = ABS_{620}/IC \times 100.$$

- Purezza del colore

Rappresenta la purezza del colore rosso: più è elevato il valore, più il vino possiede un colore rosso dominante.

$$[R = (1 - ABS_{420} + ABS_{620})/2 ABS_{520} \times 100]$$

### 2.3.3 Analisi delle sostanze fenoliche

#### 2.3.3.1 Estrazione dei composti fenolici dal mosto/vino

5 ml di ciascun campione, portati a pH 2 con HCl 0,1N, sono stati estratti ponendo 2 volte con 5 ml di dietilere e la frazione organica è stata portata a secco sotto flusso di azoto. Il residuo, disciolto in 1 ml di H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1 v/v) e filtrato su filtri millipore 0,45 µm, rappresentava il campione per l'analisi LC/MS (M.A. Rodriguez-Delgado et al., 2001).

#### 2.3.3.2 Estrazione dei fenoli dalle bucce

Gli acini d'uva sono stati accuratamente sbucciati e le bucce lavate per allontanare eventuali residui di polpa. I campioni sono congelati a -20°C.

5 g di bucce, asciugate con carta filtro, sono stati estratti per 3 volte con 20 ml di dietiletere. La frazione organica è stata portata a secco sotto flusso di azoto. Il residuo, disciolto in 5 ml di H<sub>2</sub>O/MeOH (1:1 v/v) e filtrato su filtri millipore 0,45 µm, rappresentava il campione per l'analisi LC/MS.

### 2.3.3.3 Analisi LC/MS dell'estratto

L'analisi di Spettrometria di Massa accoppiata alla cromatografia liquida è stata realizzata con un sistema cromatografico HP1100 MSD (Agilent, Palo Alto, CA) dotato di detector UV e interfacciato con uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo dotato di una sorgente ESI (Electrospray Ionization), controllato da un software HP Chem Station, per l'acquisizione, l'analisi e la trasformazione degli spettri di massa.

20 µl di campione sono stati iniettati in una colonna Novo-Pak C18 (150 mm × 3,9) ad un flusso di 0,4 ml/min. L'eluente A era costituito da H<sub>2</sub>O e acido formico 0,1%, mentre l'eluente B costituito da H<sub>2</sub>O/acetonitrile (20:80) e acido formico 0,1%.

Tempo	% B
0	5
2	5
25	45
30	47
35	80

L'analisi di Spettrometria di Massa accoppiata alla cromatografia liquida è stata realizzata con un sistema cromatografico HP1100 MSD (Agilent, Palo Alto, CA) dotato di detector UV e interfacciato con uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo dotato di una sorgente ESI (Electrospray Ionization), controllato da un software HP Chem Station, per l'acquisizione, l'analisi e la trasformazione degli spettri di massa.

20 µl di campione sono stati iniettati in una colonna Novo-Pak C18 (150 mm×3,9) ad un flusso di 0,4 ml/min. L'eluente A era costituito da H<sub>2</sub>O e acido formico 0,1%, mentre l'eluente B costituito da H<sub>2</sub>O /acetonitrile (20:80) e acido formico 0,1%.

### 2.3.3.4 Estrazione della frazione antocianica dalle bucce

Gli acini d'uva sono stati accuratamente sbucciati e le bucce lavate per allontanare eventuali residui di polpa. I campioni sono congelati a -20°C.

5 g di bucce, asciugate con carta da filtro, sono state macerate in 50 ml di metanolo ed acido cloridrico (0,5% HCl, v/v) sotto costante agitazione per 5 h. Successivamente l'estratto è stato filtrato su lana vetro e solfato di sodio anidro per allontanare, rispettivamente, impurezze e H<sub>2</sub>O e conservato a -20°C (Mazzuca et al., 2005). Su tale

estratto è stato, inoltre, effettuato la determinazione degli antociani totali (metodo Ribéreau-Gayon, Stonestreet 1965) e la determinazione dei fenoli totali (con Folin-Ciocalteu).

I campioni di mosto/vino sono stati analizzati previa diluizione 1:1 con H<sub>2</sub>O e acido formico 0,1%.

### 2.3.3.5 Analisi LC/MS

L'analisi di Spettrometria di Massa accoppiata alla cromatografia liquida è stata realizzata con un sistema cromatografico HP1100 MSD (Agilent, Palo Alto, CA) dotato di detector UV e interfacciato con uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo dotato di una sorgente ESI (Electrospray Ionization), controllato da un software HP Chem Station, per l'acquisizione, l'analisi e la trasformazione degli spettri di massa.

L'eluente A era costituito da H<sub>2</sub>O e acido formico 0,1%, mentre l'eluente B era costituito da acetonitrile e acido formico 0,1%.

L'analisi cromatografia è stata condotta utilizzando una colonna Novo-Pak C18 (150 mm×3,9) ad un flusso di 0,4 ml/min e applicando un gradiente di eluizione come riportato in tabella (Hebrero et al., 1988).

Tempo	% B
0	10
2	10
12	15
22	20
39,5	30
42	30

Il campione eluito dalla colonna, rilevato alla lunghezza d'onda di 520 nm, veniva inviato allo spettrometro di massa. L'acquisizione dello spettro di massa veniva effettuata in modalità positiva in un range di 250-1500 uma con un tempo di una scansione al minuto. La sorgente dello spettrometro di massa era fissata a 350°C, il voltaggio applicato al capillare era di 3,2 KV e la pressione all'uscita del cono era di 35 psi.

### 2.3.3.6 Estrazione dei tannini dai vinaccioli

I vinaccioli sono stati lavati per allontanare eventuali residui di polpa e asciugati con carta da filtro, prima di essere congelati a -20°C.

5 g di vinaccioli, dopo essere stati triturati, sono stati estratti 4 volte con 15 ml di metanolo al 90% e con 0,5mg/ml di acido ascorbico per prevenire le ossidazioni. La frazione organica è stata trattata con esano per allontanare i grassi e portata a secco sottovuoto

(M.A. Escribano-Bailòn et al., 1992). Sull'estratto è stata effettuata la determinazione dei fenoli totali con il reattivo Folin-Ciocalteu e dei tannini totali con metodo Bate-Smith. L'estratto, sciolto in 10 ml di H<sub>2</sub>O mq e acido formico 0,1%, costituiva il campione per la successiva analisi LC/MS.

### 2.3.3.7 Analisi LC/MS

L'analisi di Spettrometria di Massa accoppiata alla cromatografia liquida è stata realizzata con un sistema cromatografico HP1100 MSD (Agilent, Palo Alto, CA) dotato di detector UV e interfacciato con uno spettrometro di massa a singolo quadrupolo dotato di una sorgente ESI (Electrospray Ionization), controllato da un software HP Chem Station, per l'acquisizione, l'analisi e la trasformazione degli spettri di massa.

L'analisi cromatografia è stata condotta utilizzando una colonna Novo-Pak C18 (150 mm×3,9) ad un flusso di 0,4 ml/min e applicando un gradiente di eluizione come riportato in tabella.

Tempo	% B
0	0
2	0
60	100

L'eluente A era costituito da H<sub>2</sub>O e acido formico 0,1%, mentre l'eluente B da acetonitrile/H<sub>2</sub>O (20:80) e acido formico 0,1%.

Il campione eluito dalla colonna, rilevato alla lunghezza d'onda di 280 nm, veniva inviato allo spettrometro di massa. L'acquisizione dello spettro di massa veniva effettuata in modalità negativa in un range di 100-3000 uma con un tempo di una scansione al minuto. La sorgente dello spettrometro di massa era fissata a 350°C, il voltaggio applicato al capillare era di 3,2 KV, il frammento di 215 e la pressione all'uscita del cono era di 35 psi.

### 2.3.4 Indice di caseina

Abbiamo messo a punto un test per la determinazione dell'astringenza dei tannini estratti dai vinaccioli analogo al metodo proposto da Glories e noto con il nome di Indice di Gelatina. Tale metodo, infatti, rappresenta la percentuale di tannini che reagiscono con le proteine (rappresentate della gelatina) dando un'indicazione sull'astringenza. Nel metodo da noi proposto sono state usate 2 ml di soluzioni acquose al 3% una contenente caseina (CN) intera di vacca ed un'altra contenente la frazione β-CN.

A tali soluzione sono state aggiunte 0,2 mg di tannini estratti da vinaccioli secondo la procedura precedentemente riportata al par 3.3.5 ed è stata valutata la quantità di caseina precipitata.

## 2.4 Risultati

### 2.4.1 Pallagrello Nero

#### Le caratteristiche produttive e fenologiche

Gli studi condotti nell'ambito del progetto P.O.M.B35 (2001) con la partecipazione della Regione Campania, evidenziano che il *Pallagrello nero* presenta tutte le fasi fenologiche anticipate di circa 7 giorni, rispetto all'Aglianico. Infatti, il germogliamento avviene tra la prima e la seconda decade di aprile; la fioritura è a cavallo tra maggio e giugno; l'invasatura cade tra l'inizio e il 20 di agosto, mentre la vendemmia va programmata per la prima decade di ottobre.

La produttività del *Pallagrello nero* è maggiore rispetto a quella dell'Aglianico, vitigno utilizzato nella sperimentazione come varietà di riferimento. Infatti, la produzione unitaria e il peso medio del grappolo del *Pallagrello nero* rispetto all'Aglianico sono stati di 6,14 kg/pianta contro 3,34 kg/pianta per la produzione e di 251,2 g e 171 g per il peso del grappolo.

Anche il vigore vegetativo è maggiore (1,37 kg/pianta contro 1,02 kg/pianta per il legno). I valori della fertilità reale sono risultati superiori per l'Aglianico rispetto al *Pallagrello nero* (1,29 contro 1,02), mentre la fertilità potenziale è stata maggiore per quest'ultimo (1,69 contro 1,62 dell'Aglianico). I due vitigni presentano una percentuale di gemme cieche molto simile (circa il 7% sul totale delle gemme per l'Aglianico e 10% per il *Pallagrello nero*).

Il *Pallagrello nero*, infine, risulta mediamente tollerante a condizioni di siccità e sensibile alle più diffuse fitopatie, in particolare alla botrite; buona è l'affinità d'innesto con i principali portinnesti.

#### Il mosto

Il vitigno ha la capacità di accumulare una elevata quantità di zucchero nei grappoli; infatti, il tenore zuccherino del mosto non è mai inferiore a 22,00°Brix, con punte di 23,60°, valori cui corrisponde una gradazione alcolica potenziale compresa tra 13 e 14 %. L'acidità titolabile dell'uva *Pallagrello nero*, in corrispondenza della piena maturazione, è risultata compresa tra 5,02 e 5,5, valori molto più contenuti rispetto all'Aglianico; il pH è compreso tra 3,4 e 3,6. Anche il corredo polifenolico risulta meno complesso rispetto a quello dell'Aglianico. In particolare, per le uve di *Pallagrello nero* sono stati riscontrati valori di antociani totali, polifenoli totali, flavonoidi totali procianidine e flavani reattivi alla vanillina, inferiori, a quelli riscontrati per le uve di Aglianico. L'uva *Pallagrello Nero* presenta, dunque, un ottimo quadro analitico di base per l'ottenimento di un vino rosso

caratterizzato da buon equilibrio gustativo sin dalla fine della fermentazione alcolica, con un carattere tannico contenuto (Atti del P.O.M. B35, 2001).

#### Il vino

I risultati ottenuti nell'ambito del P.O.M. B35 (2001) sul vino *Pallagrello nero* si è evidenziata una elevata gradazione alcolica, una acidità titolabile molto contenuta, una acidità reale molto bassa e valori di pH>3,5. Tali valori, unitamente alla bassa concentrazione di flavani reattivi alla vanillina, confermano la limitata astringenza del vino.

Il valore della gradazione alcolica è risultata compresa tra un massimo del 14,3% e un minimo del 13%. Per l'acidità totale si sono registrati valori da un minimo di 4,2 g/l ad un massimo di 4,75 g/l. I polifenoli totali determinati nel vino ottenuto dalla vinificazione in purezza di uva *Pallagrello nero* risultano compresi tra 2215 e 2406 mg/L.

Il profilo aromatico è caratterizzato essenzialmente da note di frutti rossi, tabacco, confettura di more, evidenziando punti di contatto con il Merlot e il Primitivo.

In conclusione questi dati inseriscono l'uva *Pallagrello nero* sono in linea tra le cultivar a bacca nera impiegate per la produzione di vini di qualità. L'uva *Pallagrello nero*, inoltre, è perfettamente idonea alla produzione di differenti tipologie di vino: novelli, rosati, rossi impegnativi e rossi da destinare ad affinamento in legno per la produzione di vini atti ad invecchiare” (Atti del P.O.M. B35, 2001).

#### **2.4.1.1 Analisi chimiche - Uva**

Nella tab 1, sono riportate le analisi chimiche routinarie ed il contenuto di fenoli totali, antociani e tannini dal Pallagrello Nero in confronto con quello dell'uva Aglianico. Infatti questa cv ed i relativi prodotti sono tra le poche cultivar campane su cui sono disponibili lavori scientifici (Moio et al.,1999). Inoltre, le uve Aglianico possono essere utilizzate nell'uvaggio assieme a quella Pallagrello Nero come riportato nel Disciplinare di produzione. I risultati mostrano che l'uva Aglianico ha un contenuto superiore sia di antociani che tannini rispetto all'uva Pallagrello nero.

#### **2.4.1.2 Analisi LC/MS - Uva**

##### Antociani

In fig. 1A e 1B i profili HPLC e TIC rispettivamente, mostrano gli antociani estratti dalle bucce e nella tab 2 si riportano le molecole identificate sulla base della loro massa molecolare. I risultati dimostrano che il profilo antocianico dell'uva Pallagrello è costituito

principalmente da delfidina (Df), cianidina (Cn), petunidina (Pt), malvidina (Mv), peonidina (Pn)-3-O monoglucoside e dai loro derivati acilati con acido acetico, caffeoilico e cumarico. In particolare, le antocianine monoglucosilate sono più rappresentate rispetto alle corrispondenti forme acilate. In conclusione, sulla base dei loro valori relativi identificati tutti gli antociani possono essere ordinati come segue: Mv-3-O-Glu + Peo-3-O-Glu > Mv-3-O-CouGlu + Peo-3-O-CouGlu > Mv-3-O-AcGlu + Peo-3-O-AcGlu > Cn-3-O-Glu + Pt-3-O-glu > DF-3-O-Glu > Mv-3-O-caffeoylGlu > PT-3 -O-CouGlu + Cn-3-O-Cou > DF-3-O-CouGlu.

In particolare, è stato osservato che le forme monoglucosilate sono le più abbondanti seguite da quelle di acetilate, poi dalle forme coumarilate, mentre le caffeoilate sono le meno rappresentate. Per quanto riguarda ciascuna classe, le antocianine sono risultate ordinate quantitativamente: Mv > Pt > Pn > Df > Cn. Tale gerarchia è stata osservata sia per le antocianine monoglucosilate che per quelle acetilate, ma non per quelle coumarilate.

Dal confronto di questi risultati con quelli ottenuti da uve Aglianico sono state rilevate alcune differenze consistenti in: nelle uve Aglianico le forme monoglucosilate sono le più abbondanti seguite dalle coumarilate e da quelli acetilate ed infine le forme caffeoilate. Per quanto riguarda la distribuzione quantitativa delle antocianine, nell'Aglianico si rileva una inversione tra peonidina e delfinidina sia per le forme monoglucosilate che per quelle acetilate e una inversione tra peonidina e petunidina coumarilate. La cianidina è presente nell'uva Aglianico solo in forma monoglucosilata, mentre nel Pallagrello Nero sono state identificate anche le forme acilate, ad eccezione della forma caffeoilata. Questi dati, come espressione della genomica della pianta, possono essere considerati come marcatori genetici varietali.

### Flavanoli

Nella fig 3 sono riportati i profili HPLC dei flavonoli ed in tab 4 i componenti identificati mediante l'analisi MS. Essi sono costituiti principalmente da kamferolo-3-glucoside, quercetina-3-glucoside, quercetina-3-arabnoside e tracce dei loro agliconi come mircittina, quercetina e kamferolo.

Nell'estratto in dietiletere dalle bucce non sono state identificate tannini (procianidine/prodelfinidine o epicatechina/epigallocatechina) che possano essere utilizzati per scopi tassonomici come riportato da altri autori (Escribano-Bailón et al., 1995; Souquet et al., 1996, 2000).

### Tannini

In fig 2, è riportato il profilo HPLC dei tannini estratti dai vinaccioli, identificati mediante HPLC/ESI-MS. e in tab 3 sono riportati i componenti, in ordine di eluizione temporale.

Da questi risultati si può concludere che i principali componenti dei vinaccioli sono costituiti da i due flavan-3-oli, catechina ed epicatechina, seguiti dai dimeri B1, B2 e B4 in ordine di eluizione. Infine, in corrispondenza della zona più idrofobica del gradiente compresa tra la parentesi graffa in figura, eluiscono i tannini condensati come trimeri, tetrameri e pentameri ed i loro derivati con acido gallico.

#### Indice di caseina

Come è noto, i tannini hanno la loro proprietà di reagire con le proteine e di formare con esse delle combinazioni stabili. Questa reattività interviene nella sensazione di astringenza che si avverte al momento della degustazione di un vino rosso. Una stima di tale reattività può essere effettuata per mezzo dell'indice di gelatina (Glories, 1974 e 1978a), che mette in evidenza la capacità dei tannini di reagire con le proteine della gelatina. I tannini condensati presenti nei vini precipitano, infatti, con la gelatina in modo riproducibile e omogeneo. A questo scopo in questo lavoro un test con la stessa finalità è stato effettuato utilizzando caseina e  $\beta$ -CN purificata per determinare la qualità astringente dei tannini di Aglianico e Pallagrello sulla base della percentuale di caseina e/o  $\beta$ -CN precipitata. I risultati ottenuti mostrano che la quantità di beta-caseina precipitata dai tannini di Aglianico è superiore a quello precipitato dal Pallagrello nero. Gli stessi risultati, anche se a livelli inferiori, si sono ottenuti con la caseina, indicando la maggiore astringenza dei tannini "Aglianico". Correlando questi risultati alla composizione qualitativa dei tannini di Aglianico e Pallagrello, abbiamo osservato una maggiore eterogeneità nella composizione dei tannini di Aglianico caratterizzata da un maggior grado di polimerizzazione dei flavonoli e un numero maggiore di forme gallate.

#### **2.4.1.3 Analisi chimiche - Vino**

Nella tab 5, sono riportati i risultati relativi alle analisi quantitative realizzate sui vini raccolti in cantina a 2 e 8 mesi di stoccaggio in acciaio, a ulteriori 17 mesi in barrique e a 24 mesi in bottiglia. La diminuzione dell'acidità titolabile può essere spiegata con la precipitazione di sali di bitartrato e i valori di pH molto simile con la produzione di altri acidi ionizzabili dal fenomeno di idrolisi. La diminuzione dei composti fenolici totale può essere correlato a perdita di co-pigmenti tannini-antociani insolubili o a fenomeni di copolimerizzazione.

#### **2.4.1.4 Analisi del colore del vino mediante spettrometria**

La percentuale del colore rosso (D.O. 520) e di blu (D.O. 620) (fig.5; tab 6) varia durante l'invecchiamento del vino in maniera opposta mentre il giallo (D.O. 420) è quasi costante. In particolare, l'aumento della D.O. 620% e la diminuzione della D.O. 520%, dal mosto al

vino invecchiato 8 mesi in acciaio, possono essere collegati con l'aumento del valore del pH (pH = 3,3 vs 3,68 ). Nel vino invecchiato in botte, l'aumento della D.O. 520 nel vino può essere connesso con la produzione di pigmenti derivate antocianine con maggior potere colorante perché stabili alla decolorazione con anidride solforosa. Questo dato è confermato dall'analisi quantitativa dove è stata osservata una diminuzione del contenuto di antociani liberi. Infine, nel vino conservato in bottiglia la diminuzione di colore rosso può essere legato al calo del tenore di O<sub>2</sub>.

#### **2.4.1.5 Analisi LC-MS - Vino**

Nella fig 6 sono riportati i profili TIC dei 4 campioni di vino, raccolti a 2 e 8 mesi in acciaio, il campione invecchiato in botte e quello in bottiglia. Questi risultati mostrano una diversa eterogenità nella composizione in particolare nella seconda parte del cromatogramma dove eluiscono i più componenti idrofobici. I risultati sono riassunti nella tab dove, per una migliore comprensione dei risultati, i composti identificati sono suddivisi in 7 gruppi sulla base della loro nomenclatura chimica: flavon-3-oli, procianidine oligomere, procianidine gallate, antocianine monoglucosidi e le loro forme acetiliche, piranoantociani, pigmenti antociani-flavonoli (AF) legati attraverso ponte vinilico, pigmenti antociani-flavonoli (AF) legati attraverso ponte etilico. I risultati indicano che i due flavan-3-oli monomeri (catechina ed epicatechina) ed i loro dimeri sono presenti ad ogni stadio dell'affinamento del vino, mentre i tannini condensati (trimeri, tetrameri e pentameri) scompaiono durante l'invecchiamento probabilmente per fenomeno di idrolisi e/o polimerizzazione e/o condensazione. Questo risultato è confermato dall'analisi quantitativa in fig 7, dove è stata riportata la diminuzione dei composti fenolici totale.

Gli antociani monoglucosidi e le loro forme acilate, ad eccezione della cianidina acetilica e cumarilica, sono ancora presenti, anche se la loro concentrazione diminuisce durante l'invecchiamento. Anche in questo caso, questi dati sono confermati dall'analisi quantitativa in quanto è stata osservata la diminuzione degli antociani liberi (fig 8). Inoltre, nei vino Pallagrello sono stati identificati alcuni pigmenti condensati come piranoantociani e 5 pigmenti antociani-flavanoli legati attraverso ponte vinilico ed 1 pigmento antociani-flavanoli legati attraverso ponte etilico. I piranoantociani sono pigmenti derivanti dalla reazione degli antociani con metaboliti dei lieviti in particolare con l'acido piruvico (vitisina A) e l'acetaldeide (vitisina B). Nel vino Pallagrello Nero sono stati identificati la Vitisina A e i suoi derivati acetilici e cumarilici e la Vitisina B; il loro livello quantitativo, ad eccezione della cumaril-Vitisina A, aumenta durante l'affinamento del vino. Tutti questi composti, in particolare i piranoantociani, esibiscono una grande resistenza all'anidride

solforosa e contribuiscono in modo significativo far aumentare il colore del vino. Per esempio, la Vitisina A contribuisce circa 11 volte in più al colore a pH 3 e 14 volte di più al colore a pH 2 rispetto agli antociani liberi.

#### **2.4.2 Pallagrello Bianco**

##### Le caratteristiche produttive e fenologiche

Dagli studi condotti nell'ambito del P.O.M. (2001) è risultato che il vitigno Pallagrello Bianco presenta buona vigoria e produttività. I valori della fertilità reale e potenziale sono, in media, pari a 1,42 e 1,64, con punte di 1,62 e 1,72; tali dati sono, comunque, al di sotto di quelli rilevati per la varietà Chardonnay (Atti P.O.M., 2001).

La produzione per ceppo, per piante con 24 gemme, è attestata in 6,77 Kg/pianta, con peso medio grappolo di 233 g e peso medio della bacca di 1,70 g. Il peso del legno di potatura è pari a 1,58 Kg per pianta.

Il germogliamento avviene, di norma, nella seconda decade di aprile; fiorisce tra la terza decade di maggio e la prima di giugno; l'invasitura cade entro la seconda decade di agosto, mentre la piena maturazione delle uve si prevede entro la metà di settembre.

Il *Pallagrello bianco* mostra una buona tolleranza alla siccità ed alla botrite per la buccia piuttosto spessa dell'acino e per una modesta compattezza del grappolo. Mostra, infine, una buona affinità d'innesto con i principali portinnesti utilizzati.

##### Il mosto

I livelli di zucchero e di acidità titolabile sono maggiori nel *Pallagrello bianco*, rispetto allo Chardonnay (23,6 e 21,01 per i °Brix; 5,55 e 4,88 per l'acidità titolabile rispettivamente per il *Pallagrello bianco* e lo Chardonnay). In dettaglio i dati evidenziano che la concentrazione zuccherina dell'uva *Pallagrello bianco*, in corrispondenza della piena maturazione, è risultata compresa tra 23,3 e 24,6 °Brix, valori che determinano una gradazione alcolica potenziale compresa tra 13,50 e 14,50 %. L'acidità titolabile, è risultata compresa tra 5,2 e 5,86 g/L ed il pH tra 3,29 e 3,64 (Atti del P.O.M. B35).

Relativamente al contenuto di polifenoli a livello della buccia e dei vinaccioli, dagli studi effettuati nell'ambito del progetto P.O.M. B35, l'uva *Pallagrello bianco* è risultata caratterizzata da livelli comparabili a quelli di altre varietà autoctone di uve che non hanno problemi di facile ossidabilità dei mosti, come la Falanghina ed il Fiano, e che consentono l'ottenimento di vini bianchi di elevata qualità.

##### Il vino

I vini a base di *Pallagrello bianco* si caratterizzano per l'elevata gradazione alcolica. Infatti, in armonia con i dati del mosto, i vini hanno mostrato un gradazione compresa tra 13,45 e 14,20 %. Contenuta è, come prevedibile dai dati sull'uva, l'acidità titolabile.

E, pertanto, un vitigno che consente la produzione di vini con un buon equilibrio gustativo. Infine, i valori di estratto secco, D.O. a 420 nm e polifenoli totali del *Pallagrello bianco* sono in linea con gli stessi valori relativi a vini bianchi di qualità. Dai dati della ricerca effettuati nel suddetto P.O.M, il vino prodotto dalla vinificazione in purezza di uva *Pallagrello bianco* è caratterizzato da un equilibrio gustativo leggermente sbilanciato verso la componente dolce. Per quanto riguarda i caratteri aromatici esso risulta caratterizzato da note di frutta esotica, albicocca e miele, ben evidenti. Sotto il profilo degli aromi floreali, invece, il vino ottenuto da *Pallagrello bianco* è confrontabile con quello ottenuto da uva Fiano. Quest'ultimo presenta un marcato carattere floreale probabilmente legato ad una significativa presenza di composti terpenici, in particolare linalolo e  $\alpha$ -terpinolo, tuttavia, quest'ultimo sembra assente nel Pallagrello. I descrittori d'aroma maggiormente associati al Fiano sono risultati i seguenti: mela, banana, fiori di tiglio, rosa, menta, nocciola, mandorla e miele (Moio et al., 2002).

#### 2.4.2.1 Analisi chimiche - Uva

	UVA
Zuccheri ( ° Brix)	23,7
Acidità totale (g/l ac. Tartarico)	6,11
pH	3,43
Rapporto zuccheri/acidità totale (z%/a‰)	3,87
Polifenoli tot. (mg/l ac. gallico)	733,3
Tannini (g/l)	2,3
Polifenoli tot. delle bucce (mg/100g di bucce)	50,93
Tannini dei vinaccioli (g/100g di vinaccioli)	5,30

Per un migliore interpretazione dei risultati abbiamo confrontato l'uva Pallagrello Bianco con alcune varietà campane più note quali il Greco ed il Fiano per i quali sono disponibili alcuni lavori scientifici (Moio et al., 2002; Genovese et al., 2007)

I dati riportati in tabella indicano un potenziale grado alcolico superiore a 13% ed un basso valore di acidità titolabile se paragonata ad altre due uve autoctone campane come Greco (9,1 g/L ac. tartarico) e Fiano (8,4 g/L ac. tartarico) (dati personali). L'uva esibisce, inoltre, un buon contenuto in polifenoli totale: 733,3 mg/L, espressi in ac. gallico, rispetto ai 971,2 mg/L del Greco e ai 200 mg/L del Fiano, mentre quello dei tannini è risultato di 3,37 g/L contro 5,13 e 2 g/L rispettivamente nel Greco e nel Fiano.

#### **2.4.2.2 Analisi LC-MS -Uva**

##### Tannini

Nella fig 9 viene riportato il profilo HPLC dei componenti l'estratto metanolico dei tannini dei vinaccioli e nella tab 8 le molecole identificate. Tra queste le più abbondanti sono costituite dai flavanoli monomeri, catechina ed epicatechine, seguiti dalle loro forme condensate oligomere come le procianidine B1, B4 e B2 in ordine di eluizione crescente. Le componenti minori sono costituite dai tannini a più alto grado di condensazione, come trimeri, tetrametri e pentameri, e dalle loro forme esterificate "galloilate".

##### Fenoli

Nella fig 10 è riportato il profilo delle sostanze fenoliche estratte dall'uva con dietiletere e nella annessa tab 9 le molecole identificate mediante spettrometria di massa (MS). Questi risultati indicano che questa frazione è costituita da due categorie di composti fenolici: flavoni ed acidi fenolici. I primi sono costituiti principalmente dalle forme glucosidiche del Kampferolo (il componente più abbondante) e della quercetina, tra cui, la diidroquercetina-3-O-rhamnoside (astilbina), un composto recentemente individuato nei vini rossi e bianchi. Degli acidi fenolici è presente un solo acido benzoico, l'acido gallico ed il suo estere etilico, due esteri etilici degli acidi cinnammici ed un derivato tartarico (acido caftarico). Anche per l'uva Pallgrello Bianco, così come già evidenziato per il Pallagrello Nero, nell'estratto in dietiletere dalle bucce non sono stati identificati i flavanoli.

#### **2.4.2.3 Analisi chimiche - Vino**

Passando dall'uva al vino, l'alcol sviluppato ha raggiunto i 12,2 °A, rispetto ai 14,2 del TAP. L'acidità si è ridotta da 6,11 a 4,8 g/L per effetto della fermentazione malo lattica, come riportato in tab 10.

Il contenuto fenolico del vino è risultato inferiore a quello dell'uva, come era da attendersi per l'assenza di macerazione; dunque, è stato osservato un contenuto pari a 512,8 g/L di ac. gallico e a 0,48 g/L di polifenoli totali e tannini rispettivamente.

#### **2.4.2.4 Analisi LC-MS - Vino**

La determinazione delle componenti fenoliche ha riguardato il vino a 2 e 5 mesi dalla produzione, conservato in acciaio e in barriques. I risultati (tab 11) indicano che la composizione è molto simile a quella dell'uva per quanto riguarda i flavoni. I flavoni, gli acidi fenolici ed i loro prodotti di ossidazione non enzimatica sono tra i composti responsabile del tipico colore giallo dei vini "bianchi"

La composizione degli acidi fenolici è più eterogenea rispetto all'uva per l'aumentato numero di acidi cinnammici, caffeico e di quelli esterificati con l'acido tartarico. Anche le modalità di affinamento (acciaio o barrique) influenza la composizione di questa frazione. Dopo 5 mesi di affinamento il campione conservato in barrique esibisce una composizione più eterogenea in acidi fenolici per la presenza di acido caffeico ed etilgallato rispetto allo stesso campione in acciaio. Allo stesso tempo, i livelli di acido tartarico e di etilcutarico sono inferiori in barrique rispetto all'acciaio probabilmente per fenomeni ossidativi dovuti al passaggio dell'ossigeno attraverso il legno.

## 2.5 Conclusioni

### Pallagrello Nero

La determinazione del “metaboloma” fenolico dell’uva e del vino, espressione del genoma della cv, permette l’individuazione di marcatori molecolari di tipicità dell’uva quali:

- le antocianine sono ordinate quantitativamente  $Mv > Pt > Pn > Df > Cn$  e tale gerarchia è stata confermata anche nel caso delle antocianine acetilate, ma non in quello delle cumarilate. Dal confronto con l’uva Aglianico la composizione qualitativa e quantitativa degli antociani acilati è risultata diversa ed in particolare è stata osservata la seguente gerarchia  $Mv > Pt > Df > Pn > Cn$  sia per le antocianine monoglucosidiche che per quelle acetilate e per quelle cumarilate.
- la composizione dei tannini dei vinaccioli è risultata caratterizzata dai flavanoli monomeri, catechina ed epicatechina, quali componenti principali seguiti dalle loro forme condensate, come le procianidine dimere, nell’ordine  $B2 > B1 > B4$ . Tra i componenti minori sono stati identificati trimeri, tetrametri e pentameri assieme alle loro forme esterificate galloilate. Dal confronto con il profilo dei tannini Aglianico i monomeri, catechina ed epicatechina sono risultati i maggiori componenti sebbene con un inverso rapporto quantitativo. La qualità astringente dei tannini dei vinaccioli è stata valutata dalla quantità di  $\beta$ -caseina insolubilizzata da una quantità nota di estratto tannico dai vinaccioli (Pallagrello Nero) e confrontata con gli stessi risultati ottenuti con i tannini “Aglianico” e  $\beta$ -caseina. I risultati hanno dimostrato la maggiore astringenza dei tannini “Aglianico” rispetto a quelli “Pallagrello Nero”.
- La composizione polifenolica del vino risulta essere strettamente dipendente non solo dalla cultivar, ma anche dalla tecnologia di produzione utilizzata. Il livello degli antociani monoglucosidi e delle loro forme acilate diminuisce durante la conservazione del vino; nello stesso tempo sono state rilevate le loro forme condensate con i flavanoli tra cui la Vitisina A e la Vitisina B.

### Pallagrello Bianco

- le molecole identificate più abbondanti nell’estratto dei vinaccioli di Pallagrello Bianco sono risultate i flavanoli monomeri, catechina ed epicatechina, seguiti dalle forme condensate oligomere, tra cui, le principali, le procianidine dimere nell’ordine  $B4 > B2 > B1$ . Tra i componenti minori sono stati identificati trimeri, tetrametri e pentameri e le relative forme “galloilate”.
- le molecole identificate nell’estratto dalle bucce sono flavoni ed acidi fenolici. I primi sono costituiti principalmente dalle forme glucosidiche del Kampferolo e

della quercetina, tra cui, la diidroquercetina- 3-O-rhamnoside (astilbina). Degli acidi fenolici è presente l'acido gallico ed il suo estere etilico, l'acido caftarico e due esteri etilici degli acidi cinnammici.

- la composizione fenolica del vino Pallagrello Bianco è molto simile a quella dell'uva per quanto riguarda i flavoni. La composizione degli acidi fenolici è più eterogenea rispetto all'uva per l'aumentato numero di acidi cinnammici, caffeico e di quelli esterificati con l'acido tartarico. Anche le modalità di affinamento (acciaio o barrique) influenza la composizione di questa frazione. Dopo 5 mesi di affinamento il campione conservato in barrique esibisce una composizione più eterogenea in acidi fenolici per la presenza di acido caffeico ed etilgallato rispetto allo stesso campione in acciaio. Allo stesso tempo, i livelli di acido caftarico e di etilcutarico sono inferiori in barrique rispetto all'acciaio probabilmente per fenomeni ossidativi dovuti al passaggio dell'ossigeno attraverso il legno.

Solo l'uso di tecniche analitico-strumentali sensibili, come l'analisi LC accoppiata alla spettrometria di massa ha reso possibile l'acquisizione di questi risultati.

## 2.6 Tabelle e figure

	Pallagrello Nero	Aglianico*
Zuccheri Riduttori (%)	19,4	
Acidità titolabile (g/L acido tartarico)	5,1	
pH	3,38	
Polifenoli Totali (mg/L acido gallico)	1004,2	991
Antociani (mg /L malvidina)	57,66	79
Tannini (g/l catechina)	0,31	1,62
Antociani estratti dalle bucce (mg malvidina/100g bucce)	829,06	1751
Tannini estratti dai vinaccioli (g catechina/100g vianaccioli)	5,21	7,2

\*personal data

Tab 1 Composizione chimico-fisica dell'uva Pallagrello Nero in confronto con l'uva Aglianico

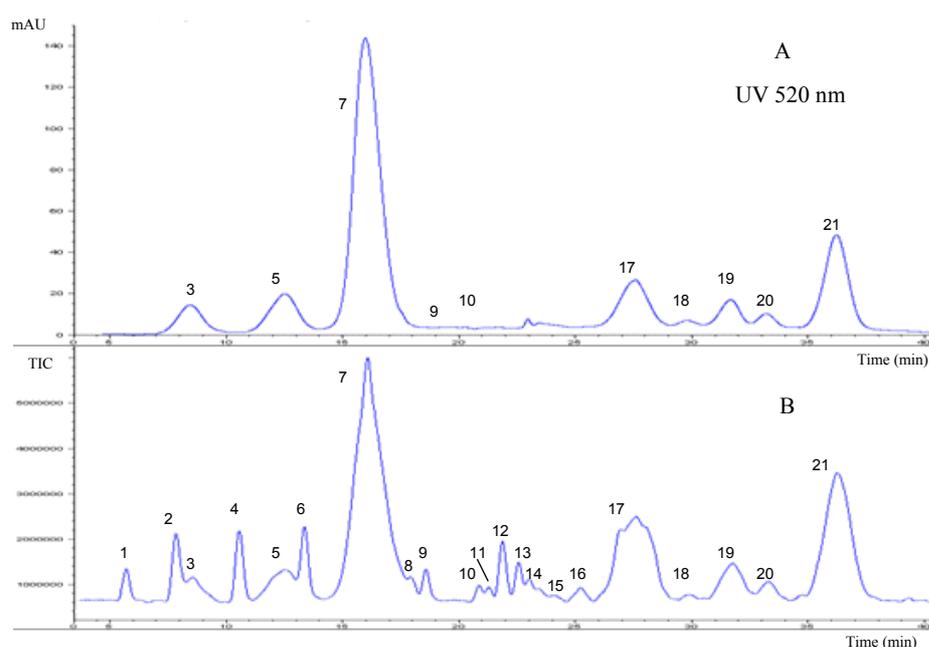


Fig1 - Profilo UV 520 nm (A) e profilo TIC (B) del profilo antocianico dell'estratto metabolico dalle bucce di uva Pallagrello Nero

Peak	Molecola	MW
1	?	
2	?	
3	Df-3-O-glu	465
4	?	
5	Cn-3-O-glu	449
	Pt-3-O-glu	479
6	?	
7	Mv-3-O glu	493
	Pn-3-O-glu	463
8	?	
9	Df-3-O-acglu	507
10	Cn-3-O-acglu	491
	Pt-3-O-acglu	521
11	?	
12	?	
13	?	
14	?	
15	?	
16	?	
17	Pn-3-O-acglu	505
	Mv-3-O-acglu	535
18	Df-3-O-cumglu	507
19	Mv-3-O-caffeilglu	639
20	Pt-3-O-couglu	625
	Cn-3-O-couglu	595
21	Mv-3-O-cumglu	639
	Pn-3-O-cumglu	609

Tab 2 Antociani identificati mediante analisi LC/MS Nell'estratto metanolico dalle bucce di uva Pallagrello Nero

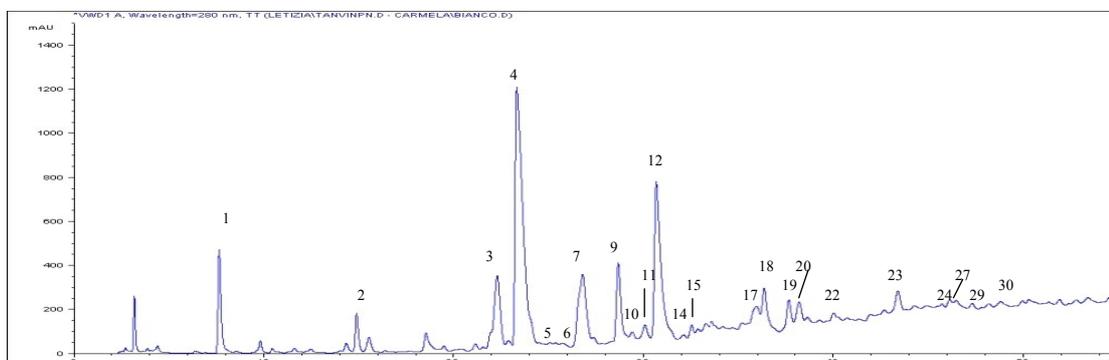


Fig2 - Profilo UV 280 nm delle procianidine monomere e oligomeriche individuate nell'estratto dei vinaccioli di uve Pallagrello nero

Peak	Molecola	MW
1	Acido Gallico	170
2	Galloilglucoside	333
3	B1 dimero	578
4	(+)-Catechina	290
5	Tetra (epi)catechina	1154
6	Di(epi)cat gallata	730
7	B4 dimero	578
9	B2 dimero	578
10	Trimerico (epi)cat	866
11	Pentamero (epi)cat	1442
12	Epicatechina	290
14	Di(epi)cat gallata	730
15	Tetramero (epi)cat	1154
17	Tetramero (epi)cat	1306
18	Trimerico (epi)cat	866
19	Di(epi)cat gallata	730
20	Pentamero (epi)cat	1442
	Tri(epi)cat gallata	1018
22	Pentamero (epi)cat	1442
23	Epicatechina gallata	442
27	Tetra(epi)cat digallata	1306
24	Trimerico (epi)cat	1018
29	Trimerico (epi)cat	1018
30	Tri(epi)cat trigallata	1322
	Tetra(epi)cat gallata	1306

Tab3 Procianidine monomere e oligomeriche individuate nei vinaccioli di uve Pallagrello nero mediante analisi LC/MS.

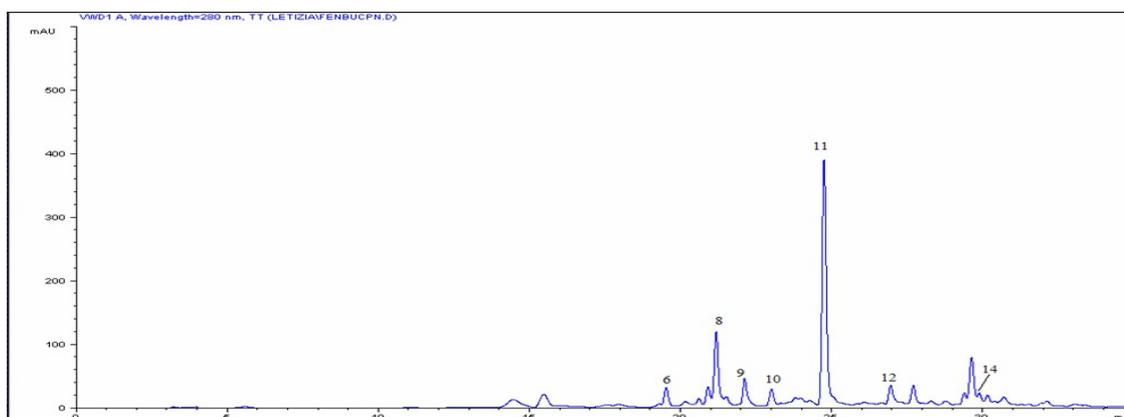


Fig3 - Profilo UV 280 nm delle sostanze fenoliche nell'estratto in dietilere dalle bucce di Pallagrello nero

Peak	Molecola	MW
6	Quercetina glucoside	464
8	Kaempferolo glucoside	448
9	Quercetina arabinoside	434
10	Mircetina	318
11	Composto fenolico	522
12	Quercetina	302
14	Kaempferolo	286

Tab4 Composti fenolici identificati nell'estratto in dietilere da bucce di Pallagrello nero mediante LC/MS

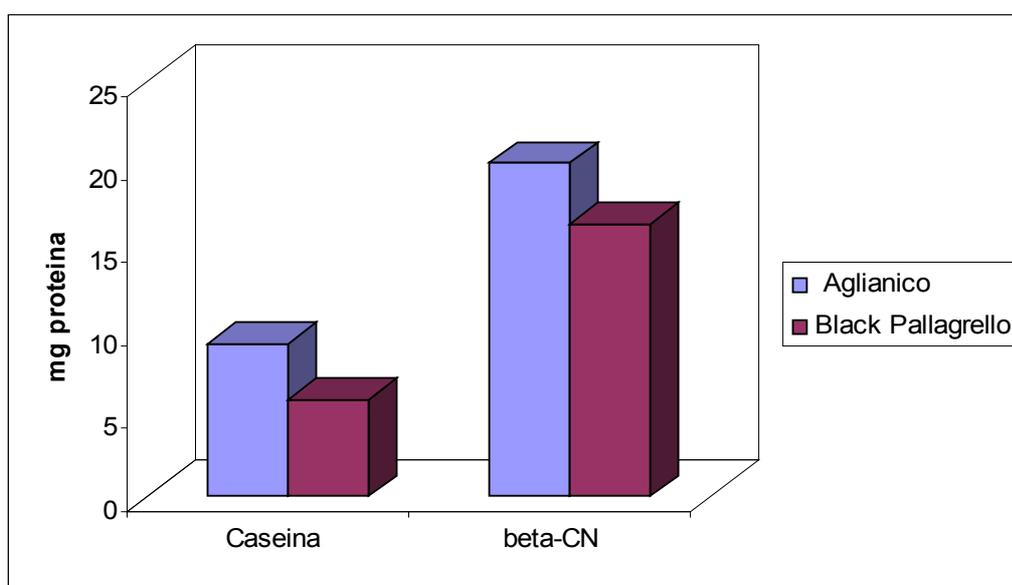


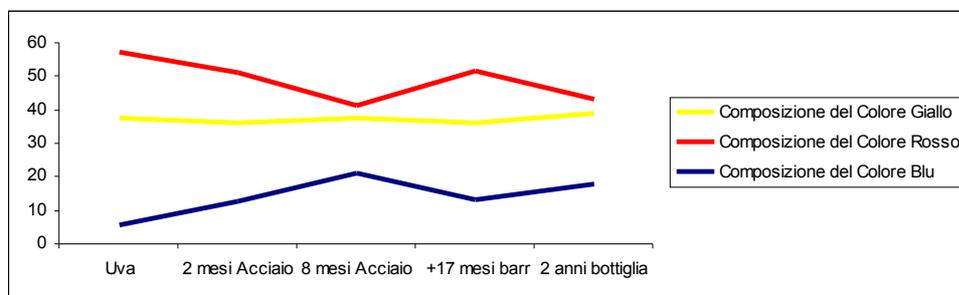
Fig4 Indice di Caseina: mg di Caseina e  $\beta$ -CN precipitate da 0,2 mg di tannini estratti da vinaccioli di Pallagrello Nero e Aglianico

	2 Mesi Acciaio	8 Mesi Acciaio	+17 Mesi Barrique	+2 anni Bottiglia
Alcol (%v/v)	11,5	12	11,5	13
Acidità Titolabile (pH=7 g/l acido tartarico)	5,25	4,65	5,02	5,03
pH	3,68	3,64	3,60	3,64
Fenoli Totali (mg/l acido gallico)	2767,03	2718,5	2695,3	2375,4
Antociani (mg /l malvidina)	298,2	362,1	248,1	167,8
Tannini (g /l catechina)	4,18	3,49	5,64	5,22

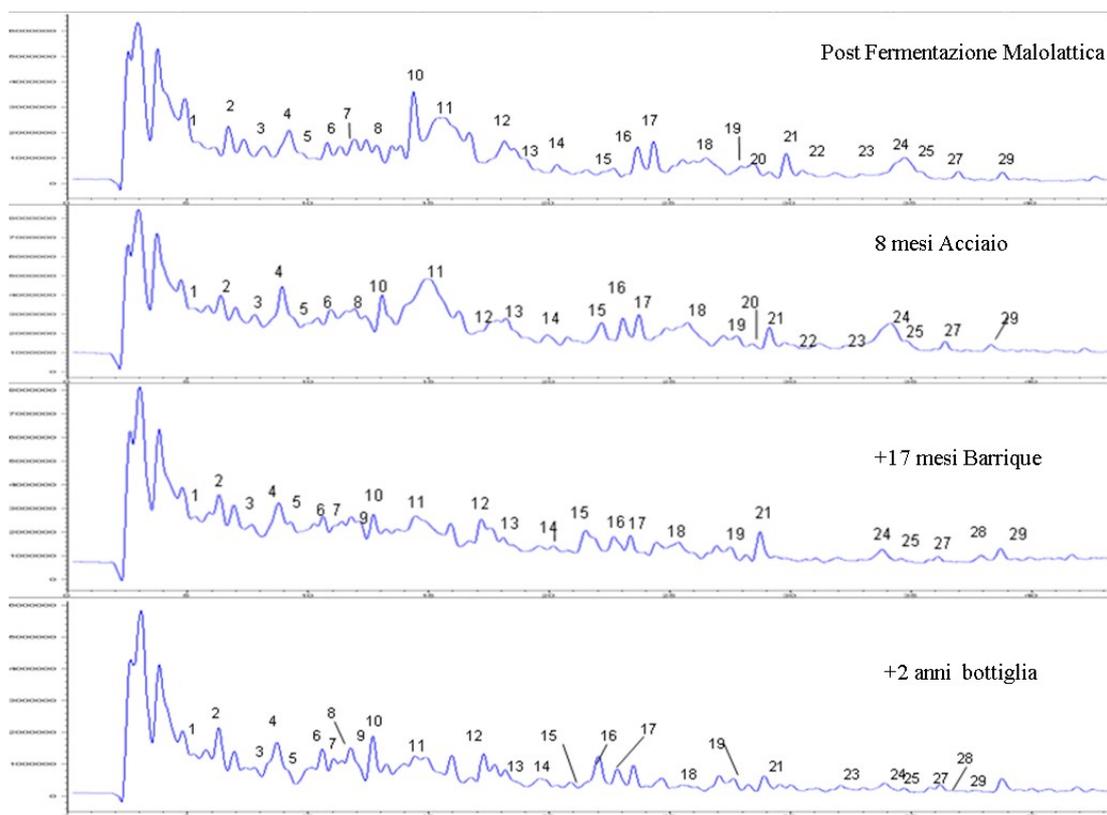
Tab5 Analisi chimico-fisiche dei vini Pallagrello Nero

	Composizione % del Colore			Purezza del rosso
	Giallo	Rosso	Blu	
Uva	37,32	57	5,68	62,28
2 mesi Acciaio	35,87	50,9	12,65	51,78
8 mesi Acciaio	37,67	41,4	20,93	29,23
+17 mesi barrique	35,87	51,76	13,23	53,4
2 anni bottiglia	39,06	43,13	17,81	34,07

*Tab6 Studio colore dell'uva e dei vini Pallagrello Nero mediante analisi spettrofotometrica*



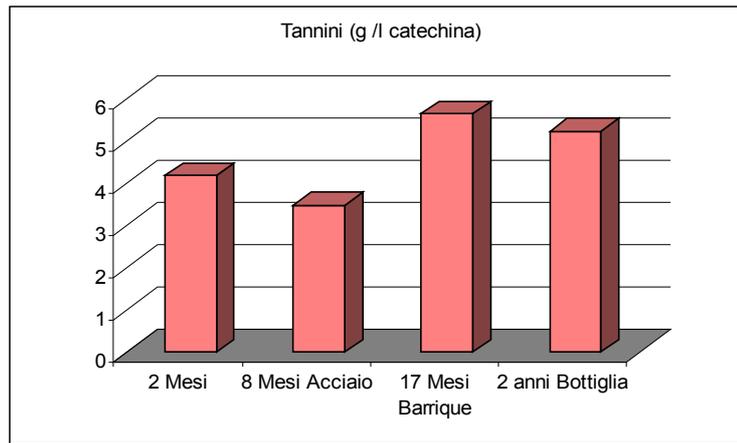
*Fig5 Andamento del contributo percentuale dei colori rosso, giallo e blu al colore totale del vino rosso*



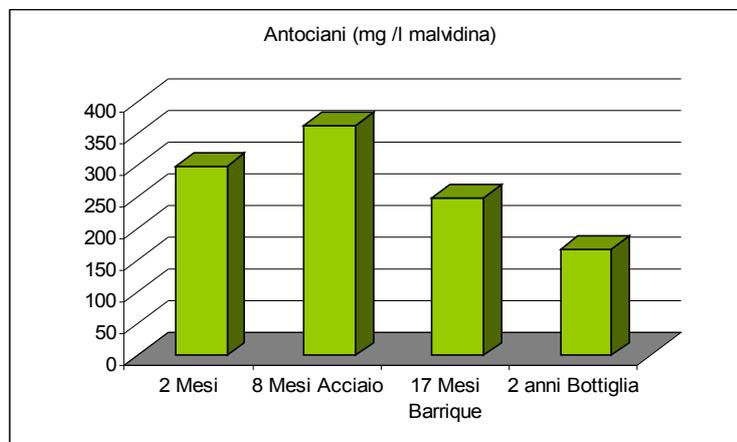
*Fig6 - Profilo TIC dei composti fenolici identificati nei vini Pallagrello Nero*

Peak	Rt	Attribution	m/z	2 mesi Acciai o	8 mesi Acciai o	+17 mesis Barr	2 anni bottigli a
<b>Monomeri</b>							
4	9,6	(+)-catechina	291	+	+	+	+
10	13,7	(-)-epicatechina	291	+	+	+	+
<b>procianidine oligomere</b>							
2	6,8	B1 dimero	579	+	+	+	+
5	9,0	tetramero (epi)cat	1155	+		+	+
5	9,4	pentamero (epi)cat	1443		+		
6	11,2	B2 dimero	579	+	+	+	+
8	13,8	Tetramero (epi)cat	1155	+	+		+
<b>procianidine gallate</b>							
1	6,1	di(epi)cat di-gallata	883	+	+	+	+
5	16,2	di(epi)cat gallata	731	+	+	+	+
5	16,3	tri(epi)cat gallata	1019			+	
8	16,4	tri(epi)cat gallata	1019	+			
8	17,1	di(epi)cat gallata	731	+	+	+	+
<b>Antocianine</b>							
3	16,9	de-3-O-glu	465	+	+	+	+
7	19,1	cy-3-O-glu	449	+	+		+
7	19,6	pt-3-O-glu	479		+	+	+
11	22,2	pe-3-O-glu	463	+	+	+	+
11	22,3	mv-3-O-glu	493	+	+	+	+
13	28,8	df-3-O-acglu	507	+	+	+	+
15	32,3	pt-3-O-acglu	521	+	+	+	+
18	36,4	pe-3-O-acglu	505	+	+	+	+
18	37,0	mv-3-O-acglu	535	+	+	+	+
20	39,9	de-3-O-cumglu	611	+	+		
22	41,3	mv-3-caffeilglu	655	+	+		
23	43,8	pt-3-O-cumglu	625	+	+		+
24	46,7	pe-3-O-cumglu	609	+	+		+
24	47,0	mv-3-O-cumglu	639	+	+	+	+
<b>Piranoantocianine</b>							
12	22,4	mv-3-O-glu piruvato (vit A)	561	+	+	+	+
14	29,2	mv-3-O-acglu piruvato (acvit A)	603	+	+	+	+
19	32,5	mv-3-O-cumglu piruvato (cum vit A)	707	+	+	+	+
16	34,5	mv-3-O-glu acetaldeide (vit B)	517	+	+	+	+
<b>A-F ponte vinile</b>							
18	35,8	mv-3-O-glu-4-vinil-di(epi)cat	1093	+	+	+	+
24	50,3	mv-3-O-glu-4-vinil(epi)cat	805			+	+
25	52,4	mv-3-O-cumglu-4-vinil-di(epi)cat	1239	+	+	+	+
27	52,5	mv-3-O-glu-4-vinil(epi)cat	805	+	+	+	+
28	53,4	mv-3-O-cumglu-4-vinil(epi)cat	951	+	+	+	+
<b>A-F ponte etile</b>							
18	35,6	mv-3-O-glu-8-etil(epi)cat	809	+	+	+	+

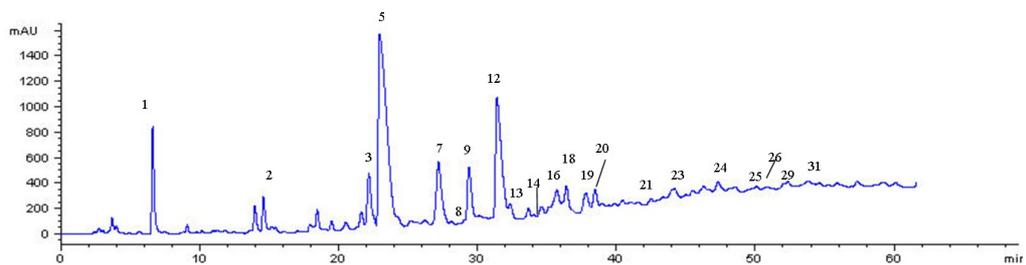
Tab7 Molecole fenoliche identificate nei vini Pallagrello Nero mediante analisi LC/MS



*Fig7 – Andamento quantitativo della frazione tannica durante il processo di vinificazione e conservazione*



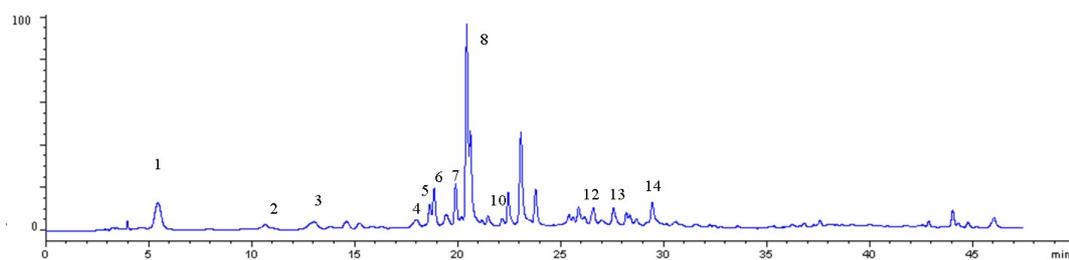
*Fig8 - Andamento quantitativo della frazione antocianica durante il processo di vinificazione e conservazione*



*Fig.9 - Profilo UV 280 nm delle Procianidine monomere e oligomeriche nell'estratto dai vinaccioli di Pallagrello bianco*

Peak	Molecola	MW
1	Ac. Gallico	170
2	Galloilglucoside	333
3	Procianidina B1	578
4	Catechina	290
7	Procianidina B4	578
8	Tetramerogallato	1306
9	Procianidina B2	578
12	Epicatechina	290
13	Trimerogallato	1018
	Tetramero	1154
14	Dimero gallato	730
16	Dimero gallato	730
18	Trimero	866
19	Dimero gallato	730
20	Pentamero	1442
	Trimero gallato	1018
21	Tetramero gallato	1306
	Pentamero	1442
23	Epicatechina gallato	442
24	Trimero gallato	1018
25	Tetramero gallato	1306
26	Pentamero gallato	1674
28	Dimero gallato	730
31	Pentamerogallato	1674

*Tab.8 Procianidine monomere e oligomeriche identificate nell'estratto dai vinaccioli di Pallagrello bianco*



*Fig10 - Profilo UV 280 nm delle sostanze fenoliche nell'estratto da uva di Pallagrello bianco*

Peak	Molecola	MW
1	Ac.gallico	170
2	Ac.caftarico	312
3	Etilcinnamato	176
4	Etilgallato	198
5	Quercetina glucuronide	478
6	Quercetina glucoside	464
7	Diidroquercetina-3-O-ramnoside (Astilbina)	450
8	Kampferolo glucoside	448
10	Mircitina	318
12	Quercetina	302
13	Etilcaffeico	208
14	Kampferolo	286

Tab9 Sostanze fenoliche identificate nell'estratto dal succo di uva di Pallagrello bianco

	Uva	Svinato
<b>°Brix</b>	23,7	-
<b>TAP/ Grado alcolico</b>	14,2	12,2
<b>pH</b>	3,43	3,48
<b>Acidità totale (g/L ac.tartarico)</b>	6,11	4,8
<b>Polifenoli totali (mg/l ac. gallico)</b>	733,3	512,8
<b>Tannini (g/l)</b>	2,3	0,48

Tab10 Confronto analisi chimico-fisiche uva Pallagrello Bianco e relativo vino alla svinatura.

Peak	Molecola	
1	Ac. gallico	170
2	Ac. Caftarico	312
3	Etilcinnamato	176
4	Ac.cutarico	296
5	Ac.fertarico	326
6	Ac.caffeico	180
7	Etilgallato	198
8	Etilbenzoato	166
9	Quercetinagluconide	478
10	Quercetina glucoside	464
11	Diidroquercetina-3-O-ramnoside (Astilbina)	450
12	Etilcaftarico	340
13	Kamferolo glucoside	448
14	Etilcutarico	324
15	Quercetina	302
16	etilcaffeico	208

Tab11 Composti fenolici identificati nel vino Pallagrello bianco mediante LC/MS

### **3 Caratterizzazione aromatica dell'uva e del vino Pallagrello Bianco e Nero e studio dell'effetto del processo di chiarifica sul profilo aromatico del vino bianco**

#### **3.1 Introduzione**

Le caratteristiche aromatiche di un vino derivano da composti volatili provenienti dall'uva, dal metabolismo di lieviti e batteri, dalle pratiche enologiche, dall'uso del legno.

Oltre ottocento composti volatili sono stati identificati nel vino tra cui alcoli, esteri, acidi organici, aldeidi, chetoni e terpeni che possono essere classificate, in relazione alla loro genesi, in:

- varietali, a loro volta distinte in primarie, se già presenti nell'uva in quanto originatesi dal suo metabolismo, o secondarie, se derivate direttamente da precursori non volatili già presenti nell'uva tramite fenomeni biochimici (ossidazioni, idrolisi), nel corso del tempo, dalle fasi di pre-fermentazione sino a quelle di affinamento;
- secondarie fermentative, se prodotte dal metabolismo dei lieviti e dei batteri responsabili della fermentazione alcolica e malolattica;
- terziarie, conseguenti a reazioni chimiche ed enzimatiche post-fermentative nel corso dell'affinamento dipendenti da diversi parametri, tra cui l'ambiente ossidante o riducente (affinamento in acciaio o in legno).(Riberau-Gayon et al.1998).

#### **3.1.1 Gli aromi varietali**

E' noto che i composti aromatici dell'uva giocano un ruolo primario nella formazione di note aromatiche tipiche della varietà utilizzata per la vinificazione.

Gli aromi varietali (primari e secondari) appartengono a diverse famiglie chimiche:

- terpeni in forma libera e glicosilata;
- norisoprenoidi C-13 in forma libera e glicosilata;
- metossipirazine;
- composti solforati che possiedono una funzione tiolica (tioli volatili e precursori dei tioli volatili derivati della cisteina);(Failla et al 2006, Riberau-Gayon et al.1998).

È altresì noto che ognuna di queste molecole è il prodotto di vie biosintetiche caratterizzate da enzimi, espressione del genoma della pianta, mentre il loro contenuto è strettamente dipendente dalle condizioni pedoclimatiche e dalle pratiche viticole.

L'aroma varietale, a parte le varietà denominate aromatiche, come i moscati, può non essere percepibile direttamente nelle uve e nei vini.

Tuttavia, i mosti di numerose varietà, indicate dall'appellativo "meutre", pur essendo inodori, danno vini il cui aroma caratteristico è più o meno specifico della varietà, come avviene nella la maggior parte dei grandi vitigni quali Merlot, Cabernet, Sauvignon, Semillon, Pinots, Gamay, Chardonnay.

Questo è dovuto alla presenza di precursori d'aroma, inodori come per esempio terpeni e norisoprenoidi glicosilati da cui si liberano gli agliconi odorosi per fenomeni idrolitici dovuti alla vinificazione.

L'idrolisi dei composti glicosilati può portare alla liberazione di agliconi volatili oppure agliconi che sono loro stessi precursori di composti aromatici, come osservato per la maggior parte degli agliconi C-13 norisoprenoidi. La via biosintetica dei norisoprenoidi comincia con una reazione di taglio bio-ossidativo dei carotenoidi e comprende una serie di reazioni enzimatiche (Wirth et al 2001, Strauss et al 1987, Winterhalter et al 1990).

Quindi durante la vinificazione uno o più enzimi sono responsabili dell'idrolisi di precursori glicosidici e del conseguente rilascio di composti volatili. I precursori comprendono monoglucosidi, in cui lo zucchero è il B-D-glucosio, e precursori diglicosidici, in cui al glucosio è legata con una seconda unità glucidica come A-L-arabinofuranoside, A-L-rhamnopiranoside, B-D-apiofuranoside.

Al pH del vino, l'idrolisi spontanea del legame B-glicosidico porta al rilascio dei composti volatili. Inoltre, enzimi con attività glicosidica, come quelli prodotti da alcuni lieviti, sono capaci di promuovere una rapida idrolisi di composti glicosilati. Il meccanismo proposto include, nel caso dei glicosidi disaccaridi, l'azione preliminare di un'appropriata glicosidasi (arabinofuranosidasi, rhamnopiranosidasi o apiofuranosidasi) per rilasciare lo zucchero terminale prima che la B-glicosidasi liberi l'aglicone volatile. Per i precursori glucosidici è necessario solo l'ultimo step. Vari studi hanno dimostrato che l'estratto enzimatico di *Saccharomyces cerevisiae* è capace di liberare la frazione volatile dei precursori glicosilati della bacca. I *Saccharomyces cerevisiae* hanno minor attività glicosidica rispetto ai lieviti non-*Saccharomyces*; l'attività enzimatica è massima durante la fase di crescita esponenziale della popolazione di lieviti, dopo si abbassa velocemente. L'attività glicosidica è influenzata negativamente dal pH del vino e dalla concentrazione di etanolo, perciò è limitata alla prima fase della fermentazione (Delfini et al 2001, Ugliano et al 2006, Abbot et al 1991, Lema et al 1996, Delcroix et al 1994).

### **3.1.1.1 Ruolo degli aromi varietali nell'ecologia della pianta**

Le molecole volatili degli aromi sono, come i polifenoli, metaboliti secondari, ovvero prodotti che non partecipano ai processi metabolici essenziali al mantenimento della vita di un organismo vegetale. In realtà, grazie ai progressi nella conoscenza dei processi metabolici ed alla maggiore accuratezza delle indagini relative al significato fisiologico-ecologico di questi prodotti, si è messo in evidenza il ruolo di questi nella difesa della pianta le avversità che caratterizzano l'ambiente in cui vivono. Alcuni di questi metaboliti sono realmente secondari in quanto non essenziali per la sopravvivenza della maggior parte delle piante; viceversa numerosi prodotti delle stesse vie biosintetiche sono indispensabili a tutte le piante (ormoni, chinoni, pigmenti).

Le vie principali che portano alla produzione di metaboliti secondari sono tre: via dell'acido scichimico, dell'acido mevalonico e dei polichetidi.

La funzione ecologica del metabolismo secondario si esplica nel ruolo di difesa che queste sostanze avrebbero nei riguardi dell'ambiente biotico ed abiotico in virtù delle loro caratteristiche irritanti, tossiche e repellenti. Le piante nel corso della loro evoluzione hanno sviluppato soluzioni strategiche che consentono loro di bilanciare la crescita (dovuta prevalentemente al metabolismo primario che interessa gli zuccheri, le proteine ed i lipidi) con le necessità legate alla sopravvivenza (difesa dai parassiti, dagli erbivori e da agenti tossici) che sono connesse al metabolismo secondario.

La stimolazione del metabolismo secondario avviene a spese dell'accrescimento in quanto diretta una parte degli assimilati verso sostanze destinate alla difesa, cioè alla sopravvivenza. I metaboliti secondari possono quindi essere considerati come molecole dispensabili per la crescita e lo sviluppo, ma indispensabili per la sopravvivenza della specie. Le loro funzioni sono principalmente legate alla difesa da stress biotici, quali gli attacchi di predatori e parassitari, e abiotici, quali l'eccesso di radiazione e temperatura, ma anche all'attrazione degli agenti dell'impollinazione (pronubi) e della dispersione dei semi (disseminatori). Seppure possa apparire paradossale, la funzione prevalente delle molecole aromatiche è quella della difesa da stress biotici e abiotici, piuttosto che quella di attrazione di pronubi e disseminatori. Ad esempio, i profumi terpenici emessi dai fiori, più che attrarre i pronubi, consentirebbero la protezione degli organi riproduttivi in essi contenuti dagli attacchi nemici, agendo come repellenti e intossicanti nei confronti di animali erbivori (insetti soprattutto) e funghi patogeni. I terpeni, inoltre, consentirebbero la protezione dei cloroplasti dagli stress termici e ossidativi. Le sostanze volatili liberate dagli organi verdi in caso di danno meccanico accidentale o conseguente agli attacchi di larve, come ad esempio aldeidi e alcoli C6, sono in grado di attrarre i parassitoidi e i predatori

delle larve stesse. La sintesi di tale sostanze è, inoltre, correlata alla produzione di altre molecole volatili, e specificatamente di giasmonato, che a sua volta induce la sintesi di fitoalessine, come, nella vite, il resveratrolo, ovvero di sostanze capaci di contrastare gli attacchi parassitari e gli stress abiotici (Buchanan et al 2003, Maffei).

### 3.1.1.2 I norisoprenoidi

Sono molecole aromatiche di natura terpenica molto diffuse in natura e presenti in foglie, fiori e frutti. Nella vite si rinvengono in foglie e frutti, prevalentemente in forma (mono)glucosidica, come arabinosilglucosidi e ramnosilglucosidi (Razungles et al 1993). Sono caratterizzati da una potente nota aromatica floreale e fruttato grazie alla bassa soglia di percezione. Derivano chimicamente dai carotenoidi, terpeni a 40 atomi di carbonio (tetraterpeni), per degradazione chimica, fotochimica e ossidazione enzimatica (Failla et al 2006). Da un punto di vista chimico, si distinguono due principali gruppi di composti, i megastigmani e i non megastigmani, costituiti, ognuno, da un sensibile numero di composti volatili (Fig 3.1.1.2.1).

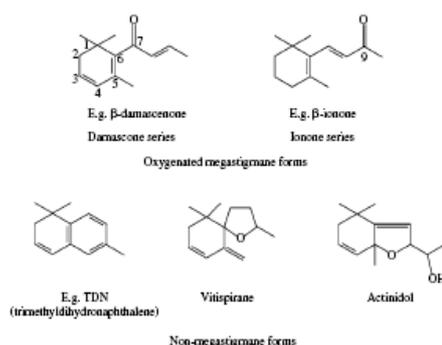


Fig.3.1.1.2.1 Principali famiglie C-13 norisoprenoidi nell'uva (Riberau-Gayon et al 1998)

La struttura dei megastigmani è caratterizzata da un ciclo a sei atomi di carbonio sostituito da gruppi metilici sui carboni 1 e 5 e da una catena alifatica a quattro atomi di carbonio, recante un'insaturazione sul C6 del ciclo. I megastigmani sono norisoprenoidi a tredici atomi di carbonio ossigenati, sul C7 (serie damascone) o sul C9 (serie ionone). Fra questi composti, il β-damascenone, dall'odore complesso di fiori, di frutti esotici e di composta di mele, possiede una soglia di percezione olfattiva molto bassa nell'acqua (3,5 ng/l) e relativamente bassa in soluzioni modello (45 ng/l) (Ribereau-Gayon, 2006). La sua soglia di riconoscimento nei vini rossi è di 5.000 ng/l. Esso è stato inizialmente identificato nel succo d'uva delle varietà Riesling e Moscato, ma esiste, verosimilmente, in tutti i vitigni. La concentrazione in β-damascenone dei vini bianchi e rossi è estremamente variabile. Si ritiene, tuttavia, che il suo impatto olfattivo in certi vini sia importante. I valori riscontrati

nei vini rossi sono un po' più elevati di quelli dei vini bianchi secchi e molto elevati nei vini dolci naturali ottenuti da varietà di tipo Moscato. In media, i tenori dei vini rossi Merlot, Cabernet Sauvignon e Cabernet Franc, non presentano differenze significative. Il  $\beta$ -ionone, dal caratteristico odore di violetta, possiede una soglia di percezione di 120 ng/l nell'acqua e di 800 ng/l in soluzione idroalcolica modello, mentre nei vini è 1,5  $\mu$ g/l. Esso è stato identificato nelle uve di diversi vitigni bianchi e nei Moscati; come il  $\beta$ -damascenone, esiste in tutti i vitigni. Il contributo aromatico del  $\beta$ -ionone all'aroma dei vini bianchi è trascurabile; al contrario, può svolgere un ruolo significativo nei vini rossi. La sua concentrazione è ancora più variabile di quella del  $\beta$ -damascenone e non sembra influenzata significativamente dal vitigno. Gli altri norisoprenoidi ossigenati identificati sono il 3-oxo- $\alpha$ -ionolo (a nota aromatica di tabacco), il 3-idrossi- $\beta$ -damascone (tè, tabacco) e il  $\beta$ -damascone (tabacco, fruttato). L'impatto olfattivo di questi composti, a causa delle loro alte soglie di percezione, è trascurabile, malgrado spesso siano contenuti nei vini in quantità importanti. I nonmegastigmani sono anch'essi norisoprenoidi a tredici atomi di carbonio di cui alcuni composti molto odorosi. Fra questi si segnala, innanzi tutto, il TDN (1,1,6 trimetil-1,2-diidronaftalene) che gioca un ruolo importante nella formazione della nota aromatica di cherosene dei vini Riesling vecchi. Generalmente assente nell'uva e nel vino giovane, il TDN si può formare nel corso dell'invecchiamento in bottiglia, fino a raggiungere tenori di 200  $\mu$ g/l, che superano la sua soglia di percezione (circa 20  $\mu$ g/l). Gli actinidoli e i vitispirani sono altri composti della stessa famiglia che possiedono un odore di canfora. Certi norisoprenoidi non megastigmani deriverebbero dalla trasformazione acido catalizzata dei megastigmani. I vitispirani isomeri, che si formano per questa via durante l'invecchiamento in bottiglia, potrebbero contribuire all'odore difettoso di canfora dei vini prematuramente ed esageratamente invecchiati (Riberau-Gayon et al. 1998).

### **3.1.1.3 La biosintesi dei norisoprenoidi**

Questi aromi varietali del vino derivano da molecole contenute nell'uva (i carotenoidi) (Fig 3.1.1.3.1). Recentemente alcuni studi avrebbero confermato l'ipotesi che i norisoprenoidi si originino in seguito all'attività di un enzima specifico, detto carotene diossigenasi, capace di produrli a partire dai carotenoidi (Failla et al 2006).

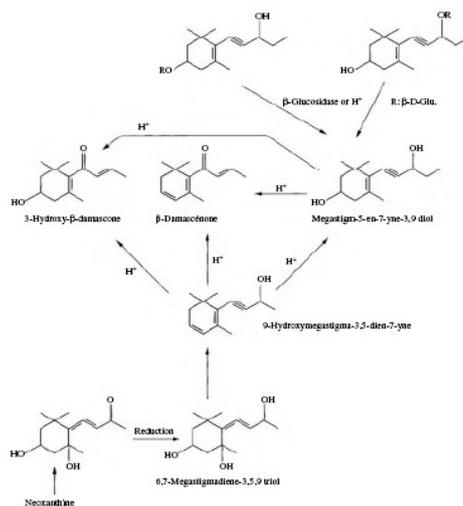


Fig3.1.1.3.1. Via di formazione del  $\beta$ -damascenone nell'uva e nel vino ((Riberau-Gayon et al.1998).

In passato vari risultati avevano supportato l'ipotesi di un coinvolgimento di una ossigenasi regione -specifica in grado di formare i C-13 norisoprenoidi a partire dai carotenoidi: la maggioranza di norisoprenoidi aventi 13 atomi di carbonio, la configurazione dei centri asimmetrici in comune con i rispettivi carotenoidi, la correlazione negativa osservata durante la maturazione tra i livelli di C-13 norisoprenoidi e carotenoidi. Adesso è stato identificato un gene (VvCCD1) in *Vitis vinifera* in grado di codificare la carotene diossigenasi; è stata osservata un'induzione significativa nell'espressione del gene circa una settimana prima dell'invasatura in due cultivars, Moscato di Alessandria e Syrah (Mathieux et al.,2005).

La via biosintetica proposta che porta dai carotenoidi ai C-13 norisoprenoidi comprende tre stadi successivi; il primo riguarda la degradazione enzimatica dei carotenoidi tramite ossidasi. I primi prodotti di questi tagli sono carbonili di C-13 norisoprenoidi che hanno lo scheletro ossidato dei corrispettivi carotenoidi. Il secondo stadio riguarda la modificazione, tramite ossidasi e reductasi, del grado di ossidazione di questi primi prodotti. Infine, il terzo stadio consiste nella glicosilazione, tramite la glicosiltransferasi, di quei composti norisoprenoidi aventi un gruppo ossidrilico. Ci sono diverse prove in favore dell'ipotesi che i C-13 norisoprenoidi derivino dai carotenoidi; queste comprendono il fatto che la maggioranza di norisoprenoidi possiede 13 atomi di carbonio e questo indica la specificità di taglio; la configurazione dei centri asimmetrici comune ai C-13 norisoprenoidi e i corrispondenti carotenoidi (Fig 3.1.1.3.2, Fig3.1.1.3.3); il trasferimento di marcatori C dai carotenoidi ai norisoprenoidi tra l'invasatura e la maturazione; la

correlazione negativa osservata tra i livelli di carotenoidi e norisoprenoidi tra l'invasatura e la maturazione, soprattutto se i grappoli sono direttamente esposti alla luce solare.

L'espressione del gene che codifica l'enzima e la conseguente sintesi di norisoprenoidi si attivano qualche giorno prima dell'invasatura. Ciò differenzia la sintesi dei norisoprenoidi da quella degli altri metaboliti secondari della maturazione dell'uva, quali gli antociani e i terpeni, e lascia intravedere un loro possibile ruolo regolatore dell'invasatura e della successiva maturazione (Failla et al 2006).

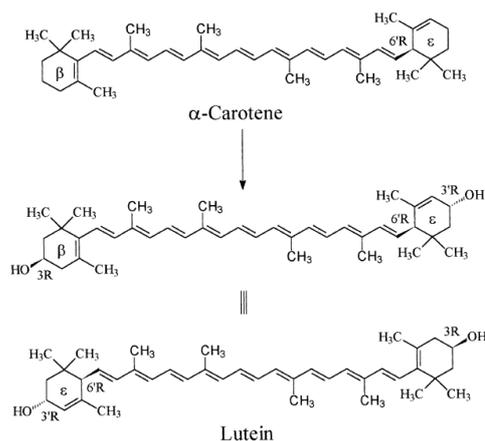


Fig.3.1.1.3.2 Formazione dei glucosidi megastigmano-3,9-diolo e del 3-oxo- $\alpha$ -ionolo dalla luteina mantenendo la stereochimica dei carboni 3 e 6 (Baumes et al.2002).

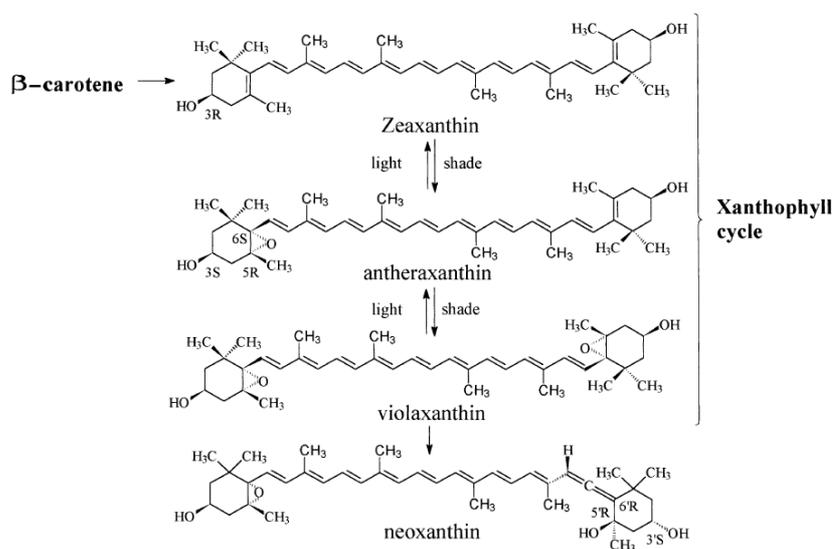


Fig.3.1.1.3.3 Formazione del 3-idrossi- $\beta$ -damascone (e del suo glucoside) e del  $\beta$ -damascenone dalla neoxantina, mantenendo la stereochimica del carbonio 3 (Baumes et al.2002)

### 3.1.1.4 I Terpeni

I terpeni volatili possono essere distinti in due gruppi correlati biosinteticamente: i monoterpeni, composti a 10 atomi di carbonio, e i sesquiterpeni, composti a 15 atomi di carbonio, formati rispettivamente a partire da due o tre unità isopreniche. Attualmente si

conoscono circa 50 monoterpeni. I più odorosi appartengono alla classe degli alcoli monoterpenici quali il linalolo, il geraniolo, il nerolo, il citronellolo,  $\alpha$ -terpineolo. I terpeni sono costituenti secondari della pianta, la cui biosintesi comincia con l'acetil-coenzimaA (CoA). Anche i microrganismi sono in grado di sintetizzarli (Carrau et al., 2005). Il ruolo dei monoterpeni nell'aroma dell'uva e del vino del moscato è ben conosciuto (Bayonove e Cordonnier, 1971; Ribereau-Gayon ed altri, 1975; Williams ed altri, 1980). Molti autori hanno indicato che i terpeni glicosidici della buccia hanno un ruolo dominante nella definizione dell'aroma varietale dei vini.

È possibile in tal senso la seguente classificazione delle uve:

- uve moscate, intensamente aromatizzate, in cui la concentrazione totale di monoterpeni liberi può essere di 6 mg/l;
- varietà non-moscate, ma aromatiche con una concentrazione totale di monoterpene 1-4mg/l;
- varietà neutre, che non dipendono dai monoterpeni per il loro odore sebbene essi possano essere potenzialmente disponibili nella forma glicosilati inodore.

Nell'uva, infatti, si possono individuare monoterpeni liberi, poli-idrossilati e glicosidici. I principali composti terpenici liberi sono gli alcoli come il linalolo, il geraniolo e il nerolo, insieme alle forme furaniche e piraniche degli ossidi del linalolo, il citronellolo, l' $\alpha$ -terpineolo, l'ho-trienolo, gli ossidi del nerolo, il mircenolo, e aldeidi ed idrocarburi. Nei vini, inoltre, sono stati trovati parecchi eteri ed esteri.

Le forme poli-idrossilate dei monoterpeni o polioli inodori (come il 3,7-dimetil-1-octen-3,6,7-triolo, il 3,7-dimetil-2-octen-1,7-diolo) possono dare origine, per idrolisi in ambiente acido, a monoterpeni volatili piacevoli e "potenti". Ad esempio dal diendiolo (3,7-dimetilotta-1,5-diene-3,7-diolo) si può liberare l'ossido del nerolo e dell'ho-trienolo.

Le forme glicosilate dei monoterpeni sono complesse e si differenziano per la struttura dell'aglicone costituita principalmente dai terpenoli, ma anche dagli ossidi del linalolo, dai dioli terpenici ed dai trioli. I glicosidi sono, nella maggior parte delle uve, più abbondanti delle corrispondenti forme libere (Mareo et al., 2000). I risultati delle ricerche condotte sull'argomento hanno messo in evidenza che la quantità e la qualità dei terpeni glicosilati dipendono dalla cultivar dell'uva (Bayonove et al., 1993).

I monoterpeni glicosidi inodori, come precedentemente detto, per idrolisi acida o enzimatica possono liberare gli agliconi aromatici volatili.

L'idrolisi enzimatica, durante i trattamenti prefermentativi produce un aroma più "naturale" nel vino (Cordonnier e Bayonove, 1974; Gunata et al., 1985; Mateo e Jimenez, 2000;

Gunata, 2002). Il fenomeno è favorito dalla macerazione delle parti solide, data l'elevata concentrazione di composti terpenici legati presenti nelle bucce.

Per quanto concerne l'idrolisi acida dei terpeni glicosidici, è stato osservato in vitro che essa può indurre una riorganizzazione molecolare dei monoterpenoli i quali sono trasformati in altri composti (Williams et al., 1982). Questo processo simula le reazioni che avvengono, in vivo, durante l'invecchiamento. Infatti il contenuto in monoterpeni cambia durante la conservazione in bottiglia, o piuttosto durante la maturazione del vino, per mezzo di reazioni catalizzate da acidi (Rapp e Mandery, 1986; Di Stefano, 1989).

### **3.1.1.5 Le Metossipirazine**

Sono composti eterociclici azotati, provenienti dal metabolismo degli amminoacidi. La 2-metossi-3-isopropilpirazina, la 2-metossi-3-secbutilpirazina e la 2-metossi-3-isobutilpirazina sono caratterizzate da un odore vegetale che ricorda il peperone verde, l'asparago e note terrose.

La 2-metossi-3-isobutilpirazina ha note aromatiche di peperone verde, pisello e patata. È stata identificata per la prima volta da Boyonove et al. (1975) nell'uva della varietà Cabernet Sauvignon; in seguito, sono state identificate anche la 2-metossipirazina e altre pirazine nelle uve e nei vini di numerose altre varietà come Sauvignon, Cabernet franc, Merlot, Pinot grigio, Gewürztraminer, Chardonnay, Riesling (Augustyn et al., 1982; Harris et al., 1987; Calò et al., 1991; Allen et al., 1994).

### **3.1.1.6 I tioli volatili**

I composti solforati di tipo tiolico (o mercaptani) sono, generalmente, responsabili di difetti olfattivi. Tuttavia, il loro ruolo nell'aroma di certi frutti è ben noto. Essi conferiscono al vino aromi caratteristici le cui differenti note erbacee e fruttate, ricordano il peperone verde, il bosso, la ginestra, il pompelmo, il frutto della passione, il fumo. Recentemente diversi tioli molto odorosi sono stati identificati nei vini da uve Sauvignon. La prima tra tali sostanze identificata è stata il 4-mercapto-4-metil-pentan-2-one (Darriet et al., 1993) dal marcato odore di bosso e di ginestra. In seguito sono state identificate altre molecole quali l'acetato di 3-mercaptoesan-1-olo, il 4-4-mercapto-4-metilpentan-2-olo ed altre (Tominaga et al., 1998). I mosti Sauvignon, come quelli di molte varietà neutre, sono poco odorosi mentre l'aroma caratteristico del vitigno si sviluppa durante la fermentazione alcolica. Come Peynaud (1980) aveva previsto sono stati trovati i precursori inodori degli aromi dei mosti Sauvignon, come il 3-mercaptoesan-1-olo, il 4-metil-4-mercaptopentan-2-

one, il 4-metil-4-mercaptopentan-2-olo, derivati S-coniugati della cisterna, rilasciati nel corso della fermentazione alcolica, probabilmente per intervento di una  $\beta$ -liasi specifica. Il rilascio di questi composti è più o meno importante a seconda del ceppo di lievito di *S. cerevisiae* che conduce la fermentazione (Masneuf et al.,1996).

### **3.1.2 I composti volatili da trattamenti prefermentativi**

Gli aromi prefermentativi si formano in seguito alla destrutturazione della compartimentazione cellulare per l'azione di enzimi (idrolisi e lipossigenasi) e dell'ossigeno sui lipidi e acidi grassi. La catena di reazioni, che si innesca, porta rapidamente alla formazione di aldeidi e alcoli a sei atomi di carbonio dal caratteristico odore di erba tagliata o foglie stropicciate. Queste note odorose diminuiscono di intensità durante la maturazione in quanto diminuisce l'attività enzimatica responsabile (Zironi et al., 2000).

La sequenza sequenza delle attività enzimatiche avviene per "step": un'acilidrolasi libera gli acidi grassi insaturi a 18 C dai lipidi di membrana; su di essi la lipossigenasi catalizza la fissazione dell'ossigeno. I perossidi ottenuti vengono scissi in aldeidi a 6 C, parte dei quali viene ridotta nei corrispondenti alcoli da un'alcoldeidrogenasi dell'uva (Crouzet,1986). Questi alcoli (esanolo ed esenoli) sono responsabili degli odori erbacei.

### **3.1.3 Aromi di fermentazione**

Gli aromi di fermentazione sono costituiti principalmente dai prodotti del metabolismo dei microrganismi responsabili della fermentazione alcolica e malolattica. Da un punto di vista chimico sono costituiti da alcoli superiori (con più di due atomi di carbonio), dai loro esteri acetici, dagli esteri etilici degli acidi grassi e dai composti carbonilici.

#### Alcoli superiori

Gli alcoli superiori sono sintetizzati a partire dai chetoacidi provenienti dal metabolismo degli aminoacidi. I principali sono l'alcol isobutilico (2-metil-1-propanolo) e gli alcoli amilici (miscela di 2-metil-1-butanolo e di 3-metil-1-butanolo). Ad eccezione del feniletanolo, il cui odore ricorda quello di rosa, gli altri alcoli superiori del vino sono maleodoranti in quanto evocano i solventi organici, come ad esempio l'alcol isoamilico. Un particolare alcol, il metionolo ha odore di cavolo cotto e può essere all'origine di un grave difetto olfattivo.

## Esteri

Grazie alle sue attività esterasiche, il lievito genera diversi esteri. Alcuni esteri possono essere naturalmente presenti nell'uva come l'antranilato di metile, responsabile dell'odore *foxy* delle uve e dei vini da *Vitis Labrusca*. Invece, nei vini gli esteri hanno due origini distinte: la fermentazione e la conservazione. Nel primo i processi fermentativi comportano esterificazioni di natura enzimatica, mentre nel secondo si hanno processi di esterificazioni chimiche. Per quanto concerne gli esteri acetici degli alcoli superiori, tra cui i più importanti l'isoamilacetato (odore di banana) ed il feniletilacetato (odore di rosa) partecipano alla complessità aromatica dei vini da uve neutre e possono mascherare gli aromi specifici di certe varietà.

Gli esteri etilici degli acidi grassi, essenzialmente caproato e caprilato di etile, sono formati dai lieviti durante la fermentazione alcolica. Hanno odori molto piacevoli di cera e di miele.

## Composti carbonilici

Fra i composti responsabili dell'aroma del vino contribuiscono anche composti carbonilici come le aldeidi, i chetoni, i lattoni e gli acetali. L'etanale è un composto carbonilico presente nel vino derivante dall'ossidazione del corrispondente alcol. I vini, in cui esiste dell'etanale non legata, sono "svaniti" ovvero hanno odore di mela appena tagliata. Oltre all'etanale altre aldeidi sono presenti in tracce nei vini come le aldeidi superiori, quali propanale, 2-metilpropanale, eptanale, nonanale e le aldeidi della serie aromatica (vanillina), dotate di uno spiccato aroma vanigliato, associate, anche, alla maturazione in fusti di legno. Fra le molecole a funzione "chetoniche" sono stati trovati il propanone, il butanone e il pentanone. Alcuni lattoni volatili di origine fermentativa possono contribuire all'aroma del vino; di questi il più noto è il  $\gamma$ -butirrolattone. I lattoni possono anche provenire dall'uva; è stato segnalato, ad esempio, il loro contributo nella formazione dell'aroma varietale del Riesling.

### **3.1.4 Aromi di post-fermentazione**

Gli aromi post-fermentativi si liberano nel corso della conservazione del vino durante la quale il profilo aromatico evolve da un gusto fresco e fruttato, tipico dei vini giovani, ad uno più affinato. Queste modificazioni sono indotte da processi di idrolisi, di ossidoriduzione nonché di esterificazione sia chimica che biologica, quest'ultimi soprattutto a carico degli acidi fissi. Ne consegue che accanto alla diminuzione o alla scomparsa di alcune sostanze, si ha la comparsa di composti nuovi quali aldeidi, acetali, lattoni di

diversa provenienza etc. Tutte queste trasformazioni così come l'intensità e la velocità con cui avvengono, dipendono da fattori di varia natura, quali la presenza o meno di ossigeno, la durata e la temperatura di conservazione, il tipo di vino etc. Esse contribuiscono a definire il cosiddetto "bouquet" di un vino ovvero il risultato di percezioni aromatiche, gustative e sensoriali.

Il bouquet dei vini rossi e bianchi si sviluppa dopo un lungo periodo di invecchiamento in bottiglia, durante il quale tutto l'ossigeno disciolto è stato consumato ed ha determinato un basso valore limite (<200 mV) del potenziale di ossidoriduzione dipendente dalla composizione del vino, dal suo tenore in SO<sub>2</sub>, dal sistema di tappatura impiegato, dalla temperatura e dalla luce. In queste condizioni si armonizzano gli aromi derivanti dall'uva con quelli prodotti dalle fermentazione (alcolica e malolattica) e con quelli derivati dal tipo di affinamento (legno, vaniglia).

### **3.1.5 Aromi derivanti da affinamento in legno**

Tradizionalmente la conservazione dei grandi vini rossi, dalla fine della vinificazione all'imbottigliamento, avviene in fusti di legno di rovere. Il legno svolge due effetti opposti: accentua la durezza attraverso la dissoluzione di costituenti fenolici in esso contenuti e ammorbidisce i tannini condensati grazie alla formazione dei polimeri "eterogenei". Tre fenomeni, associati a questa pratica, intervengono nell'evoluzione del vino:

- i. reazioni di ossidoriduzione;
- ii. la dissoluzione dei costituenti volatili del legno;
- iii. la dissoluzione dei costituenti non volatili del legno.

L'ossigeno, che penetra attraverso il legno (16%), gli interstizi tra le doghe (63%) e attraverso il tappo (21%), provoca l'ossidazione dei costituenti del vino. In particolare, l'etanolo è ossidato ad aldeide acetica (etanale) che è implicata in fenomeni di copolimerizzazione carbocationica tra antociani e tannini con la formazione di composti che conferiscono un colore ambrato stabile nel tempo. Inoltre, l'aumento del grado di condensazione dei tannini fa diminuire la reattività di quest'ultimi nei confronti delle proteine e quindi la sensazione di astringenza (Vivas e Glories. 1996).

Nel corso della conservazione in fusti, il legno di rovere cede al vino dei lattoni, i cis e trans- $\beta$ -metil- $\gamma$ -ottalattone, noti con il nome di "lattoni di quercia" o "wisky lattoni", che conferiscono al vino una complessità aromatica, nota con il nome "boisé". Il controllo dell'intensità dell'aroma boisé è essenziale; esso dipende dalla struttura generale del vino, con il quale le note legnose si possono fondere più o meno bene. Infatti, esso non deve

essere esagerato e non deve dominare le caratteristiche proprie del vino. I fattori da tenere sotto controllo sono:

- il tipo di legno;
- il grado di tostatura;
- l'utilizzo di barrique nuove;
- la durata dell'affinamento

Il legno è responsabile della liberazione di un grande numero di composti non volatili, in primo luogo, gli ellagitannini. I due maggiori composti fenolici presenti nel legno di rovere, impiegato per la fabbricazione dei fusti, sono la vescalagina e la castalagina. Per idrolisi parziale si ottengono la vescalina e la castalina che sono solubili sia in acqua sia in soluzioni idroalcoliche, come i vini. Dal momento che sono facilmente ossidabili, la principale azione degli ellagitannini è favorire l'invecchiamento del vino, proteggendo gli antociani e i flavonoidi.

Il processo di fabbricazione delle botti ha molta influenza sulle sostanze che il legno cederà al vino durante l'affinamento. Esso prevede diverse fasi come l'essiccamento del legno (naturale o artificiale), la curvatura (per riscaldamento e conseguente degradazione termica delle lignine) e la tostatura. Il trattamento termico del legno genera la termodegradazione di alcune sostanze come la cellulosa, le emicellulose e la lignina e porta alla formazione di numerosi composti aromatici (aldeidi furaniche, fenoli volatili, aldeidi fenoliche e fenil chetoni). Chatonnet et al. (1989) hanno messo in evidenza che una tostatura media (a temperatura di 200°C per 10 minuti) corrisponde alla massima produzione di composti aromatici provenienti dal legno; nel caso di tostature forti i processi degradativi superano quelli di formazione (Castino M. et al., 2003).

Altre sostanze estratte dal legno, sono le lignine, ricche in unità guaiacile e siringale. Durante la tostatura, la lignina viene degradata termicamente con formazione di aldeidi sia della serie cinnamica (aldeide sinapica e coniferilica), sia della serie benzoica (aldeide vanillina e siringica) (Chatonnet et al.,1990). Inoltre, sono presenti le cumarine, il cui contenuto nel vino dipende dalla composizione e dalle modalità di essiccamento del legno; esse possono trovarsi disciolte nel vino sia sotto forma eterosidica (scopolentina, esculentina) che agliconica (scopolina,esculetina) (Salagoity-Auguste et al.,1987). Le cumarine aglicone sono acide e possiedono caratteristiche di durezza, mentre i loro eterosidi sono amari. Un altro gruppo di molecole che provengono dal legno e dalla lignina sono gli acidi fenolici, in particolare l'acido gallico, caratterizzate da un sapore acido. Il legno di rovere grezzo contiene, inoltre, un certo numero di sostanze volatili che presentano un odore caratteristico come i fenoli volatili costituiti dagli isomeri del cresolo,

guaiacolo e 4-metilguaiacolo, eugenolo (note odorose di affumicato, spezie e chiodi di garofano), isoeugenolo e propiovanillone (Castino et al., 2002). La cellulosa presente nel legno nel corso del riscaldamento libera aldeidi furaniche come l'idrossi-metilfurfurale e il metilfurfurale. Esse sono caratterizzate da odori grigliati, ma la loro soglia di percezione è bassa e possono essere trascurate. Il trans-2-nonenale, un'altra molecola la cui concentrazione varia molto da un campione di legno all'altro, insieme al trans-2-octenale ed al 1-decanale, è la principale responsabile dell'odore di "planche", letteralmente di "asse", che i vini possono acquisire durante l'affinamento nei fusti: questo odore sgradevole è attribuito al legno fresco e può essere attenuato aumentando il grado di tostatura interne dei fusti.

Nel caso dei vini bianchi, la qualità del carattere "boisé" presuppone la vinificazione del vino nei fusti. Infatti, in generale, l'aroma boisé di un vino fermentato in barrique è nettamente inferiore a quello del medesimo vino messo in botte dopo la fermentazione alcolica (Chatonnet et al., 1992). Questo fenomeno è essenzialmente legato alla riduzione, ad opera dei lieviti, della vanillina in alcol vanillico, pressoché inodore; le aldeidi furaniche sono anch'esse ridotte ad alcol. I lieviti sono, infatti capaci di fissare e di trasformare continuamente alcuni costituenti volatili a mano a mano che vengono liberati dal legno.

### **3.1.6 L'illimpidimento e la stabilizzazione**

La limpidezza è un requisito che il consumatore richiede, soprattutto ai vini bianchi. Il vino nuovo e particolarmente ricco di particelle, costituite dalle fecce dei lieviti e da altri residui vegetali. La loro progressiva sedimentazione, seguita dalla loro eliminazione per decantazione, permette di raggiungere la limpidezza. Non è, tuttavia sufficiente che il vino sia limpido al momento dell'imbottigliamento, è anche necessario che si mantenga tale durante la conservazione.

Numerosi sono i fattori che influiscono nelle alterazioni delle caratteristiche qualitative del vino bianco e che possono comprometterne l'aroma, il colore e la limpidezza, dando origine ad intorbidamenti indesiderati. Tra questi ricordiamo, l'azione dell'ossigeno, specie in fase prefermentativa ed in particolare la sua interazione con le sostanze polifenoliche, la presenza di sostanze minerali quali ferro e rame, i sali dell'acido tartarico ed il contenuto in proteine, che in particolari condizioni possono aggregare e precipitare dando origine all'indesiderato fenomeno della "casse proteica". Le reazioni di ossidazione, possono essere di natura enzimatica o chimica, le prime, sono dovute alle polifenolossidasi e si

verificano principalmente nel mosto. Le reazioni di natura chimica sono piuttosto lente, possono richiedere settimane o mesi per verificarsi e avvengono nel vino imbottigliato (Cilliers e Singleton 1990), alterandone notevolmente le caratteristiche qualitative. Gli effetti più nefasti sono dovuti agli enzimi ossidativi, i quali, oltre ad agire sui composti polifenolici (catechine, proantocianidine, acidi cinnamici e loro derivati) (Margheri et al., 1980), causando indesiderati fenomeni di imbrunimento nei mosti e nei vini, alterano le frazioni aromatiche con conseguente diminuzione o totale assenza dell'espressione varietale dei vitigni. Le sostanze di natura polifenolica, quindi, possono essere responsabili del fenomeno dell'imbrunimento dei vini bianchi, che comporta alterazioni del colore, del sapore e dell'aroma (Singleton et al. 1984). Nei vini bianchi, i processi ossidativi, possono essere prevenuti, controllando alcuni parametri quali temperatura, pH e assorbimento di ossigeno da parte del prodotto, ma anche utilizzando sostanze chiarificanti e stabilizzanti di natura proteica (gelatina, albumina, caseina), o minerale (silice, bentonite); questi riducendo la quantità di sostanze polifenoliche, proteggono il vino dall'imbrunimento non enzimatico.

### **3.1.7 Chiarifica**

La principale differenza tra la vinificazione in rosso e quella in bianco consiste nel trattamento delle bucce e nel processo di chiarifica prima, durante e dopo la fermentazione alcolica. La presenza di composti provenienti da bucce, semi e raspi ha infatti una diretta influenza sul colore e il bouquet aromatico di vino bianco. Dunque, la chiarifica dei mosti ha da un lato lo scopo primario di eliminare le particelle responsabili di torbidità (residui cellulari, colloidali, ecc) e dall'altro eliminare l'eccesso di proteine (che potrebbero causare intorbidamento proteico) e di polifenoli ossidabili (responsabili dell'intorbidamento ossidativo).

#### **3.1.7.1 Chiarifica spontanea**

La chiarifica spontanea a bassa temperatura è di norma il primo passo per rimuovere gli intorbidanti da un mosto d'uva bianca prima della fermentazione. La chiarifica, ottenuta cioè lasciando semplicemente riposare il vino, è dovuta alla sedimentazione, per effetto della gravità, delle particelle in sospensione, al loro adsorbimento sulle pareti del recipiente ed infine al travaso del mosto illimpidito. Fattori esterni, quali temperatura, ossigeno ed ellagitannini del legno di quercia, possono favorire od ostacolare la precipitazione.

Quando il processo di chiarifica spontanea è troppo lento, a causa di una insufficiente attività delle pectinasi dell'uva, può essere accelerato mediante l'aggiunta di pectinasi

industriali da *Aspergillus niger*. Come le pectinasi dell'uva, anche quelle industriali possiedono numerose attività ed in particolare un'attività pectino esterasica che demetila le catene pectiche e un'attività endopoligalatturonasica che idrolizza i legami osidici tra i residui galatturonici. L'uso di pectinasi esogeni può condurre ad una eccessiva chiarificazione del succo, spesso occorre perciò regolarne la torbidità. È opportuno insistere sull'importanza di questi diversi aggiustamenti della limpidezza sia per assicurare una completa fermentazione sia per la qualità aromatiche di vini bianchi secchi.

### **3.1.8 Il collaggio**

L'operazione del collaggio consiste nell'aggiungere ad un vino più o meno torbido o che presenta instabilità colloidale (materia colorante nei vini rossi) una sostanza in grado di flocculare e sedimentare trascinando con sé le particelle responsabili della torbidità e/o dell'instabilità; il vino viene così chiarificato e stabilizzato. Il prodotto del collaggio è sovente costituito da una miscela di proteine denaturate e precipitate per effetto dei tannini, dei cationi o dell'acidità.

I meccanismi del collaggio sono complessi, e il processo può essere suddiviso in due tappe:

- la flocculazione dovuta all'interazione tannini e proteine
- la chiarifica, meccanismo che consente di separare il vino dalle sostanze in sospensione

I prodotti impiegati per il collaggio sono tradizionalmente di natura proteica e di origine animale: albumina d'uovo, caseina (latte), gelatina (collagene).

Ad essi si affiancano alcuni prodotti di origine minerale (bentonite, sol di silice) che intervengono nella chiarifica e nella stabilizzazione. Ogni prodotto impiegato per il collaggio proteico possiede un'azione specifica a seconda della sua origine e, dunque, della sua composizione e delle caratteristiche dei suoi costituenti.

#### **3.1.8.1 Le gelatine**

Per **gelatina** si intende il prodotto d'idrolisi parziale del collagene contenuto nelle pelli, nei tessuti connettivi e nelle ossa degli animali. Sotto l'aspetto chimico consiste di una miscela di proteine solubili in acqua di peso molecolare medio valutato tra i 15000 e 250000 e circa 18 residui di amminoacidi entrano nella sua composizione. Per idrolisi completa della gelatina sono stati ottenuti i vari amminoacidi nelle seguenti proporzioni in peso (%): ac. aspartico 6,7; ac glutammico 11,4; alanina 11; arginina 8,8; glicina 27,5; idrossiprolina 14,1; istidina 0,78; leucina e isoleucina 5,1; lisina 4,5; metionina 0,9; prolina 16,4; serina

4,2; treonina 2,2; tirosina 0,3; valina 2,6. la cistina è presente in tracce e manca il triptofano. Rispetto all'idrolisi di altre proteine è rimarchevole l'altra percentuale di glicina e prolina. Tra le caratteristiche principali è la capacità di formare un gel in soluzione acquosa a T inferiore a 34-40 °C. Le dosi di impiego variano da 3-10 g/hl per i vini rossi.

La distribuzione delle masse molecolari delle proteine che costituiscono la gelatina e i valori della densità di carica elettrica sono caratteristiche utili a valutare l'azione delle colle nel vino. Infatti, all'aumentare della carica superficiale aumenta la reattività della gelatina nei confronti delle diverse famiglie di tannini presenti nel vino rosso.

I meccanismi che si attivano durante il collaggio di un vino fanno intervenire la carica superficiale delle gelatine. Infatti la gelatina si comporta nel vino come un polielettrolita di segno positivo. Le forze che intervengono nel corso del collaggio possono essere identificate come forze di Van der Waals che dipendono dalla struttura delle proteine, dunque dalla natura delle gelatine utilizzate. La densità di carica elettrica delle gelatine è variabile tra 0,4 e 0,9 meq/L. Tanto maggiore è la carica superficiale più ampio è lo spettro d'azione, ossia la gelatina va a reagire un po' con tutte le classi di tannini. Tanto minore è la carica superficiale tanto più stretto lo spettro d'azione, ossia la gelatina va a reagire soprattutto con i tannini più reattivi e più aggressivi.

Nel caso particolare dei vini bianchi, l'impiego congiunto della gelatina e di un gel di silice consente di evitare il surcollaggio e di utilizzare questa colla proteica su vini ricchi di colloidali polisaccaridici. Al momento dell'addizione della gelatina al vino, i composti elettronegativi del vino si uniscono alla superficie delle proteine, dapprima occupando solo alcuni siti, via via fino a formare uno strato continuo. Si vengono così a stabilire degli equilibri che si traducono nei fenomeni di aggregazione e precipitazione. I fiocchi che sedimentano inducono la precipitazione delle particelle di torbido presenti, realizzando la chiarifica. Ciò porta all'eliminazione anche delle particelle colloidali in sospensione e quindi ad ottenere la stabilizzazione colloidale.

### **3.1.8.2 L'albumina**

L'**albumina d'uovo** si ottiene diluendo con acqua l'albume d'uovo di gallina e facendolo disseccare a bassa temperatura. Si trova in commercio sotto forma di squamette lucenti, trasparenti, giallo chiari che in contatto con l'acqua fredda si rigonfiano e poi si scioglie formando un liquido viscoso che spumeggia per agitazione. Il costituente principale è l'ovoalbumina (ac glutammico 16,5; ac aspartico 9,3; leucin 9,2; fenilalanina 7,7; isoleucina 7,0; alanina 6,7; lisina 6,3; valina 6,4)

La sua composizione è leggermente diversa da quella dell'albumina fresco in quanto l'essiccamento determina la perdita di proteine ad elevata massa molecolare (Ikonomou-Potiri,1985).

Le dosi di impiego variano tra 5-15 g/hl.

Viene consigliata per ammorbidire i vini ricchi di tannini ed, eventualmente, caratterizzati da una eccessiva astringenza. Viene sconsigliata per i vini bianchi.

Prendendo in considerazione la composizione in amminoacidi e facendo un confronto tra le gelatine e l'albumina è possibile notare delle importanti differenze. Nelle gelatine, infatti, la glicina, la prolina e l'idrossiprolina rappresentano insieme quasi la metà degli amminoacidi costitutivi, mentre nell'albumina esse rappresentano meno del 10%. Questo determina importanti differenze nella carica superficiale delle proteine a pH 3,5, infatti nel caso dell'albumina essa è pari a 0,8 meq/L, mentre quella delle gelatine è variabile tra 0,4 e 0,9 meq/L.

### **3.1.8.3 Il caseinato**

Il collaggio con latte intero non è autorizzato dalla UE.

Le caseine sono etero proteine contenente fosforo. Questi gruppi fosforici sono importanti sia per la struttura della proteina che per la sua proposta funzione. Infatti questo gruppo, caricato negativamente al pH del latte, è in grado di legare ioni calcio e magnesio, da cui la supposta funzione di questa proteina, cioè quella di carrier di calcio minerale. Sono anche quasi tutte piuttosto idrofobiche. La conformazione delle caseine è simile a quella di proteine denaturate a causa della presenza di un alto numero di residui di prolina che impedisce alla proteina di potersi ripiegare per formare strutture più ordinate; inoltre, le caseine non possiedono ponti disolfuro, in grado anch'essi di conferire alla proteina una struttura più ordinata.

Ottenuta per coagulazione del latte scremato, è commercializzata come caseinato di sodio e potassio e assume nel vino, carica positiva. La sua flocculazione è esclusivamente dovuta all'acidità del mezzo, molto vicino al suo punto isoelettrico, mentre la presenza dei tannini è necessaria per la precipitazione e la chiarifica. Pertanto è indicata per la chiarificazione dei vini bianchi, carenti in colloidali elettronegativi. Interagisce con i polifenoli, attuando così un'azione decolorante e di prevenzione nei confronti della maderizzazione, oltre che deodorante e di sottrazione di parte del ferro ossidato. La quantità utilizzata è di 10 – 20 g/hl.

### **3.1.8.4 La Bentonite**

Le bentoniti sono dei silicati idrati di alluminio, composti principalmente di montmorillonite con una struttura semplificata,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Si}_4\text{O}_2$ ,  $\text{NH}_2\text{O}$ ; esse contengono cationi scambiabili ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ) che influenzano in modo rilevante le loro proprietà chimico-fisiche. L'impiego delle argille per la chiarifica e la stabilizzazione dei vini è un procedimento antico. Le bentoniti usate in campo enologico raramente vengono impiegate allo stato grezzo, sono, invece, sottoposte a trattamento di attivazione con acido solforico o sali alcalini; grazie alla loro elevata capacità di scambio ionico possono fissare ioni  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ : si ottengono perciò bentoniti acide, sodiche o calciche. Le bentoniti sodiche possiedono un forte potere adsorbente nei confronti delle proteine, pur essendo relativamente inerti dal punto di vista chimico; esse possono cedere qualche decina di mg/L di  $\text{Na}^+$ , tuttavia non hanno alcuna influenza sulle caratteristiche sensoriali, almeno quando vengono impiegate a dosi moderate. Il trattamento con bentonite rappresenta attualmente il processo più utilizzato per asportare le proteine in eccesso. In genere, sui vini rossi ha un effetto confrontabile a quello del collaggio proteico classico. Per quanto riguarda i vini bianchi, possono essere trattati con bentonite solo i bianchi poveri di polisaccaridi e di colloidali protettori che ostacolano la flocculazione e la sedimentazione delle particelle di bentonite. In genere, si raccomanda il trattamento con bentonite per la stabilizzazione sia per i vini rossi che per i bianchi; la chiarifica può essere ottenuta successivamente con un trattamento di collaggio o filtrazione.

### **3.1.9 Effetto della chiarifica sul profilo aromatico**

Le perdite in composti volatili, durante il collaggio, dipendono dal vino, dalla composizione della colla e dalla dose impiegata. Ciascuna colla presenta un'affinità particolare nei confronti dei composti aromatici. Interazioni tra proteine e sostanze volatili dipendono molto dalla natura chimico-fisica delle molecole coinvolte. In generale, le proteine trattengono le molecole volatili attraverso interazioni idrofobiche reversibili, adsorbimento o assorbimento, e/o con legami chimici di diversa intensità. La forza di interazioni dipende dalla capacità della molecola volatile di indurre una modificazione della proteina. Le interazioni tra le sostanze aromatiche volatili e composti non volatile sono di due tipi:

- attrattive (fissazione di composti volatili su substrato non volatile)
- repulsive (rilascio dei composti volatili).

Tali interazioni sono, dunque, strettamente dipendenti dalle caratteristiche chimico-fisiche della proteina e della molecola aromatica. Tra le diverse proteine nei prodotti alimentari, l' $\beta$ -lattoglobulina è una delle più conosciute e più studiate. Questa sieroproteina del latte è stata ampiamente caratterizzata, ha buone proprietà emulsionanti (Batte t al.,1994) ed è nota l'interazione con molti composti aromatici volatili, come ad esempio aldeidi e chetoni (O'Neill et al.,1987), iononi (Dufour et al., 1990), e idrocarburi (Wishnia et al.,1966). Tuttavia, le molecole aromatiche hanno diverso comportamento in relazione alle classe chimica. Ad esempio, acidi a corta catena e metilpirazine (Pelletier et el.,1998) non interagiscono con la  $\beta$ -lattoglobulina, mentre le metossipirazine interagiscono con la  $\beta$ -lattoglobulina (Reiners et al.,2000). Sono state, inoltre, osservate interazioni idrofobiche tra esteri e  $\beta$ -lattoglobulina, a causa dell'aumento di affinità quando la lunghezza di una delle due catene idrofobiche aumenta (Pelletier et el.,1998). La  $\beta$ -lattoglobulina in soluzione acquosa induce una diminuzione della volatilità delle molecole aromatiche più idrofobiche, soprattutto a causa delle interazioni con la cavità centrale della proteina. Questa ritenzione induce una significativa diminuzione della percezione odorosa (Guichard et al., 2000). Recentemente, alcuni autori (Voilley et al.,1990) hanno studiato il ruolo delle macromolecole (mannani e pareti cellulari dei lieviti) nella perdita delle molecole aromatiche ed hanno ipotizzato i legami possibili tra due tipi di composti. I trattamenti di chiarifica (sono stati presi in esame bentonite e caseinato) sono risultati avere un ruolo maggiore nella ritenzione degli aromi rispetto alle macromolecole. L'ipotesi di fissazione di composti volatili ad opera delle macromolecole da sola, quindi, non spiega la perdita di aroma osservato nel vino. L'effetto del trattamento di chiarifica svolto gioca un ruolo innegabile nella perdita di parte dei composti aromatici.

Anche i trattamenti di chiarifica con agenti di natura non proteica come la bentonite e la silice hanno mostrato avere effetti sull'intensità aromatica dei vini. In uno studio su vini spagnoli Armada et al., 2007 hanno dimostrato che l'uso di bentonite nei vini causa una diminuzione del contenuto globale di terpeni e norisoprenoidi C13 (13%) e Alcoli C6 (33%), composti responsabili rispettivamente dell'aroma varietale e prefermentativi, mentre il gel di silice come agente chiarificante è più adatto per i vini elaborati da uve aromatiche. Infatti, quando si è impiegato il gel di silice sia il contenuto globale di terpeni che i norisoprenoidi C13 è aumento di circa il 25%, mentre si è osservata una riduzione del contenuto in composti C6 consentendo di avere vini con meno odori erbacei che mascherano in misura minore il tipico aroma terpenico (floreale).

### 3.1.10 Microestrazione in fase solida dello spazio di testa statico (HS-SPME)

Questa metodologia, sviluppata nei primi anni '90 da Arthur e Pawliszyn per studiare gli inquinanti nelle acque ed estesa, in seguito, all'analisi del *flavour* degli alimenti, negli ultimi anni ha sostituito quella del *purge and trap* per il pre-arricchimento del campione prima dell'analisi cromatografica. Tale tecnica può essere applicata con successo sia per i composti polari che per quelli apolari sia allo stato solido, che liquido o gassoso e può essere facilmente accoppiata a diverse metodologie strumentali separative (GC e HPLC) accoppiati a rivelatori come l'MS. (Kataoka et al., 2000). La SPME presenta i vantaggi di essere sensibile, semplice, poco laboriosa e di non implicare l'uso di solventi. D'altro canto, però, tale tecnica analitica presenta alcuni svantaggi: oltre ad essere piuttosto dispendiosa in termini di tempo, può comportare il rischio di contaminazioni ed eventuale formazione di artefatti dovuta all'uso di temperature elevate (Kataoka et al., 2000)

#### 3.1.10.1 Principio di funzionamento.

Il procedimento di concentrazione/estrazione degli analiti mediante HS-SPME è illustrato in fig 3.1.10.1

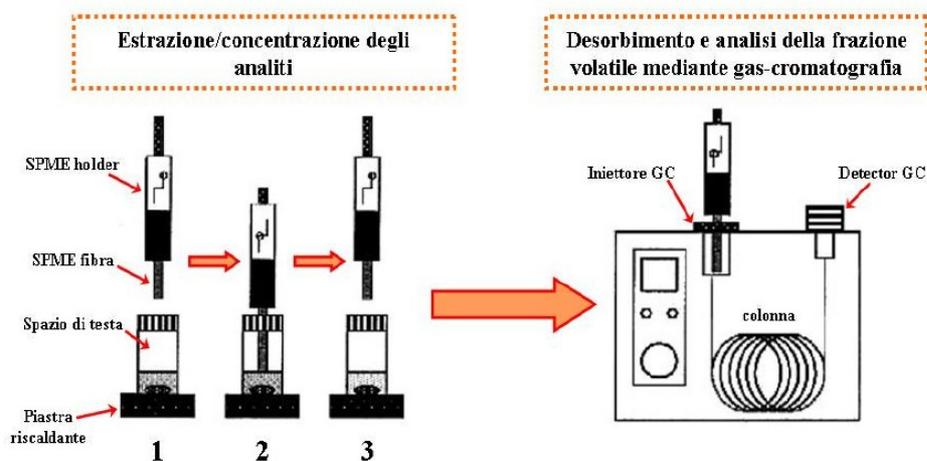


Fig 3.1.10.1 Procedimento di concentrazione/estrazione della frazione volatile mediante analisi HS-SPME e successivo desorbimento/analisi mediante analisi gas-cromatografica.

Fase 1. Forare il setto della vial contenente il campione;

Fase 2. Esporre la fibra allo spazio di testa;

Fase 3. Rimuovere l'holder.

La tecnica prevede una prima fase di concentrazione/estrazione dei componenti volatili (fig 3.1.10.1 fasi 1 e 2) mediante l'esposizione allo spazio di testa di una fibra in silice fusa rivestita da un film relativamente sottile di fase stazionaria polimerica. Durante questa fase si stabilisce un equilibrio tra le concentrazioni degli analiti presenti nello spazio di testa del campione e il rivestimento dei polimeri sulla fibra. La quantità di analita adsorbita sulla

fibra dipende dallo spessore del polimero e dal tempo/temperatura di esposizione; la selettività può essere alterata attraverso il cambiamento del tipo di polimero di rivestimento o del suo spessore, in quanto i composti volatili richiedono un rivestimento più spesso rispetto ai composti semivolatili (Kataoka et al., 2000; Wardenki et al., 2004).

Dopo un opportuno tempo di estrazione, la fibra viene ritirata nell'ago e rimossa dalla vial contenente il campione (fig 3.1.101.1, fase 3) per essere inserita direttamente nell'iniettore del GC per la successiva fase di desorbimento.

Per ottenere una maggiore accuratezza e precisione attraverso l'analisi SPME, sono molto importanti sia il tempo di campionamento che gli altri parametri utili per raggiungere l'equilibrio nello spazio di testa del campione. Inoltre è molto importante scegliere la misura della vial che deve essere usata per il campionamento così come la scelta del volume di campione da utilizzare, che deve restare costante. Esistono due metodiche di campionamento mediante l'utilizzo della fibra: una che prevede l'immersione della fibra nel campione e l'altra che invece prevede l'esposizione della fibra allo spazio di testa del campione. Le due metodiche si basano su una diversa cinetica di migrazione dei composti volatili sulla fibra, anche se entrambi gli approcci sono risultati complementari (Yang e Peppard, 1994).

Quando si effettua un campionamento mediante l'immersione della fibra nella soluzione da analizzare, è importante che la lunghezza della fibra immersa nel campione sia sempre la stessa. Per ottenere una maggiore sensibilità utilizzando l'esposizione della fibra allo spazio di testa e non immergendola direttamente nel campione, la quantità di campione da analizzare dovrebbe essere minima in modo da aumentare lo spazio di testa (Zhang e Pawliszyn, 1993). Infatti l'equilibrio dei composti è ottenuto molto più rapidamente nello spazio di testa del campione che immergendo la fibra, perché gli analiti possono diffondere più rapidamente attraverso lo spessore della fibra. Queste caratteristiche possono essere manipolate per migliorare l'adsorbimento selettivo dei componenti del campione, in modo appropriato. L'utilizzo dello spazio di testa è ideale per minimizzare le interferenze con l'analita e prolungare la shelf-life della fibra (Zhang e Pawliszyn 1993). La microestrazione in fase solida può essere usata rapidamente per effettuare uno screening di campioni o quando usata come metodo estrattivo insieme alla presenza di uno standard interno, può essere un valido aiuto per un'analisi quantitativa. Il numero di estrazioni che possono essere effettuate con una singola fibra dipende dalla cura con cui si effettua il montaggio e con cui si opera, ma anche dalla natura dei composti dei campioni che vengono analizzati. Nella maggior parte dei casi, con una fibra è possibile effettuare dalle 50 alle 100 estrazioni (Bollettino Supelco 923, 1998).

### 3.1.10.2 Parametri che influenzano l'efficienza estrattiva del SPME

Nei prodotti alimentari o nelle matrici complesse spesso è riscontrabile un vasto numero di analiti presenti in piccole quantità e per questo motivo è necessaria la preparazione di campioni alimentari e la preconcentrazione di analiti per l'analisi finale. Le tecniche che prevedono l'analisi dello spazio di testa (come ad esempio lo spazio di testa dinamico, statico, SPME) rappresentano una vera garanzia in questo ambito (Sides et al., 2000, Snow e Slack, 2002). L'analisi SPME in special modo è capace di soddisfare maggiormente queste richieste ed è per questo che negli ultimi anni sono aumentate le pubblicazioni scientifiche riguardo l'uso di tale tecnica. L'efficacia della preconcentrazione degli analiti con la tecnica SPME dipende da molti parametri come: il tipo di fibra, il volume del campione, il tempo e la temperatura di estrazione, il metodo di estrazione, il desorbimento degli analiti dalla fibra e l'eventuale aggiunta di sale. (Supelco Note 56, 1998; Zhang e Pawliszyn, 1993).

### 3.1.10.3 Tipi di fibre

La sensibilità della tecnica della microestrazione dipende principalmente dal valore di una costante di distribuzione degli analiti ripartiti tra il campione e la fase stazionaria della fibra adsorbente. Quindi la quantità di composti adsorbiti dal rivestimento della fibra può essere calcolato mediante la seguente formula:

$$n=C_0*V_1*V_2*K/(K*V_1+V_2)$$

dove n è la massa assorbita dal rivestimento

V<sub>1</sub> e V<sub>2</sub> sono i volumi del rivestimento e della soluzione

K è il coefficiente di ripartizione dell'analita tra il rivestimento e la soluzione

C<sub>0</sub> è la concentrazione iniziale dell'analita nella soluzione da analizzare.

Il tipo di fibra dovrebbe essere scelto in base alle specie che si vogliono analizzare, la regola generale "il simile scioglie il simile" applicata alla SPME è vera, per es. i composti polari sono assorbiti da fibre polari e i composti non polari da fibre non polari. In commercio esistono diversi tipi di fibre come è possibile osservare dalla tab 3.1.10.3

Tab 3.1.10.3 Diversi tipi di fibre adsorbenti disponibili in commercio. Tratto dal bollettino 923 di Supelco, 1998

Stationary Phase	Recommended Use
<b>Polydimethylsiloxane (PDMS)</b>	
100µm/ non-bonded	Volatiles
30µm/ non-bonded	Non polar semivolatiles
7µm/ non-bonded	Moderately polar to non polar semivolatiles
<b>Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB)</b>	
65µm/ partially crosslinked	Polar semivolatiles
60µm/ partially crosslinked	General purpose (for HPLC only)
<b>Carbowax/Divinylbenzene (CW/DVB)</b>	
65µm/ partially crosslinked	Polar analytes
<b>Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)</b>	
50µm/ partially crosslinked	Surfactants (for HPLC only)
<b>Polycrylate</b>	
85µm/ partially crosslinked	Polar semivolatiles

L'efficienza della preconcentrazione dipende non solo dal tipo di fibra usato ma anche dallo spessore della fibra. Nell'SPME, comunque, poichè solo 1 cm di fibra è esposta al campione, il rivestimento della fibra deve essere o non polare o fortemente polare. Le piccole differenze della polarità della fase stazionaria che sono usate in gas-cromatografia potrebbero non produrre un apprezzabile differenza di selettività nel caso dell'analisi SPME (Bollettino Supelco 923, 1998). Film spessi, permettono l'estrazione di un più alto numero di analiti paragonati all'utilizzo di film sottili. Le fibre con film spessi sono molto più efficaci nel caso di composti volatili, consentendo un migliore trasporto all'iniettore gas-cromatografico senza perdite. D'altro canto, le fibre con film sottili sono raccomandate per l'isolamento e la preconcentrazione di sostanze con un alto punto di ebollizione perché consentono fasi di estrazione e desorbimento realizzabili in tempi relativamente brevi (Wardencki *et al.*, 2004). L'effetto dello spessore del film (PDMS polydimethylsiloxane) di una fibra SPME sulla efficienza di arricchimento e selezione dei composti dopo 15 minuti di esposizione ad una soluzione acquosa è mostrato in tab 3.1.10.4

Tab 3.1.10.4 Effetto dello spessore che ricopre la fibra SPME sul recupero dei analiti (fibre di PDMS, campione esposto per 15 minuti). Tratto dal bollettino 923 di Supelco, 1998

Analyte	Fiber coating thickness on relative recovery (%)		
	100µm	30µm	7µm
Benzene	2	1	<1
Toluene	5	1	<1
Ethylbenzene	6	4	1
1,3-Dichlorobenzene	15	5	1
Naphthalene	13	4	1
Fluorene	29	18	6
Phenanthrene	37	27	16
Anthracene	49	38	32
Pyrene	69	54	47
Chrysene	100	100	100
Benzo(a)anthracene	105	91	96
Benzo(a)pyrene	119	127	131

Un rivestimento della fibra spesso avrà una maggiore estrazione di alcuni analiti rispetto a un rivestimento sottile, mentre un rivestimento sottile è usato per permettere una rapida diffusione e un rilascio di composti con un più alto punto di ebollizione durante il desorbimento termico (Wardencki *et al.*, 2004). È importante che la fibra venga pulita prima dell'analisi di ciascun campione allo scopo di rimuovere i contaminanti che forniscono un alto rumore di fondo al cromatogramma. La pulizia può essere fatta inserendo la fibra in un iniettore ausiliare.

### 3.1.10.4 Volume di campionamento

All'inizio, quando si sono effettuati i primi studi mediante l'SPME, per incrementare l'efficienza di estrazione, si tendeva a minimizzare il volume dello spazio di testa nella vial (Yang e Peppard, 1994; Pawliszyn, 1997). In genere, la vial è riempita a metà delle sue capacità, ma in uno studio effettuato da Pawliszyn nel 1997 è stato dimostrato come l'equilibrio raggiunto è tre volte più veloce mettendo 1 cm<sup>3</sup> di liquido in una vial da 5 cm<sup>3</sup>, anziché mettendo 10 cm<sup>3</sup> di liquido in una vial da 50 cm<sup>3</sup> (Pawliszyn, 1997).

### **3.1.10.5 Temperatura e tempo di estrazione**

La costante di distribuzione di una sostanza tra la fibra e il campione dipende anche dalla temperatura. Un incremento della temperatura di estrazione facilita il trasporto degli analiti dalla soluzione allo spazio di testa, accelerando l'adsorbimento di particolari sostanze sulla fibra. D'altra parte, un eccessivo incremento della temperatura può causare un prematuro desorbimento di analiti. Generalmente, la temperatura ottimale dipende dalla composizione della matrice, dai composti e dalla fase stazionaria usata. Il tempo di esposizione è un altro fattore importante, un tempo più lungo favorisce l'occupazione di molti siti sulla fibra da parte delle molecole dell'analita, ma un tempo prolungato, quando tutti i siti sono occupati, non ha effetto sull'efficienza della preconcentrazione e in qualche caso può causare desorbimento (Zhang e Pawliszyn, 1993). Il tempo e la temperatura sono parametri strettamente collegati tra loro, (Mestres et al., 2000) ad es. un incremento di temperatura richiede un tempo di analisi più breve, perciò accelera il tempo di analisi.

### **3.1.10.6 Sale**

L'aggiunta del sale aumenta l'efficienza di estrazione di molti analiti, in particolare quella di composti polari e volatili ma nello stesso tempo diminuisce la solubilità degli stessi in soluzione (Wardenki et al., 2004). Infatti, mediante l'aggiunta di sale l'equilibrio di ripartizione delle molecole in soluzione, a parità di temperatura, è spostato a favore della fase vapore da un aumento della polarità della soluzione iniziale a causa dell'aumento della forza ionica della soluzione. Il sale non è necessario per aumentare l'estrazione degli analiti con alti coefficienti di distribuzione, deve essere usato sempre in tracce e può introdurre picchi di interferenza (Bollettino Supelco 923, 1998).

### **3.1.10.7 Modalità di estrazione**

La fibra può essere esposta al campione in due modi, attraverso l'immersione diretta della fibra SPME all'interno della soluzione del campione (estrazione diretta) oppure mediante l'esposizione della fibra allo spazio di testa. Il campionamento dei composti volatili di un campione di una matrice complessa è generalmente realizzato mediante l'esposizione della fibra allo spazio di testa. In questo caso si prolunga la shelf-life della fibra, perché non c'è contatto diretto con il campione (Wardencki et al., 2004). D'altra parte, immergendo direttamente la fibra all'interno della soluzione è possibile l'estrazione di composti volatili in tracce, ma in questi casi, la fibra usata si deteriora più facilmente, aumentando i costi dell'analisi. (Kataoka et al., 2000).

### **3.1.10.8 Desorbimento degli analiti dalla fibra**

La selezione dei parametri di desorbimento è ugualmente importante per ottimizzare le condizioni di estrazione (Wardencki et al., 2004). Generalmente è usato il desorbimento termico nell'iniettore del gas cromatografo che deve avvenire nel più breve tempo possibile ad una temperatura dell'iniettore più alta del punto di quella di ebollizione dei composti, nei limiti dalla resistenza termica della fibra usata.

### **3.1.10.9 Derivatizzazione**

Gli analiti sono frequentemente presenti nei campioni in tracce e in una miscela complessa. I componenti di una matrice che sono simili o presenti ad alte concentrazione possono interferire, o spesso ostacolare, la loro determinazione. A tal fine viene usata la conversione in derivati. Tuttavia, durante il processo di derivatizzazione gli analiti acquisiscono nuove proprietà fisiche e chimiche, che potrebbero interferire con la rilevazione degli analiti stessi (Wardencki et al., 2001, 2003).

### **3.1.10.10 Applicazione agli alimenti**

Negli ultimi dieci anni, l'applicazione dell'HS-SPME accoppiata all'analisi GC, GC-MS, HPLC e LC-MS, agli alimenti e alle modificazioni indotte dai processi alimentari ha subito un notevole sviluppo. Tale metodica, in particolare, è stata utilizzata nella la determinazione del *flavour* e degli *off-flavour* degli alimenti (Kataoka et al., 2000), per l'analisi dei contaminati presenti nelle acque (Arthur e Pawliszyn, 1990), nell'analisi dei pesticidi isolati da differenti matrici (Wan, 1995; Jimenez et al., 1998; Beltran et al., 2000; Fidalgo-Used et al., 2003), nella determinazione dei residui di solventi negli oli vegetali (Evans et al., 1997; Grimaldi et al., 1999) e nell'analisi dei composti dell'aroma (Chin et al., 1996; Ferreira et al., 1996; Galipo et al., 1999; Rocha et al., 2001) e nell'analisi dello spazio di testa di piante aromatiche e medicinali (Bicchi et al., 2000).

### **3.1.10.11 Applicazione al vino**

La composizione delle molecole aromatiche del vino è molto complesso sia per la differente struttura dei costituenti (fattori endogeni) sia per l'influenza di fattori esogeni quali l'ambiente (suolo, clima), la varietà di uva e lo stadio di maturazione, le condizioni di fermentazione (ceppo di lievito impiegato) ed il processo di produzione (Bonino *et al.*, 2003). Esso è costituito da diverse classi di composti chimici volatili come idrocarburi, terpeni, alcoli, esteri, aldeidi e acidi. Ad eccezione di pochi composti presenti in alta

concentrazione (100 mg/l), la maggior parte di questi è presente in concentrazioni dell'ordine dei  $\mu\text{g/l}$  o  $\text{ng/l}$ . Di conseguenza, prima dell'analisi è necessaria l'estrazione e la concentrazione della maggior parte dei componenti. De la Calle Garcia *et al.*, a partire dal 1996 hanno effettuato diversi studi sulla caratterizzazione dei componenti il bouquet del vino usando entrambe le metodologie di campionamento: l'immersione diretta della fibra nel vino e l'esposizione della fibra allo spazio di testa del campione. L'analisi ottenuta con l'esposizione al fibra allo spazio di testa del campione ha generato profili più complessi del bouquet del vino rispetto a quello ottenuto per immersione diretta della fibra (De la Calle Garcia *et al.*, 1996; 1997).

In conclusione, la tecnica SPME è quella più usata per l'isolamento delle molecole volatili per l'analisi GC o GC-MS o LC-MS o HPLC (Wardencki *et al.*, 2004). Sia l'analisi qualitativa che quantitativa presentano alcuni vantaggi:

- un tempo di preparazione dei campioni molto ridotto
- l'eliminazione dei solventi organici tossici
- la possibilità di analizzare composti semi-polari e non polari in campioni gassosi, liquidi o solidi
- l'alta sensibilità verso alcune classi di composti, anche se tale sensibilità dipende dal detector usata
- la necessità di un piccolo volume di campione
- un costo relativamente basso di analisi
- la sensibilità per l'automazione
- l'utilizzo di una strumentazione semplice e possibilità di campionamento in situ

Gli svantaggi legati alla tecnica della microestrazione in fase solida riguardano il recupero relativamente basso degli analiti in alcune condizioni e la bassa precisione delle determinazioni, secondo alcuni autori, che limitano la possibilità di un'accurata analisi qualitativa e quantitativa.

### 3.2 *Scopo*

Nell'ultimo decennio la vendita di vini autoctoni Campani è aumentata rispetto a quelli alloctoni. Una recente indagine dal titolo "La risorsa Genetica della vite in Campania" (2001) riporta 34 varietà di viti non ancora riportate nel Registro nazionale.

Tra queste, le due varietà autoctone – Pallagrello Bianco e Nero- allevate nell'area casertana compresa nella IGT Terre del Volturno.hanno dimostrato un buon potenziale aromatico e polifenolico, come precedentemente riportato, per la produzione di vini.

Come nel caso dei polifenoli, mancano tuttavia studi di caratterizzazione aromatica importanti nella "obiettivizzazione" dei descrittori aromatici inseriti come parametri qualitativi nel disciplinare di produzione del vino IGT.

E' noto che, a differenza del vino rosso dalla più complessa qualità sensoriale dovuta sia alle "note gustative" derivanti dalla frazione polifenolica che da quella aromatica, solo quest'ultima contribuisce in maniera preponderante alla qualità sensoriale del vino bianco. Le molecole aromatiche, in generale, derivano dalla cv impiegata (terpeni, nor-soprenoidi, esteri) e dall'attività fermentativa dei lieviti (esteri, alcoli, aldeidi, chetoni e terpeni liberati dai precursori glucosidici inodori).

I terpeni ed i norisoprenoidi sono metaboliti secondari della pianta e come tali possono essere usati come marcatori molecolare della cultivar in quanto non modificati dal processo di vinificazione.

L'obiettivo del lavoro è stato, dunque, quello di determinare il profilo terpenico e norisoprenoide mediante l'uso di HS-SPME-GC/MS delle due cultivar Pallagrello Bianco (PB) e Pallagrello Nero (PN) e dei relativi vini in confronto rispettivamente con l'uva ed il vino Fiano (F) e Aglianico (A).

In tale ambito è stato studiato "*in vitro*" l'effetto dei più comuni collanti usati nella pratica enologica per la chiarificazione del mosto e del vino in confronto a quello delle due frazioni caseiniche  $\alpha$ -CN e  $\beta$ -CN, sul livello quantitativo di 5 molecole terpeniche ed un norisoprenoide ( $\alpha$ -pinene, 3-carene, limonene, linalolo, bornilacetato e  $\alpha$ -ionone) aggiunte in quantità note ad una soluzione acido-alcolica (simil vino) ed a un vino bianco neutro.

### **3.3 Materiali e metodi**

#### **3.3.1 Analisi delle sostanze aromatiche**

##### **3.3.1.1 Estrazione dei composti volatili con SPME**

Questo tipo di analisi è stata realizzata utilizzando una fibra di polimetilossano/divinilbenzene (PDMS/DVB), in equilibrio nello spazio di testa di 250  $\mu$ l di campione, aggiunti di 20 g di sale, per 45 minuti. Il desorbimento è stato effettuato alla temperatura di 250°C dell'iniettore per 60 secondi.

##### **3.3.1.2 Analisi GC/MS**

Le analisi gas-cromatografiche sono state realizzate con un gas-cromatografo HP6890N (Agilent Technologies) munito di un iniettore split/splitless, accoppiato con uno spettrometro di massa HP5973 dotato di una sorgente ad impatto elettronico (70 eV) ed analizzatore a singolo quadrupolo. È stata utilizzata una colonna capillare HP5ms (30 m  $\times$  0,32 mm). La temperatura del forno è stata programmata da 40°C a 180°C con un incremento di temperatura di 3°C al minuto. La temperatura del rilevatore è stata mantenuta costante a 280°C e quella dell'iniettore a 250°C. La velocità del flusso dell'elio, utilizzato come gas di trasporto, è stata fissata a 1 ml/minuto.

I componenti volatili sono stati identificati mediante confronto degli spettri sperimentali con quelli riportati nella libreria NIST MS e con quelli ottenuti iniettando composti di riferimento standard.

Le analisi sono state effettuate in modalità SCAN (range 45-330 Da) e SIM (Selected Ion Monitoring). Le determinazioni quantitative delle molecole di interesse sono state effettuate mediante costruzione di rette di taratura in matrice, nel range di verificata linearità.

#### **3.3.2 Prodotti chimici e reagenti:**

L' $\alpha$ -pinene, il 3-carene, il linalolo, il limonene, l' $\alpha$ -ionone ed il bornilacetato (98%), l'1-ottanolo (IS) (99,8%) sono stati forniti dalla ditta Sigma-Aldrich, l'albumina (ALB) dalla ditta Laffort, la gelatina (GEL) dalla ditta Enartis, il caseinato (CAS) dalla ditta DalCin.

Le frazioni caseiniche  $\alpha$ s e  $\beta$  di vacca sono state preparate a partire dalla caseina intera secondo la procedura di Zittle e Custer.

### 3.3.3 Composizione e preparazione delle soluzioni modello

Il soluzione modello 1 è stata preparata sciogliendo 415 ppb di linalolo, 598 ppb di limonene, 498 ppb di bornilacetato, 518 ppb di 3-carene, 628 ppb di  $\alpha$ -pinene, 555 ppb di  $\alpha$ -ionone e 447 ppb di 1-ottanolo (IS) in una soluzione di EtOH 13%, contenente 7 mg/L di acido tartarico (pH=3,3). La soluzione modello 2 è stata preparata aggiungendo le stesse quantità di terpeni ad un vino bianco commerciale pH=3, dopo averne verificato la trascurabilità del contenuto terpenico “endogeno” rispetto a quello “esogeno” aggiunto. Le soluzioni sono state sottoposte a 6 “processi di chiarifica over-night” in presenza dello 0,05% sia di caseinato che di ciascuna frazione caseinica  $\alpha$   $\beta$  bovina, dello 0,01% sia di gelatina che albumina e dello 0,1% di bentonite, come raccomandato (escluso il caso dell' $\alpha$  e  $\beta$ -CN) dai produttori in etichetta.

### 3.3.4 Analisi GC/MS

Di ogni soluzione modello, prima e dopo la “chiarifica”, è stato determinato il livello delle 5 molecole terpeniche mediante microestrazione in fase solida HS-SPME ed analisi GC/MS, secondo la procedura di Nasi et al, 2008

Le analisi gas-cromatografiche sono state realizzate con un gas-cromatografo HP6890N (Agilent Technologies) munito di un iniettore split/splitless, accoppiato con uno spettrometro di massa HP5973 dotato di una sorgente ad impatto elettronico (70 eV) ed analizzatore a singolo quadrupolo. È stata utilizzata una colonna capillare HP5ms (30 m  $\times$  0,32 mm). La temperatura del forno è stata programmata da 40°C a 180°C con un incremento di temperatura di 3°C al minuto. La temperatura del rilevatore è stata mantenuta costante a 280°C e quella dell'iniettore a 250°C. La velocità del flusso dell'elio, utilizzato come gas di trasporto, è stata fissata a 1 ml/minuto.

I componenti volatili sono stati identificati mediante confronto degli spettri sperimentali con quelli riportati nella libreria NIST MS e con quelli ottenuti iniettando composti di riferimento standard.

Le analisi sono state effettuate in modalità SCAN (range 45-330 Da) e SIM (Selected Ion Monitoring).

### **3.4 Risultati**

#### **3.4.1 Determinazione aromatica dell'uva Pallagrello Bianco**

Nella tab.1 sono riportate le molecole volatili con i relativi descrittori odorosi identificate nell'uva mediante analisi HS-SPME/GC/MS in modalità SCAN.

I primi quattro composti esanale, 2-esenale, 2-esen-1-olo e 1-esanolo sono responsabili della cosiddetta “nota erbacea” che si avverte nell'uva non matura (Ribéreau-Gayon et al.,1998). Sono stati rilevati, inoltre, molti esteri, aldeidi, chetoni ed acidi i cui descrittori sono identificati ed indicati in tabella.

L'identificazione dei terpeni è stata effettuata mediante confronto con i tempi di ritenzione con gli spettri di standard di riferimento. Nell'uva in esame operando in modalità SIM (Selected Ion Monitoring) sono stati individuati il limonene, il 3-carene, il 4-carene, il linalolo, l' $\alpha$ -terpineolo, l' $\alpha$ -ionone e l'isobornilacetato (tab 2).

Queste molecole sono state quantificate mediante di costruzione di rette di taratura in matrice, nel range di verificata linearità. È stato possibile quantificare (fig 1) solo il 3-carene, l' $\alpha$ -terpineolo e l' $\alpha$ -ionone perché in concentrazioni superiori ai limiti di rilevabilità. Confrontando il profilo terpenico dell'uva Pallagrello Bianco (PB) con quello del Fiano (F) i risultati hanno messo in evidenza l' $\alpha$ -terpineolo, quale componente principale di entrambe le uve in ordine quantitativo PB>F, mentre il 3-carene e il  $\alpha$ -ionone discriminano le due cultivar.

#### **3.4.2 Evoluzione del profilo aromatico del vino Pallagrello bianco durante l'affinamento**

Nelle fig 3, 4, 5 e 6 vengono riportati i profili gas-cromatografici dei componenti la frazione aromatica corrispondenti ad altrettanti significativi stadi della fermentazione, inizio (1g) e fine (10g), e dell'affinamento in acciaio, 60 giorni e 180 giorni. Come riportato dalle relative identificazioni essi appartengono a diverse classi chimiche tra cui alcoli, aldeidi, chetoni, esteri e terpeni. Dal confronto tra queste composizioni si evince che il maggior numero di specie terpeniche, costituiti da limonene, linalolo,  $\alpha$ -ionone e  $\beta$ -damascenone, è presente solo dopo 180 giorni di affinamento. Degli alcoli superiori identificati il C6, dal caratteristico odore erbaceo è presente solo nei primi stadi della fermentazione a differenza dell'alcol feniletilico prodotto in un tempo successivo, ma presente fino allo stadio finale. La frazione più eterogenea è quella degli esteri, formata dagli acetati degli alcoli superiori e dagli etilati degli acidi grassi da C4 a C12. Alcuni sono presenti già nel mosto, altri si formano negli stadi successivi, altri sono presenti solo in alcuni stadi dell'affinamento. Allo scopo di una migliore visualizzazione delle variazioni

dei livelli quantitativi (%) più significativi di 7 esteri e di un alcol superiore (l'alcol feniletilico) durante i 80 giorni considerati sono stati riportati in fig 7. I risultati indicano che l'ottanoato ed il decanoato di etile sono i più abbondanti in ogni tempo, ma l'evoluzione del loro livello quantitativo è opposto, partendo dall'inizio fino a 180 giorni: alla massima concentrazione dell'ottanoato all'inizio della fermentazione corrisponde quella minima del decanoato; entrambi poi raggiungono la stessa concentrazione dopo 180 giorni. Considerando i rimanenti esteri e l'alcol feniletilico, tutti presenti ad un livello quantitativo inferiore rispetto ai primi due, si può concludere che la frazione aromatica del Pallagrello Bianco raggiunge la sua maggiore espressione aromatica a 74 giorni dall'inizio della fermentazione, sulla base del maggior numero di molecole alla loro massima concentrazione.

Confrontando la composizione terpenica dell'uva con quella del vino si evince un sensibile aumento delle molecole terpeniche già identificate nelle uve accompagnato dalla comparsa di nuovi terpeni probabilmente derivanti da precursori glicosilati in conseguenza a peculiari condizioni di processo (pH, idrolisi enzimatica).

Per quanto riguarda i vini "fiore" (fig 2), il Pallagrello Bianco differisce dal Fiano di riferimento per la maggiore presenza di  $\alpha$ -terpineolo e per la presenza in tracce di linalolo,  $\alpha$ -pinene, limonene e 3-carene.

Perciò, considerando che è consuetudine il taglio dei vini anche nella produzione di DOC e DOCG, l'aggiunta di Fiano nella produzione di Pallagrello Bianco aumenterebbe la nota "agrumata" per il maggiore apporto di limonene e linalolo.

### **3.4.3 Determinazione della composizione aromatica del Pallagrello Nero mediante analisi GC/MS**

La caratterizzazione aromatica dell'uva Pallagrello Nero è stata effettuata nelle stesse condizioni operative utilizzate per l'uva Pallagrello Bianco.

Le molecole odorose sono state separate ed identificate mediante gas cromatografia/spettrometria di massa (GC/MS), utilizzando metodi SCAN e SIM. Gli spettri di frammentazione dei componenti odorosi sono stati confrontati con quelli riportati nella libreria NIST MS e con quelli ottenuti iniettando molecole standard.

Nella tab.3 sono riportate le molecole volatili con i relativi descrittori odorosi identificate nell'uva.

Anche nel caso dell'uva Pallagrello Nero, i primi tre composti, esanale, 2-esenale, 1-esanolo, dal tipico descrittore odoroso erbaceo; tali molecole sono generalmente presenti in quantità rilevanti in uve non aromatiche (N. Carro et al).

Sono state identificate anche molecole aromatiche appartenenti alla classe delle aldeidi, come eptanale e nonanale, anch'esse associate a descrittore erbaceo.

Nell'uva, inoltre, sono già presenti alcuni esteri etilici e acetici come l'esanoato di etile, l'esil acetato, l'ottanoato di etile e il decanoato di etile, probabilmente prodotti di degradazione enzimatica dell'uva e/o originatisi da attività prefermentativa ad opera di lieviti endogeni.

I terpeni identificati (tab 4) nell'uva sono il 3-carene, il  $\alpha$ -pinene, il limonene, il linalolo, il bornilacetato, un derivato terpenico, e l' $\alpha$ -ionone, un norisoprenoide, quest'ultimo è stato l'unico in quantità misurabili, gli altri erano presenti in tracce, rilevabili solo operando in modalità SIM (Selected Ion Monitoring).

Confrontando il Pallagrello Nero all'Aglianico, i risultati hanno evidenziato la presenza del solo  $\alpha$ -ionone in entrambe le cultivar ad un livello quantitativo paragonabile (fig 8).

#### **3.4.3.1 Identificazione dei composti aromatici del vino Pallagrello Nero**

Come per l'uva, anche in questo caso le molecole odorose sono state separate ed identificate mediante analisi GC/MS, utilizzando metodi SCAN e SIM al fine di definire un profilo sia qualitativo che quantitativo.

Nella tab. 5 sono riportati le molecole individuate con il metodo SCAN nei campioni di vino svinato e ad 1 mese in confronto con quelle del relativo mosto aziendale.

Dall'analisi della tabella, si può notare che, tutti i terpeni identificati nell'uva sono stati ritrovati anche nel vino

Dal confronto con il vino fiore Aglianico (fig 9) è stato evidenziato e quantificato il  $\beta$ -citronellolo, perciò considerando che questo vino è utilizzato per il taglio nella produzione di Pallagrello Nero; questi risultati hanno dimostrato che questa procedura può avere un fondamento scientifico nel più elevato contenuto di limonene e di  $\beta$ -citronellolo nell'Aglianico, che possono contribuire ad ottenere una maggiore nota agrumata nel vino Pallagrello Nero.

Le aldeidi (pentanale, esanale e 2-esenale), originatesi per ossidazione enzimatica degli acidi linolenico e linoleico, al momento della trasformazione in succo dell'uva, sono state identificate nell'uva, mentre non sono più rilevabili già nello svinato.

Per quanto riguarda gli alcoli, l'alcol isoamilico e l'1-esanolo sono presenti sia nel mosto che nei vini, a differenza del 1-octen-3-olo rilevato esclusivamente nel primo.

Gli esteri, che, come noto, si formano principalmente dal metabolismo dei lieviti, si presentano, come era da attendersi, in misura maggiore nel vino; infatti, agli esteri presenti in tracce nell'uva (etil esanoato e etil acetato) si aggiungono 14 molecole di neoformazione nel vino.

### **3.4.4 Determinazione del livello quantitativo dei terpeni prima e dopo la “chiarifica in vitro” con i collanti commerciali**

#### **3.4.4.1 Soluzione modello 1**

Nella fig. 10 sono riportati, sotto forma di istogrammi, i livelli quantitativi delle cinque molecole aromatiche prima e dopo la “chiarifica” della soluzione modello 1 con CAS, ALB, GEL e BEN. I risultati indicano che gli idrocarburi ciclici ( $\alpha$ -pinene, 3-carene e limonene) subiscono, dopo ogni processo, un decremento quantitativo con ogni chiarificante (tab1) nell'ordine CAS>ALB>GEL>BEN. Ognuna delle restanti tre molecole vengono adsorbiti in quantità minore solo con alcuni dei quattro collanti; in particolare, il bornilacetato viene “adsorbito” solo dalla gelatina, che, nello stesso tempo risulta “inerte” nei confronti dell' $\alpha$ -ionone. Quest'ultimo esibisce decrementi molto simili dopo i trattamenti con CAS, ALB e BEN. Infine, il linalolo non mostra nessuna differenza quantitativa dopo ognuna delle quattro “chiarifiche”. Dal momento che i) gli idrocarburi ciclici sono più apolari di quelli a catena aperta recanti un gruppo funzionale polarizzabile e che ii) le proteine sono caratterizzate dalla contemporanea presenza di sequenze idrofile ed idrofobe caratteristiche, si può concludere che tra queste due classi di composti si stabiliscono interazioni idrofobiche che risultano più intense con la caseina rispetto alle altre proteine. Su questi presupposti si spiegherebbe anche la minore interazione delle stesse molecole con la bentonite per il suo maggiore carattere idrofilo.

#### **3.4.4.2 Soluzione modello 2**

Questi andamenti vengono in gran parte confermati anche nel vino (fig.11) Confrontando tra loro i risultati ottenuti nelle 2 prove “*in vitro*” si evince la stessa gerarchia tra i collanti proteici, ma non quella tra questi e la bentonite probabilmente per la diversa forza ionica del vino ed in particolare del minore valore di pH. Questo risultato comunque necessita di ulteriori approfondimenti.

### 3.4.5 Determinazione del livello quantitativo dei terpeni prima e dopo la “chiarifica in vitro” con le frazioni caseiniche $\alpha$ s e $\beta$

Al fine di discriminare collanti proteici caratterizzati nello stesso tempo da buone attitudini chiarificanti e scarsa interazione con le molecole volatili, dalla caseina bovina sono state estratte le frazioni  $\alpha$ s ( $\alpha$ s1+ $\alpha$ s2) e  $\beta$ -CN a tale scopo. La prima frazione è caratterizzata da una elevata idrofilicità per la presenza di un elevato numero di gruppi fosfato idrofili (9 sull' $\alpha$ s1 e 13 sull' $\alpha$ s2 ) e dal maggior numero di amminoacidi aventi gruppi ionizzabili in catena laterale rispetto alla  $\beta$ -CN (5 gruppi fosfato e un numero doppio di residui di prolina idrofobici). I decrementi subiti dalle 5 molecole terpeniche dopo la chiarifica “*in vitro*” in presenza delle due frazioni  $\alpha$ s-CN e  $\beta$ -CN sono mostrati nelle fig. 12 e 13 sotto forma di istogrammi. In entrambi i casi le due frazioni caseiniche determinano un decremento diverso da quello della caseina ed opposto tra loro. In particolare, l' $\alpha$ s-CN, rispetto sia alla caseina che alla  $\beta$ -CN, determina il minor decremento delle molecole terpeniche ed in misura maggiore nel vino rispetto alla soluzione alcolica sintetica. La  $\beta$ -CN, in particolare, determina il maggior decremento non solo rispetto all' $\alpha$ s-CN, ma anche alla stessa caseina in accordo con la sua più elevata idrofobicità. Questi risultati, tenendo presente quanto prima detto sulle caratteristiche idrofobiche ed idrofiliche delle due frazioni caseiniche, confermano il prevalente carattere idrofobico delle interazioni tra i terpeni ciclici e la caseina.

Delle altre tre molecole il bornilacetato, inerte alla CAS ed alla  $\beta$ -CN, subisce un decremento dell' 8,24% con l' $\alpha$ s-CN, l' $\alpha$ -ionone risulta inerte a tutte e due le frazioni caseiniche a differenza della caseina intera ed infine il linalolo, come era da attenersi, non interagisce con nessuna delle due frazioni caseiniche. Lo stesso andamento qualitativo, viene evidenziato anche nel vino. In conclusione, la sostituzione della caseina con la frazione  $\alpha$ s-CN determina un maggior livello delle molecole terpeniche dopo la chiarifica.

### 3.5 Conclusioni

La caratterizzazione varietale basata sull'uso di marcatori come i terpeni e i norisoprenoidi può contribuire alla genuinità di un vino monovarietale. Questo problema, allo stato attuale, riveste grande importanza per quei vini, come sopra detto, che vengono commercializzati con la denominazione di vitigno.

Questi obiettivi, perseguiti nel presente lavoro con l'uso delle tecniche cromatografiche accoppiate alla spettrometria di massa, hanno permesso la caratterizzazione aromatica dell'uva Pallagrello Bianco e del Pallagrello Nero. L'identificazione delle molecole aromatiche responsabili dei descrittori aromatici, se riportata nel disciplinare di produzione, costituiscono parametri obiettivi di qualità a cui correlare quelli sensoriali espressi dai panel test addestrati.

Il Pallagrello Bianco, in particolare, risulta caratterizzato da note di frutta esotica, albicocca e miele, ben evidenti. Tali descrittori rispecchiano il profilo aromatico ottenuto particolarmente ricco di esteri etilici di acidi grassi a corta catena.

Il profilo terpenico del Pallagrello Nero, costituito da  $\alpha$ -pinene, 3-carene, limonene, linalolo, bornilacetato e  $\alpha$ -ionone che contribuisce alla definizione dei descrittori floreali riportate per quest'uva. Nel vino questa nota è amplificata dalla sinergia dei composti terpenici con quelli di diversa struttura chimica come il feniletilalcol (rosa). Al quadro aromatico complessivo contribuiscono anche i composti di origine fermentativa come esteri, alcoli, aldeidi dai descrittori odorosi di mela, agrumi, menta e note balsamiche.

Questi risultati confermano che l'ottimizzazione del processo di produzione dei vini di qualità non può prescindere dalla massima espressione del corredo aromatico dell'uva e da quello generato dal processo di fermentazione.

D'altra parte, i collanti proteici, usati nella chiarifica del vino, finalizzata alla sua stabilità durante la vita di scaffale, fanno diminuire la concentrazione di alcune componenti aromatiche come quelle terpeniche.

A tal riguardo, i risultati ottenuti in "vitro" indicano che studi condotti a livello molecolare sulla coppia collante-aroma, oltre a fornire conoscenze sul tipo di interazioni che tra essi si instaurano, può essere di ausilio nella scelta di quelli più "inerti", come in questo caso l'uso del complesso  $\alpha$ -CN invece del caseinato.

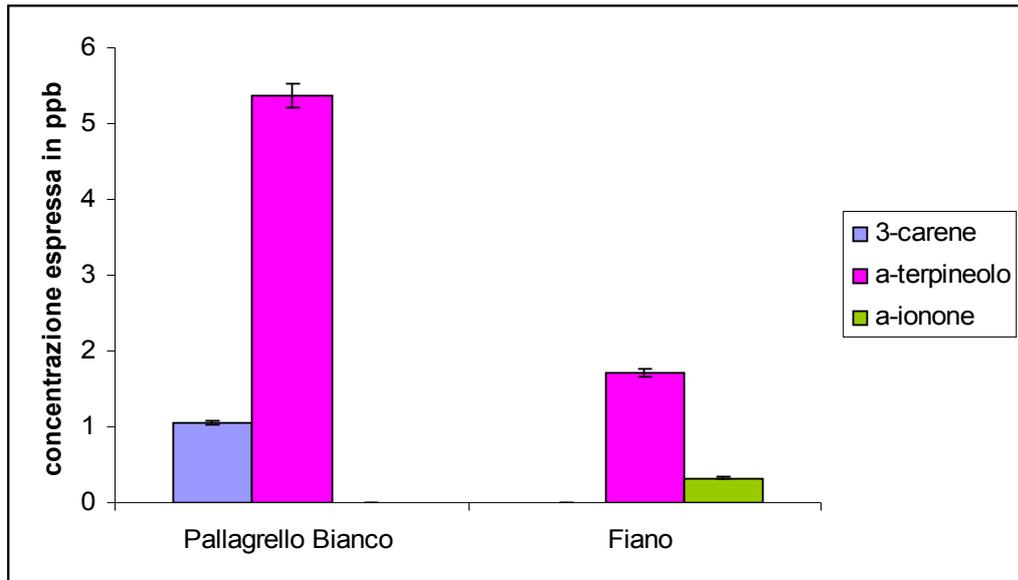
### 3.6 Tabelle e figure

MOLECOLE	Descrittore
Esanale	Erba
2-esenale	Erba
2-esen-1-olo	Erba
1-esanolo	Erba
Isoamil acetato	Banana
2-eptanone	Sapone
Metossifenilossima	Fruttato
Metilesanoato	Frutta
Eptenale	agrumi,rancido
1-otten-1-olo	Funghi
6-metil-3-eptanone	
2-ottanone	Fagioli,burro
Ac.esanoico	Pungente
Esanoato di etile	Frutta
Etilacetato	Frutta
2-etil-1-esanolo	Rosa, verdura
Benzaacetaldeide	Mandorla
Ottanolo	Muschio,fungo
2-nonanone	Latte caldo
Metil ottanoato	Arancia
Ac.ottanoico	Formaggio
Ottanoato di etile	Frutta
Decanoato di etile	Uva,frutta

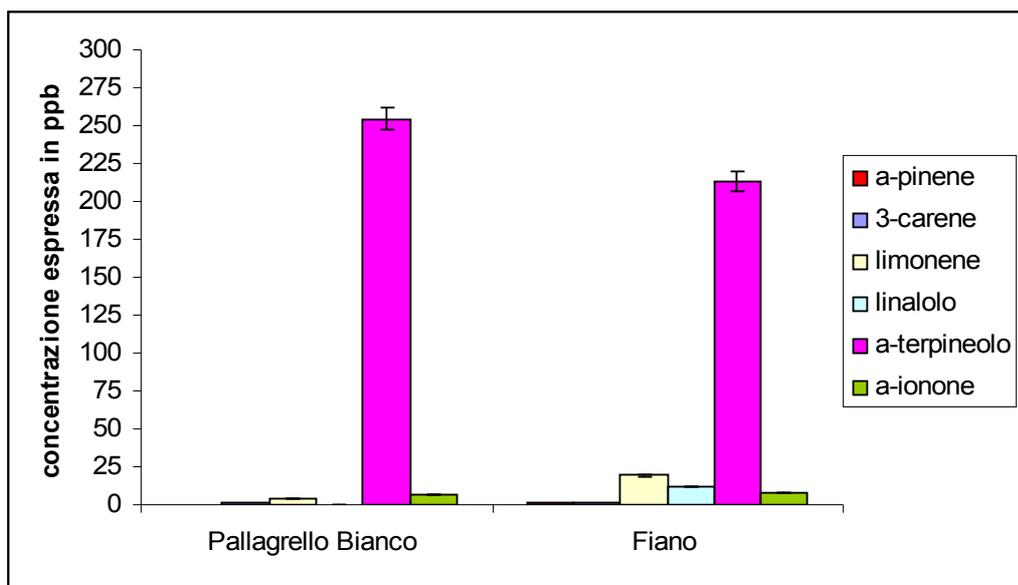
Tab 1 Molecole aromatiche identificate mediante SPME-GC/MS in modalità SCAN in uva Pallagrello Bianco

Molecole	Descrittore
Limonene	Agrumi
3-carene	Agrumi
4-carene	Agrumi
Linalolo	lavanda
$\alpha$ -terpineolo	menta
$\alpha$ -ionone	Violetta
Bornilacetato	Canfora
$\beta$ -damascenone	Frutto della passione

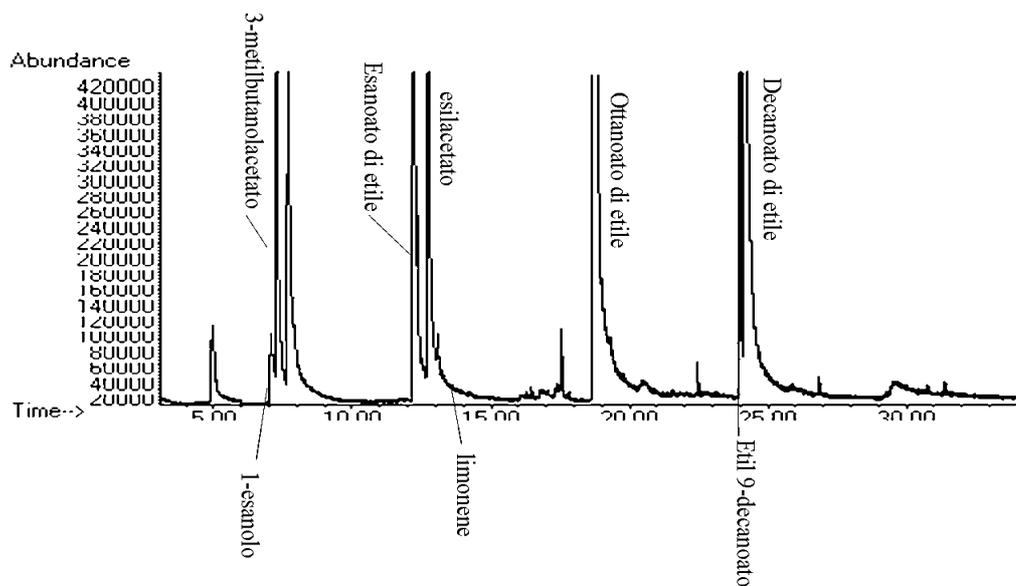
Tab 2 Terpeni identificati nell'uva Pallagrello Bianco



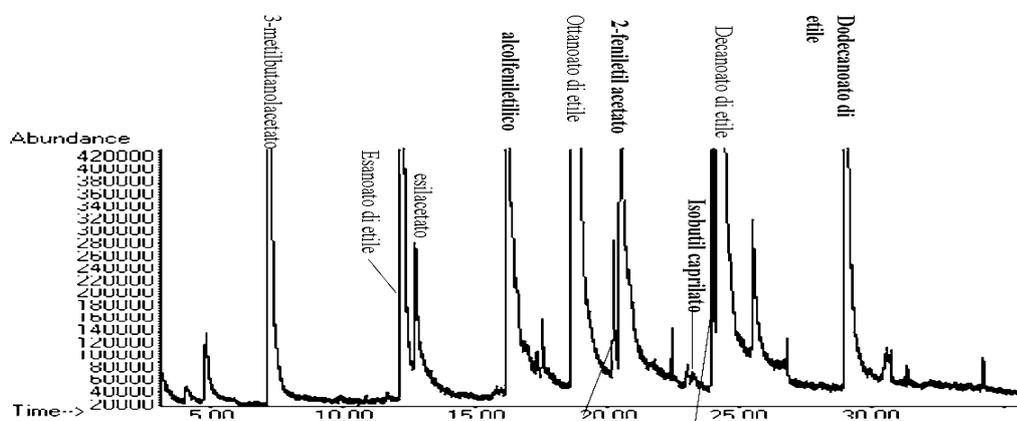
**Fig. 1** *Quantificazione terpeni identificati nelle uve Pallagrello Bianco e Fiano*



**Fig. 2** *Quantificazione terpeni identificati nei vini Pallagrello Bianco e Fiano*



*Fig3 Profilo gascromatografico delle molecole volatili del vino Pallagrello bianco Inizio Fermentazione*



*Fig4 Profilo gascromatografico delle molecole volatili del vino Pallagrello bianco Fine Fermentazione*

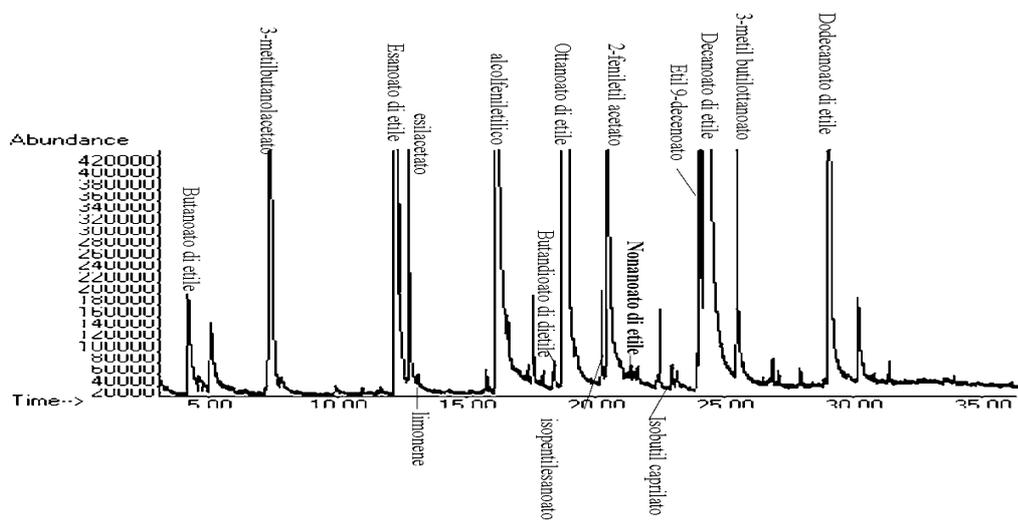


Fig5 - Profilo gascromatografico delle molecole volatili del vino Pallagrello bianco Fine Fermentazione Malolattica

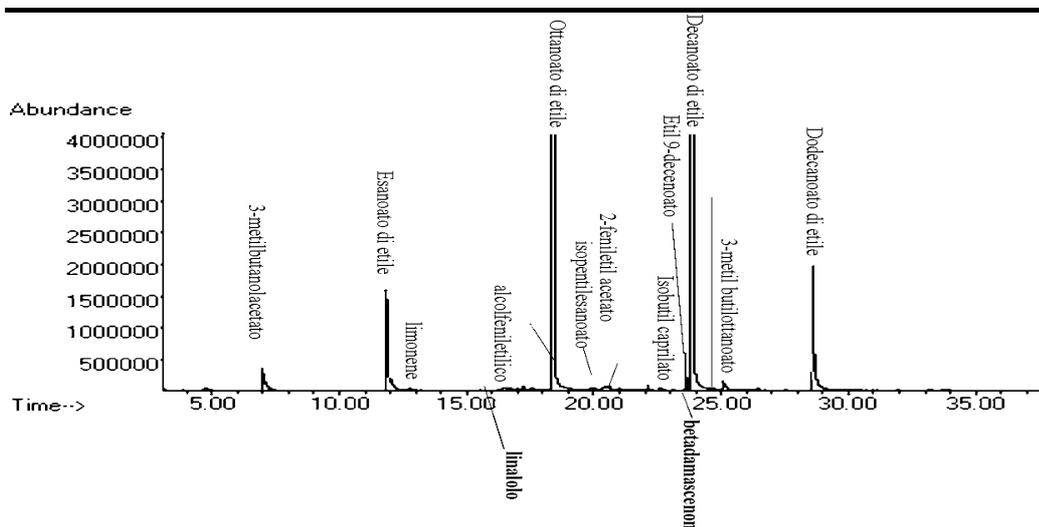


Fig6 - Profilo gas-cromatografico delle molecole volatili del vino Pallagrello bianco 6 mesi maturazione acciaio

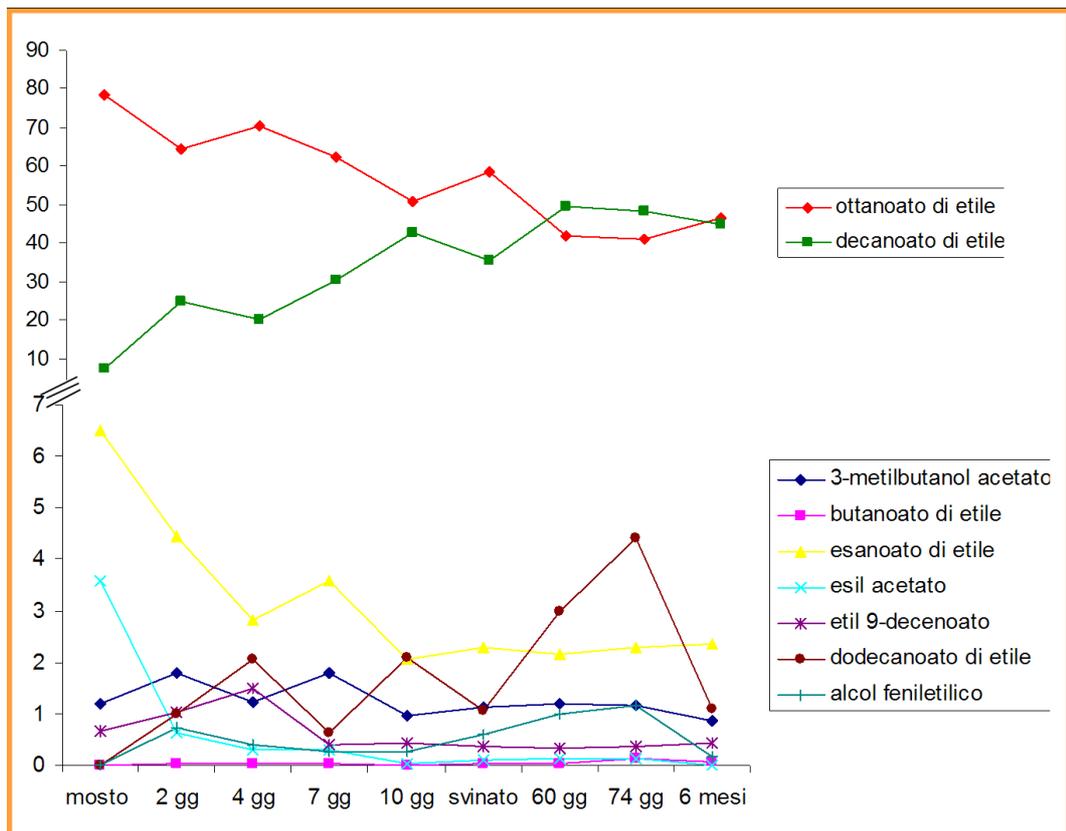


Fig7 Evoluzione delle molecole volatili nel periodo 1-180 gg

Molecola	Descrittore
esanale	Erbaceo
2-esenale	Erbaceo
1-esanolo	Erbaceo
$\alpha$ -pinene	Resina
1-octen-3-olo	Funghi
etil esanoato	Frutta
esil acetato	Frutta
limonene	Agrumi
linalolo	Agrumi
bornil acetato	Canfora
$\alpha$ -ionone	Violetta

Tab3 Molecole aromatiche identificate nell'uva Pallagrello nero

Molecole	Descrittore
$\alpha$ -pinene	Pino
Limonene	Agrumi
3-carene	Agrumi
Linalolo	lavanda
$\alpha$ -ionone	Violetta
Bornilacetato	Canfora

Tab 4 Terpeni identificati nell'uva Pallagrello Nero

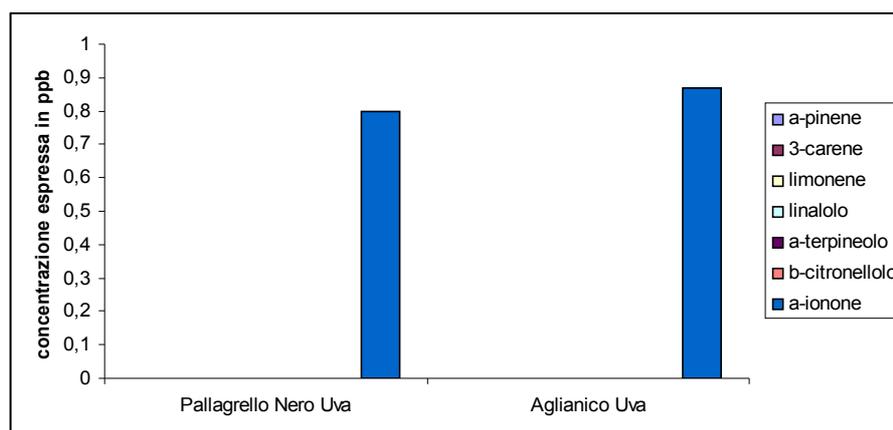


Fig 8 - Quantificazione terpeni identificati nelle uve Pallagrello Nero e Aglianico

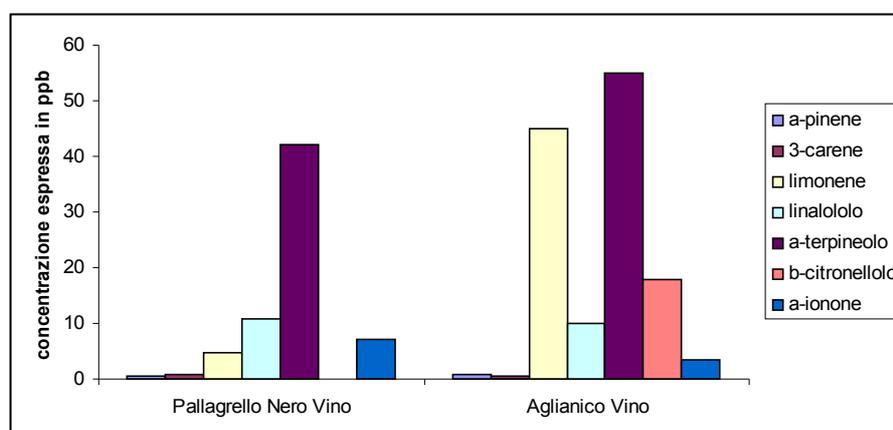


Fig 9 - Quantificazione terpeni identificati nei vini Pallagrello Nero e Aglianico

Molecola	PALLAGRELLO NERO			Descrittore
	MOSTO	VINO "FIORE"	1 MESE	
Pentanale	*			Erbaceo
Isoamilalcol	*	*	*	Whiskey
Esanale	*			Erbaceo
etil butirrato		*	*	Mela
2-esenale	*			Erbaceo
1-esanolo	*	*	*	Erbaceo
isoamil acetato		*	*	Banana
$\alpha$ -pinene	*	*	*	Resina
1-octen-3-olo	*			Funghi
etil esanoato	*	*	*	Mela
esil acetato	*	*	*	Frutta
Limonene	*	*	*	Agrumi
Linalolo	*	*	*	Lavanda
etil eptanoato		*	*	Frutta
alcol feniletileico		*	*	Rosa
etil ottanoato		*	*	Ananas
isopentilesanoato		*	*	
Bornilacetato	*	*	*	Resina
etil nonanoato		*	*	Frutta
etil 9-decanoato		*	*	Frutta
etil decanoato		*	*	Frutta
$\alpha$ -ionone	*	*	*	Violetta
Isoamilottanoato		*	*	Frutta
Etil dodecanoato			*	Frutta

*Tab5 Molecole aromatiche identificate nell'uva e nel vino Pallagrello prelevato alla svinatura e ad 1 mese di conservazione*

Fig.10 Decremento (%) dei livelli quantitativi dei terpeni rilevate prima e dopo l'aggiunta dei diversi chiarificanti nella soluzione modello 1

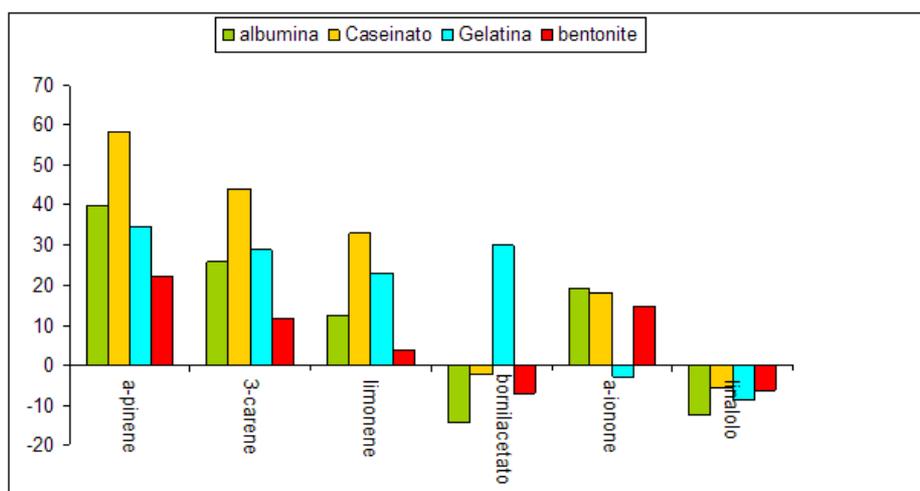


Fig.11 Decremento (%) dei livelli quantitativi dei terpeni rilevate prima e dopo l'aggiunta dei diversi chiarificanti nella soluzione modello

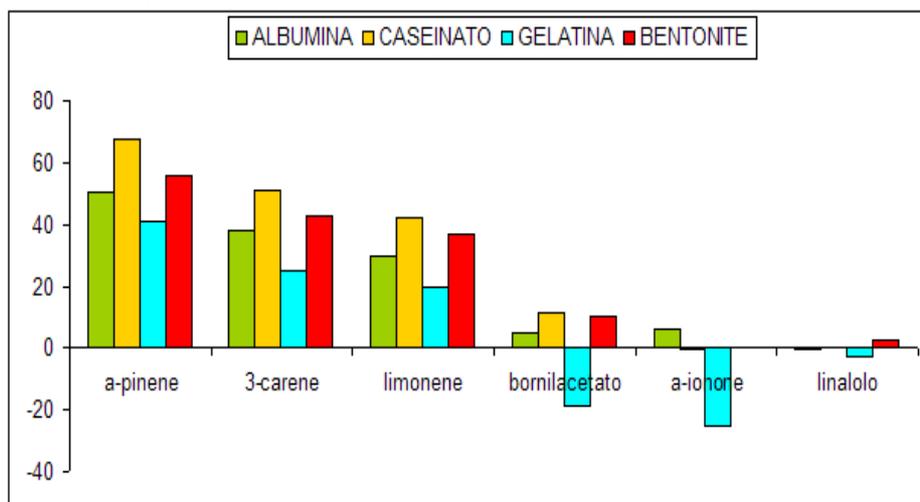


Fig.12 Decremento (%) dei livelli quantitativi dei terpeni rilevate prima e dopo l'aggiunta dei  $\alpha$  e  $\beta$ -caseina nella soluzione modello1

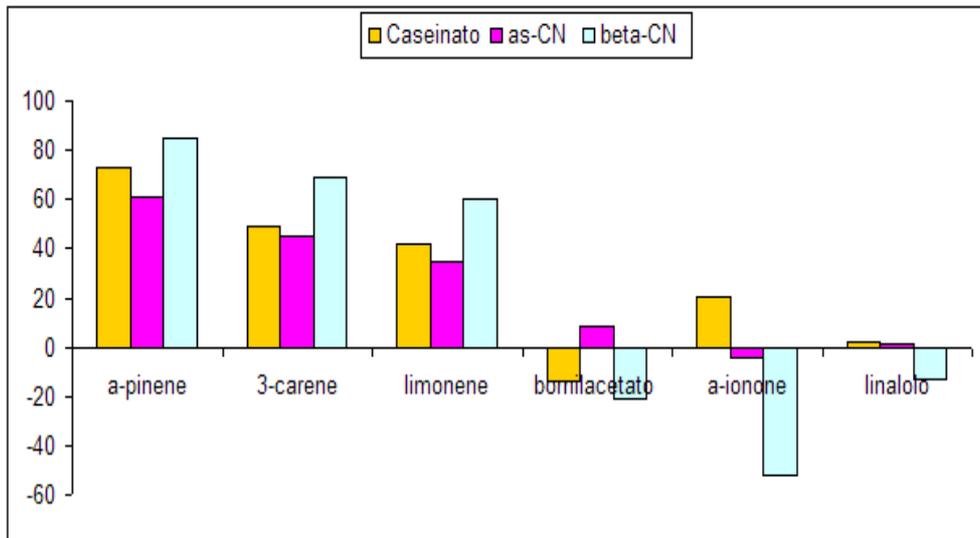
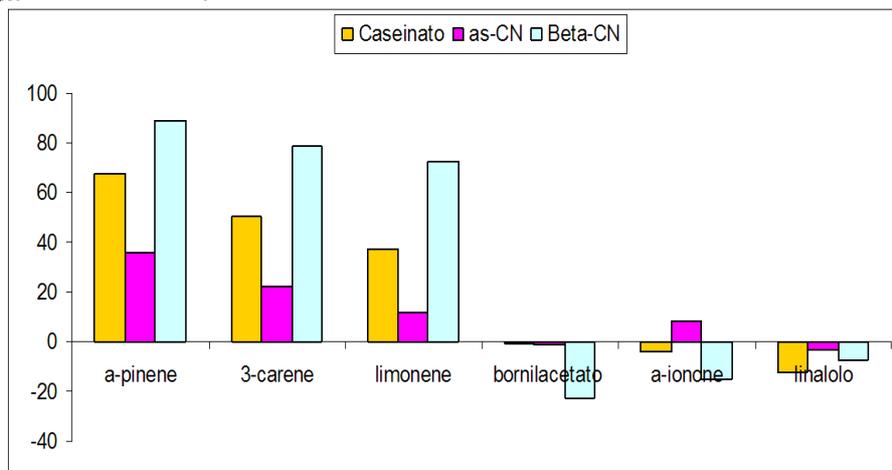


Fig.13 Decremento (%) dei livelli quantitativi dei terpeni rilevate prima e dopo l'aggiunta dei  $\alpha$  e  $\beta$ -caseina nella soluzione modello 2



#### 4 BIBLIOGRAFIA

1. Plinio. *Naturalis historia*;
2. Gallesio G. 1817-19. *Pomona italiana ossia trattato degli alberi fruttiferi*, Pisa
3. Guyot J. 1866. *Sur la viticulture de la France*, Paris
4. Vaamonde, A., Sanchez, P., Vilarino, F.;Pazo, M.;Traveso, C., On consistency of qualifications of winetasting panels. Application of multivariate statistical methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48 (2) 177-180, 1997.
5. Tzouros N. E., Arvanitoyannis I. S., *Agricultural produces: synopsis of employed quality control methods for the authentication of foods and application of chemometrics for the classification of foods according to their variety or geographical origin*. *Crit. Rev. Food Sci. and Nutrit.*, 41, 4, 287-319, 2001.
6. Mateo R., Bosch-Reig, F. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugar, and pH. *J. Agr. Food Chem.*, 46, 393-400, 1998.
7. Arvanitoyannis I.S., Katsota M.N, Psarra E.P., Soufleros E.H., Kallithraka S., Application of quality control methods for assessing wine authenticity: use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends Food Sci. Techn.*, 10, 321-336, 1999.
8. Etievant P., Schlich P., Bouvier J.C., Varietal and geographic classification of french red wines in terms of elements aminoacids, and aromatic alcohols *J. Sci. Food Agric.* 48, 25-41, 1988, a.
9. Etiévant P., Schlich P., Bertrand A., Symonds P., Bouvier J.C., Varietal and geographical classification of french red wines in terms of pigments and flavonoids compounds . *J. Sci. Food Agric.* 42, 39-54, 1988 b.
10. Latorre J.M., Garcia-Jares C., Medina B., Herrero C., Pattern recognition analysis applied to classification of wines from Galicia. (Northwestern Spain) with certified brand of origin. *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1451-55, 1994.
11. Day M., Zhang B., Martin G., Determination of the geographical origin of wine using joint analysis of elemental and isotopic composition. II-Differentiation of the principal production of zones in France for the 1990 vintage. *J. Sci. Food Agric.* 67, 113-123, 1995.
12. Siegmund H., Bachmann K., Die Lagezuordnung von Weinen durch Bestimmung des Spurenelementmusters. *Z. Lebensm. Unters-Forsch.* 164, 1-7, 1977.

13. Siegmund H., Bachmann K., Anwendung der numerischen Taxonomie für die Klassifizierung von Weinen *Z. Lebensm. Unters-Forsch.* 166, 298-303, 1978.
14. Gonzales-Larreira M., Gonzales A., Médina B., Les ions métalliques dans la différenciation des vins rouges des trois appellations d'origine Rioja. *Conn.Vigne.Vins.* 2, 127-140, 1987.
15. Baldi M., Rignati V. e Specchiarello M., Caratterizzazione e classificazione di vini da tavola con metodologie statistiche. *Industrie delle Bevande*, Febbraio, 1-6, 1984.
16. Médina B., Van Zeller A.L., Differentiation des vins de trois régions de France. *Conn. Vigne Vin.* 18, 225-235, 1984.
17. Arhurst P.R., Dennis M.J., Food authentication. Chapman-Hall London, 1996.
18. McCurdy E., Potter D., Medina M., Trace elements in wines. *Laboratory news.* Sept. 10-11, 1992.
19. Garcia-Jares C., Garcia-Martin S., Cela-Torrijos R., Analysis of some high compounds of wines by means of purge and cold trapping injector capillary gas-chromatography. Application to the differentiation of Rias Baixas Spanish white wines. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 764-768, 1995 a.
20. Garcia-Jares C., Garcia-Martin S., Marino N., Torrijos C., GC-MS identification of volatile components of Galician (Northwestern Spain) white wines. Application to differentiate Rias Baixas wines from wines produced in nearby geographical regions. *J. Sci. Food Agric.* 69, 175-184, 1995 b.
21. Forcén M., Mulet A., Bernal A., Contribution of gas-chromatography and conventional data to the characterization of major compounds in musts and wines by means of pattern recognition techniques *J. Sci. Food Agric.*, 60, 229-238, 1992
22. Gomez-Cordoves C., Gonzales-San Jose M.L., Correlation between flavonoids and color in red wines aged in wood. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 295-298, 1995.
23. Palma M., Barroso C.G., Perez-Bustamante J.A., The potential polyphenolic for the differentiation of the clones from the Palomino Fino variety. *Acta Hort.* 388, 155-159, 1995.
24. Siversten H.K., Holen B., Nicolaysen F., Risvik E., 1999, Classification of French red wines according to their geographical origin by the use of multivariate analysis. *J. Sci. Food Agric.* 79, 107-115, 1999.
25. Boselli, *Gli Ambienti Campani* 2003

26. Trutta, Giovanni Francesco *Dissertazioni storiche delle antichità alifane* Stamperia Simoniana, “[4], 420 p., [2] c. di tav. 1 c. geogr. ripieg. 4°”1776
27. Giovo N. *Brindisi di Eupidio* 1729
28. Costacurta A, Calo` A, Crespan M, Milani M, Carraro R, Aggio L, Flamini R, Ajmone-Marsan P. Morphological, aromatic and molecular characteristics of Moscato vine varieties and research on phylogenetic relations. *Bulletin de l’O.I.V.* 841-842:133–150, 2001.
29. Di Stefano R. *Methodi chimici nella caratterizzazione varietale.* *Riv Vitic Enol* 1:51–56, 1996.
30. Flamini R, Dalla Vedova A, Calo` A. Study on the monoterpene contents of 23 accessions of Muscat grape: Correlation between aroma profile and variety. *Riv Vitic Enol* 2(3):35–49, 2001
31. Bullock J.D., *The biosynthesis of natural products.* P.1. McGraw-Hill, London, 1965
32. Bate-Smith E.C., Age and distribution of galloyl esters, iridoids and certain other repellents in plants. *Phytochemistry*, 23:945-950, 1984
33. Gottlieb O.R., *Phytochemicals: differentiation and function* *Phytochemistry*, 29:1725-1724, 1990
34. Harborne J.B., *Introduction to ecological biochemistry* Academic press, London, 1967
35. Janzen D.H., *Coevolution.* *Science* 165, 415:416, 1969
36. Winkel J.S.B., *Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology.* *Plant Physiology* 126, 485- 493, 2001
37. Bosso A., Cravero MC, Ubigli M. *Applicazione di un metodo per la valutazione delle caratteristiche sensoriali del vino.* *Vignevini*, 4, 42-49, 1999.
38. Bosso A., Guaita M., Castellari L. *Il Guttumio: relazione tra ambiente e vino.* *Vignevini* n. 10, 50-56, 2001.
39. Escribano T. Nailon Y. G. E., Rivas-Gonzalo J. C., Santos C. *Characterization of Prcyanidins of “ Vitis vinifera” Variety Tinta del Pais Grape Seed.* *J. Agric. Food Chem*, 1992.
40. Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. *Trattato di enologia II.* Ed. Edagricole, 1998.
41. Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A. *Trattato di enologia I.* Ed. Ed agricole, 1998.
42. Mazza G., Fukumoto L., Delaquis P., Girard B., Ewert B. *Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia.* *J. Agric. Food Chem.*, 47, pp. 4009-4017, 1999

43. Vian M.A., Tomao V, Coulomb P.O., Lacombe J.M. and Dangles O., Comparison of the anthocyanin composition during ripening of Syrah grapes grown using organic or conventional agricultural practices, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, pp. 5230–5235, 2006
44. Gagné S, Saucier C, GénY L. Composition and cellular localization of tannins in Cabernet Sauvignon skins during growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:9465–9471, 2006
45. Pannala S., C. S. Daw, and J. S. Halow Near Real-time Simulations of Large Fluidized Beds with a Low Order, 2001
46. Bomser J., Singletary K., Meline B. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced mouse skin ornithine decarboxylase and protein kinase C by polyphenolics from grapes. *Chem. Biol. Interact.* 127(1), 45-59, 2000
47. Ahmad, N. and Mukhtar, H. Green tea polyphenols and cancer:biologic mechanisms and practical implications. *Nutr Rev* 57: 78– 83, 1999
48. Castillo-Muñoz, S. Gomez-Alonso, E. Garcia-Romero and I. Hermosin-Gutierrez, Flavonol profiles of *Vitis vinifera* Red grapes and their single-cultivar wines, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (3) (2007), pp. 992–1002. Bubble Model,” Session 199b, AIChE Annual Meeting, Reno, Nevada, November 4–9,.
49. Makris D. P., Kallithraka S., Kefalas P. Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters *Journal of Food Composition and Analysis* 19, 396–404, 2006
50. Calò A., Tomasi D., Cravero M.C., Di Stefano R. Contributo Alla caratterizzazione e classificazione varietale attraverso la determinazione degli antociani e degli HCTA della buccia di varietà a bacca rossa. *Riv. Vitic. Enol.*, 47, (3), 1325, 1994
51. Cravero M.C., Di Stefano R. I composti fenolici e l’origine varietale delle uve. *Riv. Vitic. Enol.*, (1):33-44, 1990
52. Eder E., Wendelis S., Barna J. Classification of red wine cultivars by means of anthocyanins analysis. I report: application of multivariate statistical methods for differentiation of grape samples. *Mitteilungen Klosterneoburg*, 44, 201212, 1994
53. Scienza A., Versini G., Mattivi F. Profilo aromatico dell’uva e del vino di Moscato rosa. *Atti Acc. It. Vite e vino*, 41, 159182, 1989
54. Shiraishi S.I., Watanabe Y. Anthocyanins pigments in the grape skins of several red *Vitis vinifera* cultivars bred in Japan. *J. Agric. Kyoshu University*, 1991
55. Asselin C., Ballester F.F. Caracterization polyphenolique des raisins et des vins de Cabernet franc. Importance de l’effect terroir. *Progr. Agric. Vitic*, 109, 415420, 1992

56. Baldi A., Romani A., Mulinacci N., Vincieri F.F. Composés Phenoliques dans les cepages de Vitis vinifera de Toscane. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 27, 201215, 232233, 1993.
57. CALÒ D., DI STEFANO R., GIORGESSI F., PEZZA L. Variazioni del metabolismo di accumulo in relazione alla distribuzione dei capi a frutto e delle gemme. Significato dei rapporti tra antociani e AICT del frutto. *Riv. Vitic. Enol.*, 1993
58. Hmamouchi M., EsSafi N., Pellecuer J., Es safi M. Composition antocianique des pellicules de raisin de quatre cepages rouges cultivés au Maroc. *Bull. OIV*, 68 (777778), 905919, 1995
59. Downey, M. O.; Harvey, J. S.; Robinson, S. P. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis Vinifera L.*). *Aust. J. Grape Wine Res.* 9, 110-121, 2003
60. Von Baer, D.; Mardones, C.; Gutierrez, L.; Hofmann, G.; Becerra, J.; Hitschfeld, A.; Vergara, C. Varietal authenticity verification of Cabernet sauvignon, Merlot and Carmene`re wines produced in Chile by their anthocyanin, flavonol and shikimic acid profiles. *Bull. O.I.V.* 887-888, 45-57, 2005
61. Souquet, J.M., Labarbe, B., Le Guernevé, C., Cheynier, V., and Moutounet, M. Phenolic composition of grape stems. *J. Agric. Food Chem.*, 48:1076–1080, 2000
62. Souquet, J.M., Cheynier, V., Brossaud, F., and Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43:509–512, 1996
63. Escribano-Bailón, T., Guerra, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C., and Santos-Buelga, C. Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 200:221–224, 1995
64. Burns, J., Gardner, P.T., Matthews, D., Duthie, G.G., Lean, M.E.J., and Crozier, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wine during vinification. *J. Agric. Food Chem.*, 49:5797–5808, 2001
65. Somers, T.C. and Pocock, K.F. Phenolic harvest criteria for red vinification. *Aust. Grapegrower Winemaker*, 268:24; 26–7; 29–30, 1986
66. Macheix, J.-J., Sapis, J.-C., and Fleuriet, A. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 30:441–486, 1991
67. Hartnell, C. Polyphenols and grape processing: the key to better white wine. *Aust. Grapegrower Winemaker*, April, 13–15, 1987
68. Robichaud, J. and Noble, A. Astringency and bitterness of selected phenolic in wine. *J. Sci. Food Agric.*, 53:343–353, 1990
69. Bourzeix, M. La diffusion des composés phenoliques au cours de la fermentation

- intracellulaire. C.R. J. Maceration Carbonique, February 10–11, 47, 1971
70. Ribereau-Gayon, P. and Glories, Y. Phenolics in grape and wines, in Proc. 6th Aust. Wine Ind. Techn. Conf., Australian Industrial Publishers, Adelaide, 247, 1987
  71. Cilliers, J.J.L. and Singleton, V.L. Nonenzymic autooxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *J. Agric. Food Chem.*, 37:890–896, 1989.
  72. Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J.-N., and Lavigne, V. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *J. Sci. Food Agric.*, 62:191–202, 1993.
  73. Dugelay, I., Gunata, Z., Sapis, J.C., Baumes, R., and Bayonove, C. Role of cinnamoyl esterase from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *J. Agric. Food Chem.*, 41:2092–2096, 1993.
  74. Schreier, P. Flavor composition of wines: a review. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 12:59–111, 1979.
  75. Somers, T.C., Verette, E., and Pocock, F. Hydroxycinnamate esters of *Vitis vinefera*: changes during white wine vinification and effects of exogenous enzymic hydrolysis. *J. Sci. Food Agric.*, 40:67–78, 1987.
  76. Betes-Saura, C., Andres-Lacueva, C., and Lamuela-Raventos, R.M. Phenolics in white free run juices and wines from Penedes by high-performance liquid chromatography: changes during vinification. *J. Agric. Food Chem.*, 44:3040–3046, 1996.
  77. Macheix, J.-J., Fleuriet, A., and Billot, J. *Fruit Phenolics*, CRC Press, Boca Raton, FL, 1990
  78. Ribereau-Gayon, P. The chemistry of red wine colour, in *Chemistry of Wine-Making*, Dinsmoor-Webb, A., Ed., ACS Symposium Series 137, American Chemical Society, Washington, D.C., 50–87, 1974.
  79. Ribereau-Gayon, P., Pontallier, P., and Glories, Y. Some interpretations of colour changes in young wines during their conservation. *J. Sci. Food Agric.*, 34:505–516, 1983.
  80. Singleton, V.L. and Essau, P. 1969. *Phenolic Substances in Grapes and Wine and Their Significance*, Academic Press, New York.
  81. Rous, C. and Alderson, B. 1983. Phenolic extraction curves for white wine aged in French and American oak barrels. *Am. J. Enol. Vitic.*, 34:211–215.
  82. Singleton, V.L. 1974. Some aspects of the wooden containers as a factor in wine maturation, *Rep. Res. Lab. Kirin Brew. Co.*, 15:17–24.
  83. Quinn, M.K. and Singleton, V.L. 1985. Isolation and identification of ellagitannins from white oak wood and estimation of their role in wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, 36:148–155.

84. Figueiredo, P., Elhabiri, M., Toki, K., Saito, N., Dangles, O., and Broullaird, R. 1996. New aspects of anthocyanins complexation. Intramolecular copigmentation as a means of colour loss? *Phytochemistry* 41:301–308.
85. Santos de Buelga, C., Francia-Aricha, E.M., and Escribano-Bailón, M.T. 1995. Comparative flavan- 3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chem.*, 53:197–201.
86. Somers, T.C. 1971. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, 10:2175–2186.
87. Bakker, J., Bridle, P., Bellworthy, S. J., Garcia-Viguera, C., Reader, H. P., and Watkins, S. J. 1998. "Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine." *J. Sci. Food Agric.* 78(3): 297-307.
88. Dallas, C., Ricardo-da-Silva, J.M., and Laureano, O. 1996. Products formed in model wine solutions involving anthocyanins, procyanidin B2, and acetaldehyde. *J. Agric. Food Chem.*, 44:2402–2407.
89. Escribano-Bailón, T., Alvarez-Garcia, M., Rivas-Gonzalo, J.C., Heredia, F.J., and Santos- Buelga, C. 2001. Color and stability of pigments derived from the acetaldehydemediated condensation between malvidin 3-O-glucoside and (+) catechin. *J. Agric. Food Chem.*, 49:1213–1217.
90. Francia-Aricha, E.M., Guerra, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C., and Santos-Buelga, C. 1997. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J. Agric. Food Chem.*, 45:2262–2266.
91. Wildenradt, H.L. and Singleton, V.L. 1974. Production of aldehydes as result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *Am. J. Enol. Vitic.*, 25:119–126.
92. Ribereau-Gayon, P., Pontallier, P., and Glories, Y. 1983. Some interpretations of colour changes in young wines during their conservation. *J. Sci. Food Agric.*, 34:505–516.
93. Timberlake, C.F. and Bridle, P. 1967. Flavylium salts, anthocyanidins and anthocyanins. I. Structural transformation in acid solutions. *J. Sci. Food Agric.*, 18:473–478.
94. Haslam, E. and Lilley, T.H. 1988. Natural astringency in foodstuffs. A molecular interpretation. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 27:1–40.
95. Es-Safi, N.-E., Fulcrand, H., Cheynier, V., and Moutounet, M. 1999. Competition between (+) catechin and (–) epicatechin in acetaldehyde induced polymerization of flavanols. *J. Agric. Food Chem.*, 47:2088–2095.

96. Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., and Moutounet, M. 1998. A new class of pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, 47:1401–1407.
97. Mateus, N., and de Freitas, V. 2001. "Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during Port wine ageing." *J. Agric. Food Chem.* 49(11): 5217-5222.
98. Romero, C., and Bakker, J. 1999. "Interactions between grape anthocyanins and pyruvic acid with effect of pH and acid concentration on anthocyanin composition and color in model solutions." *J. Agric. Food Chem.* 47(8): 3130-3139.
99. Wulf LW, Nagel CW. 1978. High-pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. *Am J Enol Vitic* 29(1):42–49.
100. Hebrero E, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo C. 1988. High performance liquid chromatography-diode array spectroscopy identification of anthocyanins of *Vitis vinifera* variety Tempranillo. *Am J Enol Vitic* 39(3):227–233.
101. Hebrero E, Garcia-Rodriguez C, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo C. 1989. Analysis of anthocyanins by liquid chromatography-diode array spectroscopy in a hybrid grape variety (*Vitis vinifera*/*Vitis berlandieri* 41B). *Am J Enol Vitic* 40(4):283–291.
102. Hong V, Wrolstad RE. 1990a. Characterization of anthocyanin-containing colorants and fruit juices by HPLC/photodiode array detection. *J Agric Food Chem* 38(3):698–708.
103. Hong V, Wrolstad RE. 1990b. Use of HPLC separation/ photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *J Agric Food Chem* 38(3):708–715.
104. Lee CY, Jaworski AW. 1990. Identification of some phenolics in white grapes (research note). *Am J Enol Vitic* 41(1):87–89.
105. De Pauw E. 1986. Review: Liquid matrices for secondary ion mass spectrometry; basics of any aspects of the FAB process and general matrix requirements. *Mass Spectrom Rev* 5:191.
106. De Pauw E, Agnello A, Derwa F. 1991. Review: Liquid matrices for secondary ion mass spectrometry: An update. *Mass Spectrom Rev* 10:283.
107. de Hoffmann E. 1996. Tandem mass spectrometry: A primer. *J Mass Spectrom* 31:125–137.
108. Niessen WMA, Tinke AP. 1995. Liquid chromatography-mass spectrometry. General principles and instrumentation. *J Chromatogr A* 703:37–57.
109. Abian J. 1999. The coupling of gas and liquid chromatography with mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 34:157–168.
110. Cheynier V, Doco T, Fulcrand H, Guyot S, Le Roux E, Souquet JM, Rigaud J,

- Moutounet M. 1997. ESI-MS analysis of polyphenolic oligomers and polymers. *Anal Mag* 25(8):32–37.
111. Fenn JB, Mann M, Meng ChK, Wong ShF, Whitehouse CM. 1990. Electrospray ionization-principles & practise. *Mass Spectrom Rev* 9:37–70.
112. Gaskell SJ. 1997. Electrospray: Principles & practise. *J Mass Spectrom* 32:677–688.
113. Cooks RG, Caprioli RM. 2000. Special feature on electrospray ionization. *J Mass Spectrom* 35:761
114. Perez-Magarino S, Revilla I, Gonzales-SanJosé' ML, Beltran S. 1999. Various applications of liquid chromatography-mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. *J Chromatogr A* 847:75–81.
115. Asenstorfer RE, Hayasaka Y, Jones GP. 2001. Isolation and structures of oligomeric wine pigments by bisulfite-mediated ion-exchange chromatography. *J Agric Food Chem* 49(12):5957–5963.
116. Bakker J, Timberlake CF. 1985. The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of Port Wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. *J Sci Food Agric* 36:1315–1324.
117. Hayasaka Y, Asenstorfer RE. 2002. Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 50(4):756–761.
118. Mazzuca P., Ferranti P, Picariello G, Chianese L., Addeo F. 2005. Mass spectrometry in the study of antochyanins and their derivates: differentiation of vitis vinifera and hybrid grapes by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *J. Mass Spec.*, 40, 83-90
119. Pati S., Losito I., Gambacorta G., La Notte E., Palmisano F. and P. Zambonin G. 2006 Simultaneous separation and identification of oligomeric procyanidins and anthocyanin-derived pigments in raw red wine by HPLC-UV-ESI-MSn. () *J. Mass Spec.*, 41, 861–871
120. Remy-Tanneau, S., Le Guernevé, C., Meudec, E., and Cheynier, V. 2003. "Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry." *J. Agric. Food Chem.* 51(12): 3592 – 3597
121. Cantos, E., Espin, J.C., and Tomás-Barberán, F. 2002. Varietal differences among polyphenols profiles of seven table grape cultivars studied by LC-DAD-MS-MS. *J. Agric. Food Chem.*, 50:5691–5696
122. Garcia-Beneytez, Cabello, F. Revilla, E.; 2003 Anthocyanin Analysis og grape and

- wine anthocyanins by HPLC/MS. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5622-5629
123. Bate-Smith E.C., (1975). Phytochemistry of proanthocyanidins. In *Phytochemistry*. 14: 1107-1113.
  124. Regolamento CEE n.2676/90 della Commissione del 17 settembre 1990, *Gazzetta ufficiale* n. L 272 del 03/10/1990
  125. Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., (1966) *Analisi e controllo dei vini*. Ed. agricole Bologna. 214-217.
  126. Rodríguez-Delgado M. A, Malovaná SPérez., J. P., Borges T., García Montelongo F. J. "Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection" *J. Chrom A*, 912, 2, 249-257, 2001.
  127. Moio, L., Romano, S., Cirella, A., & Fuschino, G. (1999). Influenza di alcuni fattori viticoli ed enologici sulla qualita' del vino rosso prodotto dall'uva Aglianico di Taurasi. *Vignevini*, 1-2, 79-92
  128. Moio, L., Di Marzio, L., Genovese, A., Piombino, P., Squillante, E., Castellano, L., et al. (2002). I descrittori sensoriali ed i componenti volatili ad elevato impatto olfattivo dell'aroma del vino Fiano. *Vignevini*, 4, 115-123.
  129. Alessandro Genovese, Angelita Gambuti, Paola Piombino, Luigi Moio Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine *Food Chemistry* 103 (2007) 1228-1236
  130. L. Armada, E. Falquè "Repercussion of the clarification treatment agents before the alcoholic fermentation on volatile composition of white wines" *Eur Food Res Technol* 225:553-558, 2007.
  131. E. Dufour; T.Haertlé "Binding affinities of  $\beta$ -ionone and related flavor compounds to  $\beta$ -actoglobulin: effects of chemical modifications." *J. Agric. Food Chem.*, 38, 1691-1695, 1990.
  132. E. Guichard, S. Langourieux "Interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and flavour compounds" *Food Chemistry* 71, 301-308, 2000
  133. A. Nasi, P. Ferranti, S. Amato, L. Chianese "Identification of free and bound volatile compounds as typicalness and authenticity markers of non-aromatic grapes and wines through a combined use of mass spectrometric techniques" *Food Chemistry* 110, 762-768, 2008.
  134. E. Pelletier, K. Sostmann, E. Guichard, "Measurement of interactions between  $\beta$ -lactoglobulin and flavor compounds (esters, acids, and pyrazines) by affinity and exclusion size chromatography". *J. Agric. Food Chem.* 46, 1506-1509, 1998.
  135. H.E. Swaisgood, *Chemistry of milk protein*. In: P.F. Fox, Editor, *Developments in*

- Dairy Chemistry Vol. 1, Applied Science Publishers, London, pp. 1–59, 1982.
136. A. Wishnia, T.W.J. Pinder, “Hydrophobic interactions in proteins. The alkane binding sites of  $\beta$ -actoglobulin” *A and B. Biochemistry* 31, 1534-1542, 1966.
  137. Z. Zhang, J. Pawliszyn “Headspace solid-phase microextraction” *Analytical Chemistry*, 65, 1843–1852, 1993.
  138. C. A. Zittle, *J. Dairy Science*, 44, 2101, 1961
  139. Baumes R., Cordonnier R., Nitz S. and Drawert F.(1986) *J. Sci. Food Agric.*, 37, 927.
  140. Batt, C. A.; Brady, J.; Sawyer, L. Design improvements of  $\beta$ -lactoglobulin. *Trends Food Sci.Technol.* 1994, 5, 261-265.
  141. Bonino M., Scellino R., Rizzi C., Aigotti R., Delfinia C., Baiocchic C. (2003). Aroma compounds of an Italian wine (Ruchè) by HS–SPME analysis coupled with GC–ITMS. *Food Chemistry* 80:125–133.
  142. Cordonnier R. and Bayonove C. (1974) *C. R. Acad. Sci.Paris*, 278, 387.
  143. De La Calle Garcia D.; Reichenbaecher M.; Danzer K.; Hurlbeck C.; Bartzsch C. and Feller K.H. (1997) Investigations on wine bouquet components by solid-phase microextraction-capillary gas chromatography (SPME-CG) using different fibers. *J. High Resolut. Chromatogr*, 20: 665-668.
  144. De la Calle Garcia D.; Reichenbaecher M.; Danzer K.; Hurlbeck C.; Bartzsch C. and Feller K.H. (1998). Use of solid phase microextraction capillary gas chromatography (SPME-GC) for the varietal characterization of wines by means of chemometrical methods. *Fresenius J. Anal. Chem*,360: 784-787.
  145. De la Calle Garcia D.; Reichenbaecher M.; Danzer K.; Hurlbeck C.; Bartzsch C. and Feller K-H.(1998). Analysis of wine bouquet components using headspace solidphase microextraction-capillary gas chromatography *J. High Resolut. Chromatogr*, 21: 373-377.
  146. Etievant P.-X., Issanchou S.N. and Bayonove C.-L.(1983) *J. Sci. Food Agric.*, 34, 497.
  147. Gunata Y.Z., Bayonove C.L., Tapiero C., Cordonnier R.E. (1990) Hydrolysis of grape monoterpenyl  $\beta$ -D-glucosides by various  $\beta$ -glucosidases. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 38, No. 5
  148. Kataoka H., Lord H. L., Pawliszyn J. (2000). Application of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chrom. A*, 880: 35-62.
  149. Mateo J.J, Jimenez M. Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Of Chem.* 881, 2000, 558-561.
  150. Mestres M., Marti M.P., Busto O., Gausch, J. (2000). Analysis of low-volatility organic sulphur compounds microextraction and gas chromatography. *Journal of*

- Chromatography A, 881: 583–590.
151. O'Neill, T.; Kinsella, J. E. Flavor protein interactions: characteristics of 2-nonanone binding to isolated soy protein fractions. *J. Food Sci.* 1987, 52, 98-101.
  152. Pawliszyn J. (1997). *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice.* 25–55. New York: John Wiley & Sons.
  153. Rapp A. (1978) *Fresenius' J. Anal Chem.* 337-777.
  154. Reiners, J.; Nicklaus, S.; Guichard, E. Interactions between  $\alpha$ -lactoglobulin and flavor compounds of different chemical classes. Impact of the protein on the odour perception of vanillin and eugenol. *Lait* 2000, 80, 347-360.
  155. Sefton M.A., Francis I.L. and Williams P.J. (1993) *Am. J. Enol. Viticult.*, 44, 359.
  156. Schreier P., Drawert F. and Junker A. (1976) *J. Agric. Food Chem.*, 24 (2), 331.
  157. Sides A., Robards K., Helliwell S. (2000). Developments in extraction techniques and their application to analysis of volatiles in foods. *Trends in Analytical Chemistry.* 19: 322–330. Snow N.H., Slack G.C. (2002). Headspace analysis in modern gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry.* 21: 608–617.
  158. Supelco Bulletin 923 (1998). Solid phase microextraction: theory and optimization of conditions.(available from: <http://www.sigmaaldrich.com>).
  159. Supelco Note 56 (1998). Fast analysis of volatile organic compounds by solid phase microextraction/capillary GC. Supelco Note 56. (available from:<http://www.sigmaaldrich.com>).
  160. Voilley A., Lamer C.,Dubois P, Feuillat M. (1990) Influence of macromolecules and treatments on the behavior of aroma compounds in a model wine *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 38 (1), 248-251
  161. Wardencki W., Michulec M., Curalo J. (2004). A review of theoretical and practical aspects of solidphase microextraction in food analysis. *Inter. J. Food Sci. Technol.*39: 703-717.
  162. Wardencki W., Orlita J., Namiesnik J. (2001) Comparison of extraction techniques for gas chromatographic determination of volatile carbonyl compounds in alcohols. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 369, 661–670.
  163. Wardencki W., Sowinski, P., Curyo J. (2003). Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. *Journal of Chromatography A*, 984, 89–96.
  164. Witkiewicz Z. (1995). *Podstawy Chromatografii.* 401–430. Warszawa: WNT. Yang X., Peppard T. (1994). Solid-phase microextraction for flavor analysis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 42: 1925–1933.

165. Williams P.J., Straws C. R., Wilson B.(1980) Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of Muscat Grapes J. Agric. Food Chem. 28 766-771
166. Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B. and Massy-Westropp R.A. (1982) *Phytochemistry*, 21(8), 2013.
167. Zironi R., Battistuta F., Comuzzo P. La valutazione della maturità dell'uva, un mezzo per incrementare la qualità dei vini. 2004.
168. Ribéreau-Gayon P. (1970). Les dosages des composés phénoliques totaux dans le vin rouges. *Chim.Anal.* 52-6, 627-631.
169. Mathieu S., Terrier N., Procureur J., Bigey F. and Gunata Z. A Carotenoid Cleavage Dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation *Journal of Experimental Botany*, Vol. 56, No. 420, pp. 2721–2731
170. Carrau F. M., Medina K., Boido E., Farina L., Gaggero C., Dellacassa E., Versini G. and Henschke P.A. De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts 2005 *FEMS Microbiology Letters* 243 (1), 107-115
171. Strauss C.R., Wilson B., Williams P.J., *Phytochemistry* 26 (1987) 1995–1997.
172. Wirth J., Etude de la filiation entre les norisoprénoides et les caroténoides chez la vigne, Thèse de Doctorat, Université Montpellier II, Montpellier, 2001.
173. P. Winterhalter, R. Rouseff, Carotenoid-derived aroma compounds: an introduction, in: *Proceedings of the 219th ACS National Meeting*, San Francisco, CA, 2000.
174. Razungles A., Günata Y., Pinatel S., Baumes R., Bayonove C., *Sci. Aliments* 13 (1993) 59–72.
175. Baumes R., Wirth J., Bureau S , Gunata Y., Razungles A. Biogeneration of C13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apo-carotenoid pathway in grapevines *Analytica Chimica Acta* 458 (2002) 3–14
176. Mateo J.J, Jimenez M. Monoterpenes in grape juice and wines. *J. Of Chem.* 881, 2000, 558-561. Maicas S., Mateo J. J. Hydrolysis of terpenyl glycosides in grape juice and other fruit juices: a review. *Appl Microbiol Biotechnol* 67, 322–335, 2005
177. Bayonove C., Cordonnier R. and Ratier R. (1974) *C.R. Acad. Agric.*, 60, 1321.
178. Bayonove C., Cordonnier R. and Dubois P. (1975) *C.R. Acad. Sci. Paris*, 281, (D), 75.
179. Bayonove C. (1993) In *Les Acquisitions Recentes en Chromatographie du Vin*, (ed. B. Don`eche). Lavoisier, Paris.
180. Cordonnier R. and Bayonove C. (1974) *C. R. Acad. Sci. Paris*, 278, 387.
181. Gunata Z., Bittet S., Brillouet J.-M., Bayonove C. and Cordonnier R. (1988) *Carbohyd. Res.*, 184, 139.

182. Williams P.J., Strauss C.R., Wilson B. and Massy-Westropp R.A. (1982) *Phytochemistry*, 21(8), 2013.
183. Augustyn O.P.H., Rapp A. and Van Wyk C.J. (1982) *South Afric. J. Enol. Viticult.*, 3, (2), 53.
184. Allen M.S., Lacey M.J. and Boyd S. (1994) *J. Agric.Food Chem.*, 42, 1734.
185. Harris R.L.N., Lacey M.J., Brown W.V. and Allen M.S.(1987) *Vitis*, 26, 201.
186. Calo A., Di Stefano R., Costacurta A. and Calo G.(1991) *Riv. Viticult. Enol.*, 3, 3.
187. Darriet Ph., Tominaga T., Demole E. and Dubourdieu D. (1993) *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, serie 3,316 (11), 1332.
188. Tominaga T., Furrer A., Henry R. and Dubourdieu D. (1998a) *Flavour and Fragrance J.* 13 (3), 159–162.
189. Tominaga T., Murat M.-L. and Dubourdieu D. (1998b) *J. Agric. Food Chem.*, 46, 1044–1048.
190. Tominaga T., Peyrot des Gachons C. and Dubourdieu D. (1998c), *J. Agric. Food Chem.*, 46, 5215–5219.
191. Peynaud E. (1980) *Le Gout du Vin*. Dunod, Paris.
192. Masneuf I. (1996) *Recherches sur l'identification genetiques des levures de vinifications. Applications oenologiques*. These Doctorat, Universite Victor Segalen Bordeaux II.

Siti consultati

<http://www.ilportaledelvinoinCampania.it>

*Ringrazio di cuore la Professoressa Lina Chianese per la meravigliosa opportunità e per l'instancabile apporto scientifico ed umano.*

*Ringrazio, inoltre, il Prof. Spagnamusso, direttore del Dipartimento di Scienza degli Alimenti ed il coordinatore del dottorato il Prof Barbieri.*

*Un grazie per il sostegno morale e scientifico alle dottoresse del “gruppo Chianese”:, Rosalba Mauriello, Maria Adalgisa Nicolai e Giuseppina Garro.*

*Ringrazio con molto affetto le dottoresse Maria Quarto, Simonetta Caira ed in modo speciale Gabriella Pinto e Marina Cuollo per l'amicizia, il sostegno ed i consigli.*

*Infine, ringrazio la dottoressa De Pascale innanzitutto per il supporto sperimentale e didattico e per tutto il resto.*

**UN GRAZIE A TUTTA LA MIA FAMIGLIA!!!**