

# Sviluppo di un nuovo indice di maturità fenolica basato sull'ossidazione dei vinaccioli

Laura Rustioni\*, Mara Rossoni, Luigi Defilippi e Osvaldo Failla

Dipartimento di Produzione Vegetale, Università di Milano

## Development of a new phenolic ripening index based on seed oxidation

**Abstract.** In spite of the increasing in chemical and physiological knowledge, the observation of the seed browning is still the best method to evaluate the grape phenolic ripening, even though it is a subjective indicator. A number of results are in agreement with the hypothesis of the seed phenolics oxidation as an important interpretative key of tannin change during ripening. The aim of this work, is to study the seed maturation, with the objective of develop a new index based on phenolic oxidation and useful for wine business. With this purpose, we tested different spectrophotometric assays. We analyzed Pinot noir and Croatina from Oltrepò pavese (Italy), sampled in 2009. Two indexes were developed: one related to the molecular structure, and the other concerning the antioxidant activity. Both the indexes were significantly correlated with the ripening time and with the seed color change. Considering the differences between the two cultivars, an important result was the similar response which allowed to consider the samples together. As expected, the structural index decreased during ripening, indicating molecular changes related with phenolic oxidation. Contrarily, and unexpectedly, the antioxidant index increased during ripening. An interesting negative correlation was found between the two indexes. Comparing HPLC chromatograms, we found epicatechin-3-O-gallate as the flavan-3-ol which showed the biggest decrease.

**Key words:** grapes, polyphenols, quality, tannins, *Vitis vinifera*.

## Introduzione

“...Naturalis autem maturitas est, si cum expresseris vinacea, quae acinis celantur, iam infuscata et nonnulla praeter modum nigra fuerint. Nam colorem nulla res vinaceis potest adferre nisi naturae maturitas...” nella sua “De Re Rustica” Columella (4-70 D.C.), ha indicato il cambiamento del colore dei semi

come il miglior indice di maturazione. Attraverso i secoli, Kennedy *et al.* nel 2000 hanno descritto il cambiamento visivo del colore dei semi durante la maturazione e Ristic *et al.* hanno pubblicato, nel 2005, una carta colorimetrica. Due secoli di coltivazione dell'uva e produzione del vino hanno sottolineato l'importanza di questo fenomeno sulla qualità del prodotto finito.

Nonostante la sua importanza e l'incremento nelle conoscenze chimiche e fisiologiche, l'osservazione dell'imbrunimento del seme rimane il miglior metodo per valutare la maturazione fenolica dell'uva, anche se si tratta di un indicatore soggettivo, e non è facile discriminare le tonalità di marrone per la mancanza di omogeneità tra i semi e nello stesso seme, anche in relazione alla similitudine dei colori negli ultimi steps della maturazione (i più importanti ai fini produttivi).

Fino a poco tempo fa, si credeva che il cambiamento nel colore fosse dovuto alla lignificazione dei tegumenti del seme, e che i fenoli dei semi diminuissero come conseguenza di una barriera fisica contro la loro estrazione (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). L'indurimento dei semi è però dovuto alla lignificazione degli strati interni dei tegumenti esterni (Ristic *et al.*, 2005), mentre i tannini si trovano nel parenchima molle del seme, tra la cuticola ed il rivestimento duro (Adams, 2006). Questa evidenza diminuisce l'importanza della lignificazione ai fini enologici.

Le auxine, l'etilene e la luce sono i principali stimoli che influenzano lo sviluppo della bacca. Pilati *et al.* (2007) osservarono inoltre uno scoppio ossidativo caratterizzato da un rapido accumulo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in invaiatura e dalla modulazione dei principali enzimi della via dei ROS. L'ossidazione dei fenoli può anche spiegare alcuni risultati relative al rendimento della catalisi acida in presenza di floroglucinololo. In uno studio iniziale sul metodo, riguardante l'evoluzione delle proantocianidine in vinaccioli di Shiraz, il rendimento variava consistentemente in relazione alla maturità del frutto. Per le proantocianidine isolate a pre-invaiatura la resa media era del 89%, dopo l'invaiatura questa diminuiva progressivamente per arrivare a valori inferiori al 69% alla maturità commerciale. Questa osservazione, insieme ad altre (cambi nella composizione dei flavan-3-oli monomeri,

\*laura.rustioni@unimi.it

aumento nei radicali organici liberi e cambiamento del colore esterno del seme) suggeriscono che le proantocianidine siano ossidate dopo l'invasiatura (Kennedy e Jones, 2001).

I tannini sono molto importanti nella qualità dei vini rossi. Il loro impatto sensoriale cambia durante la maturazione, ma questo non è legato a particolari fenomeni di accumulo o degradazione. Solitamente i tecnici del settore utilizzano il contenuto antocianico per valutare la maturità fenolica, ma osservando la via biosintetica si può notare una specie di competizione tra la sintesi dei pigmenti e quella dei flavan-3-oli (considerati come sub unità formanti i tannini).

Obiettivo di questo lavoro è quindi quello di sviluppare un nuovo indice di maturità dei vinaccioli relativo all'ossidazione delle molecole fenoliche, utilizzando semplici e veloci metodi spettrofotometrici.

## Materiali e metodi

Un primo piano sperimentale è stato svolto nel 2008, dimostrando l'importanza dell'estrazione: deve essere svolta su semi freschi e solo gli estratti possono essere successivamente conservati a basse temperature.

Nel 2009 abbiamo lavorato su due varietà coltivate nel centro sperimentale di Riccagioia (Torrazza Coste, Oltrepò Pavese): Pinot Nero e Merlot. Iniziando dalla chiusura del grappolo, i campioni venivano raccolti settimanalmente, in tre repliche biologiche.

A causa delle differenze del numero medio di semi per bacca, ogni replica è stata ottenuta estraendo i semi contenuti in 20 acini di Merlot o 15 bacche di Pinot nero. Prima dell'estrazione gli acini ed i semi sono stati pesati, ed i semi sono stati contati. Il colore medio dei semi è stato ottenuto usando la carta colorimetrica di Ristic *et al.* (2005). È stata fatta una doppia estrazione con metanolo puro, per avere una buona solubilità senza modificare le proprietà antiossidanti. I semi raccolti sono stati quindi estratti prima in 25 ml di metanolo per 20 ore, e successivamente per altre 4 ore in altri 25 ml di metanolo nuovo. Alla fine i due estratti sono stati mischiati, per ottenere 50 ml totali.

Diversi metodi sono stati testati, per sviluppare nuovi indici relativi all'ossidazione delle molecole fenoliche: il contenuto in polifenoli totali (Di Stefano *et al.*, 1989), l'indice di proantocianidine per catalisi acida (Makkar, 2000), l'assorbanza a 280 nm, la reazione con DPPH (Siddhuraju e Becker, 2003; Aqil *et al.*, 2006), la quantificazione dei sostituenti orto-diidrossilati (Duran *et al.*, 1991). Questi risultati sono stati misurati usando uno spettrofotometro Jasco 7800.

Alla fine quattro estratti per ogni varietà sono

stati selezionati per studiare i cambiamenti nella composizione fenolica, secondo i metodi di Kammerer *et al.* (2004) e Monagas *et al.* (2005). Le analisi sono state eseguite con un HPLC Shimadzu LC-10 AD VP (Shimadzu Co. Tokyo, Giappone) usando una colonna Nova-Pak C18 con precolonna SecurityGuard (300 mm, 3,9 mm, 4 µm). Il flusso è stato impostato a 0,8 ml/min.

## Risultati e discussione

La figura 1 mostra i cambiamenti del colore in relazione alla carta colorimetrica di Ristic *et al.* (2005). Un importante cambio di colore è stato evidenziato appena dopo l'invasiatura, quando i semi da verdi diventavano giallo/marroni.

Il problema principale riscontrato con questo metodo era la soggettività e la difficoltà nella classificazione dei semi marroni. Comunque è stata rilevata una buona correlazione tra il cambiamento di colore dei semi e la data di campionamento (fig. 2).

Un obiettivo del nostro lavoro era lo sviluppo di

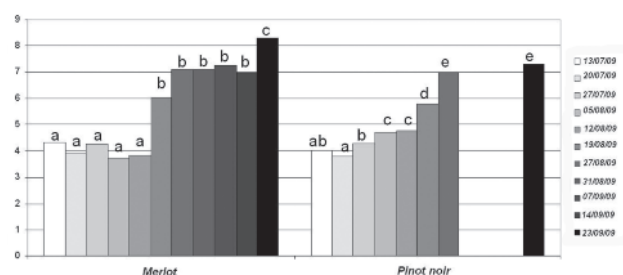


Fig. 1 - Cambiamenti del colore del seme in relazione alla carta colorimetrica di Ristic *et al.* (2005).

Fig. 1 - Seed color change obtained by the Ristic *et al.* (2005) color chart.

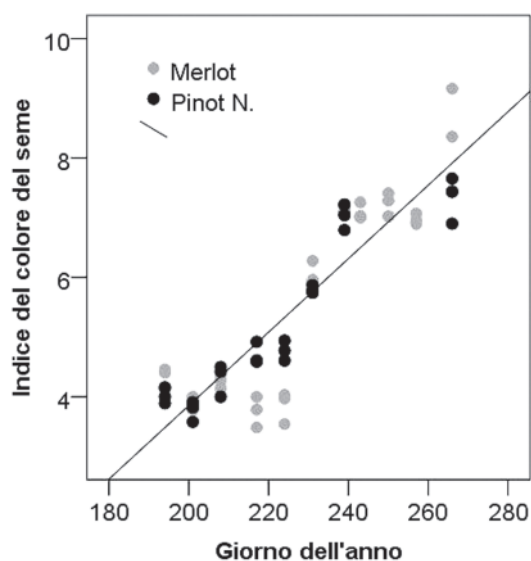


Fig. 2 - Regressione lineare tra cambiamento di colore dei semi e data di campionamento ( $R^2 = 0,811$ ;  $y = 0,0615 * x + -8,453$ ).

Fig. 2 - Linear regression of the seed color index in relation to the day of the year ( $R^2 = 0.811$ ;  $y = 0,0615 * x + -8,453$ ).

un indice utilizzabile per cultivar differenti. Dovrebbe quindi rappresentare la qualità dei polifenoli dei semi, di conseguenza abbiamo deciso di “pulire” il risultato utilizzando un rapporto, anziché un’indicazione diretta del contenuto.

La tabella 1 indica la correlazione dei differenti indici proposti, e, considerando le performances delle due varietà ed il significato chimico, ne sono stati selezionati due:

- un indice di struttura molecolare dato dal rapporto tra i sostituenti orto-difenolici e le proantocianidine per catalisi acida;
- un indice delle proprietà antiossidanti ottenuto dal rapporto DPPH/assorbanza a 280 nm.

Per sviluppare gli indici chimici, sono state seguite strade differenti.

Abbiamo provato ad evidenziare i cambiamenti nella struttura dei tannini (indice di struttura), in relazione alle proprietà dei diversi legami nei polimeri tannici. Un metodo classico per la valutazione dei tannini è l’indice di proantocianidine: per catalisi acida, le unità di estensione unite da legami C4-C8 o C4-C6 sono convertite in antociani colorati (Xie e Dixon, 2005; Dixon *et al.*, 2005). D’altra parte, è dimostrato che le sostituzioni orto-diidrossilate sono i migliori siti per l’ossidazione nelle molecole di flavonoidi (Waterhouse e Laurie, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009). Per questa ragione, abbiamo usato l’abilità di complessazione di questi gruppi fenolici con alcuni metalli per avere un’indicazione della quantità di gruppi catecolo impegnati in legami prodotti dall’ossidazione. Il metodo proposto da Maestro Durán *et al.* (1991) utilizza le proprietà complessanti del molibdeno.

La figura 3 mostra il trend dell’indice di struttura durante lo sviluppo del seme. Il primo incremento può essere legato ad una sintesi di tannini, mentre il decre-

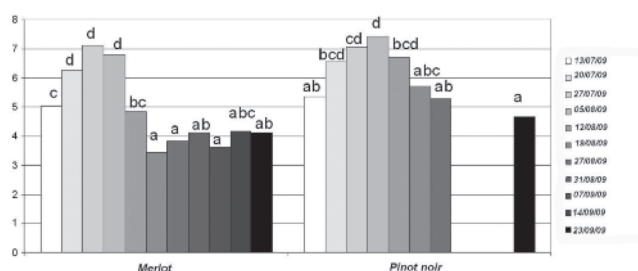


Fig. 3 - Trend dell’indice di struttura durante lo sviluppo del seme.

Fig. 3 - Structural index during seed development.

mento successivo potrebbe essere dovuto all’ossidazione dei fenoli.

L’altro punto di vista considerato è relativo alle proprietà antiossidanti.

Poiché il reattivo di Folin-Ciocalteu (contenuto in polifenoli totali) è anche associato con alle caratteristiche ossidative dei fenoli, abbiamo deciso di correlare l’indice DPPH all’assorbanza a 280 nm. Le figure 4 e 5 indicano la regressione lineare di questo indice in relazione al cambiamento di colore dei semi e alla data di campionamento.

Contrariamente alle nostre aspettative, l’indice antiossidante aumentava progressivamente durante lo sviluppo del seme.

Un correlazione negativa significativa è stata anche osservata tra i nostri due indici (Pinot nero,  $r = -0,547$  e Merlot  $r = -0,581$  entrambe con  $P < 0,001$ ). Questo teoricamente significa che i prodotti di ossidazione sono più antiossidanti dei loro precursori. Provando a spiegare questi risultati, abbiamo preso in considerazione le proprietà antiossidanti dei composti fenolici. Quando un fenolo reagisce con un ROS, la velocità di reazione di ciascuna molecola fenolica dipende dalla sua abilità a formare prodotti radicalici relativamente stabili.

I composti contenenti un gruppo 1,2,3-triidrossilico (pirogallolo), un anello aromatico 1,2-idrossilico (catecolo), o un anello aromatico 1,4-diidrossilico (assente nel vino) sono più facilmente ossidabili perché il radicale semichinonico fenoxile risultante può essere stabilizzato da un secondo atomo di ossigeno (Waterhouse e Laurie, 2006; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Castañeda-Ovando *et al.*, 2009).

La figura 6 mostra un esempio di prodotto di ossidazione di una proantocianidina (Allen, 1998). In questo caso la stabilizzazione degli intermedi è dovuta all’elevata delocalizzazione (fig.7).

Con questo punto di vista è possibile supporre che i prodotti di ossidazione possono essere più antiossidanti dei loro precursori.

Tab. 1 - Correlazioni tra l’indice di colorazione del seme e gli indici spettrofotometrici testati: considerando entrambe le varietà, i migliori indici sono risultati Orto-difenoli/proantocianidine come indice strutturale e DPPH/assorbanza a 280 nm come indice delle proprietà antiossidanti

Tab. 1 - Pearson correlations between the seed color index and the tested spectrophotometric indexes. Considering both the varieties, the best indexes were: ortho-dihydroxylated/proanthocyanidin as structural index and DPPH/280 absorbance for the antioxidant properties.

| Parametri                         | Pinot nero | Merlot    |
|-----------------------------------|------------|-----------|
| n                                 | 24         | 33        |
| orto-difenoli / polifenoli totali | -0,551 **  | -0,084 ns |
| orto-difenoli / assorbanza 280nm  | -0,191 ns  | 0,042 ns  |
| orto-difenoli / proantocianidine  | -0,511 *   | -0,742 ** |
| orto-difenoli / polifenoli totali | 0,122 ns   | 0,536 **  |
| orto-difenoli / assorbanza 280nm  | 0,742 **   | 0,779 **  |
| orto-difenoli / proantocianidine  | -0,095 ns  | -0,594 ** |

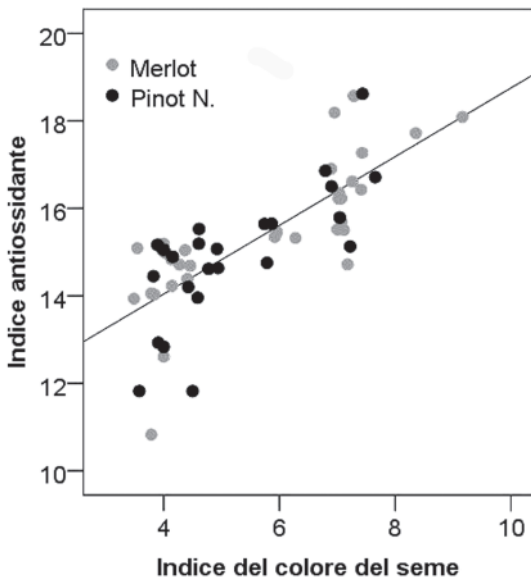


Fig. 4 - Regressione lineare dell'indice antiossidante in relazione al cambiamento di colore dei semi ( $R^2 = 0,590$ ;  $y = 0,785 * x + 10,898$ ).

Fig. 4 - Linear regression of the antioxidant index in relation to the seed color index ( $R^2 = 0.590$ ;  $y = 0.785 * x + 10.898$ ).

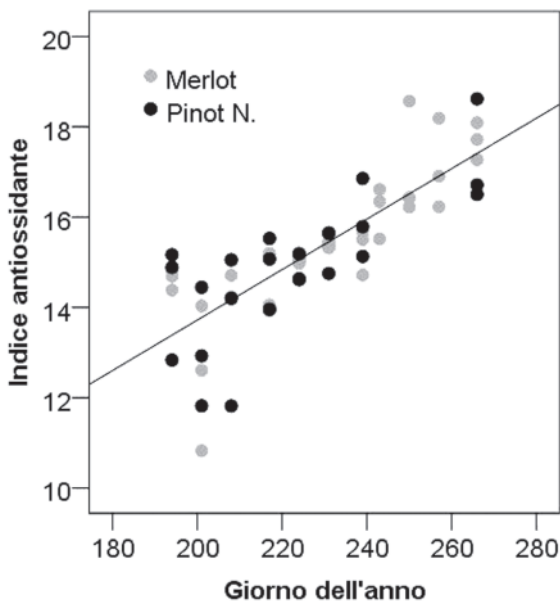


Fig. 5 - Regressione lineare dell'indice antiossidante in relazione alla data di campionamento ( $R^2 = 0,640$ ;  $y = 0,056 * x + 2,5499$ ).

Fig. 5 - Linear regression of the antioxidant index in relation to the day of the year ( $R^2 = 0.640$ ;  $y = 0,056 * x + 2,5499$ ).

Infine abbiamo selezionato 4 campioni per ogni varietà rappresentativi del trend dell'indice. Dopo analisi HPLC, abbiamo trovato che il cambiamento principale nella composizione polifenolica era relativo alla diminuzione dell'epicatechina-3-O-gallato, in accordo con Kennedy *et al.* (2000) che trovavano un decremento di epicatechina-3-O-gallato dall'8% all'invaiaitura all'1% al momento della raccolta.

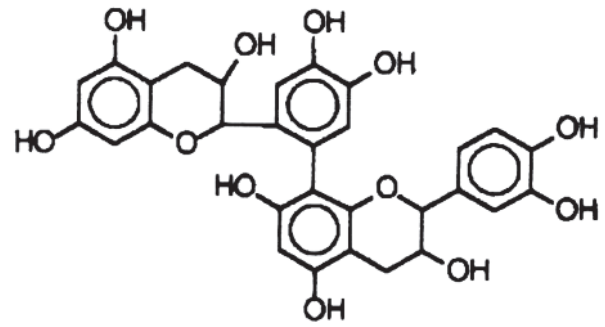


Fig. 6 - Esempio di prodotto di ossidazione di una proantocianidina (Allen, 1998).

Fig. 6 - Example of oxidation product (Allen, 1998).

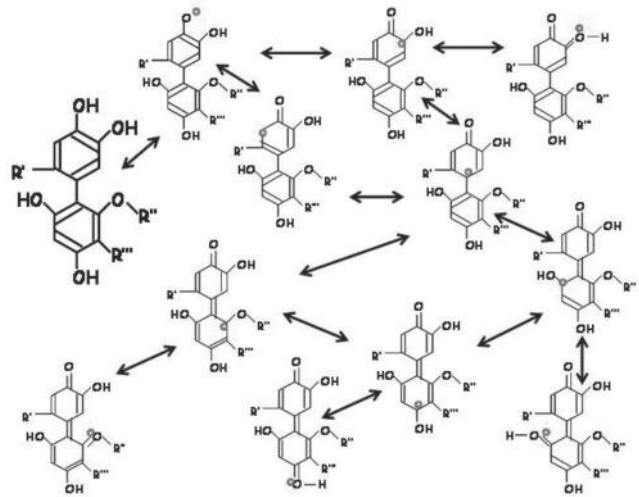


Fig. 7 - Possibile delocalizzazione del radicale libero ottenuto dal prodotto di ossidazione disegnato in figura 6.

Fig. 7 - Hypothetical free radical stabilization of the oxidation product drawn in figure 6.

## Conclusioni

Durante la maturazione i tannini dei semi evolvono, come dimostrato dal cambiamento di colore e di "gusto". In questo lavoro abbiamo provato a sviluppare un indice obiettivo, facile e veloce, utile per i produttori vitivinicoli.

In questa direzione abbiamo proposto due differenti indici spettrofotometrici, uno relativo alla struttura molecolare ed ai legami tra le sub unità flavanoliche, e l'altro legato alle proprietà antiossidanti. Specialmente il secondo ha dato risultati molto interessanti ed inaspettati. Anche se i polifenoli dell'uva si ossidano durante la maturazione, le loro proprietà antiossidanti aumentano. I risultati ottenuti nel 2009 sono stati molto motivanti, anche se una validazione sarà necessaria nel 2010.

## Riassunto

Durante la maturazione il vinacciolo imbrunisce, a causa di fenomeni ossidativi. Obiettivo del lavoro è sviluppare un nuovo indice di maturità fenolica che correli bene con il colore del seme, semplice, rapido, con l'utilizzo di strumentazioni diffuse. L'esperimento si è svolto nel 2009, in Oltrepò pavese, su Pinot Nero e Merlot. Attraverso prove spettrofotometriche sono stati ottenuti due indici legati al cambiamento della struttura molecolare e al potere antiossidante. Entrambi correlano significativamente sia con la data di campionamento sia con il cambiamento di colore del seme. La varietà ha un effetto secondario, presupposto indispensabile per la diffusione del metodo su cultivar differenti.

**Parole chiave:** polifenoli, qualità, tannini, uva, *Vitis vinifera*.

## Bibliografia

- ADAMS D.O., 2006. *Phenolics and ripening in grape berries*. Am. J. Enol. Vitic., 57(3): 249-256.
- ALLEN M., 1998. *Phenolics demystified*. Proc. ASVO oenology seminar. Phenolics and extraction. Adelaide, 9 October 1997. Australian Society of Viticulture and Oenology.
- AQIL F., AHMAD I., MEHMOOD Z., 2006. *Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants*. Turk J. Biol., 30: 177-183
- CASTAÑEDA-OVANDO A., PACHECO-HERNÁNDEZ M., PAEZ-HERNÁNDEZ M.E., RODRÍGUEZ J.A., GALÁN-VIDAL C.A., 2009. *Chemical studies of anthocyanins: A review*. Food Chem. 113: 859-871.
- COLUMELLA. *De re rustica, liber undecimus*.
- DI STEFANO R., CRAVERO M.C., GENTILINI N., 1989. *Metodo per lo studio dei polifenoli nei vini*. L'Enotecnico. Maggio: 83-89.
- DIXON R.A., XIE D., SHARMA S.B., 2005. *Tansley review. Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research?* New Phytologist, 165: 9-28.
- KAMMERER D., CLAUS A., CARLE R., SCHIEBER A., 2004. *Polyphenol screening of pomace from red and white grape varieties (Vitis vinifera L.) by HPLC-DAD-MS/MS*. J Agric Food Chem., 52: 4360-4367.
- KENNEDY J.A., JONES G.P., 2001. *Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol*. J. Agric. Food Chem. 49: 1740-1746.
- KENNEDY J.A., JONES G.P., 2001. *Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol*. J. Agric. Food Chem., 49: 1740-1746.
- KENNEDY J.A., MATTHEWS M., WATERHOUSE A.L., 2000. *Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening*. Phytochem. 55: 77-85.
- MAKKAR, 2000. *Quantification of tannins in tree foliage*. Joint FAO/IAEA, Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. FAO/IAEA Working Document. IAEA, VIENNA, 2000
- MONAGAS M., SUAREZ R., GOMEZ-CORDOVES C., BARTOLOME B., 2005. *Determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC DAD/ESI-MS*. Am. J. Enol. Vitic. 56: 2.
- PILATI S., PERAZZOLI M., MALOSSINI A., CESTARO A., DEMATTÈ L., FONTANA P., DAL RI A., VIOLA R., VELASCO R., MOSER C., 2007. *Genome-wide transcriptional analysis of grapevine berry ripening reveals a set of genes similarly modulated during three seasons and the occurrence of an oxidative burst at véraison*. BMC Genomics, 8: 428. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/8/428>
- RIBEREAU-GAYON P., GLORIES Y., MAUJEAN A., DUBOURDIEU D., 1998. *Trattato di enologia II - Chimica del vino Stabilizzazione Trattamenti*. Edagricole: 141-204.
- RISTIC R., ILAND P.G., 2005. *Relationships between seed and berry development of Vitis vinifera L. cv Shiraz: developmental changes in seed morphology and phenolic composition*. Austral. J. Grape Wine Res., 11: 43-58.
- SIDDHURAJU P., BECKER K., 2003. *Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (Moringa oleifera Lam.) leaves*. J. Agric. Food Chem., 51, 2144-2155.
- WATERHOUSE A.L., LAURIE V. F., 2006. *Oxidation of wine phenolics: a critical evaluation and hypotheses*. Am. J. Enol. Vitic. 57(3): 306-313.
- XIE D., DIXON R.A., 2005. *Review - Proanthocyanidin biosynthesis - still more questions than answers?* Phytochemistry 66: 2127-2144.