

UN NUOVO APPROCCIO VOLTAMMETRICO PER L'ANALISI DEI POLIFENOLI DELLE UVE BIANCHE E IL CONTROLLO DELLE OPERAZIONI PREFERMENTATIVE

Maurizio UGLIANO¹, Jérémie WIRTH², Stéphanie BÉGRAND², Jean-Baptiste DIÉVAL², Christine PASCAL^{2,*}, Stéphane VIDAL²

¹ Università degli Studi di Verona, Dipartimento di Biotecnologie, Italia;

² Vinventions, Team Enologia, Francia

*christine.pascal@vinventions.com

Introduzione

I composti fenolici presenti nell'uva sono ampiamente coinvolti in diversi aspetti della qualità del vino, in particolare colore, sensazione in bocca, persistenza aromatica e potenziale di affinamento. Vitigno, fattori viticoli, annata e grado di maturità svolgono un ruolo essenziale nella determinazione della composizione fenolica delle uve raccolte e hanno conseguenze sul potenziale qualitativo del vino finito. Inoltre i composti fenolici dell'uva subiscono una trasformazione importante durante la vinificazione, in particolare nei processi che conducono alla loro estrazione dall'uva al mosto e nelle ossidazioni chimiche e enzimatiche che avvengono nei mosti e nei vini (Singleton, 1987). Complessivamente molte delle nozioni positivamente associate alla qualità del vino come equilibrio, morbidezza alla degustazione e finale e persistenza aromatica sono legati alla gestione dei composti fenolici del vino.

Tradizionalmente c'è sempre stata grande attenzione al ruolo svolto dai composti fenolici nel vino rosso. Tuttavia, negli ultimi anni, è apparso evidente come alcuni composti fenolici dei vini bianchi abbiano una funzione fondamentale nella percezione della qualità e siano coinvolti in diverse reazioni chimiche importanti per la stabilità del colore e dell'aroma del vino durante la conservazione in cantina e in bottiglia. In particolare si è riscontrato come le catechine e gli acidi idrossicinnamici svolgano un ruolo centrale in molte di tali reazioni (Singleton, 1987).

Dal punto di vista pratico è noto come le condizioni di trattamento dei mosti e in particolare il tipo di pressatura e di collaggio, il livello di ossigenazione e la macerazione pellicolare prefermentativa abbiano un impatto profondo sulla composizione fenolica del vino finito. In generale la maggior parte dei produttori tende a limitare l'estrazione dei composti fenolici durante tali fasi o a eliminarli del tutto mediante ossigenazione o collaggio controllati.

Nelle modalità di vinificazione tipiche della produzione dei vini bianchi le uve sono portate in cantina e trattate seguendo una procedura standard di pressatura, collaggio, ecc. che, nella migliore delle ipotesi, è adattata in base all'obiettivo di produzione. Tuttavia le uve di una stessa tipologia di vitigno, se provengono da vigneti differenti, possono essere molto diverse tra loro, senza poi parlare dell'enorme influenza data dall'annata. La possibilità di anticipare determinati fabbisogni di vinificazione per i singoli lotti di uve a partire da parametri analitici semplici semplificherebbe ampiamente il lavoro della cantina volto a rendere più razionali e efficienti le procedure di elaborazione. Allo stesso modo il controllo in tempo reale dei cambiamenti nella composizione che avvengono durante la vinificazione permetterebbe di prendere decisioni più pertinenti, ottenendo vantaggi qualitativi e un potenziale risparmio a livello di costi. In virtù del loro ruolo centrale nella qualità del vino, i composti fenolici rappresentano un interessante target per questo tipo di approccio.

Il principale problema riscontrato nella fattibilità della misurazione in tempo reale in cantina è rappresentato dalla complessità dell'analisi stessa. Le attrezzature necessarie possono infatti rivelarsi particolarmente costose, il protocollo può dover richiedere un certo livello di preparazione del campione e un personale formato – a volte anche la necessità di dover centrifugare il campione può rappresentare un vero ostacolo – e, infine, l'interpretazione dei dati può rivelarsi complessa.

Inoltre un metodo che consenta di ottenere un responso rapido è realmente necessario, soprattutto per poter acquisire in tempo reale quei risultati che saranno poi utilizzati in fase decisionale.

Gli studi di Kilmartin e dei suoi collaboratori hanno dimostrato come per analizzare i composti fenolici del vino e seguirne l'evoluzione nel corso della vinificazione sia possibile utilizzare la voltammetria ciclica con elettrodi di carbonio vitreo. Martins e coll. hanno inoltre suggerito che è possibile utilizzare tale tecnica nella gestione pratica dell'ossigenazione dei vini. Tuttavia lo sporco accumulato sugli elettrodi a causa dei composti fenolici del vino richiede procedure di pulizia fastidiose, limitando così l'applicazione pratica delle tecniche voltammetriche nel settore. I recenti progressi in questo campo hanno portato a sviluppare elettrodi monouso serigrafati che semplificano ampiamente l'applicazione di procedure di routine basate sui metodi voltammetrici.

È stato quindi possibile riuscire a sviluppare un approccio integrato che sfrutta gli elettrodi monouso per effettuare analisi voltammetriche di routine direttamente in cantina e poter così analizzare la composizione fenolica delle uve e dei mosti. Con questo tipo di procedura non è necessario preparare i campioni e i dati grezzi possono essere esaminati grazie a un'interfaccia software che permette di ottenere parametri di vinificazione pertinenti. Nel presente articolo sono indicate diverse possibili applicazioni di questa nuova metodologia per la produzione di vini bianchi.

Materiali e metodi

Il dispositivo elettrochimico utilizzato, illustrato in Figura 1, è costituito da un potenziostato, il NomaSense PolyScan P200, e da elettrodi serigrafati miniaturizzati (Wine Quality Solutions, Belgio) che contengono un elettrodo di lavoro in inchiostro conduttivo al carbonio. Per ogni misurazione una goccia di campione (50 µl) è stata depositata sulla superficie dell'elettrodo. I voltammogrammi ottenuti per scansione lineare sono stati registrati tra 0 V e 1,2 V in condizioni ambiente. Per ogni misurazione è stato utilizzato un elettrodo nuovo. Tutte le misurazioni sono state effettuate due volte senza diluire il campione. Gli esperimenti preliminari hanno infatti mostrato come la diluizione del campione non migliori la qualità dei risultati, come dimostrato anche da altri elettrodi in carbonio vitreo.



Figura 1. Analizzatore elettrochimico utilizzato per lo studio, costituito da un potenziostato portatile e elettrodi miniaturizzati

Per l'analisi dei profili voltammetrici dei campioni di uva, si è estratto succo a partire da 200 acini appena raccolti. Gli acini sono stati franti con un piccolo mulino da laboratorio e i campioni analizzati subito dopo.

La pressatura è stata effettuata utilizzando una pressa da laboratorio da 5 litri (Parapress, Germania). Ogni ciclo di pressatura è durato 10 min e l'analisi voltammetrica è stata eseguita al termine di ogni ciclo.

I test di ossidazione dei mosti sono stati condotti come indicato di seguito. Chardonnay e Riesling: le uve sono state frante con un piccolo mulino da laboratorio e il succo così ottenuto è stato utilizzato per esperimenti di iperossigenazione dei mosti. 3 mL di succo sono stati disposti in un flacone da 5 mL con sensore di ossigeno (Pst5, Presens, Regensburg, Germania) e portati rapidamente a un tasso di ossigeno disciolto di 8 mg/L mediante agitazione vigorosa. Quindi i flaconi sono stati posti in un sistema SDR (SensorDish® Reader) per la lettura dei sensori (Presens, Regensburg, Germania) per permettere la misurazione continua del consumo di ossigeno. Dopo aver consumato la prima dose di ossigeno, una piccola parte del campione è stata prelevata per eseguire analisi chimiche e voltammetriche. Successivamente l'ossigeno disciolto è stato nuovamente portato a 8 mg/L. La sequenza di operazioni descritta è stata ripetuta per un totale di tre consumi di ossigeno consecutivi, al termine dei quali l'esperimento è stato interrotto. Per ogni vitigno sono state effettuate quattro repliche sperimentali, ognuna con analisi eseguite due volte.

L'analisi dei polifenoli totali è stata condotta come descritto da Singleton e Rossi jr. I valori sono stati corretti in base alla concentrazione di zucchero nel succo.

L'assorbanza a 320 nm è stata misurata con uno spettrofotometro Shimadzu UV-1800.

L'analisi dei polifenoli è stata eseguita mediante iniezione diretta dei vini in un sistema di cromatografia in fase liquida ad alte prestazioni (HPLC) Waters Alliance, dotato di sistema di pompa 2690, iniettore automatico, forno a colonna e rilevatore a diodi (DAD, Waters 996) a 320 nm. È stata utilizzata una colonna HPLC a fase inversa, Atlantis dC18 (250 mm x 2,1 mm, granulometria 5 µm). Il volume iniettato è stato di 5 µL con forno a 30°C. Sono stati utilizzati solventi di eluizione acqua/acido formico (95/5, v/v) e acetonitrile/acqua/acido formico (80/15/5, v/v/v).

Risultati e discussione

Le tecniche voltammetriche implicano l'utilizzo di una configurazione analitica generalmente costituita da un sistema di tre elettrodi (elettrodo di lavoro, elettrodo ausiliario e elettrodo di riferimento) che consentono lo studio della corrente (Ampere) in base al potenziale applicato (Volt). In fase di analisi il potenziale è modificato affinché i vari composti presenti nel campione siano ossidati a seconda del relativo potenziale di ossidazione. Con questa tecnica è possibile analizzare efficacemente i composti fenolici. La sequenza analitica utilizzata nello studio è riepilogata in Figura 2. Una goccia di campione è depositata sull'elettrodo e subito dopo è avviata l'analisi. All'elettrodo viene applicato un potenziale che provoca l'ossidazione dei vari componenti chimici del campione. Nell'esperimento è stato applicato un potenziale crescente da 0 a 1200 mV in grado di coprire i potenziali di ossidazione dei composti fenolici del vino, che possono quindi essere ossidati secondo il loro potenziale di ossidazione caratteristico. Viene così ottenuto il voltammogramma presentato in Figura 2. Poiché il mosto d'uva e il vino contengono una miscela complessa di composti fenolici con potenziali di ossidazione vicini tra loro, il voltammogramma non produce una serie di picchi marcati, ma un profilo curvilineo corrispondente ai vari gruppi di composti ossidati.

Come detto in precedenza, l'uso abituale della voltammetria direttamente in cantina risulta difficile poiché gli elettrodi tradizionali come quelli in carbonio vitreo si sporcano velocemente a causa dei composti fenolici che si depositano sulla loro superficie e devono essere puliti costantemente. Per ovviare al problema sono stati sviluppati elettrodi miniaturizzati monouso a base di inchiostro di pasta

di carbonio brevettato che si adatta perfettamente all'analisi dei composti fenolici del vino. Inoltre è stato sviluppato un potenziostato appositamente pensato per funzionare con questo tipo di elettrodi.

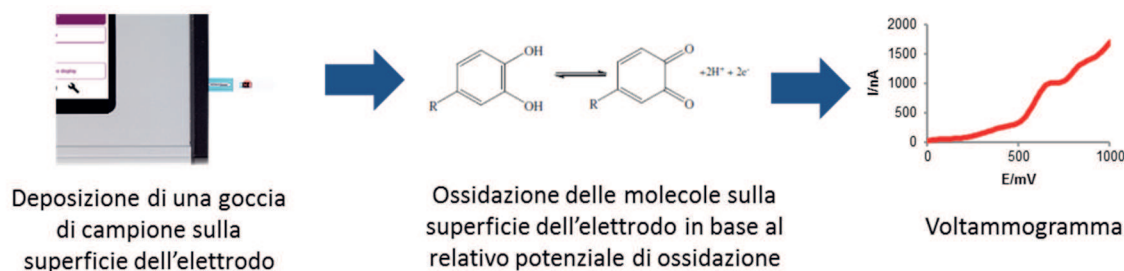


Figura 2. Fasi analitiche che conducono all'ottenimento di un voltammogramma

Studiando il profilo dei vari composti fenolici del vino è stato possibile assegnare a determinati composti delle regioni specifiche del voltammogramma. La regione corrispondente ai potenziali più bassi (200-600 mV) è legata a composti più facilmente ossidabili come catechine, acido caffeico, acido caftarico e acido gallico. Un segnale più alto in questa regione corrisponde a un contenuto maggiore di composti facilmente ossidabili. Attorno a 780 mV è stato possibile osservare un netto picco corrispondente a composti meno ossidabili quali acido p-cumarico e acido ferulico (Kilmartin e coll. 2002). La raccolta di oltre 200 voltammogrammi effettuati con annate dal 2012 al 2014, unita all'analisi dei vari composti fenolici e in particolare all'analisi dei composti fenolici totali e degli acidi idrossicinnamici tramite UV-Vis e HPLC, ha permesso di creare curve di taratura per parametri enologici pertinenti rispetto alla composizione fenolica delle uve e del vino. Ad esempio un valore corrispondente a composti fenolici totali misurati per mezzo di Folin-Ciocalteu (equivalenti di acido gallico mg/L) può essere ottenuto calcolando la carica totale trasmessa durante l'analisi (Figura 3). È inoltre possibile calcolare un indice corrispondente alla corrente trasmessa nella regione dei composti fenolici facilmente ossidabili. Questi due parametri, denominati PhenOx e EasyOx, possono essere utilizzati per caratterizzare i campioni di uva e mosto con lo scopo di prevedere o gestire determinate pratiche enologiche.

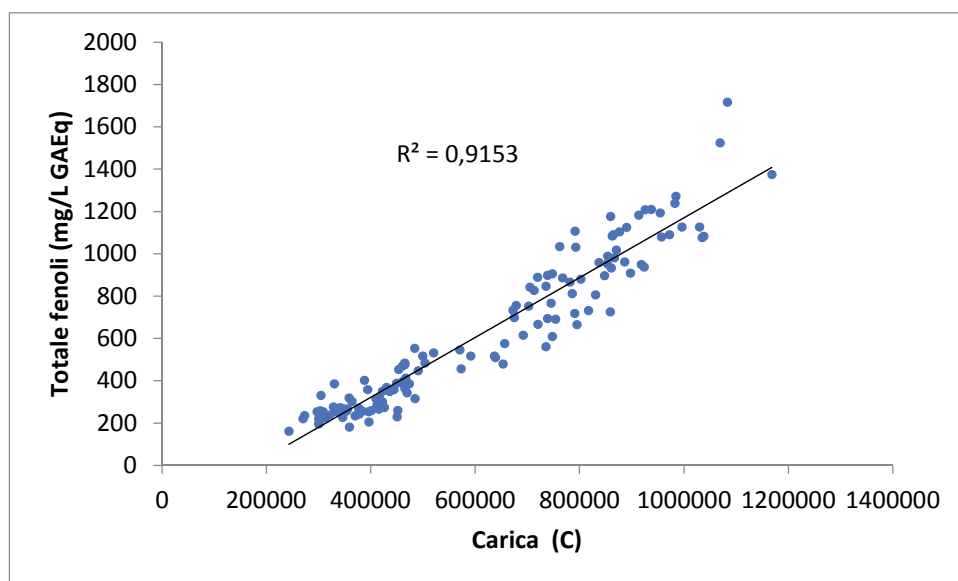


Figura 3. Esempio di correlazione tra i composti fenolici totali misurati tramite spettrofotometria (mg/L, GAEq) e la carica trasmessa durante l'analisi voltammetrica

Profili fenolici dei vari vitigni

La figura 4 mostra un esempio di profilo voltammetrico di vari campioni di uva con i relativi valori di EasyOx e PhenOx. Tutti i campioni di Viognier, Riesling e Grenache hanno mostrato livelli elevati di PhenOx, corrispondenti ai composti fenolici totali. Tuttavia Riesling e Grenache hanno livelli di EasyOx maggiori, il che suggerisce che i mosti di tali uve conterranno livelli più alti di composti soggetti a rapida ossidazione come catechine e acidi idrossicinnamici. In generale per i mosti d'uva con un contenuto maggiore di EasyOx è possibile eseguire interventi come una collaggio o un'ossidazione controllata volti a eliminare una parte dei composti facilmente ossidabili. Petit Manseng, Chardonnay e Chenin sono generalmente caratterizzati da valori simili di EasyOx, con lo Chenin che ha valori di PhenOx più bassi. È poi interessante notare come il Viognier, che ha un contenuto relativamente basso di EasyOx rispetto a Riesling e Grenache, ha mostrato livelli di PhenOx comparabili a quelli di questi due vitigni. I risultati ottenuti evidenziano una percentuale inferiore di composti facilmente ossidabili nel campione di Viognier, nonostante un contenuto di composti fenolici totali simile.

È importante notare che i profili voltammetrici e i valori EasyOx e PhenOx corrispondenti sono stati ottenuti senza centrifugare, filtrare o diluire il campione. In questi termini l'approccio voltammetrico qui discusso offre un grande vantaggio rispetto alle tecniche spettrofotometriche convenzionali.

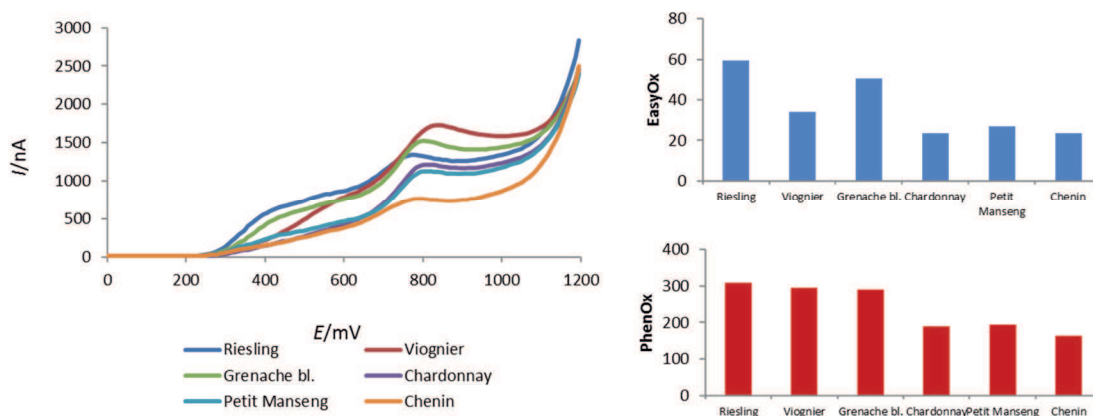


Figura 4. Profili voltammetrici di sei campioni di vari succhi di uva e relativi parametri fenolici EasyOx e PhenOx

Pressatura

La rapida valutazione dell'estrazione fenolica in corso di pressatura potrebbe fornire grandi vantaggi alle cantine in termini di selezione ottimizzata delle frazioni di pressa, permettendo un controllo più preciso della produzione del vino e conseguenti risparmi. I risultati delle analisi voltammetriche di varie frazioni di pressa di uva Grenache blanc sono indicati in Figura 5. È possibile osservare che la frazione di succo di pressa a 0,4 bar è caratterizzato da un segnale più alto nella regione corrispondente agli acidi idrossicinnamici e ad altri composti facilmente ossidabili, con valori di EasyOx maggiori. Il succo successivamente spremuto fino a 1 bar dona poi valori di EasyOx più bassi. Anche il picco ottenuto attorno a 800 mV è inferiore a 1 bar, quindi, complessivamente, il succo estratto a 0,4 bar mostra livelli di PhenOx superiori. In seguito a una nuova rottura e a un nuovo aumento della pressione, il profilo voltammetrico del succo cambia. I valori di EasyOx rimangono simili a quelli ottenuti a 1 bar, mentre i valori di PhenOx aumentano significativamente a causa dell'aumento della concentrazione di composti con potenziale di ossidazione attorno a 800

mV. Tale risultato è dovuto all'aumento della pressione, che porta a una maggiore estrazione dei composti presenti nelle bucce, il cui potenziale di ossidazione è più alto, e dall'ossidazione che avviene durante il ciclo di pressatura e causa la perdita di composti EasyOx, come si vedrà in seguito. Complessivamente questi dati indicano che l'analisi voltammetrica del mosto durante la pressatura può essere un metodo efficace per caratterizzare il contenuto di composti fenolici e il profilo delle varie frazioni di pressa.

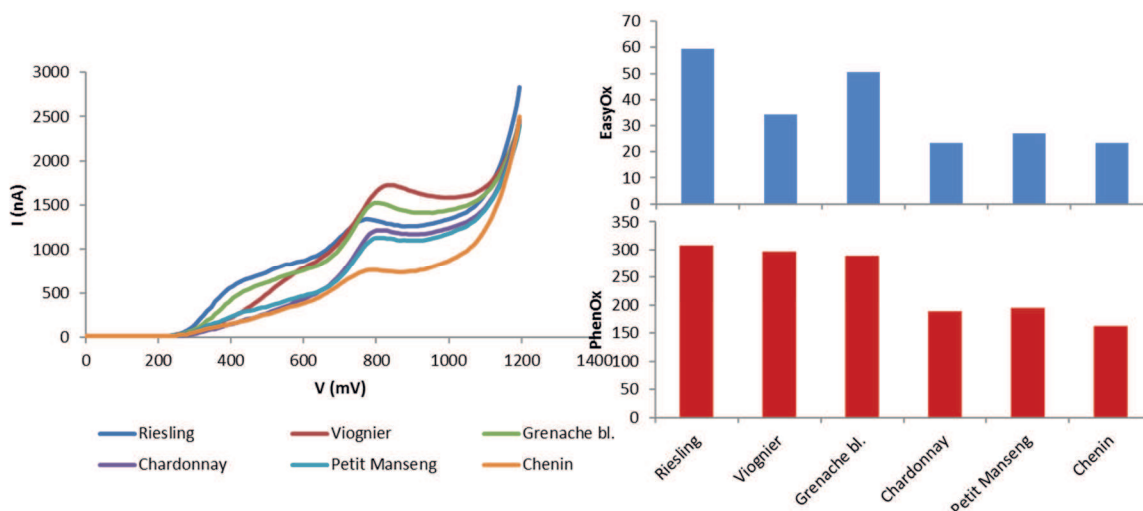


Figura 5. Profili voltammetrici di campioni di mosto di Grenache blanc durante la pressatura e relativi parametri fenolici EasyOx e PhenOx

Ossigenazione controllata dei mosti

L'ossidazione controllata dei mosti mediante l'applicazione di forti dosi di ossigeno (generalmente più saturazioni) è stata proposta come metodo per eliminare i composti fenolici facilmente ossidabili nel mosto di uva bianca e evitare così che tali composti partecipino a reazioni ossidative nel mosto finito. Poiché ogni mosto reagisce all'aggiunta di uno stesso quantitativo di ossigeno in modo diverso, un aspetto critico per l'efficace applicazione di questa tecnica è quello riuscire a valutare rapidamente l'effettivo grado di eliminazione fenolica durante il processo, in modo da evitare eventuali interventi eccessivi o insufficienti.

I mosti di Riesling e Chardonnay analizzati in precedenza sono stati sottoposti a ossigenazione controllata con consumo di tre saturazioni di ossigeno sequenziali (Figura 6). Come mostrano i dati in Figura 4, il mosto di Riesling ha reagito velocemente con l'ossigeno, con un sostanziale abbassamento della carica misurata sin dal consumo della prima saturazione in ossigeno per continuare fino alla terza saturazione. A confronto, il mosto di Chardonnay trattato nelle medesime condizioni è molto meno reattivo e fa registrare un abbassamento relativamente inferiore subito dopo la prima saturazione. I dati raccolti finora mostrano che per ottenere livelli sufficientemente bassi di composti fenolici facilmente ossidabili deve essere raggiunto un valore di EasyOx inferiore a 35. Nel caso del mosto di Riesling si nota quindi che per raggiungere tale valore erano necessarie tre saturazioni, mentre con il mosto di Chardonnay bastava una saturazione per ottenere un'adeguata eliminazione dei composti facilmente ossidabili. L'esistenza di una simile differenza di risposta pone l'accento sulla necessità di effettuare la misurazione in tempo reale, eventualmente con la tecnica di voltammetria sviluppata, per aiutare i produttori a condurre interventi di ossigenazione controllata.

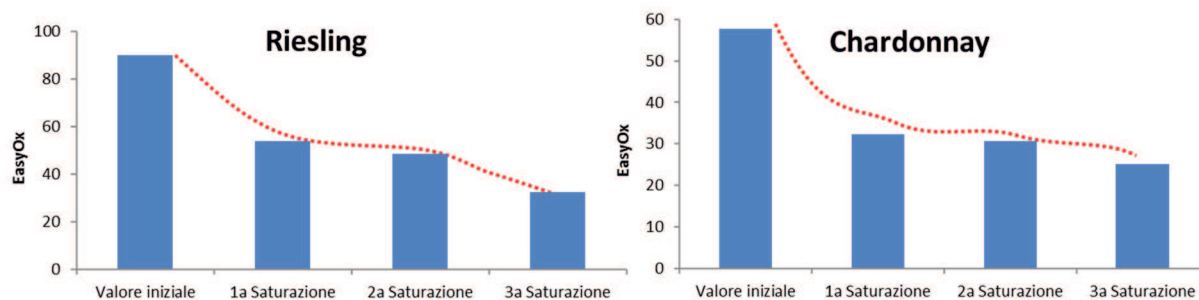


Figura 6. Valori di EasyOx dei due mosti durante una serie di saturazioni di ossigeno sequenziali

Conclusioni

I primi esperimenti relativi all'uso di un metodo di analisi voltammetrica adattato all'uso di routine nelle cantine hanno permesso di mostrare le grandi potenzialità di questa tecnica nell'analisi del profilo fenolico delle uve bianche e della gestione delle fasi prefermentative della vinificazione in bianco. La tecnica applicata permette una rapida caratterizzazione del profilo polifenolico delle uve, con una procedura analitica estremamente semplice e facilmente abbinabile ai classici controlli della maturità. I risultati ottenuti possono essere utilizzati per procedere a una selezione varietale e parcellare, ma anche per definire meglio le esigenze di vinificazione dei vari lotti, in particolare per quanto concerne applicazioni come collaggio e ossigenazione dei mosti. I risultati ottenuti mostrano inoltre che la metodologia analitica proposta può essere impiegata anche per seguire l'evoluzione della composizione fenolica dei mosti durante le operazioni di pressatura o ossigenazione per aiutare il vinificatore a prendere le decisioni migliori per ottenere una maggiore precisione nell'elaborazione dei vini.

Bibliografia

1. Singleton, V. L. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines and model systems: Observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* 1987, 38, 69-77.
2. Singleton, V.; J.A. Rossi Jr, *Am. J. Enol. Vitic* 1965, 3 144-158
3. Kilmartin, P.A.; Zou, H.; Waterhouse, A.L. A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 1957–1965.
4. Kilmartin, P.A.; Zou, H.; Waterhouse, A.L. Correlation of Wine Phenolic Composition versus Cyclic Voltammetry Response. *Am. J. Enol. Vitic* 2002, 53, 294-302
5. Martins, R.C.; Oliveira, R.; Bento, F.; Geraldo, D.; Lopes, V.L.; Guedes de Pinho, P.; Oliveira, C.M.; Silva Ferreira, A.C. Oxidation management of white wines using cyclic voltammetry and multivariate process monitoring. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 12092-12098.

Abstract

È stato sviluppato un metodo elettrochimico per l'analisi veloce dei composti fenolici dell'uva e del mosto. Il metodo sfrutta elettrodi monouso miniaturizzati che consentono un'applicazione veloce e polivalente sia in laboratorio che in cantina per la misurazione dei polifenoli totali e dei polifenoli facilmente ossidabili. Il sistema è stato utilizzato per caratterizzare il profilo fenolico di tre vitigni e per seguirne l'evoluzione nel corso della pressatura e dell'ossigenazione dei mosti. La tecnica permette di adattare meglio le pratiche di vinificazione alla composizione delle uve e di gestire le fasi prefermentative chiave della vinificazione in bianco.