



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Biotecnologie Agrarie

DOTTORATO DI RICERCA IN : VITICOLTURA, ENOLOGIA E MARKETING
DELLE IMPRESE VITIVINICOLE
CICLO XXII

**APPLICAZIONE DI TECNICHE ANALITICHE AVANZATE
NELLO STUDIO DEI COMPOSTI CHIMICI DELL'UVA
E DEL VINO CONSERVATO IN BOTTI DI LEGNO:
IL CASO DEL RABOSO**

Coordinatore: Ch.ma Prof.ssa Viviana Corich

Supervisore: Ch.mo Prof. Andrea Curioni

Dott. Riccardo Flamini

Dottorando: Mirko De Rosso

Alla mia famiglia

INDICE

Riassunto.....	4
Abstract.....	5
Scopo della tesi.....	6
1. INTRODUZIONE.....	7
1.1 La Caratterizzazione Chimica dell’Uva.....	9
1.1.1 I Metaboliti Secondari dell’Uva.....	9
1.1.1.1 Lo Studio dei Polifenoli.....	10
1.1.1.2 Lo Studio del Profilo Aromatico.....	11
1.1.2 Lo Studio delle Proteine dell’Uva.....	21
1.1.2.1 La tecnica MALDI/MS.....	22
1.2 Il Raboso Piave ed il Raboso Veronese.....	25
1.2.1 Raboso Piave.....	25
1.2.2 Raboso Veronese.....	27
1.3 La Composizione Chimica dei Vini Invecchiati in Botte di Legno	29
1.3.1 Utilizzo del Legno in Enologia.....	29
1.3.2 Tipi di Legno Impiegati in Enologia.....	31
2. MATERIALI E METODI	33
2.1 La Caratterizzazione Chimica dell’Uva di Raboso.....	35
2.1.1 Campionamento delle Uve.....	35
2.1.2 Studio dei Polifenoli dell’Uva.....	36
2.1.2.1 Standard e Reagenti.....	36
2.1.2.2 Estrazione dei Campioni.....	36
2.1.2.3 Analisi Spettrofotometriche.....	38
2.1.2.4 Le Analisi HPLC.....	38
2.1.3 Studio del Profilo Aromatico dell’Uva.....	40
2.1.3.1 Standard e Reagenti.....	40
2.1.3.2 Preparazione dei Campioni.....	40
2.1.3.3 Estrazione SPE (Solid Phase Extraction).....	41
2.1.3.4 Analisi GC/MS (Gas Cromatografia-Spettrometria di Massa).....	42
2.1.4 Studio del Profilo Proteico dei Vinaccioli.....	42
2.1.4.1 Reagenti.....	42

2.1.4.2	Campionamento dei Vinaccioli.....	42
2.1.4.3	Preparazione dei Campioni.....	43
2.1.4.4	Estrazione delle Proteine dai Vinaccioli.....	43
2.1.4.5	Analisi MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight).....	43
2.2	Studio dei Composti Volatili e Polifenolici Estratti da Cinque Tipi di Legno Diversi.....	45
2.2.1	Analisi dei Composti Volatili e Polifenolici.....	45
2.2.1.1	Campioni e Standard.....	45
2.2.1.2	Estrazione dei Campioni.....	45
2.2.1.3	Preparazione dei Campioni per l'Analisi GC/MS.....	45
2.2.1.4	Metodi Analitici Utilizzati.....	46
2.2.2	Lo Studio dei Fenoli Volatili Ceduti dai Diversi tipi di Legno Mediante GC/MS-PICI.....	47
2.2.2.1	Campioni e Standard.....	47
2.2.2.2	Curve di Calibrazione.....	47
2.2.2.3	Analisi GC/MS.....	48
2.3	Studio dell'Invecchiamento del Vino Raboso Piave in Botti Fabbricate con Diversi Tipi di Legno.....	49
2.3.1	Botti Utilizzate e Campionamenti dei Vini.....	49
2.3.2	Solventi e Standard.....	49
2.3.3	Analisi dei Composti Aromatici.....	49
2.3.4	Analisi dei Polifenoli.....	51
2.3.5	Analisi LC-ESI-MS ⁿ (Cromatografia Liquida - Spettrometria di Massa).....	51
3.	RISULTATI E DISCUSSIONE.....	53
3.1	La Caratterizzazione Chimica dell'Uva: Il Caso del Raboso Piave e del Raboso Veronese.....	55
3.1.1	Studio dei Polifenoli del Raboso Piave e Raboso Veronese.....	55
3.1.1.1	Indice di Antociani Totali e Flavonoidi Totali delle Bucces.....	55
3.1.1.2	Indice di Antociani Estraibili dalle Bucces con la Vinificazione.....	56
3.1.1.3	Indice di Polifenoli Estraibili dall'Uva con la Vinificazione.....	57
3.1.1.4	Studio del Profilo degli Antociani delle Bucces.....	58
3.1.1.5	Studio degli Acidi Idrossicinnamiltartarici.....	62
3.1.1.6	Studio dei Flavonoli nelle Bucces.....	63

3.1.1.7 Studio dei Flavanoli Monomeri nei Vinaccioli.....	65
3.1.2 Studio del Profilo Aromatico del Raboso Piave e del Raboso Veronese.....	66
3.1.2.1 Composti Alifatici e Benzenoidi Glicosilati.....	67
3.1.2.2 Terpenoli e Norisoprenoidi Glicosilati.....	69
3.1.2.3 Composti Volatili Formati in per Idrolisi Acida.....	71
3.1.2.4 Confronto del Profilo Aromatico con Altre Varietà Riportate in Letteratura.....	74
3.1.3 Differenziazione Chimica tra Raboso Piave e Raboso Veronese.....	75
3.1.4 Studio delle Proteine a Basso Peso Molecolare dei Vinaccioli dell’Uva. Applicazione Nella Caratterizzazione Varietale delle Uve e Studio del Rapporto Parentale tra Raboso Piave e Raboso Veronese.....	77
3.1.4.1 Studio Delle Proteine a Basso Peso Molecolare dei Vinaccioli dell’Uva.....	77
3.1.4.2 Caratterizzazione Varietale dell’Uva sulla Base del Profilo delle Proteine dei Vinaccioli.....	80
3.1.4.3 Differenziazione tra Raboso Piave e Raboso Veronese.....	81
3.1.4.4 Studio del Rapporto Parentale tra Raboso Piave e Raboso Veronese....	84
3.1.5 CONCLUSIONI.....	86
3.2. La Composizione Chimica dei Vini: Invecchiamento in Legno ed Evoluzione del Raboso.....	89
3.2.1 Studio dei Composti Volatili e Polifenolici Estratti Da Cinque Tipi di Legno Diversi: Acacia, Castagno, Ciliegio, Gelso e Rovere.....	89
3.2.1.1 Composti Volatili Estratti da Una Soluzione di Distillato Modello.....	89
3.2.1.2 Studio dei Fenoli Volatili.....	91
3.2.1.3 Composti Polifenolici Estratti da Soluzioni di Vino Modello e Distillato Modello.....	93
3.2.2 Studio dell’Evoluzione di Vino Raboso Piave Durante l’Invecchiamento in Botti Diverse.....	96
3.2.2.1 Evoluzione dei Composti Aromatici.....	96
3.2.2.2 Evoluzione dei Composti Polifenolici.....	98
3.2.2.3 Analisi LC/MS.....	101
3.2.3 CONCLUSIONI.....	105
Bibliografia.....	107
Ringraziamenti.....	119

RIASSUNTO

Raboso Piave e Raboso Veronese sono varietà diverse tipiche del Veneto orientale, dalle caratteristiche organolettiche molto simili tanto da essere vinificate sotto il nome generico di “Raboso”. La notevole somiglianza delle due varietà, confermata anche dall’analisi molecolare, suggeriva profili simili anche per i metaboliti chimici dell’uva. La prima fase di questo lavoro di tesi è stata rivolta alla caratterizzazione chimica dell’uva, con lo studio dei composti polifenolici ed aromatici e del profilo delle proteine dei vinaccioli attraverso lo sviluppo di un nuovo approccio analitico di spettrometria di massa Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization (MALDI/MS). In entrambe le varietà sono stati riscontrati elevati contenuti di flavonoidi e di antociani estraibili con la vinificazione, e di quercetina glucoside in particolare nel Raboso Veronese. Il profilo degli antociani è risultato essere caratterizzato da un importante contenuto di cianina e da bassi livelli di antociani acilati, mentre il profilo aromatico da una significativa presenza di terpenoli in forma glicosilata e di norisoprenoidi. L’approccio MALDI/MS è risultato un valido strumento per la caratterizzazione varietale, evidenziando per le varietà studiate diversi profili delle proteine dei vinaccioli indipendentemente dall’annata e dalla zona. E’ risultato possibile differenziare chimicamente il Raboso Piave dal Veronese in particolare sulla base del profilo degli antociani.

Lo studio della composizione polifenolica ed aromatica ha messo in evidenza una particolare attitudine del vino Raboso per l’affinamento in legno. La seconda fase della tesi è stata pertanto focalizzata sullo studio dell’evoluzione del vino Raboso durante la conservazione in botti di legno. Sono state prese in considerazione botti costruite in legno di acacia, castagno, ciliegio, gelso e rovere. Lo studio delle cessioni aromatiche e polifenoliche in soluzioni di vino e di distillato modello dei diversi tipi di legno ha permesso l’identificazione complessivamente di 51 diversi composti volatili negli estratti idroalcolici, con un caratteristico profilo per ogni tipo di legno. Le maggiori cessioni polifenoliche sono risultate quelle di castagno e rovere; il ciliegio, con alti contenuti di polifenoli che sono però risultati poco estraibili in vinificazione e poco stabili all’ossidazione, si è rivelato il legno meno adatto per i lunghi tempi d’invecchiamento, mentre il più adatto a tale scopo è risultato il rovere. Lo studio dell’evoluzione chimica del vino durante nove mesi d’invecchiamento ha evidenziato che la botte di gelso ha indotto una rilevante diminuzione degli esteri etilici a nota fruttata e di etilguaiacolo, ed una elevata cessione di etilfenolo, indicando questo legno come il meno adatto all’invecchiamento dei vini.

ABSTRACT

Raboso Piave and Raboso Veronese are different grape varieties typical of Eastern Veneto, because are characterized by very similar organoleptic characteristics they used in winemaking for production of the wine named “Raboso”. The remarkable similarity of the two varieties, also confirmed by molecular analyses, suggested similar chemical grape profiles. The first step of the thesis was focused to the chemical characterization of two grape varieties by the study of polyphenolic and aromatic compounds, and of seed protein profiles with a new analytical approach by Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization mass spectrometry (MALDI/MS). High amount of flavonoids and anthocyanins extractable with winemaking were found in both varieties, and high quercetin glucoside was found in particular in Raboso Veronese. The anthocyanic profile was characterized by important content of cyanin, and low contents of acylated anthocyanins, the aroma profile by significant presence of glycoside terpenols and norisoprenoids. The MALDI/MS method was proved to be a valuable tool for variety characterization, evidencing different seed protein profiles for the grape varieties studied. The differentiation between Raboso Piave and Veronese was possible in particular on the basis of the anthocyanic profile.

The study of aromatic and polyphenolic composition evidenced a particular aptitude for wood aging of Raboso wine. As a consequence, the second step of the study was focused on the wine evolution during storage in wooden barrels. Barrels made with acacia, chestnut, cherry, mulberry and oak were used. The study of volatile and polyphenolic compounds released by the wood in wine and spirit model solutions allowed to identify in hydroalcoholic extracts 51 different volatile compounds, and each type of wood showed a distinctive profile. Chestnut and oak showed the major cession of polyphenolic. Cherry had high content of polyphenols but low extractable by the wine and unstable to oxidation so it proved to be the wood least suitable for long time wine aging, while the oak was the most suitable. The study of chemical evolution of wine during nine months of aging showed a significant reduction of fruity-note ethyl esters and ethylguaiacol and a large supply of ethylphenol in the mulberry barrel aged wine, indicating this wood as less suitable for aging of wines.

SCOPO DELLA TESI

Questo lavoro di dottorato si inserisce all'interno dell'attività del Laboratorio Chimico CRA-VIT che già da diversi anni opera nello sviluppo di metodiche ed approcci analitici finalizzati a fornire nuovi strumenti per lo studio della chimica dell'uva e del vino e per la caratterizzazione varietale.

La prima fase della tesi si poneva come obiettivo la caratterizzazione chimica varietale del Raboso, attraverso lo studio qualitativo e quantitativo dei polifenoli e della composizione aromatica dell'uva di Raboso Piave e Raboso Veronese. La notevole somiglianza delle due varietà, confermata anche dall'analisi molecolare con i marcatori microsatelliti (Crespan *et al.*, 2004), suggeriva profili simili dei metaboliti chimici dell'uva. I vini prodotti sono infatti, a parità di tecniche di vinificazione impiegate, molto simili, tanto che nel disciplinare di produzione DOC Piave non si fa distinzione fra le due varietà e si cita tra i vitigni ammessi genericamente il "Raboso". Per fare questo sono state applicate tecniche analitiche strumentali tradizionali (HPLC, GC/MS, spettrofotometria UV-Vis), e sono stati sviluppati nuovi approcci con l'impiego di tecnologie avanzate (MALDI/MS). Lo studio ha permesso di individuare analogie e differenze dal punto di vista chimico tra le due varietà, e di stimare il potenziale polifenolico ed aromatico che dall'uva può essere trasferito al vino.

Nella seconda fase della tesi è stato condotto lo studio dell'evoluzione della composizione chimica del vino invecchiato in botti di legno legata all'apporto varietale ed all'utilizzo di materiali diversi. Lo studio è stato condotto sui vini di Raboso Piave di cui già erano noti gli apporti chimici varietali. Sono state studiate le cessioni nel vino date dall'impiego di legno di acacia, castagno, ciliegio, gelso e rovere che vengono utilizzati per la fabbricazione delle botti destinate all'invecchiamento di vini e distillati. Per le loro caratteristiche organolettiche - che apportano al vino le tipiche note d'invecchiamento in legno - sono stati studiati i polifenoli ed i composti volatili rilasciati nel vino e in soluzioni modello. Per questi studi sono stati sviluppati nuovi approcci con l'utilizzo di tecniche analitiche innovative (SPME) e tecnologie avanzate (LC/MS, MS/MS).

1. Introduzione

1.1 La Caratterizzazione Chimica dell'Uva

1.1.1 I Metaboliti Secondari dell'Uva

I metaboliti secondari dell'uva sono composti legati principalmente alla varietà non coinvolti direttamente nelle principali funzioni fisiologiche delle piante, anche se dal punto di vista quantitativo possono essere influenzati da fattori climatici ed ambientali (Di Stefano, 1996a e 1996b). Polifenoli e aromi dell'uva appartengono a questa classe di composti. Tra i polifenoli destano particolare interesse gli antociani, gli acidi idrossicinnammiltartarici, i flavonoli, i flavani, che giocano un ruolo essenziale nel colore e nel gusto dell'uva e del vino. Questi composti sono inoltre studiati per le loro proprietà antiossidanti e protettive nei confronti delle malattie cardiovascolari (Riberau-Gayon *et al.*, 1998). I composti aromatici dell'uva appartengono alle classi dei terpenoidi, norisoprenoidi, benzenoidi, metossipirazine, composti solforati.

Molte pratiche di cantina sono rivolte al miglioramento delle caratteristiche sensoriali del vino: l'uso di lieviti ed enzimi selezionati, la macerazione in condizioni di temperatura e ossigenazione controllate, l'uso di batteri selezionati per la fermentazione malolattica, l'invecchiamento in legno e in bottiglia. Lo studio della composizione chimica dell'uva e del vino riveste pertanto un ruolo importante per il miglioramento della qualità, la caratterizzazione del prodotto e per stimare il potenziale enologico che dall'uva può essere trasferito al vino (Costacurta *et al.*, 2001).

1.1.1.1 Lo Studio dei Polifenoli

Gli antociani: sono i pigmenti tipici delle uve rosse. Localizzati essenzialmente nelle bucce, sono presenti anche nelle foglie alla fine del periodo vegetativo o come risposta ad agenti patogeni.

L'unità fondamentale della molecola è costituita da due anelli benzenici uniti per mezzo di un eterociclo ossigenato, insaturo e dotato di carica positiva (ione flavilio) (Figura 1.1). I principali antociani presenti nell'uva sono la delfinidina (Dp), la cianidina (Cy), la petunidina (Pt), la peonidina (Pn) e la malvidina (Mv). Nella forma di agliconi (antocianidine) queste molecole sono meno stabili che in forma eterosidica (antocianine) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998), nelle uve di *Vitis vinifera* sono state identificate le antocianine monoglucosilate (nella forma di 3-O-monoglucosidi) ed i loro derivati acilati con l'acido para-cumarico, l'acido acetico e, solo nel caso della malvidina, l'acido caffeico. La presenza di composti diglucosidi (una seconda molecola di glucosio è legata all'ossidrile sul carbonio in posizione 5) è riscontrabile nelle uve di alcune specie di *Vitis* non vinifera (*V. riparia* e *V. rupestris*), ed essendo un carattere genetico che si trasmette in linea dominante, si ritrova anche negli ibridi di prima generazione derivanti da un incrocio fra *V. vinifera* e una delle specie sopra citate. Questo spiega la presenza di antociani diglucosidi negli "ibridi produttori diretti" (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Flamini *et al.*, 2000; 2009). Recentemente anche la pelargonidina diglicoside è stata rilevata in tali ibridi (Wang *et al.*, 2003) (Figura 1.1).

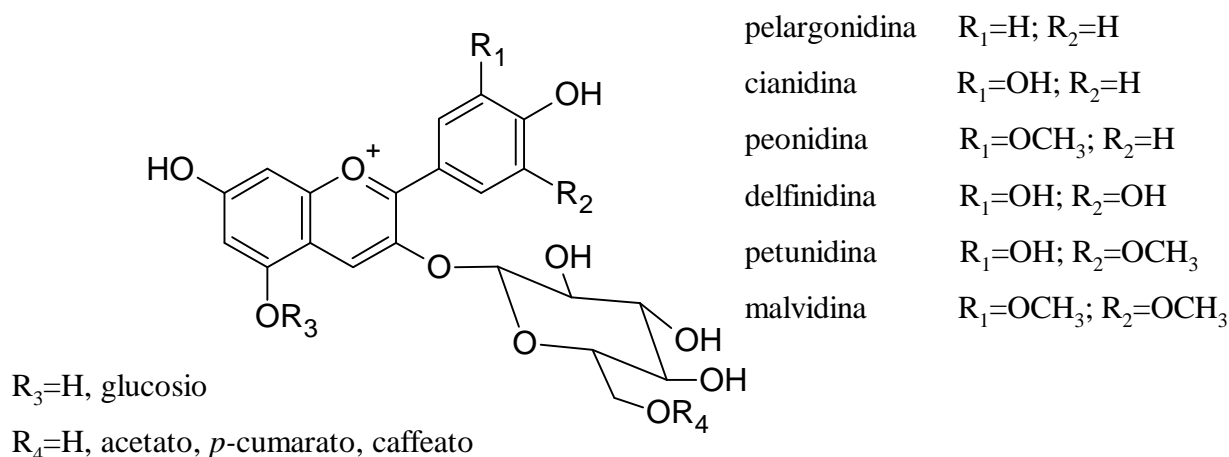


Figura 1.1. Gli antociani dell'uva.

La colorazione che l'antociano assume in soluzione dipende dalla composizione del mezzo (pH, SO₂), dalla struttura molecolare del composto, dalla copigmentazione con altre sostanze presenti. La sostituzione del β-ring causa uno spostamento batocromico della lunghezza d'onda del massimo assorbimento (verso il colore malva), mentre la glucosilazione e l'acilazione spostano il

colore in senso inverso (verso l'arancio). Gli altri polifenoli presenti in soluzione possono copigmentare modificando il colore (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Gli acidi idrossicinnamiltartarici (HCTA): gli esteri tartarici degli acidi cinnamici sono gli acidi fenolici più importanti delle uve sia bianche che rosse (Cravero, 1991). In Figura 1.2 è riportata la struttura generale di questi acidi che si differenziano in *para*-cumarico, caffeico e ferulico (*cis* o *trans*), in base ai sostituenti dell'anello benzenico. Nelle uve sono presenti sia nelle bucce che nelle polpe e oltre che esterificati possono essere in misura minore glucosilati (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

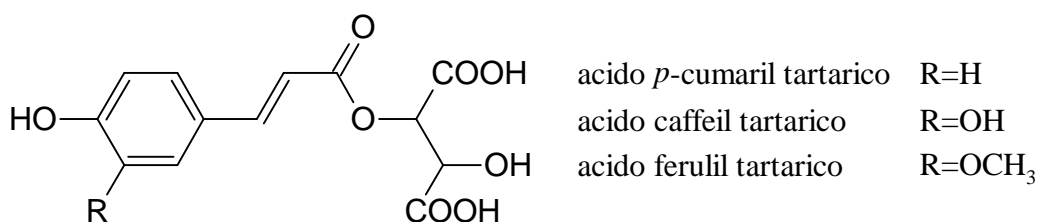


Figura 1.2. Struttura degli acidi idrossicinnamiltartarici dell'uva.

I tenori di HCTA nell'uva possono variare in prossimità della maturazione, però la loro composizione relativa è caratteristica della varietà (Di Stefano, 1996b). L'acido caffeil tartarico risulta essere il composto più abbondante nel mosto, mentre nelle bucce - a seconda della varietà - può essere più abbondante l'acido *trans-p*-cumaril tartarico, mentre l'acido ferulil tartarico è in generale sempre presente in misura minore sia nelle bucce che nel mosto (Cravero e Di Stefano, 1992). L'incremento degli HCTA avviene nei giovani frutti sino a pochi giorni dopo l'inizio dell'invasatura, poi decrescono velocemente con un nuovo piccolo incremento in corrispondenza della diminuzione di accumulo degli zuccheri. Si è inoltre osservato che l'acido caffeil tartarico si riduce rapidamente durante la normale preparazione del mosto, in quanto viene trasformato in acido 2-S-glutationil caffeil tartarico ad opera di un'ossidazione enzimatica. I composti idrossicinnamici sono composti importanti per i loro effetti sulla digeribilità dei cibi e sull'attività microbica, il gusto amaro, la loro azione anti-tiamina, anti-mutagena e anticancerogena e per il loro utilizzo per scopi terapeutici e farmacologici (Cravero, 1991).

E' stato recentemente dimostrato che gli HCTA e gli acidi fenolici sono incolori ma possono assumere colorazione gialla in seguito all'ossidazione: sono infatti responsabili degli imbrunimenti dei mosti causati da ossidazione enzimatica in quanto i substrati ideali delle polifenolossidasi (PPO)

(Cheynier *et al.*, 1989a e 1989b). Dal punto di vista sensoriale questi composti non presentano sapore o odore particolari in soluzioni idroalcoliche, ma per azione di microrganismi possono dare origine a fenoli volatili quali 4-etil-fenolo (odore di “animale”), 4-etil-guaiacolo, 4-vinil-fenolo (odore di guazzo) e 4-vinil-guaiacolo (speziato) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

I flavonoli: appartenenti alla classe dei flavonoidi, i flavonoli sono localizzati nelle bucce delle uve bianche e rosse. In Figura 1.3 sono riportati i principali flavonoli dell’uva formati da due anelli benzenici uniti da un eterociclo ossigenato, derivante dal nucleo 2-fenil cromone, che si differenziano in base ai sostituenti dell’anello laterale in quercetina, miricetina e campferolo. La miricetina è assente, o è presente solo in tracce, nelle uve bianche (Borsa *et al.*, 2005). Nell’uva sono rilevabili principalmente le forme eterosidiche, in particolare la quercetina, la miricetina ed il campferolo nelle forme di glucosidi e di glucuronidi, anche se sono spesso presenti altri flavonoli minori (Di Stefano, 1996b). Il contenuto di agliconi nei vini rossi è di circa 100 mg/L, nei vini bianchi (fermentati in assenza della parti solide dell’uva) sono compresi tra 1-3 mg/L in base alla varietà (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

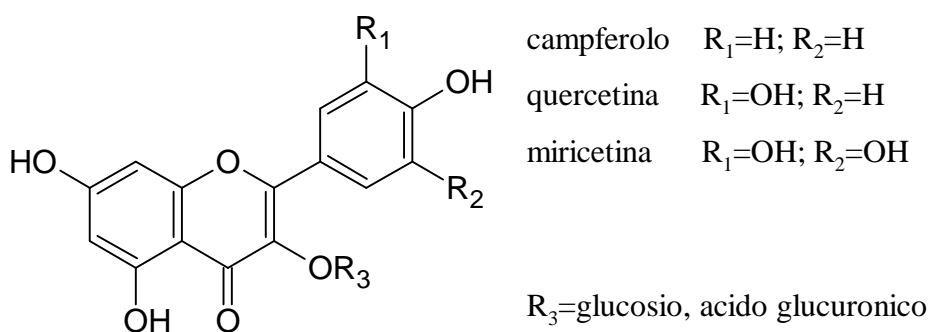


Figura 1.3. I flavonoli dell’uva.

L’importanza dei flavonoli come potenziali agenti anti-mutageni ed anti-cangerogeni e la loro influenza sul colore data dalla co-pigmentazione con gli antociani è stata dimostrata nei vini rossi e nella frutta (Cheynier *et al.*, 1986; Asen *et al.*, 1972).

I flavanoli e le proantocianidine: i flavan-3-oli ed i loro polimeri (proantocianidine) sono presenti soprattutto nelle parti solide dell'uva, in particolare nei vinaccioli. I principali flavan-3-oli dell'uva sono la (+)-catechina e la (-)-epicatechina essendo gli stereoisomeri più stabili dei due carboni asimmetrici dell'eterociclo ossigenato (Figura 1.4). Nei vinaccioli è stata comunque riscontrata la presenza della (-)-epicatechina gallato (l'acido gallico è esterificato sul carbonio C3) anche se in piccole quantità (Pastor del Rio e Kennedy, 2006).

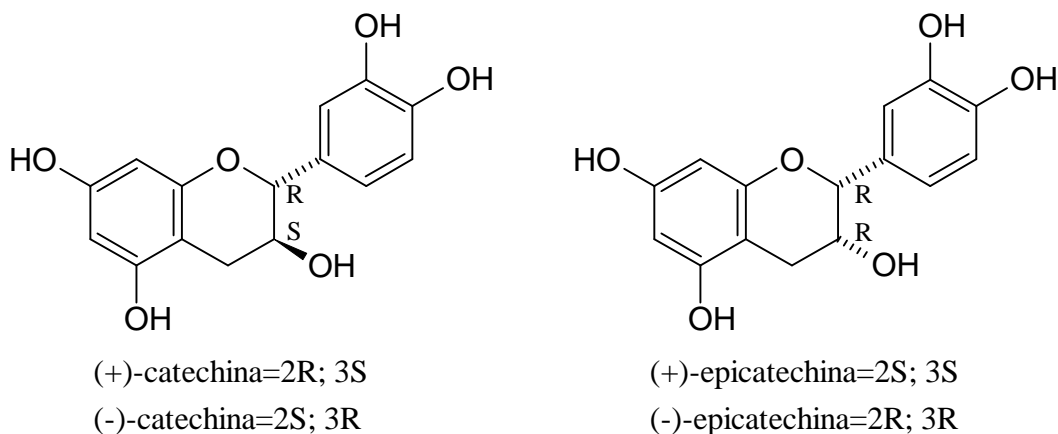


Figura 1.4. I flavan-3-oli dell'uva.

Nell'uva sono state riscontrate proantocianidine dimere, trimere, oligomere e polimere. Sono suddivise in dimeri di tipo A, dove i due monomeri sono connessi da un legame C4-C8 o C4-C6 ed un legame etero C5-C2 o C7-C2, e dimeri di tipo B, dove i due monomeri sono connessi da un solo legame C4-C8 (da B1 a B4) o C4-C6 (da B5 a B8) (fig. 1.5). Le principali procianidine dimere nei vinaccioli sono le B1 e B2.

Quando il grado di polimerizzazione supera le tre molecole, le procianidine vengono considerate tannini condensati (De Freitas *et al.*, 2000) e sono in grado di influenzare il colore e il gusto del vino. I tannini sono composti costituiti da unità monomeriche di natura fenolica in grado di legarsi con le proteine in modo stabile ed a tale scopo vengono usati per la concia delle pelli. Si differenziano in tannini idrolizzabili o gallici (gallotannini ed ellagiotannini) e tannini condensati o catechinici. Mentre i primi sono tipici del legno, solo i secondi si trovano nell'uva (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

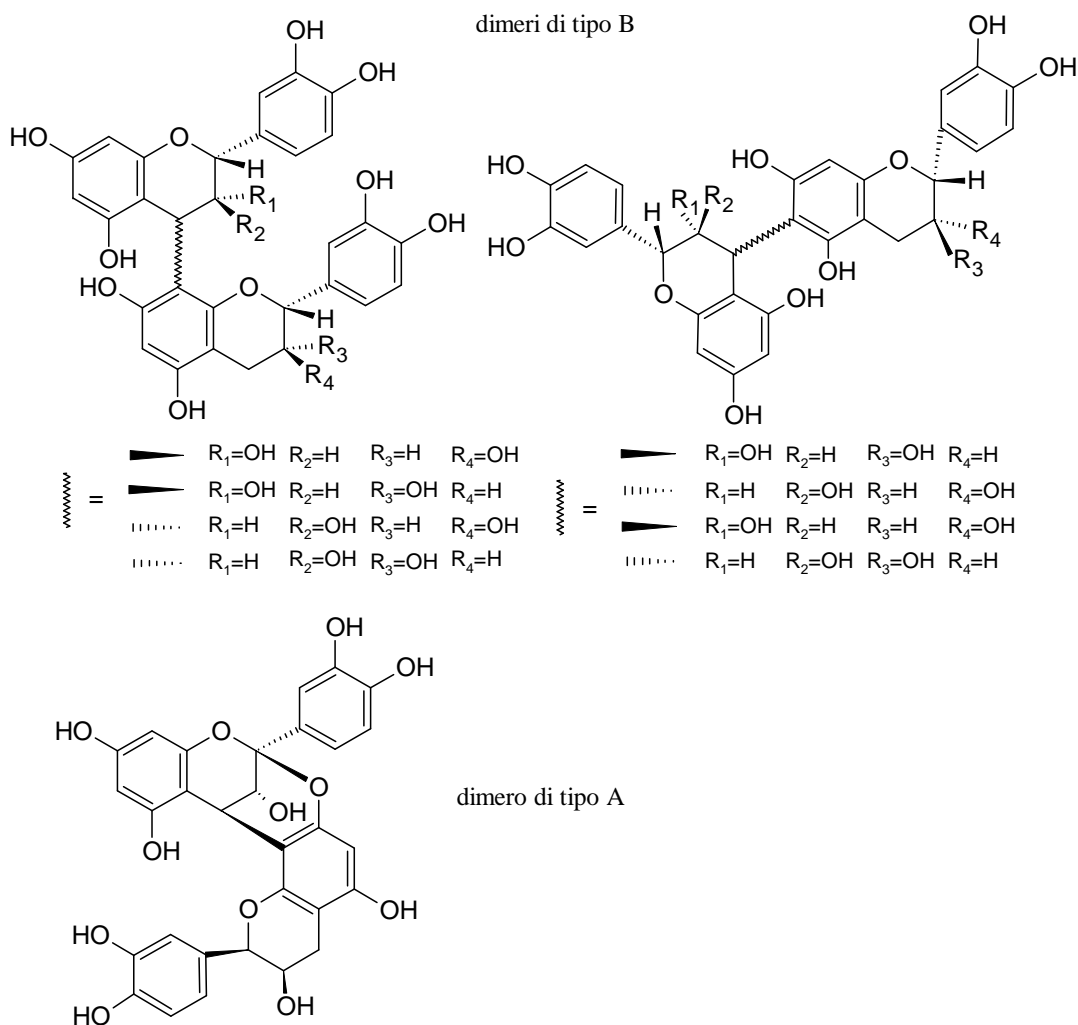


Figura 1.5. Procianidine dimere.

I flavanoli monomeri, dimeri e trimeri sono sostanze incolori, mentre le procianidine oligomere (grado di polimerizzazione superiore a 4) hanno colorazione gialla dorata, che si sposta verso il rosso aumentando il grado di polimerizzazione. Le proantocianidine sono responsabili della sensazione di astringenza dei vini, e contribuiscono ad evitare la decolorazione dei vini rossi nel tempo in quanto stabilizzano gli antociani con reazioni di condensazione tannini-antociani e antociani-tannini (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

Le proantocianidine hanno inoltre evidenziato importanti effetti farmacologici, in particolare per il loro effetto antisclerotico e le loro proprietà antiradicaliche (Aringa *et al.*, 1990; Da Silva *et al.*, 1991; Uchida *et al.*, 1987). Le proantocianidine esterificate con l'acido gallico hanno destato particolare interesse anche per le proprietà antinfiammatorie ed antiallergeniche (Boukharta *et al.*, 1988).

1.1.1.2 Lo Studio del Profilo Aromatico

I terpeni: appartengono ad una famiglia di circa 4000 composti presenti in natura, tra i quali quelli con maggiori proprietà odorose sono i monoterpeni (formati da 10 atomi di carbonio) ed i sesquiterpeni (15 atomi di carbonio). I primi esistono sottoforma di idrocarburi semplici (limonene, mircene, ecc.), aldeidi (nerale, geraniale, ecc.), alcoli (linalolo, geraniolo, ecc.), acidi (acido geranico) ed esteri (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998).

I principali composti terpenici dell'uva sono alcoli monoterpenici monoidrossilati, in particolare il linalolo, geraniolo, nerolo, α -terpineolo, citronellolo (fig. 1.6). Tali composti sono responsabili dei sentori floreali tipici delle varietà di uve aromatiche come i moscati ed le malvasie dove i loro livelli superano le corrispondenti soglie di percezione (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998; Di Stefano e Corino, 1984).

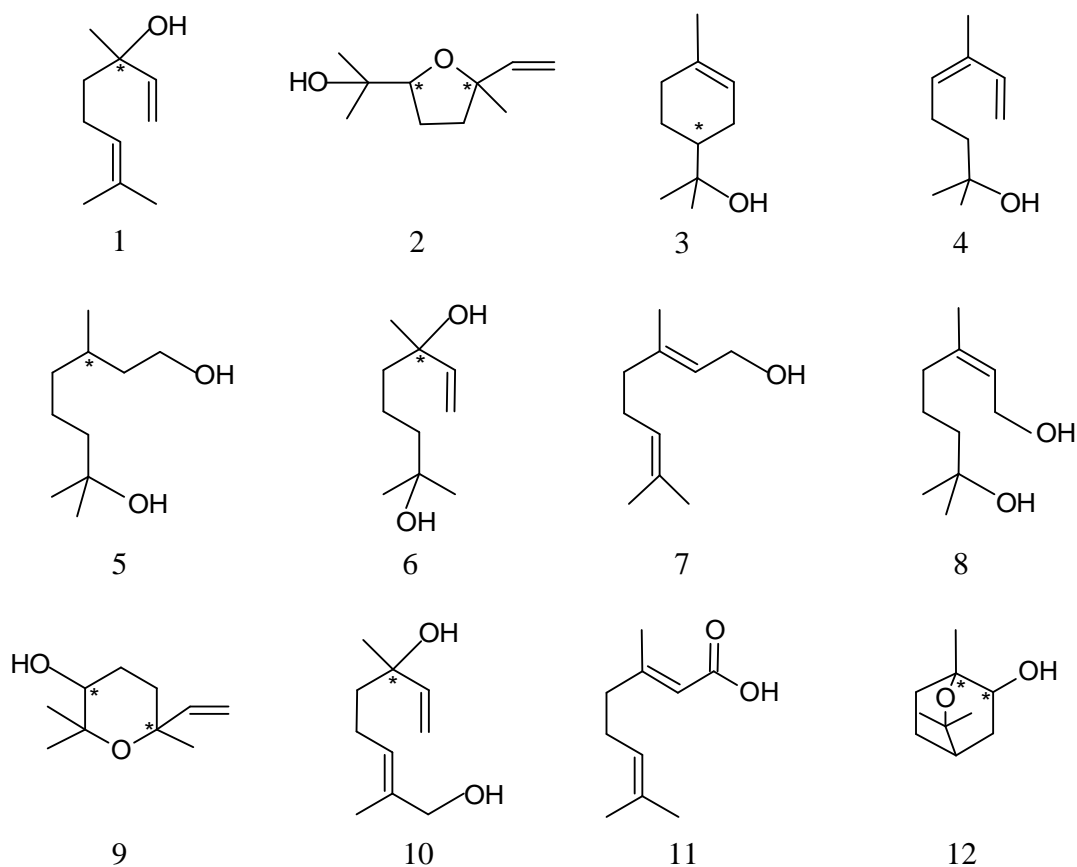


Figura 1.6. Principali alcoli terpenici dell'uva: 1. linalolo; 2. furan linalolo ossido (*cis* e *trans*); 3. α -terpineolo; 4. *trans*-ocimenolo; 5. OH-citronellolo; 6. endiolo; 7. geraniolo; 8. 7-OH-nerolo; 9. piran linalolo ossido (*cis* e *trans*); 10. 8-OH-linalolo; 11. acido geranico; 12. 2-eso-OH-1,8-cineolo.

Nell'uva i terpenoli sono per la maggior parte in forma di precursori glicosidati (Williams *et al.*, 1980; Voirin *et al.*, 1990), come monosaccaridi β -D-glucopiranosidi, o come disaccaridi 6-O- α -L-ramnofuranosil- β -D-glucopiranosidi, 6-O- β -L-apiofuranosil- β -D-glucopiranosidi e 6-O- α -L-arabinofuranosil- β -D-glucopiranosidi. L'idrolisi dei precursori aromatici può avvenire per via chimica o enzimatica. Gli enzimi β -glucosidasi endogeni dell'uva sono poco attivi alle condizioni di pH del mosto, pertanto durante la vinificazione sono utilizzati enzimi prodotti da *Aspergillus niger* al fine di liberare le sostanze aromatiche (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998). Nelle condizioni di pH del mosto e del vino possono anche avere luogo reazioni acido-catalizzate di riarrangiamento delle molecole, che possono diminuire o potenziare i sentori aromatici: i polioli (dioli o trioli) poco odorosi, per idrolisi acida possono originare altri monoterpeni maggiormente aromatici (il nerol ossido), il linalolo può essere trasformato in α -terpineolo e successivamente *cis* e *trans* 1,8-cineolo, geraniolo e nerolo possono riarrangiare per formare linalolo e α -terpineolo (Strauss *et al.*, 1986).

Il tenore dei terpeni liberi e glicosidati aumenta nel frutto con il grado di maturazione; con la sovramaturazione quello dei liberi diminuisce fino ad essere insignificante nell'uva appassita, mentre quello dei composti glicosidi subisce un ulteriore incremento per poi diminuire in fase di appassimento (Di Stefano *et al.*, 1995a).

I norisoprenoidi: sono molecole a 13 atomi di carbonio derivati dalla demolizione dei carotenoidi e delle xantofille (Di Stefano, 1996a). In base alla loro struttura si possono dividere in megastigmani e non megastigmani. I megastigmani sono caratterizzati da una struttura composta da un ciclo a sei atomi di carbonio metossilato sui carboni 1 e 5 e da una catena alifatica a quattro atomi di carbonio, insatura, sul carbonio C6. A loro volta si suddividono in due serie: la serie damascone, ossigenata sul carbonio C7, a cui appartiene il β -damascenone dalla nota di fiori, frutti esotici e miele; la serie ionone, ossigenata sul carbonio C9, a cui appartiene il β -ionone dal caratteristico odore di violetta. I non megastigmani comprendono alcuni composti molto odorosi, ad esempio l'1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftalene (TDN) dalla caratteristica nota di cherosene (Riesling), i vitispirani ed gli actinidoli, dall'odore di canfora (Winterhalter *et al.*, 1990; Strauss *et al.*, 1987). In Figura 1.7 sono riportati alcuni dei principali norisoprenoidi dell'uva.

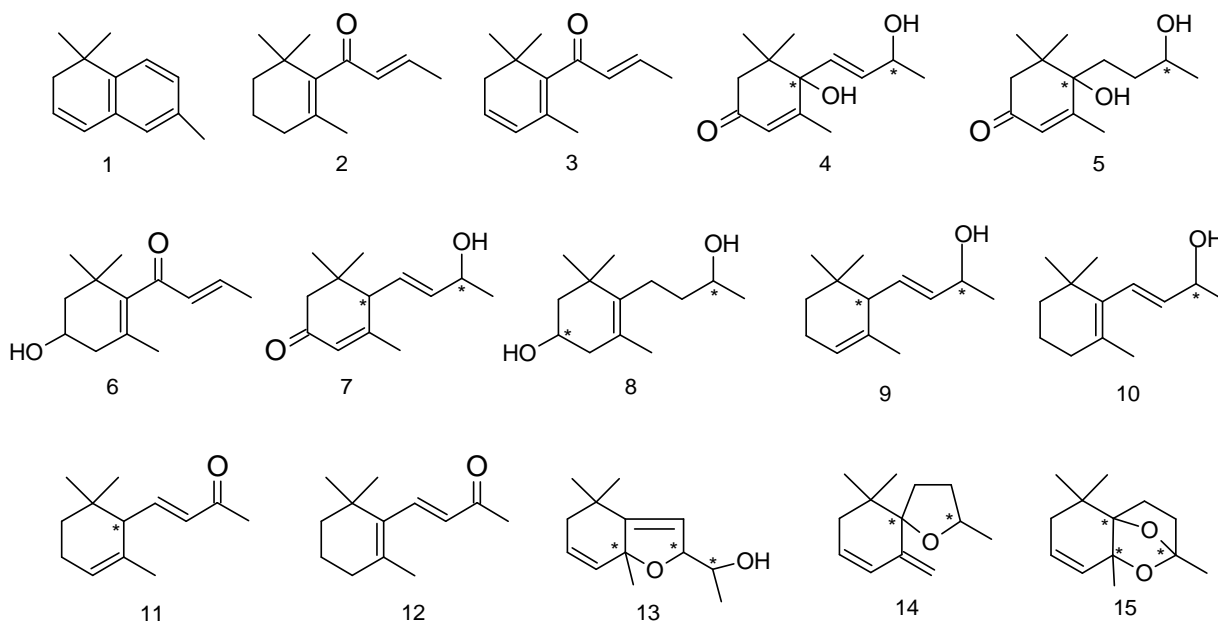


Figura 1.7. Norisoprenoidi presenti nell’uva e nel vino: 1. TDN; 2. β -damascone; 3. β -damascenone; 4. vomifoliolo; 5. diidrovomifoliolo; 6. 3-OH- β -damascone; 7. 3-oxo- α -ionolo; 8. 3-OH-7,8-diidro- β -ionolo; 9. α -ionolo; 10. β -ionolo; 11. α -ionone; 12. β -ionone; 13. actinidoli; 14. vitispirani; 15. riesling acetale.

Come nel caso dei terpenoli, i norisoprenoidi sono dislocati nell’uva sottoforma di glucosidi o polioidrossili, forme che li rendono idrosolubili e poco tossici per la stessa pianta (Di Stefano, 1996a). In mezzo acido subiscono riarrangiamenti acido-catalizzati che possono dare luogo a molecole maggiormente odorose, in particolare i megastigmani possono trasformarsi in non megastigmani (TDN, vitispirani, actinidoli) più aromatici (Strauss *et al.*, 1986). Altra reazione interessante che avviene in ambiente acido è la formazione del β -damascenone da altri precursori norisoprenoidi (es. 3,9-diidrossimegastigma-5-ene-7-ine) (Skouroumounis *et al.*, 1992; Wintherhalter, 1993). Queste trasformazioni in ambiente acido rendono i norisoprenoidi particolarmente interessanti per i vini destinati all’invecchiamento e rappresentano una riserva aromatica di fondamentale importanza per i lunghi affinamenti.

I benzenoidi: la biosintesi di questi composti è legata a quella dei composti fenolici e delle lignine e risulta controllata dalla varietà in quanto, come è noto dallo studio dei composti fenolici, l'attività che presiede l'idrossilazione e la metossilazione del β -ring degli antociani dipende dalla cultivar. Della classe dei benzenoidi fanno parte i composti con la comune caratteristica di avere un anello benzenico: vi sono composti ad anello benzenico non sostituito (alcol benzilico, β -feniletanolo, benzaldeide, ecc.), con un ossidrile sostituyente (salicilato di metile, 4-idrossibenzaldeide, ecc.), con due ossidrili sostituyente (derivati dell'acido salicilico), con un gruppo funzionale guaiacolo (vanillina, alcol vanillico, ecc.), con un ossidrile e due metossili sostituyente (siringaldeide, ecc.) (fig. 1.8) (Di Stefano, 1996a).

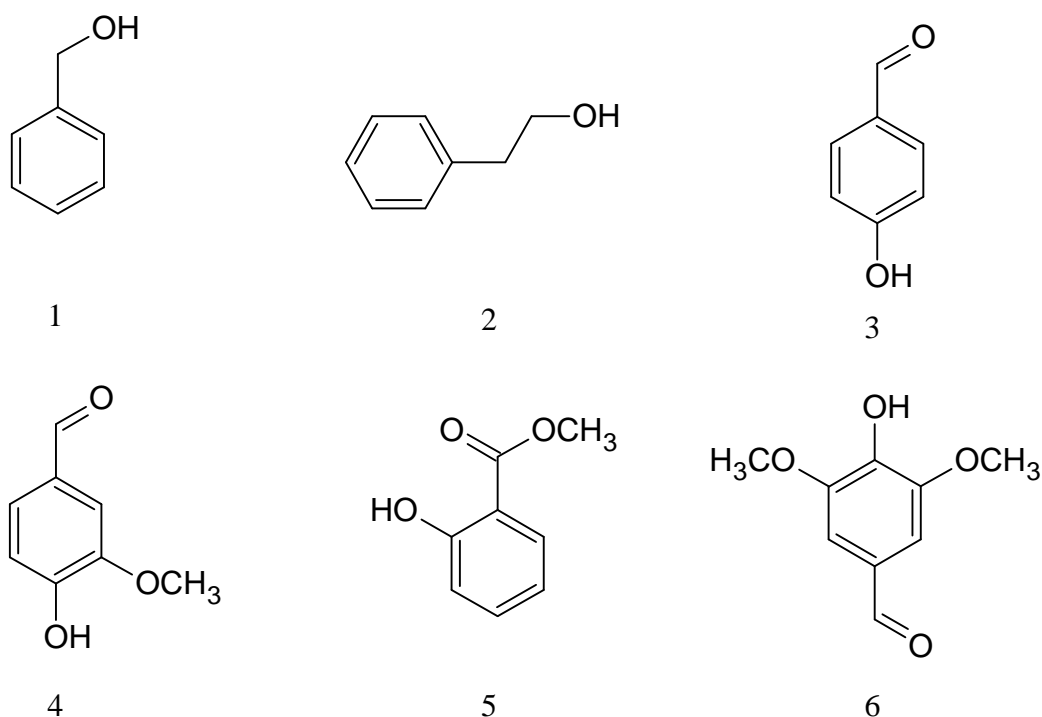


Figura 1.8. Composti benzenoidi: 1. alcol benzilico; 2. β -feniletanolo; 3. 4-idrossibenzaldeide; 4. vanillina; 5. salicilato di metile; 6. aldeide siringica.

Gli alcanoli: quelli dell'uva sono essenzialmente composti a sei atomi di carbonio (esanoli ed esenoli) derivanti dalla lisi delle membrane cellulari o da processi metabolici influenzati dalla varietà (Figura 1.9). Inoltre, alcanoli come l'esanolo, *trans*- e *cis*-3-esenolo e *trans*-2-esenolo sono prodotti attraverso la reazione di idrolisi enzimatica della frazione glicosidica dell'uva (Di Stefano, 1996a). Contribuiscono ai sentori erbacei tipici dell'uva poco matura (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998).

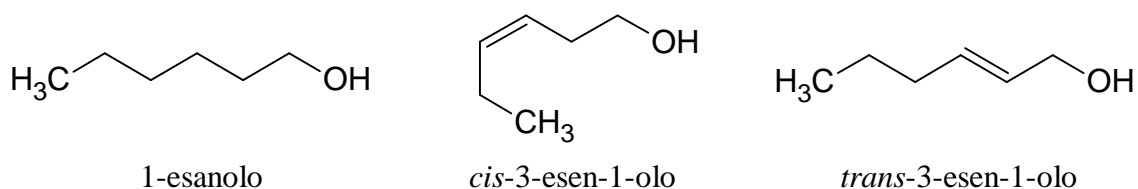


Figura 1.9. Alcuni alcanoli dell'uva.

Le metossipirazine: questi eterociclici azotati sono tipici dell'aroma di varietà quali Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc, Carmenerè, Merlot, Sauvignon (Calò *et al.*, 1991). Le principali metossipirazine sono 2-metossi-3-alchilpirazine, quali la 2-metossi-3-isopropilpirazina, 2-metossi-3-secbutilpirazina e 2-metossi-3-isobutilpirazina (Figura 1.10). Sono presenti soprattutto nelle bucce ed il loro contenuto è legato alla varietà, alla maturità delle uve, all'ambiente ed alle tecniche di coltivazione (Di Stefano, 1996a). Queste metossipirazine - caratterizzate da soglie di percezione particolarmente basse - apportano un particolare aroma vegetale al vino, con note aromatiche di peperone verde, asparago, patata, oltre a note terrose (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998).

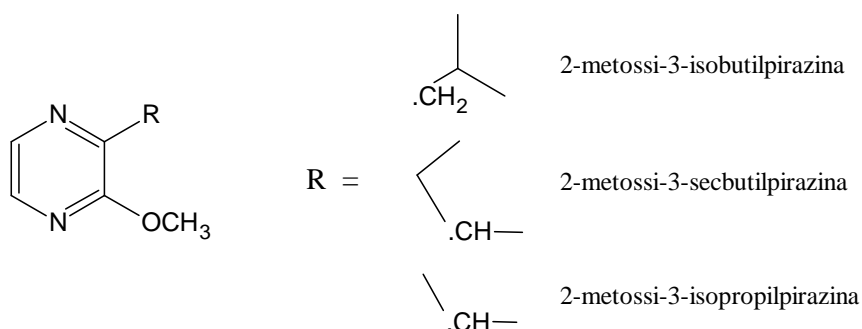


Figura 1.10. Le principali metossipirazine dell'uva.

1.1.2 Lo Studio delle Proteine dell'Uva

Oltre allo studio dei metaboliti secondari di tipo polifenolico ed aromatico, anche un approccio proteomico è risultato utile nella caratterizzazione varietale dell'uva (Flamini e De Rosso, 2006). La maggior parte delle proteine dell'uva sono sintetizzate dopo l'allegagione e si accumulano in concomitanza agli zuccheri durante la maturazione (Tattersal *et al.*, 1997). A maturazione raggiunta le proteine più importanti risultano essere quelle legate alla difesa dai patogeni (Pathogenesis-Related Proteins, PR) per la loro attività antifungina, come le taumatine e le chitinasi (Boller, 1987; Graham e Sticklen, 1994; Stintzi *et al.*, 1995). Queste proteine perdurano durante i processi di vinificazione (in particolare le taumatine PR-5 e le chitinasi PR-3) tanto da essere considerate alla base dell'instabilità proteica dei vini (Pocock e Waters, 1998), e sono state studiate anche per l'identificazione varietale dei vini. Le proteine VVTL1 (21272 Da), VVTL2 e VVTL3, appartenenti al gruppo delle *V. vinifera* taumatine, sono state identificate nell'uva di Moscato d'Alessandria e nel vino Sauvignon Bianco (Tattersal *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1997). Quattro proteine diverse appartenenti al gruppo delle chitinasi sono state identificate in diverse varietà di *V. vinifera* (Pocock *et al.*, 2000; Waters *et al.*, 1998).

Le tecniche più diffusamente utilizzate per lo studio delle proteine del vino comprendono la dialisi, l'ultrafiltrazione, la precipitazione, la cromatografia ad esclusione sterica, la gel elettroforesi mono e bidimensionale, l'elettroforesi capillare, la focalizzazione isoelettrica, la cromatografia ad affinità, l'immunodetezione, la cromatografia ad alte od ultra prestazioni. A tutte queste tecniche si è recentemente aggiunta la spettrometria di massa, in grado di discriminare i diversi peptidi in base ai loro rapporti massa/carica (m/z). Tale metodo è stato implementato con l'accoppiamento alla cromatografia liquida tramite ionizzazione per elettrospray (ESI-MS), tecnica che è stata utilizzata per la determinazione delle PR-proteine di 20 diverse varietà d'uva (Graham e Sticklen, 1994; Stintzi *et al.*, 1995). Un'altra tecnica che viene largamente utilizzata nello studio delle proteine è la spettrometria di massa Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) (Weiss *et al.*, 1998). Sia l'elettrospray che il MALDI sono sistemi che permettono di ionizzare le molecole limitandone la frammentazione. Si conservano quindi gli ioni molecolari dei composti di partenza, e con un analizzatore ad alta risoluzione si può risalire alla loro massa esatta facilitando l'identificazione soprattutto di molecole di grandi dimensioni (polipeptidi e proteine).

1.1.2.1 La tecnica MALDI/MS

Per eseguire l'analisi MALDI gli analiti vengono preventivamente mescolati ad una matrice acida che assorbe l'energia di un laser pulsato ad alta focalizzazione. Si ottiene quindi la protonazione della matrice e successivamente il trasferimento di carica (proton transfer) alle molecole del campione che sono deassorbite e desolvatate (Figura 1.11).

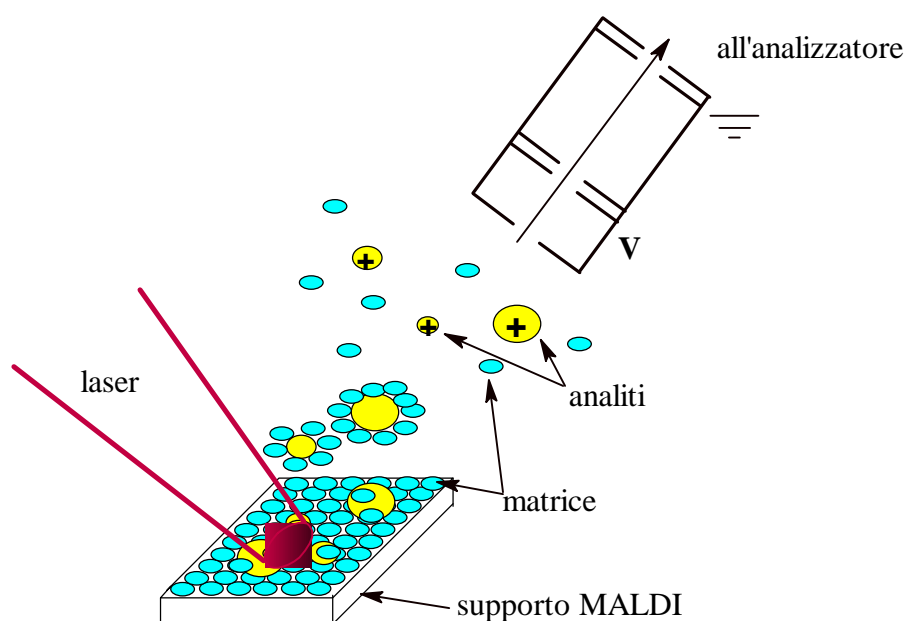


Figura 1.11. Sorgente MALDI.

I composti solitamente utilizzati come matrice sono l'acido 2,5-diidrossibenzoico (acido gentisico, DHB), l'acido 3,5-dimetossi-4-idrossicinnamico (acido sinapinico, SA), l'acido α -ciano-4-idrossicinnamico (HCCA). Il DHB e l'HCCA vengono solitamente utilizzati per la determinazione di molecole di piccole dimensioni, mentre l'acido sinapinico è preferito nell'analisi di proteine ad alto peso molecolare. Gli ioni molecolari così ottenuti vengono accelerati e separati da un analizzatore in base al loro rapporto massa/carica. Il MALDI è una sorgente ad impulsi ed è frequentemente accoppiata ad un analizzatore a tempo di volo (TOF). Ad ogni impulso si creano un gran numero di ioni di masse diverse che con l'applicazione di un campo elettrico sono accelerati alla stessa energia cinetica. A parità di energia cinetica, ioni di massa diversa raggiungono il rivelatore (a 50-100 cm dalla sorgente) in tempi diversi permettendo la loro discriminazione. Per la determinazione delle masse esatte l'analizzatore deve avere un'alta risoluzione che nel caso del TOF viene raggiunta con l'uso di un riflettore elettrostatico. Particelle con lo stesso rapporto m/z possono essere accelerate a velocità diverse influenzando negativamente la risoluzione, il riflettore

elettrostatico (Figura 1.12) compensa questo effetto ricompattando gli ioni di massa uguale in modo che raggiungano il rivelatore esattamente nello stesso tempo (Flamini e Traldi, 2010).

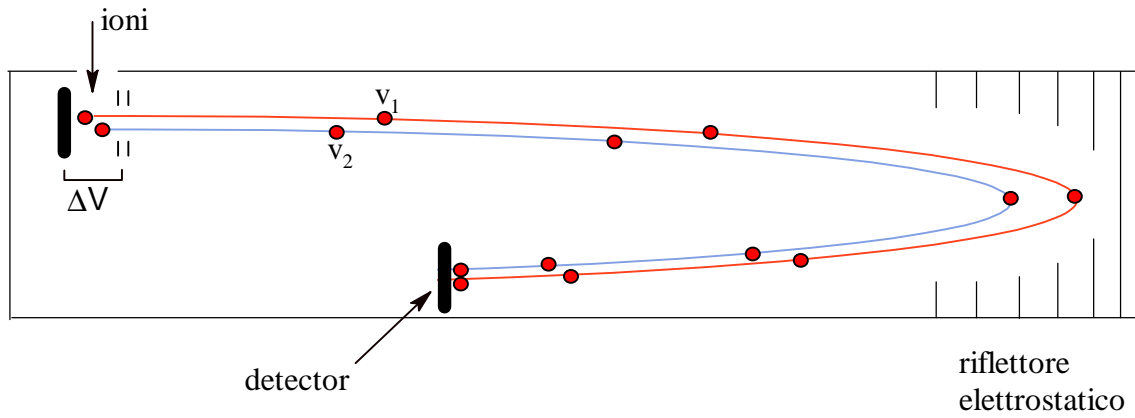


Figura 1.12. Analizzatore TOF dotato di riflettore elettrostatico: v_1 , velocità prima particella; v_2 , velocità seconda particella ($v_1 > v_2$).

1.2 Il Raboso Piave ed il Raboso Veronese

1.2.1 Raboso Piave

Il Raboso Piave è un vitigno a bacca rossa coltivato in Veneto, soprattutto nella valle del Piave e nella provincia di Padova, dove assume il nome di Friularo. Nella zona di Bagnoli (Trevigiano) il Friularo sarebbe stato introdotto nel XVII-XVIII secolo, come testimoniano documenti della Repubblica Veneta. Il Raboso viene citato da Carpenè (1873) e Di Rosavenda (1877), confermando la sua esistenza già da tempi antichi nella zona un tempo denominata Friuli che andava dall'Istria sino al Piave (Calò *et al.*, 2001a; 2001b). Si tratterebbe pertanto molto probabilmente di un vitigno autoctono derivato da viti selvatiche della pianura trevigiana.



Deve il suo nome forse dalla voce dialettale “rabiosa”, dovuta all’impatto spigoloso ed astringente che hanno al palato l’uva, caratterizzata da una elevata acidità anche a piena maturazione, ed il vino che presenta contenuti polifenolici ed acidità elevati. La denominazione potrebbe essere stata successivamente completata dal nome del fiume Piave, lungo il quale la coltura si era maggiormente diffusa.

Il vino ottenuto, molto ricco di colore e di corpo, era in passato considerato vino da taglio data la sua elevata acidità e astringenza poco adatte alla pronta beva. Attualmente il vino Raboso Piave è stato rivalutato grazie all’uso di metodi enologici volti all’ottenimento di vini più morbidi ed equilibrati. Gli alti contenuti in polifenoli e in acidità totale lo rendono particolarmente adatto all’invecchiamento in botte, processo che elimina i difetti del vino giovane, con il conferimento d’aromi più maturi e l’ammorbidimento dei tannini più astringenti. Per ovviare al basso grado alcolico recentemente è stata introdotta anche la pratica della passitura.

Scheda ampelografica

- ❖ **Apice del germoglio:** espanso, cotonoso, biancastro.
- ❖ **Foglia:** di grandezza media, pentagonale-orbicolare, un pò allungata, tri-pentalobata. Seno peziolare a U aperto. Seni laterali superiori a lira chiusa, mediamente profondi, seni laterali inferiori a U poco profondi. Lembo leggermente ondulato e bolloso.
- ❖ **Grappolo:** di media grandezza, cilindrico-piramidale, alato con una o due ali, molto compatto.
- ❖ **Acino:** medio, sferoidale, con buccia molto pruinosa, spessa, di colore blu-nero. Polpa dal sapore debolmente di viola, acidulo.
- ❖ **Fenologia:**
 - **Epoca di germogliamento:** precoce.
 - **Epoca di fioritura:** medio.
 - **Epoca d'invaiaatura:** media.
 - **Epoca di maturazione:** tardiva.
- ❖ **Isoenzimi:** GPI 10, GPM 5.
- ❖ **Attitudini agronomiche e colturali:**
 - **Portamento della vegetazione:** semieretto.
 - **Vigoria:** elevata.
 - **Peso medio del grappolo:** medio-basso (100-270 g).
 - **Fertilità delle gemme:** generalmente 2.
- ❖ **Esigenza ambientali e colturali:** produzione abbondante e costante. Predilige terreni alluvionali, profondi o sassoso-alluvionali. I sistemi d'allevamento più diffusi sono quelli espansi.
- ❖ **Sensibilità malattie ed avversità:** mediamente tollerante al freddo invernale, tollerante alla peronospora, botrite, marciume acido e mal dell'esca, sensibile all'oidio. Sensibile agli acari, cicaline e tignole. A causa del germogliamento precoce può essere danneggiato dalle brinate primaverili.
- ❖ **Caratteristiche chimiche del vino:**
 - **Grado alcolico:** 9.5-12.0 vol. %.
 - **pH:** 2.6-3.0.
 - **Acidità:** 8.2-13.9 g/L.

(Tratto da: Calò *et al.*, 2001a).

1.2.2 Raboso Veronese

Il Raboso Veronese è diffuso soprattutto nella parte orientale della pianura trevigiana, nelle vicine province di Venezia, Vicenza, Rovigo ed in quelle di Ferrara e Ravenna. E' incerta l'epoca in cui venne introdotto e la sua origine, ma nel Trevigiano iniziò a diffondersi largamente all'inizio del XIX secolo. Si ritiene che la denominazione Veronese non derivi dall'origine geografica, ma dal nome di colui che per primo ne introdusse la coltivazione. Benché spesso confuse tra loro, Raboso Piave e Raboso Veronese sono due varietà diverse e studi genetici indicano il Raboso Veronese come proveniente dall'incrocio tra Raboso Piave e Marzemina Bianca (Crespan *et al.*, 2006). Anche i vini di Raboso Veronese presentano in generale corpo e colore molto marcati dovuti all'elevato contenuto polifenolico dell'uva (Cosmo *et al.*, 1966a; 1966b). Poiché i vini risultano molto simili il disciplinare di produzione DOC Piave non distingue tra le due varietà riportando come vitigno ammesso il "Raboso" genericamente. Il rapporto di parentela con la Marzemina Bianca influisce sull'epoca di maturazione delle uve, sempre tardiva ma leggermente anticipata rispetto al Raboso Piave.



Il Raboso Veronese era in passato disacidificato e vinificato in rosato per renderlo di pronta beva. Dalla vinificazione in rosso si ottiene un vino profumato, leggermente amarognolo, molto colorato, simile quindi al Raboso Piave anche se più armonico. La produzione di vini rosati è attualmente diminuita, i produttori preferiscono quindi usarlo in uvaggi con altre varietà rosse o con lo stesso Raboso Piave.

Scheda ampelografica

- ❖ **Apice del germoglio:** di media espansione, lanuginoso, di colore verde-biancastro con leggere sfumature rosate.
- ❖ **Foglia:** media, pentagonale penta o eptalobata. Seno peziolare a U con bordi che si avvicinano fino ad accavallarsi, seni laterali superiori molto profondi, a lira che spesso si accavallano, seni laterali inferiori a U. Lembo piegato a gronda, con lobi molto marcati, leggermente a gronda.
- ❖ **Grappolo:** grande, cilindrico, allungato, con un'ala, compatto.
- ❖ **Acino:** medio, tendenzialmente sferoidale a volte allungato. Buccia pruinosa, spessa, coriacea, di colore blu nero. Polpa di sapore semplice, dolce, acidulo. Si distingue dal Raboso Piave per il grappolo più spargolo, acini quasi sferici, l'uva meno acida e astringente.
- ❖ **Fenologia:**
 - **Epoca di germogliamento:** medio precoce.
 - **Epoca di fioritura:** media.
 - **Epoca d'invaiaatura:** media.
 - **Epoca di maturazione:** tardiva.
- ❖ **Isoenzimi:** GPI 1, PGM 4.
- ❖ **Attitudini agronomiche e colturali:**
 - **Portamento della vegetazione:** semieretto.
 - **Vigoria:** notevole.
 - **Peso medio del grappolo:** medio basso (120-220 g).
 - **Fertilità delle gemme:** solitamente 2.
- ❖ **Esigenze ambientali e colturali:** vitigno rustico con media tolleranza ai freddi invernali. La produzione è costante e abbondante. Predilige terreni di pianura, ciottolosi, alluvionali, sabbioso-limosi. Forme di allevamento espanse e potatura corta.
- ❖ **Sensibilità malattie e avversità:** buona resistenza alle malattie crittogamiche, soprattutto alla peronospora, botrite e marciume acido, sensibile all'oidio e al mal dell'esca. Sensibile all'acinellatura verde con basse temperature o piogge nel periodo della fioritura.
- ❖ **Caratteristiche chimiche del vino:**
 - **Grado alcolico:** 9.0-12.5 vol. %, **pH:** 2.7-3.6, **Acidità:** 6.8-12.6 g/L.

(Tratto da: Calò *et al.*, 2001b).

1.3 La Composizione Chimica dei Vini Invecchiati in Botte di Legno

1.3.1 Utilizzo del Legno in Enologia

L'invecchiamento del vino e degli alcolici in botti di legno è un processo molto importante nell'industria enologica volto alla stabilizzazione del colore, al miglioramento della limpidezza, all'affinamento ed arricchimento delle caratteristiche sensoriali dei prodotti. Un tempo era diffuso l'uso di vasi vinari di grandi dimensioni, oggi si preferiscono botti di legno barrique (225 L) o tonneaux (500-900 L).

La permeazione dell'ossigeno attraverso il legno favorisce i processi di ossido-riduzione e la formazione di nuovi composti più stabili derivati dagli antociani e dai tannini del vino, con conseguente stabilizzazione del colore e diminuzione dell'astringenza (Ribereau-Gayon *et al.*, 1998).

L'affinamento in botte è utilizzato anche nella produzione di bevande spiritose, come armagnac, whisky, brandy e grappa (Puech, 1981; MacNamara *et al.*, 2001; Delgado *et al.*, 1990; Mattivi *et al.*, 1989).

Le sostanze cedute dal legno alle bevande appartengono a numerose classi di composti: ellagitannini, lattoni, cumarine, polisaccaridi, idrocarburi e acidi grassi, terpeni, norisoprenoidi, steroidi, carotenoidi e composti furanici. Il legno cede inoltre fenoli volatili e aldeidi benzoiche che rivestono un ruolo essenziale nella caratterizzazione sensoriale (Canas *et al.*, 2004; Puech *et al.*, 1999; Pérez-Coello *et al.*, 1999; Masson *et al.*, 1996; Ibern-Gómez *et al.*, 2001). In Figura 1.13 sono riportate le formule di struttura dei principali composti volatili identificati in un estratto di legno di rovere. La vanillina (nota di vaniglia,) e l'eugenolo (nota speziata, chiodi di garofano) contribuiscono grazie alle loro basse soglie di percezione (0.4 ppm nel vino rosso per la vanillina, Boidron *et al.*, 1988) al caratteristico aroma del vino invecchiato in legno. Secondo Canas *et al.* (2004) il rapporto tra le aldeidi benzoiche e cinnamiche differenzia i prodotti invecchiati in botti di rovere o di castagno e fornisce informazioni sul grado di tostatura a cui sono stati sottoposti i legni. I derivati furanici e piranici (es. furfurale, Figura 1.13) derivano dai trattamenti termici subiti dal legno durante la fabbricazione delle botti e conferiscono sentori di caramello bruciato (Cutzach *et al.*, 1997). Dal legno derivano anche i tannini idrolizzabili (gallotannini ed ellagitannini) che giocano un ruolo importante nell'affinamento dei vini contribuendo alla stabilizzazione del colore,

la struttura ed alle caratteristiche organolettiche (Puech *et al.*, 1999; Ribereau-Gayon *et al.*, 1998). Data la porosità del legno, nel vino in barrique possono essere dissolti 15-45 mg/L di ossigeno, i tannini idrolizzabili reagiscono con l'ossigeno formando H_2O_2 e promovendo la formazione di etanale da etanolo (Ribereau-Gayon *et al.*, 1998). L'etanale reagendo con i tannini forma composti intermedi che legandosi agli antociani stabilizzano il colore nei confronti delle variazioni di pH e la SO_2 (Ribereau-Gayon *et al.*, 1998; Escribano-Bailón *et al.*, 2001).

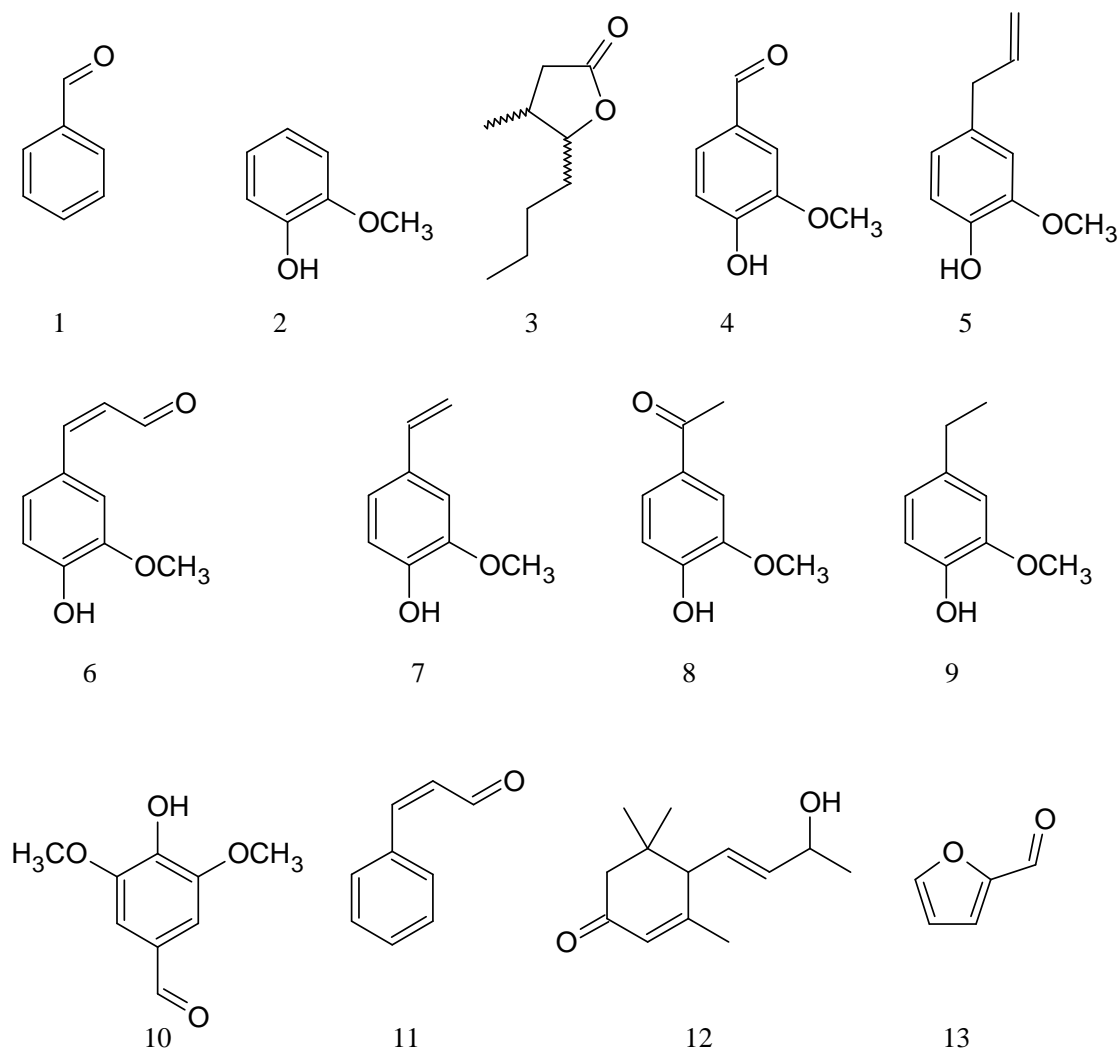


Figura 1.13. I principali composti volatili identificati in estratto di rovere: 1. aldeide benzoica; 2. guaiacolo; 3. *cis* e *trans* β -metil- γ -octalattone; 4. vanillina; 5. eugenolo; 6. coniferaldeide; 7. 4-vinilguaiacolo; 8. acetovanillone; 9. 4-etilguaiacolo; 10. aldeide siringica; 11. aldeide cinnamica; 12. 3-oxo- α -ionolo; 13. furfurale.

1.3.2 Tipi di Legno Impiegati in Enologia

Rovere. Appartenente al genere *Quercus*, il rovere è indubbiamente il legno più utilizzato per la fabbricazione delle botti destinate all'affinamento dei vini. In Europa sono utilizzate principalmente le specie *sessilis* o *petrea* (rovere) e *robur* o *pedunculata* (farnia). Per la costruzione delle botti sono solitamente utilizzati blend di legnami provenienti da diverse zone europee (Ceccarelli *et al.*, 2002). Negli Stati Uniti è utilizzato il rovere bianco (*Q. alba*) i cui legni particolarmente resinosi cedono al vino quantità piuttosto rilevanti di lattoni (sentori di vernice e resina), per tale motivo il suo uso in Europa è limitato ai liquori (MacNamara *et al.*, 2001).

Castagno. Legno che per la sua reperibilità ed economicità in passato era largamente utilizzato nell'area del Mediterraneo. Per la fabbricazione delle botti sono utilizzate piante giovani, più facili da lavorare di quelle adulte che sono caratterizzate da un legno duro che non si presta facilmente alla curvatura. Rispetto al rovere il castagno è caratterizzato da una maggiore porosità. L'uso di piante giovani allunga i tempi di stagionatura con perdita dei composti fenolici più facilmente ossidabili, limitando conseguentemente le cessioni di composti amari (Citron, 2003; Cancian 2005, tesi di laurea).

Ciliegio. Un tempo utilizzato prevalentemente nelle zone di coltivazione delle piante da frutto (*Prunus avium*), il suo legno può essere stagionato in tempi brevi e si presta bene alla curvatura tramite vapore. Il legno è molto poroso e poco compatto e permette un buon scambio di ossigeno. I prodotti invecchiati in ciliegio acquisiscono sentori di marasca (Citron, 2003; Cancian 2005, tesi di laurea).

Acacia. Ricavato dalla *Robinia pseudoacacia*, questo legno è caratterizzato da durezza elevata e difficile lavorabilità. Dal punto di vista enologico l'acacia presenta basse cessioni di tannini ed limitata porosità. Per la neutralità del legno (scarsa ossigenazione e scarse cessioni), l'acacia in passato era prevalentemente utilizzata per la fabbricazione di botti destinate all'invecchiamento dei vini bianchi (Citron, 2003; Cancian 2005, tesi di laurea).

Gelso. Il gelso (*Morus Alba* e *Morus Nigra*) originario del continente asiatico è stato importato e diffuso in Europa per il legno e i frutti. Molto utilizzato in passato nella pianura veneta come tutore delle viti, nel Trevigiano (in particolare l'opitergino) era largamente diffuso in quanto le sue foglie venivano utilizzate per l'alimentazione dei bachi da seta. Fornisce un legno tenero, elastico e di media porosità con poche cessioni, lievemente resinoso (Citron, 2003; Cancian 2005, tesi di laurea).

2. Materiali e Metodi

2.1 La Caratterizzazione Chimica dell'Uva di Raboso

2.1.1 Campionamento delle Uve

All'interno di quattro zone di produzione del Raboso Piave sono stati individuati vigneti più rappresentativi per età e forma di allevamento. I prelievi dei campioni d'uva, tre campioni di Raboso Piave e due di Raboso Veronese, sono stati effettuati alla maturità tecnologica nelle annate 2004 e 2005. Ciascun campione è stato raccolto in doppio con un prelevamento di nove grappoli posti sulle diagonali di ogni vigneto. I campioni, catalogati per varietà, data, luogo e azienda di provenienza, sono stati congelati fino al momento delle analisi. In totale sono stati prelevati 20 campioni (Tab. 2.1).

Varietà	Zona di collocazione del vigneto	Data prelievo campioni 2004	Data prelievo campioni 2005
Raboso Piave I	1. Mareno di Piave	26/10/2004	18/10/2005
Raboso Piave II	2. Candelù di Maserada	20/10/2004	11/10/2005
Raboso Piave III	3. Salgareda	20/10/2004	17/10/2005
Raboso Veronese I	1. Mareno di Piave	26/10/2004	15/10/2005
Raboso Veronese II	2. Noventa di Piave	28/10/2004	17/10/2005

Tabella 2.1. Dati relativi ai campionamenti.

In Tabella 2.2 sono riportati i parametri di maturazione dei campioni di uve studiati. I campioni raccolti nel 2005 hanno rivelato in generale una maturazione più elevata dell'annata precedente. I campioni di Raboso Veronese presentavano comunque sempre acidità più bassa del Raboso Piave in accordo con quanto precedentemente riportato (Crespan *et al.*, 2006). Questo si evidenzia in particolare per il campione Raboso Veronese II (zona Noventa di Piave) per il quale in entrambe le annate si sono riscontrate la più bassa acidità ed il maggior pH, ed i più elevati tenori zuccherini (21.20 e 23.30 °Brix).

campione	acidità totale (g/L ac. tartarico)		pH		solidi solubili (°Brix)	
	2004	2005	2004	2005	2004	2005
Raboso Piave I	12.23±0.03	9.08±0.48	3.08±0.01	3.08±0.03	17.50±0.50	19.60±0.20
Raboso Piave II	13.10±0.20	11.08±0.18	3.03±0.01	3.16±0.01	17.65±0.55	17.60±0.40
Raboso Piave III	10.08±0.23	11.60±0.10	3.12±0.02	2.99±0.01	18.35±0.35	18.50±0.40
Raboso Veronese I	7.80±0.01	8.33±0.17	3.32±0.01	3.31±0.01	16.85±0.15	18.25±0.35
Raboso Veronese II	6.10±0.15	6.35±0.20	3.42±0.02	3.35±0.03	21.20±0.45	23.30±0.45
Media R. Piave	11.80	10.58	3.07	3.07	17.83	18.57
Media R. Veronese	6.95	7.34	3.37	3.33	19.03	20.78

Tabella 2.2. Parametri tecnologici relativi alle uve campionate.

2.1.2 Studio dei Polifenoli dell'Uva

2.1.2.1 Standard e Reagenti

Gli standard di quercetina, miricetina, campferolo, quercetina-3- β -D-glucoside, campferolo-3-O-glucoside e (+)-catechina sono stati forniti dalla Fluka (Buchs, Svizzera); l'acido *trans*-caffeico, l'acido *trans-p*-cumarico e l'acido *trans*-ferulico dalla Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich srl, Milano). La preparazione dei campioni per le analisi è stata eseguita mediante estrazione in fase solida (SPE) con cartucce C₁₈ Sep-Pak da 360 mg e da 1 g (Waters Corporation, Milford, USA).

2.1.2.2 Estrazione dei Campioni

I parametri polifenolici sono stati determinati con le metodiche di estrazione dell'uva ed analitiche proposte da Di Stefano e Cravero (1991). Per ogni campione, sono stati prelevati 300 acini congelati dalle diverse parti dei grappoli in numero uguale per ogni grappolo. Di questi ne sono stati selezionati 20 (50 per i vinaccioli) che sono stati scongelati, asciugati su carta e pesati. Si è poi proceduto alla separazione delle bucce dalle polpe e dai vinaccioli. Le bucce sono state asciugate su carta ed immerse in 50 mL di una soluzione costituita da tampone tartrato pH 3.2 contenente 2 g/L di metabisolfito di sodio ed etanolo 12% (v/v) conducendo l'estrazione per 3 ore a temperatura ambiente al riparo dalla luce. La soluzione è stata successivamente omogeneizzata, centrifugata a 4000 giri/min per 5 min ed il surnatante è stato conservato

congelato fino al momento delle analisi. Le polpe sono state addizionate di 100 mg di metabisolfito di sodio, omogeneizzate, la soluzione è stata centrifugata ed il surnatante congelato. I vinaccioli, lavati con acqua distillata ed asciugati, sono stati posti in 25 mL della stessa soluzione di estrazione delle bucce e posti in congelatore.

Le determinazioni degli antociani estraibili e dei polifenoli estraibili da bucce e vinaccioli, sono state eseguite secondo le metodiche proposte da Mattivi *et al.* (2003). Le bucce ed i vinaccioli provenienti da 60 acini sono stati estratti separatamente per 5 giorni a 30 °C mediante 250 mL di una soluzione idroalcolica al 12% (v/v) a pH 3.2 contenente 100 mg/L di anidride solforosa. Gli estratti sono stati filtrati e centrifugati ed analizzati con le metodiche spettrofotometriche riportate per i vini (Di Stefano *et al.*, 1989).

I profili dei composti polifenolici sono stati determinati mediante analisi HPLC, effettuando l'identificazione dei singoli composti sulla base dei tempi di ritenzione, della sequenza di eluizione dalla colonna cromatografia e registrando gli spettri di assorbimento.

Per la determinazione dei flavanoli monomeri e delle proantocianidine dei vinaccioli sono state impiegate le metodiche già riportate in letteratura e modificate per i nostri fini (Di Stefano e Cravero, 1991; Peng *et al.*, 2001; Boukharta *et al.*, 1994; Oszmianski *et al.*, 1988). Gli estratti sono stati scongelati e posti in termostato a 25 °C per 10 giorni al riparo dalla luce. Un volume di 12.5 mL di estratto è stato evaporato a secchezza mediante evaporatore rotante ed il residuo ripreso con 10 mL di metanolo. La soluzione è stata trasferita in una provetta e posta a -20 °C per una notte al fine di ottenere la separazione dei grassi e centrifugata a -7 °C a 4500 giri/min per 5 min. Il surnatante è stato trasferito in un imbuto separatore e lavato per due volte con 20 mL di esano per la rimozione dei grassi residui. La soluzione metanolica è stata concentrata ad 1 mL mediante evaporatore rotante e ripresa con 20 mL di acqua. Allo scopo di separare i flavanoli monomeri e le proantocianidine oligomere dalle frazioni a più alto peso molecolare, si è poi proceduto con un frazionamento su cartuccia C₁₈ da 1 g precedentemente attivata mediante passaggio di 3 mL di CH₃OH e lavaggio con 5 mL di H₂O. La frazione delle proantocianidine monomere ed oligomere è stata recuperata mediante 5 mL di una soluzione acquosa di acido fosforico a pH 2 contenente 20 % acetonitrile (v/v) (Oszmianski *et al.*, 1988).

2.1.2.3 Analisi Spettrofotometriche

Gli indici di antociani e flavonoidi totali sono stati determinati mediante analisi con uno spettrofotometro UV-Visibile Uvikon 930 (Kontron Instruments, Milano). Sono state eseguite le scansioni da 250 a 350 nm (indice di flavonoidi totali) e la misura a 540 nm (indice antociani totali) degli estratti delle bucce diluiti con una soluzione di etanolo cloridrico (H₂O/etanolo/HCl, 30:70:1 v/v/v). L'indice di antociani totali - espresso come mg/L di malvidina-3-glucoside - e l'indice di flavonoidi totali - espresso come mg/L di (+)-catechina - sono stati calcolati mediante le formule di seguito riportate. Le successive conversioni in mg/kg di uva sono state ottenute considerando il volume della soluzione di estrazione ed il peso del campione di uva estratto.

$$\text{Antociani totali [malvidina-3-glucoside (mg/L)]} = E_{\lambda_{\text{max vis}}} \times 16.17 \times \text{diluizioni}$$

$$\text{Flavonoidi totali [(+)-catechina (mg/L)]} = E'_{280} \times 82.4 \times \text{diluizioni}$$

2.1.2.4 Le Analisi HPLC

Le analisi sono state condotte con un sistema di cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) ThermoFinnigan-Spectra System composto da una pompa P4000, da un autocampionatore AS3000, da un rivelatore a serie di diodi UV6000LP e equipaggiato con un degasatore in linea SCM100 (Thermo, San Jose, USA).

Le determinazioni dei profili degli antociani e dei flavanoli sono state eseguite utilizzando una colonna cromatografica LiChrospher 100 RP-18 (5 µm; 250 × 4.6 mm) (Merck, Darmstadt, Germania) secondo le metodiche precedentemente riportate in letteratura (Favretto e Flamini, 2000; Flamini e Tomasi, 2000; Di Stefano e Flamini, 2008; Di Stefano e Cravero, 1991).

Per la determinazione del profilo antocianico gli estratti delle bucce sono stati diluiti 1:1 (v/v) con una soluzione di H₂SO₄ 0.1 N ed eluiti su una cartuccia C₁₈ con fase stazionaria da 360 mg. Gli antociani sono stati recuperati mediante 2 mL di metanolo e la soluzione è stata sottoposta ad analisi HPLC dopo filtrazione con un filtro siringa 0,22 µm Acrodisc® GHP (Waters, Milford, USA). E' stato utilizzato un programma di eluizione a gradiente con un solvente binario composto da: A) H₂O/acido formico 90:10 (v/v), B) H₂O/acido formico/CH₃OH 40:10:50 (v/v/v) ad un flusso di 0.7 mL/min. Programma di eluizione: dal 10% al 45% di B in 20 min, dal 45 al 70% di B in 25 min, dal 70 al 90% di B in 10 min, dal 90 al 99% di B in 2 min, eluizione isocratica per 1 min, dal 99 al 10% di B in 4 min, isocratica per 8 min. Gli analiti sono

stati determinati con un rivelatore a fotodiodi operante simultaneamente la lettura di assorbanza alla lunghezza d'onda di 520 nm e l'acquisizione dello spettro di assorbimento nell'intervallo 250-650 nm. I singoli composti sono stati espressi in percentuale sulla somma delle aree degli antociani registrati nel cromatogramma alla lunghezza d'onda di 520 nm.

Per la determinazione dei flavan-3-oli è stato impiegato un programma di eluizione a gradiente con solvente binario composto da A) acetonitrile e B) una soluzione acquosa di H₃PO₄ pH 2.6 operando ad un flusso di 0.5 mL/min. Programma di eluizione: eluizione isocratica per 10 min al 5% di A, dal 5% al 12% di A in 20 min, isocratica per 20 min, dal 12 al 32% di A in 30 min, dal 32 al 50% di A in 10 min, dal 50 al 5% di A in 5 min e mantenuto costante per 10 min. La rivelazione dei composti è stata eseguita alla lunghezza d'onda di 280 nm e la registrazione degli spettri di assorbimento nell'intervallo 200-700 nm (Oszmianski *et al.*, 1988; Boukharta *et al.*, 1994; Peng *et al.*, 2001).

Prima di eseguire l'analisi HPLC degli acidi idrossicinnamiltartarici (HCTA) e dei flavonoli delle bucce, 4.5 mL di estratto sono stati addizionati di 0.5 mL di una soluzione di H₃PO₄ 1 M. Per l'analisi delle polpe, 1 mL di estratto è stato portato a 5 mL con l'aggiunta di 4 mL di una soluzione di H₃PO₄ 0.125 M (Di Stefano e Flamini, 2008). Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna Thermo Hypersil-Keystone ODS Hypersil RP C-18 (5 µm; 200 × 2.1 mm) con un programma di eluizione a gradiente con solvente binario composto da A) H₃PO₄ 10⁻³ M e B) metanolo operando ad un flusso di 0.25 mL/min. Programma di eluizione: dal 5% al 10% di B in 5 min, dal 10 al 30% di B in 15 min, dal 30 al 60 % di B in 10 min, dal 60 al 100% di B in 10 min, eluizione isocratica per 10 min, dal 100 al 5% di B in 4 min, isocratica per 30 min. La rivelazione degli HCTA è stata eseguita registrando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 320 nm e dei flavonoli a 360 nm, e registrando gli spettri d'assorbimento nell'intervallo 200-700 nm.

2.1.3 Studio del Profilo Aromatico dell'Uva

2.1.3.1 Standard e Reagenti

Gli standard di 1-eptanolo, 1-decanolo, 1-ottanolo sono stati forniti dalla Carlo Erba (Carlo Erba Reagenti SpA, Milano); l'enzima pectolitico Pectazina DC è stato fornito dalla Dal Cin (Dal Cin SpA, Conegliano); l'enzima pectolitico con attività glicosidica secondaria AR2000 dalla GIST-Brocades (GIST-Brocades, Francia); il Polyclar AT (PVP) dalla Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich srl, Milano). La preparazione dei campioni per le analisi è stata eseguita mediante estrazione in fase solida (SPE) con cartucce C18 Sep-Pak da 360 mg, 1 g e 10 g (Waters Corporation, Milford, USA).

2.1.3.2 Preparazione dei Campioni

Per la preparazione dei campioni da sottoporre ad analisi GC/MS, sono stati applicati metodi riportati in letteratura (Williams *et al.*, 1980; Di Stefano *et al.*, 1997; Mateo *et al.*, 1997; Ummarino *et al.*, 1999; Chassagne *et al.*, 2000; Flamini *et al.*, 2001). Da ogni campione d'uva sono stati prelevati casualmente 100 acini provvisti di pedicello e pesati. Ogni acino è stato tagliato in due parti, separato dal pedicello e, dopo l'estrazione dei semi, le polpe sono state separate dalle bucce e poste in un bicchiere con l'aggiunta di 50 mg di sodio metabisolfito. Le bucce sono state poste in una beuta contenente 30 mL di metanolo e lasciate in macerazione per un tempo di 4 ore. Dopo omogeneizzazione con Ultra-Turrax e centrifugazione a 4000 giri/min per 10 minuti delle polpe, il surnatante è stato recuperato in un matraccio da 200 mL mentre le parti solide sono state lavate con 30 mL di acqua, ancora centrifugate, ed il surnatante è stato riunito al succo. Dopo aver portato a volume con acqua distillata, la soluzione è stata trattata con 40 mg di enzima pectolitico pectazina DC privo di attività glicosidica secondaria per 4 ore a temperatura ambiente. La soluzione è stata poi centrifugata e conservata congelata fino al momento dell'analisi. Le bucce sono state omogeneizzate con la soluzione di metanolo mediante Ultra-Turrax, centrifugate come sopra ed il liquido limpido è stato recuperato in un pallone e ridotto di volume mediante evaporatore rotante, mentre il residuo solido è stato lavato con 30 mL di acqua, nuovamente centrifugato ed il liquido è stato riunito alla fase organica in un matraccio da 200 mL. Dopo aver aggiustato il volume con acqua, la soluzione è stata trattata con 4 g di Polyclar AT (pvpp insolubile) per due volte al fine di ridurre il contenuto polifenolico, filtrata con filtro compatto e congelata fino al momento dell'analisi.

2.1.3.3 Estrazione SPE (Solid Phase Extraction)

La preparazione dei campioni per le analisi è stata eseguita mediante estrazione in fase solida (SPE) con l'impiego delle metodiche già riportate in letteratura (Di Stefano *et al.*, 1997; Flamini *et al.*, 2001; 2006). Per ogni campione, un volume di 100 mL di succo è stato riunito ad un pari volume di estratto delle bucce, sono stati addizionati 200 µL di una soluzione di 1-eptanolo 185 mg/L come standard interno, e la soluzione risultante è stata fatta passare per gravità attraverso una cartuccia C₁₈ da 10 g. La cartuccia è stata lavata con 50 mL di acqua per rimuovere sali, zuccheri e composti più polari, ed una prima frazione contenente gli aromi liberi è stata recuperata mediante 50 mL di diclorometano. Una seconda frazione contenente i precursori di aromi in forma glicosilata ed i composti potenzialmente in grado di liberare composti volatili in seguito ad idrolisi acida è stata recuperata con 30 mL di metanolo. La prima frazione è stata disidratata su solfato di sodio anidro, concentrata a 200 µL mediante distillazione in colonna di Vigreux lunga 30 cm e successivamente sotto flusso di azoto, infine è stata eseguita l'analisi GC/MS. La seconda frazione è stata portata a secco mediante evaporatore rotante, ripresa con 5 mL di una soluzione di tampone citrato a pH 5 e sottoposta ad idrolisi mediante l'aggiunta di 200 mg di enzima AR2000 mantenendola a 40 °C per 16 ore. La soluzione è stata addizionata di 200 µL di una soluzione di standard interno 1-ottanolo 178 mg/L e gli agliconi sono stati estratti mediante passaggio su una cartuccia C₁₈ da 1 g e recuperati con 6 mL di diclorometano. Una seconda frazione contenente i composti successivamente sottoposti ad idrolisi acida, è stata recuperata mediante 5 mL di metanolo. La prima soluzione è stata concentrata a 200 µL come sopra ed analizzata. La soluzione metanolica è stata portata a secco, ripresa con 10 mL di tampone tartrato a pH 3, addizionata della soluzione proveniente dall'analisi della frazione dei composti glicosilati e di 200 µL di una soluzione di standard interno 1-decanolo 161 mg/L, infine posta a riflusso per 1 ora. La soluzione è stata frazionata su cartuccia C₁₈ da 360 mg recuperando i composti volatili mediante 4 mL di diclorometano, concentrata e sottoposta ad analisi GC/MS.

2.1.3.4 Analisi GC/MS (Gas Cromatografia-Spettrometria di Massa)

Le analisi sono state eseguite con un sistema Hewlett-Packard (Palo Alto, USA) costituito da un gas cromatografo HP 5890, equipaggiato con colonna in silice fusa HP Innowax (30 m × 0.25 mm i.d.; df=0.25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), interfacciato a uno spettrometro di massa HP 5971A ed autocampionatore 6890 Series Injector. Condizioni sperimentali: temperatura iniettore 200 °C; modalità di iniezione splitless; volume iniettato 0.5 µL; corrente ionizzante 70 eV; temperatura transfer line 280 °C; carrier gas He; pressione in testa alla colonna 12 psi. Programma di temperatura del forno: 3 min a 36 °C, 2 °C/min fino a 160 °C, 3 °C/min fino a 230 °C, 230 °C per 5 min. I composti sono stati identificati mediante confronto con gli spettri di frammentazione contenuti nel database NIST98 e nel database ESTRATTI del Laboratorio Chimico CRA-VIT.

2.1.4 Studio del Profilo Proteico dei Vinaccioli

2.1.4.1 Reagenti

L'acido 2,5-diidrossibenzoico (DHB), l'acido 3,5-dimetossi-4-idrossicinnamico (SA), l'acido α-ciano-4-idrossicinnamico (HCCA) sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich srl (Milano).

2.1.4.2 Campionamento dei Vinaccioli

Per la messa a punto del metodo sono state utilizzate inizialmente tre varietà di *Vitis vinifera*: Prosecco, Malvasia Nera di Brindisi e Raboso Piave. Successivamente è stato preso in considerazione anche il Raboso Veronese e la Marzemina Bianca. I vinaccioli, mantenuti congelati fino al momento delle analisi, provenivano nel caso delle varietà di Raboso dagli stessi campioni utilizzati per la caratterizzazione polifenolica ed aromatica prelevati 5 vigneti diversi nelle annate 2004 e 2005. I vinaccioli di Malvasia Nera e Marzemina Bianca provenivano da uve raccolte rispettivamente nel 1997 e nel 2007 presso la collezione del CRA-VIT, mentre nel caso del Prosecco provenivano da uve raccolte nella vendemmia 2005 in un vigneto situato in provincia di Treviso.

2.1.4.3 Preparazione dei Campioni

10 g di vinaccioli, precedentemente lavati con acqua distillata e asciugati, sono stati polverizzati mediante azoto liquido in un mortaio. La polvere così ottenuta è stata sottoposta a tre procedimenti diversi di purificazione prima dell'estrazione proteica:

- 1) 5 g di polvere di vinaccioli sono stati sgrassati mantenendoli sotto agitazione per 30 minuti in 100 mL di *n*-esano e lasciati asciugare a temperatura ambiente;
- 2) 500 mg di polvere sono stati sospesi in 5 mL di acqua distillata e dializzati contro acqua bidistillata a 4 °C per 48 ore e successivamente recuperati attraverso centrifugazione.
- 3) 4 g di polvere sono stati sottoposti ad entrambi i trattamenti 1 e 2.

2.1.4.4 Estrazione delle Proteine dai Vinaccioli

10 mg dei campioni ottenuti con i trattamenti 1-3 sono stati sospesi in 1 mL di tre diversi solventi: acqua+0.1% di acido trifluoroacetico (TFA), CH₃CN, metanolo/CH₃CN 1:1 (v/v) e posti in bagno di ultrasuoni per 5 min. I surnatanti sono stati raccolti ed analizzati mediante MALDI utilizzando tre differenti matrici: una soluzione preparata sciogliendo 10 mg di acido DHB in 1 mL di 0.1% TFA/CH₃CN 1:1 (v/v), e due soluzioni sature di SA e HCCA preparate sciogliendo gli acidi in 1 mL di 0.1% TFA/CH₃CN 1:1 (v/v).

Un volume di 5 µL di surnatante è stato riunito ad un pari volume di matrice e la soluzione è stata caricata sul supporto MALDI.

2.1.4.5 Analisi MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight)

Le analisi sono state effettuate utilizzando un sistema MALDI-TOF Ultraflex II (Bruker Daltonics, Brema, Germania) impostato per la rivelazione degli ioni positivi. Per la ionizzazione è stato utilizzato un laser UV ad impulsi (laser ad azoto, $\lambda = 337$ nm). Parametri strumentali: tensione della sorgente di ioni 1, 25 kV; tensione sorgente di ioni 2, 23.35 kV; tempo di ritardo, 100 ns.

2.2 Studio dei Composti Volatili e Polifenolici Estratti da Cinque Tipi di Legno Diversi

2.2.1 Analisi dei Composti Volatili e Polifenolici

2.2.1.1 Campioni e Standard

I campioni di legno di acacia (*Robinia pseudoacacia*), castagno (*Castanea sativa*), ciliegio (*Prunus avium*) e gelso (*Morus alba*) sono stati ricavati da piante cresciute nel Nord Italia, mentre il rovere (*Quercus petraea*) da piante francesi. Il legno naturalmente stagionato 24-36 mesi e non tostato è stato fornito sottoforma di doghe da parte di Veneta Botti srl (Conegliano). I diversi campioni sono stati ridotti in chip di $0.5-2 \times 2$ cm e dello spessore di 1 mm. Lo standard di 1-eptanolo è stato fornito dalla Carlo Erba (Carlo Erba Reagenti SpA, Milano).

2.2.1.2 Estrazione dei Campioni

Sono state utilizzate due diverse soluzioni estraenti: una soluzione acqua/etanolo 1:1 (v/v) (distillato modello) ed un tampone tartrato a pH 3.2 contenente etanolo al 12% (v/v) (vino modello). Trenta grammi di legno ridotto in truciolo (chips) sono stati estratti con 500 mL di soluzione estraente. Nel caso della soluzione idroalcolica il processo è stato protratto per 6 giorni al buio a temperatura ambiente mantenendo nell'ultimo giorno la soluzione sotto agitazione, nel caso del vino modello l'estrazione è durata 30 giorni al buio e temperatura ambiente. Dopo l'estrazione le soluzioni sono state filtrate e congelate fino al momento delle analisi.

2.2.1.3 Preparazione dei Campioni per l'Analisi GC/MS

I campioni per l'analisi gascromatografica sono stati preparati come già riportato (Flamini *et al.*, 2007). Un volume di 50 mL di estratto idroalcolico acqua/etanolo 1:1 (v/v) è stato ridotto a 30 mL sotto vuoto e temperatura ambiente. La soluzione, dopo l'aggiunta di 200 μ L di una soluzione di 1-eptanolo 185 mg/L come standard interno, è stata portata a 100 mL con acqua distillata e centrifugata a 4000 giri/min per 10 min. La purificazione del campione è stata eseguita mediante estrazione su fase solida (SPE) di 50 mL del surnatante utilizzando una cartuccia C₁₈ Sep-Pak da 1

g e recuperando gli analiti con 6 mL di diclorometano. La fase organica è stata disidratata con sodio solfato anidro, portata a 500 µL sotto flusso d'azoto ed analizzata mediante GC/MS.

2.2.1.4 Metodi Analitici Utilizzati

Le analisi spettrofotometriche sono state eseguite con lo spettrofotometro UV/Vis Uvikon 930. Sono state effettuate misure d'assorbanza degli estratti diluiti e filtrati 45 µm alle lunghezze d'onda 280, 380, 420 e 440 nm, e sono stati registrati gli spettri d'assorbimento nell'intervallo di lunghezze d'onda compreso tra 250 e 450 nm. Gli indici di polifenoli totali sono stati determinati mediante il metodo di Folin-Ciocalteu applicato ai vini (Singleton e Rossi, 1965): gli estratti sono stati diluiti 25, 50 o 100 volte con acqua e le misure di assorbanza sono state effettuate a 700 nm.

L'indice di ossidabilità degli estratti è stato determinato mediante il POM-Test (Muller Spath, 1992): 15 mL di estratto sono stati filtrati, trasferiti in un palloncino e aggiunti a 60 µL di una soluzione di acqua ossigenata al 3%. L'ossidazione è stata condotta per 1 ora a 60 °C, il campione è stato lasciato raffreddare a temperatura ambiente e filtrato 0.45 µm. Sono state effettuate misure d'assorbanza a 380 e 420 nm prima e dopo il processo d'ossidazione.

Le percentuali d'ossidazione alle due lunghezze d'onda sono state calcolate mediante la relazione

$$(\% \text{ ox H}_2\text{O}_2) = [(Abs_{\text{ox}} - Abs_{\text{p.ox}})/Abs_{\text{p.ox}}] \times 100$$

dove: Abs_{ox} = assorbanza dell'estratto dopo l'ossidazione; $Abs_{\text{p.ox}}$ = assorbanza della estratto prima dell'ossidazione.

Le analisi GC/MS sono stata eseguite con un sistema Hewlett-Packard (Palo Alto, USA) costituito da un gas cromatografo HP 5890, equipaggiato con colonna in silice fusa HP Innowax (30 m × 0.25 mm i.d.; $df=0.25$ µm, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), interfacciato ad uno spettrometro di massa HP 5971A ed un autocampionatore 6890 Series Injector. Condizioni operative: temperatura iniettore 250 °C; modalità di iniezione splitless; volume iniettato 0.5 µL; gas carrier He; pressione in testa alla colonna 12 psi. Programma di temperatura del forno: 1 min a 36 °C, 2 °C/min fino a 160 °C, 3 °C/min fino a 230 °C, 5 min a 230 °C. Lo spettrometro di massa operava in modalità SCAN (intervallo di scansione m/z 40-550), energia di ionizzazione 70 eV. Le analisi d tutti i campioni sono state ripetute in doppio.

2.2.2 Lo Studio dei Fenoli Volatili Ceduti dai Diversi tipi di Legno Mediante GC/MS-PICI

2.2.2.1 Campioni e Standard

Sono stati usati gli stessi campioni di legno visti nel paragrafo 2.2.1. Gli standard di siringaldeide, *trans*-3,5-dimetossi-4-idrossi-cinnamaldeide (sinapinaldeide), eugenolo, 4-allil-2,6-dimetossifenolo (metossieugenolo) sono stati forniti dalla Sigma-Aldrich srl (Milano); benzaldeide, alcol coniferilico, vanillina, 4-idrossi-benzaldeide dalla Fluka (Buchs, Svizzera); cinnamaldeide, anisaldeide, guaiacolo e 1-eptanolo dalla Carlo Erba Reagenti (Milano). La coniferaldeide è stata sintetizzata in laboratorio mediante ossidazione dell'alcol coniferilico: 0.4 mg di alcol sono stati sciolti in 200 µL di H₂SO₄ 6 M ed aggiunti a 100 µL di una soluzione acquosa di K₂Cr₂O₇ 0.01 M. La reazione di ossidazione è stata condotta per 5 min a temperatura ambiente ed il prodotto è stato recuperato mediante estrazione liquido-liquido con 2 mL di diclorometano.

2.2.2.2 Curve di Calibrazione

Sono state utilizzate quattro soluzioni idroalcoliche al 50% (v/v) di etanolo a concentrazioni crescenti di ciascun analita: da 0.005 a 5 mg/L di estratto di chips, corrispondenti a 0.1-100 µg/g di legno. A 50 mL di ogni soluzione sono stati aggiunti 200 µL di 1-eptanolo 185 mg/L come standard interno e l'estrazione è stata condotta come descritto nel paragrafo 2.2.1.3. Sono stati registrati i segnali relativi agli ioni molecolari [M+H]⁺ e le rette di calibrazione sono state calcolate con l'equazione $A_{m/z[M+H]^+}/A_{m/z55 SI} = RF \cdot c_{ST}/c_{SI}$, dove $A_{m/z[M+H]^+}$ è l'area del segnale della specie [M+H]⁺, $A_{m/z55 SI}$ è l'area del segnale dello ione m/z 55 dello standard interno, c_{ST} è la concentrazione dell'analita nella soluzione standard, c_{SI} è la concentrazione dello standard interno. Le analisi sono state ripetute in doppio, e le equazioni delle curve di calibrazione calcolate con i valori medi sono riportate in Tabella 2.3.

standard	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	curve di calibrazione (da 0.005 a 5 mg/L)	
ansaldeide	137	y = 14.754·x	R ² = 0.9992
idrossi-benzaldeide	123	y = 0.622·x	R ² = 0.9999
cinnamaldeide	133	y = 9.097·x	R ² = 0.9995
eugenolo	165	y = 12.559·x	R ² = 0.9999
metossi-eugenolo	195	y = 13.785·x	R ² = 0.9998
vanillina	153	y = 2.350·x	R ² = 0.9998
siringaldeide	183	y = 3.678·x	R ² = 0.9993
guaiacolo	125	y = 2.746·x	R ² = 0.9999

Tabella 2.3. Curve di calibrazione dei fenoli volatili ceduti dai diversi tipi di legno.

2.2.2.3 Analisi GC/MS

Le analisi sono state condotte mediante un gascromatografo TraceGC (ThermoFinnigan, Austin, USA) dotato di colonna capillare in silice fusa HP Innowax (30 m × 0.25 mm i.d.; df=0.25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, USA) accoppiato ad un spettrometro di massa a trappola ionica PolarisQ (ThermoFinnigan, Austin, USA). Condizioni operative: ionizzazione chimica in modalità positiva utilizzando metano come gas reagente (flusso 0.8 mL/min); temperatura sorgente 200 °C; temperatura iniettore 240 °C; volume iniettato 1 µL in modalità splitless; gas carrier He a flusso costante 1.3 mL/min. Programma di temperatura del forno: 3 min a 70 °C, 2 °C/min fino a 160 °C, 3 °C/min fino a 230 °C, 25 min a 230 °C. La trappola ionica operava in modalità scansione selezionando gli ioni da m/z 40 a 550. I composti d'interesse sono stati confermati tramite frammentazione in trappola degli ioni precursori $[M+H]^+$ utilizzando He come gas di collisione (dumping flow 0.3 mL/min) e una tensione d'eccitazione di 225 mV (Dissociazione Indotta per Collisione, CID). In Tabella 2.4 sono riportati lo ione precursore ed i principali frammenti registrati per ciascun analita.

composti	ione precursore m/z $[M + H]^+$	MS/MS m/z ioni frammenti (abbondanza >5%)
benzaldeide	107	79 (p.b.)
metilbenzaldeide	121	93;43 (p.b.)
idrossi-benzaldeide	123	95 (p.b.);91;81
guaiacolo	125	110 (p.b.);96;93;91;65
cinnamaldeide	133	115 (p.b.);105;91;79;55
anisaldeide	137	122;109 (p.b.);94
vinilguaiacolo	151	136;123;119 (p.b.);115;95;91;81
vanillina	153	138;125 (p.b.);93
2,6-dimetossifenolo	155	140 (p.b.);123;95;91;65
eugenolo	165	150 (p.b.);137;133;105
trimetossibenzene	169	154;138 (p.b.);126
coniferaldeide	179	164;161;147 (p.b.);133;119;105;55
alcol coniferilico	181	166 (p.b.);153;138
siringaldeide	183	168;155 (p.b.);140;123;95
trimetossifenolo	185	170;153 (p.b.);125
metossieugenolo	195	180 (p.b.);167;163;135;107
<i>trans</i> sinapinaldeide	209	194;191;177 (p.b.);149;121;107;93

Tabella 2.4. Principali frammenti ottenuti tramite dissociazione indotta per collisione (CID). p.b., picco base dello spettro di frammentazione.

2.3 Studio dell’Invecchiamento del Vino Raboso Piave in Botti Fabbricate con Diversi Tipi di Legno

2.3.1 Botti Utilizzate e Campionamenti dei Vini

Sono state utilizzate cinque botti da 225 L (barrique) fabbricate con legni di acacia, castagno, ciliegio, gelso e rovere con una stagionatura di 24-36 mesi fornite dalla Veneta Botti srl (Conegliano). Solo la botte in rovere aveva subito una lieve tostatura del legno (40 minuti di esposizione a fuoco vivo durante la piegatura delle doghe). Ogni botte è stata riempita per circa l’80% con vino Raboso Piave prodotto nell’annata 2005 che presentava un grado alcolico di 12.5% (v/v) ed un’acidità totale di 9.5 g/L in acido tartarico. L’invecchiamento del vino è avvenuto a temperatura di cantina (15-18 °C). Due prelievi di ciascun campione di vino sono stati effettuati dopo 3, 6 e 9 mesi, ed i campioni sono stati mantenuti congelati fino al momento delle analisi.

2.3.2 Solventi e Standard

Il metanolo (HPLC grade) è stato fornito dalla Baker (Phillipsburg, NJ) e l’acido formico (superpurity grade) dalla Romil ltd (Cambridge, UK). Gli standard di acetato di isoamile, guaiacolo, 1-eptanolo e furfurale sono stati forniti dalla Carlo Erba Reagenti (Milano); eugenolo, 4-etilfenolo, acido *trans*-ferulico, acido *trans*-caffeico, acido *trans*-*p*-cumarico e (+)-catechina dalla Sigma-Aldrich (Milano); vanillina, miricetina e quercetina glucoside dalla Fluka (Buchs, Svizzera); camferolo glucoside dalla Extrasynthese (Genay, Francia); etil esanoato e α -terpineolo dalla BDH Chemicals ltd. (Poole, UK); etil ottanoato dalla Eastman Organic Chemicals (Rochester, NY, USA); il citronellolo è stato fornito dalla Merck KGaA (Darmstadt, Germania). La microfibra per microestrazione su fase solida (SPME) Carbowax/divinilbenzene (CAR/DVB) da 65 μ m è stata fornita dalla Supelco (Bellafonte, PA, USA).

2.3.3 Analisi dei Composti Aromatici

Per l’analisi dei composti volatili aromatici è stata utilizzata una tecnica di microestrazione su fase solida (SPME) su spazio di testa del campione accoppiata ad analisi GC/MS, seguendo il metodo proposto da Carrillo *et al.* (2006), opportunamente modificato. In una vial con tappo a vite da 20 mL sono stati posti 10 mL di vino, 3 g di NaCl e 100 μ L di una soluzione di 1-eptanolo 180

mg/L come standard interno. Prima dell'estrazione il campione è stato incubato a 70 °C per 10 min, successivamente nella fase gassosa del campione (spazio di testa) è stata esposta la microfibra CAR/DVB da 65 µm. L'adsorbimento dei composti volatili è stato condotto per 30 minuti mantenendo il campione a 70 °C sotto agitazione tramite ancoretta magnetica (300 g/min).

Le analisi sono state eseguite con un sistema Hewlett-Packard (Palo Alto, USA) costituito da un gas cromatografo HP 5890, equipaggiato con colonna in silica fusa HP Innowax (30 m x 0.25 mm i.d.; df=0.25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, USA), interfacciato a uno spettrometro di massa HP 5971A. Gli analiti sono stati introdotti nel sistema gascromatografico tramite desorbimento termico della microfibra esposta per 5 minuti sull'iniettore a 230 °C. Condizioni operative: modalità di iniezione splitless; carrier gas He; pressione in testa alla colonna 12 psi. Programma di temperatura del forno: 5 min a 40 °C, 3 °C/min fino a 230 °C, 10 min a 230 °C. Lo spettrometro di massa operava in modalità Selected Ion Monitoring (SIM), energia di ionizzazione 70 eV. Le curve di calibrazione calcolate utilizzando soluzioni standard di vino modello (tampone tartrato pH 3.2, 12% etanolo) sono riportate in Tabella 2.5. Le curve sono state calcolate con l'equazione $A_{m/z}/A_{m/z70}=RF \cdot c_{ST}$ dove $A_{m/z}$ sono le aree degli ioni selezionati per ogni analista riportate in tabella, $A_{m/z70}$ è l'area dello ione m/z 70 dello standard interno (1-eptanolo), c_{ST} è la concentrazione dell'analita nella soluzione standard.

standard	soluzione madre (mg/L)	ione selezionato (m/z)	curve di calibrazione (1, 10, 100, 1000 dil. soluzione madre)	
isoamil acetato	20.54	70	$y = 4430753x$	$R^2 = 0.9989$
etil esanoato	17.67	88	$y = 6868987x$	$R^2 = 1$
etil ottanoato	20.60	88	$y = 5046805x$	$R^2 = 0.9998$
furfurale	2.15	96	$y = 37450702x$	$R^2 = 0.9992$
α-terpineolo	2.30	93	$y = 50340304x$	$R^2 = 0.9991$
citronellolo	3.00	69	$y = 47741459x$	$R^2 = 0.9991$
guaiacolo	20.05	124	$y = 10877412x$	$R^2 = 0.9999$
eugenolo	1.96	164	$y = 50833766x$	$R^2 = 1$
4-etilfenolo	19.70	107	$y = 96628453x$	$R^2 = 0.9999$
vanillina	20.44	152	$y = 1283406x$	$R^2 = 0.9991$

Tabella 2.5. Curve di calibrazione SPME-GC/MS dei composti volatili aromatici studiati nei campioni di vini invecchiati in 5 botti barrique fabbricate con legno di acacia, castagno, ciliegio, gelso e rovere.

Per la quantificazione del 4-etilguaiacolo e del 5-metilfurfurale sono state utilizzate rispettivamente le curve di calibrazione di 4-etilfenolo e furfurale.

2.3.4 Analisi dei Polifenoli

Per l'analisi degli antociani, degli acidi cinnamici ed idrossicinnamiltartarici e dei flavonoli sono state utilizzate le stesse strumentazioni ed applicati gli stessi metodi cromatografici descritti nel paragrafo 2.1.2.4 (Di Stefano e Flamini, 2008). La (+)-catechina è stata determinata durante le stesse separazioni cromatografiche condotte per gli HCTA e i flavonoli impostando il rivelatore alla lunghezza d'onda di 280 nm.

2.3.5 Analisi LC/ESI-MSⁿ (Cromatografia Liquida - Spettrometria di Massa)

Per l'identificazione dei composti incogniti, emersi dall'analisi dei cromatogrammi registrati a 320 nm (determinazione degli HCTA) dei campioni di vino invecchiati in gelso e ciliegio, è stato utilizzato uno spettrometro di massa a trappola ionica LCQDeca (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) accoppiato attraverso un sistema di ionizzazione ad elettrospray ad un sistema HPLC Ultimate 3000 (Dionex Corp., Sunnyvale, USA). Il sistema HPLC era inoltre dotato di un rivelatore UV-Vis Spectra System UV 1000 (Thermo). La separazione cromatografica è stata condotta con una colonna LiChrospher 100 RP-18 (5 µm; 250 × 4.6 mm, Merck, Darmstadt, Germania). E' stato utilizzato un programma di eluizione a gradiente con un solvente binario composto da A) H₂O/0.1% acido formico (v/v), B) metanolo, ad una velocità di flusso di 0.6 mL/min. Programma di eluizione: 33% di B per 40 min, dal 33 al 100% di B in 15 min, 100% di B per 5 min, dal 100 al 33% di B in 1 min. Parametri ESI: tensione della sorgente, 4500 V; tensione e temperatura del capillare d'entrata, 4 V e 280 °C; flusso sheath gas, 60 (u.a.); flusso gas ausiliario, 20 (u.a.). La trappola ionica operava in intervallo di scansione *m/z* 70-700 registrando gli ioni negativi. Le frammentazioni degli ioni di interesse, trattenuti all'interno della trappola tramite l'applicazione agli end-caps di una tensione a radiofrequenza supplementare dell'ordine dei 2 V, sono state ottenute tramite collisione con He come buffer gas alla pressione di 1.1x10⁻⁵ Torr.

3. Risultati e Discussione

3.1 La Caratterizzazione Chimica dell'Uva: Il Caso del Raboso Piave e del Raboso Veronese

3.1.1 Studio dei Polifenoli del Raboso Piave e Raboso Veronese

3.1.1.1 Indice di Antociani Totali e Flavonoidi Totali delle Bucces

In Tabella 3.1 sono riportati i valori degli indici di flavonoidi totali e antociani totali determinati negli estratti delle bucce di Raboso Piave e Raboso Veronese ed espressi in mg/Kg uva.

campioni	Indice Flavonoidi totali (mg/Kg uva (+)-catechina)		Indice Antociani totali (mg/Kg uva malvina)	
	2004	2005	2004	2005
Raboso Piave I	4432±33	4847±357	1349±75	1614±169
Raboso Piave II	5503±5	4846±109	1989±239	1660±32
Raboso Piave III	4655±135	4317±178	1674±160	1705±92
Raboso Veronese I	4339±370	3445±133	1356±174	1272±31
Raboso Veronese II	5237±61	5819±260	2367±167	1748±74
Media R. Piave	4863	4670	1670	1659
Media R. Veronese	4788	4632	1861	1510

Tabella 3.1 Indici di flavonoli e antociani totali delle bucce dei tre campioni di uva Raboso Piave e due campioni Raboso Veronese prelevati nelle due annate 2004 e 2005. Sono riportati i contenuti medi calcolati su due campioni prelevati per ciascuna tesi.

Come si evidenzia dai dati in tabella, il contenuto medio di flavonoidi totali e di antociani totali risulta simile fra i due vitigni Raboso Piave e Raboso Veronese. Solo il campione Raboso Veronese II (Noventa di Piave) presenta indici polifenolici superiori alla media: questo può essere ragionevolmente spiegato in quanto questo campione presentava più piccoli acini rispetto agli altri, pertanto caratterizzati da maggiori rapporti buccia/peso acino.

In Figura 3.1 sono confrontati gli indici polifenolici del Raboso Piave e del Raboso Veronese con quelli relativi ad altre varietà a bacca rossa riportati in letteratura ed ottenuti con le stesse metodiche analitiche (Calò *et al.*, 1991; Cravero e Di Stefano, 1992; Calò *et al.*, 2000; Laboratorio Chimico CRA-VIT, dati non pubblicati). Si evidenzia come il contenuto medio di

flavonoidi totali del Raboso (sia Piave che Veronese) sia superiore rispetto alle altre varietà, mentre l'indice di antociani totali è simile a quello riportato per Cabernet Sauvignon e Barbera, ed è comunque tra i più elevati.

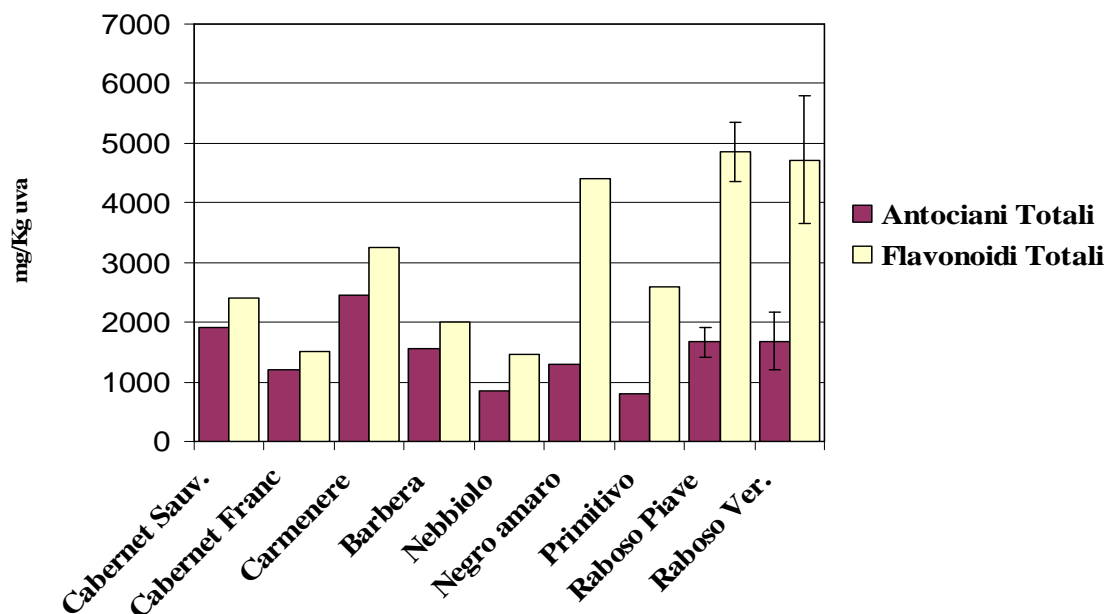


Figura 3.1. Indici di antociani e di flavonoidi totali: confronto del Raboso Piave e Raboso Veronese con altre varietà riportate in letteratura studiate secondo le stesse metodiche.

3.1.1.2 Indice di Antociani Estraibili dalle Bucces con la Vinificazione

L'indice di antociani estraibili dalle bucce con la vinificazione del Raboso Piave e Raboso Veronese, calcolato come media nelle due annate, è stato messo a confronto con i valori riportati in letteratura per altre 25 varietà di uve rosse ottenuti secondo le stesse metodiche utilizzate in questo lavoro (Mattivi *et al.*, 2003). Il confronto è riportato nell'istogramma in Figura 3.2.

In generale l'indice di antociani dell'uva estraibili in vinificazione è proporzionale al contenuto di antociani totali. Come si evidenzia dalla Figura 3.2, il Raboso Veronese ed il Raboso Piave, per i quali si riscontrano contenuti di antociani totali mediamente elevati (Tabella 3.1 e Figura 3.1), presentano anche indici di antociani estraibili tra i più elevati. Una eccezione si osserva nel caso del Cabernet Sauvignon, per il quale sono stati riportati un contenuto di antociani totali molto elevato ma un medio indice di composti estraibili con la vinificazione.

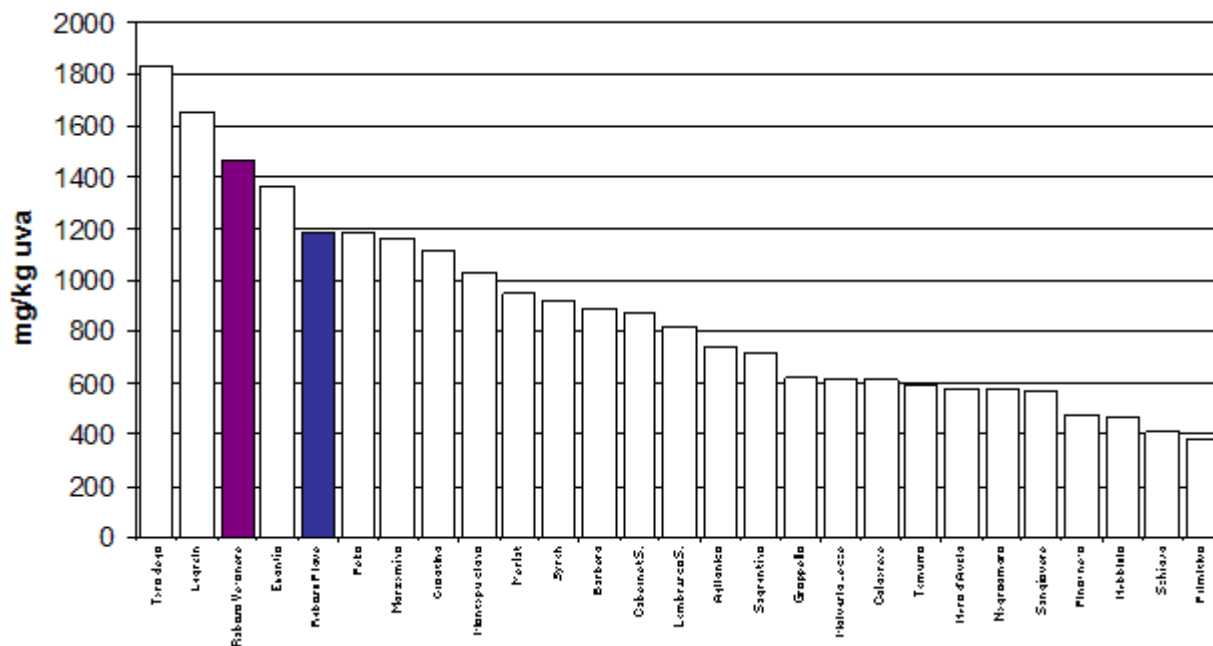


Figura 3.2. Antociani del Raboso Piave, Raboso Veronese e di altre 25 varietà di uve a bacca rossa estraibili con la vinificazione espressi in mg malvidina-3-glucoside/Kg uva. In ordine decrescente si individuano: Teroldego, Lagrein, Raboso Veronese (1465 mg/Kg uva), Enantio, Raboso Piave (1185 mg/Kg uva), Rebo, Marzemina, Croatina, Montepulciano, Merlot, Syrah, Barbera, Cabernet S., Lambrusco S., Aglianico, Sagrantino, Groppello, Malvasia Lecce, Calabrese, Tamurro, Nero d'Avola, Negroamaro, Sangiovese, Pinot nero, Nebbiolo, Schiava, Primitivo.

3.1.1.3 Indice di Polifenoli Estraibili dall'Uva con la Vinificazione

L'indice di polifenoli estraibili dall'uva (estratti dalle bucce e dai vinaccioli) con la vinificazione del Raboso Piave e Raboso Veronese, calcolato come media nelle due annate, è stato messo a confronto con i valori riportati per altre 25 varietà di uve rosse ottenuti secondo le stesse metodiche utilizzate in questo lavoro (Mattivi *et al.*, 2003). Il confronto è riportato nell'istogramma in figura 3.3. Come si evidenzia dalla figura, anche gli indici di polifenoli estraibili dal Raboso Veronese e dal Raboso Piave risultano tra i più elevati, così come gli indici dei flavonoidi totali (Tabella 3.1 e Figura 3.1). E' interessante notare come in questo caso il Negroamaro, per il quale è riportato un indice di flavonoidi totali molto elevato, presenti un indice di polifenoli estraibili relativamente basso.

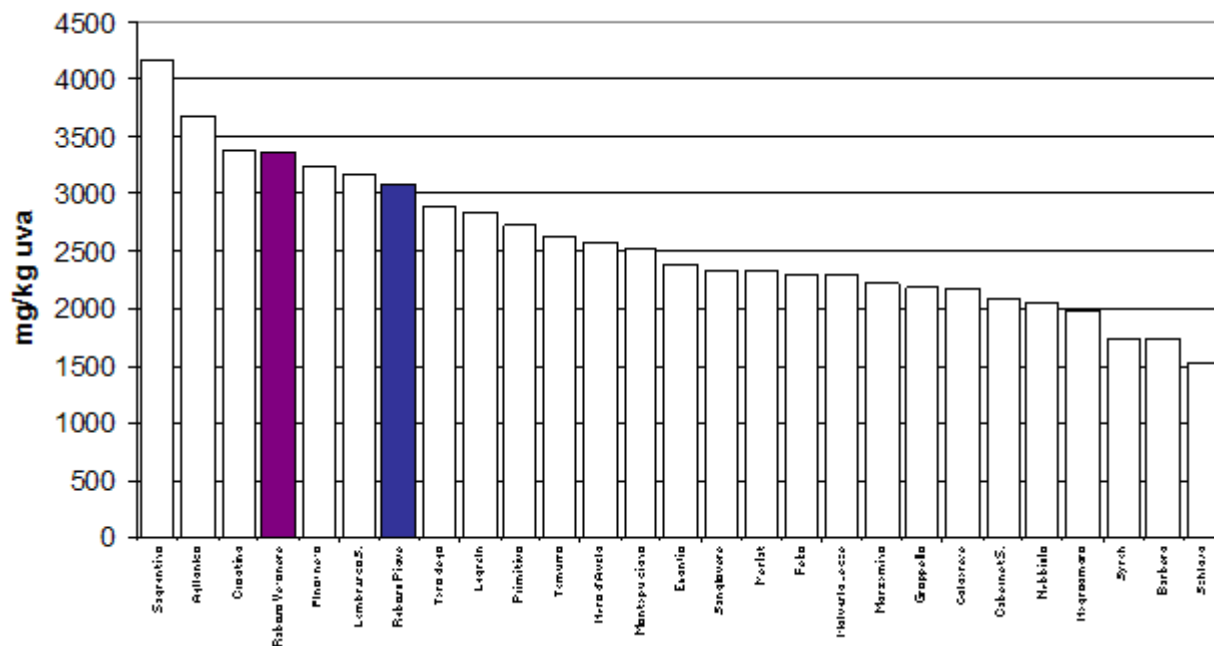


Figura 3.3. Polifenoli del Raboso Piave, Raboso Veronese e di altre 25 varietà di uve a bacca rossa estraibili dall'uva (bucce e vinaccioli) con la vinificazione espressi in mg (+)-catechina/kg uva. In ordine decrescente troviamo: Sagrantino, Aglianico, Croatina, Raboso Veronese (3366 mg/Kg uva), Pinot nero, Lambrusco S., Raboso Piave (3093 mg/Kg uva), Teroldego, Lagrein, Primitivo, Tamurro, Nero d'Avola, Montepulciano, Enantio, Sangiovese, Merlot, Rebo, Malvasia Lecce, Marzemino, Groppello, Calabrese, Cabernet S., Nebbiolo, Negroamaro, Syrah, Barbera, Schiava.

3.1.1.4 Studio del Profilo degli Antociani delle Bucce

L'assegnazione dei picchi cromatografici è stata fatta in base alla sequenza di eluizione dalla colonna cromatografica a fase inversa: 1. Delfinidina (Dp) 3-O-monoglucoside (glu); 2. Cianidina (Cy) glu; 3. Petunidina (Pt) glu; 4. Peonidina (Pn) glu; 5. Malvidina (Mv) glu; 6. Dp-monoglucoside acetato (gluAc); 7. Cy-gluAc; 8. Pt-gluAc; 9. Pn-gluAc; 10. Mv-gluAc; 11. Dp-monoglucoside paracumarato (glu-pcum); 12. Mv-monoglucoside caffeato; 13. Cy-glu-pcum; 14. Pt-glu-pcum; 15. Pn-glu-pcum; 16. Mv-glu-pcum. I profili degli antociani di un estratto di Raboso Piave e di un estratto di Raboso Veronese sono riportati rispettivamente in Figura 3.4 e Figura 3.5 (Padoan 2005, tesi di laurea). I dati sulla composizione percentuale estrapolati dalle due analisi sono riportati in Tabella 3.2 e nel diagramma in Figura 3.6.

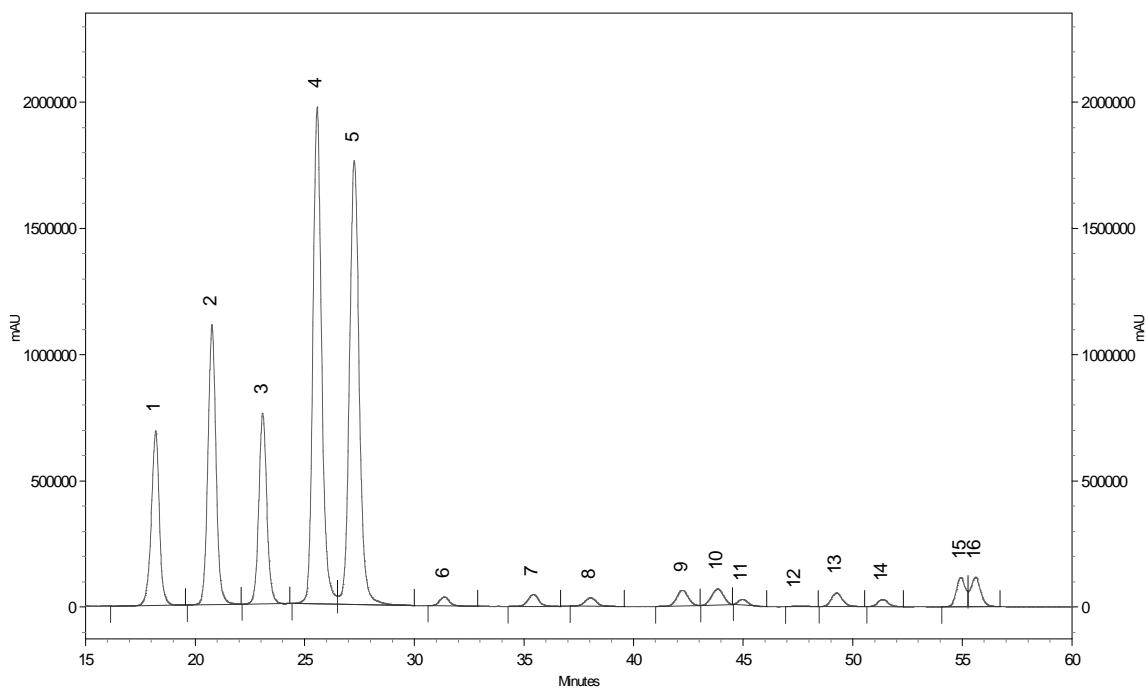


Figura 3.4. Profilo degli antociani di un estratto di bucce di Raboso Piave.

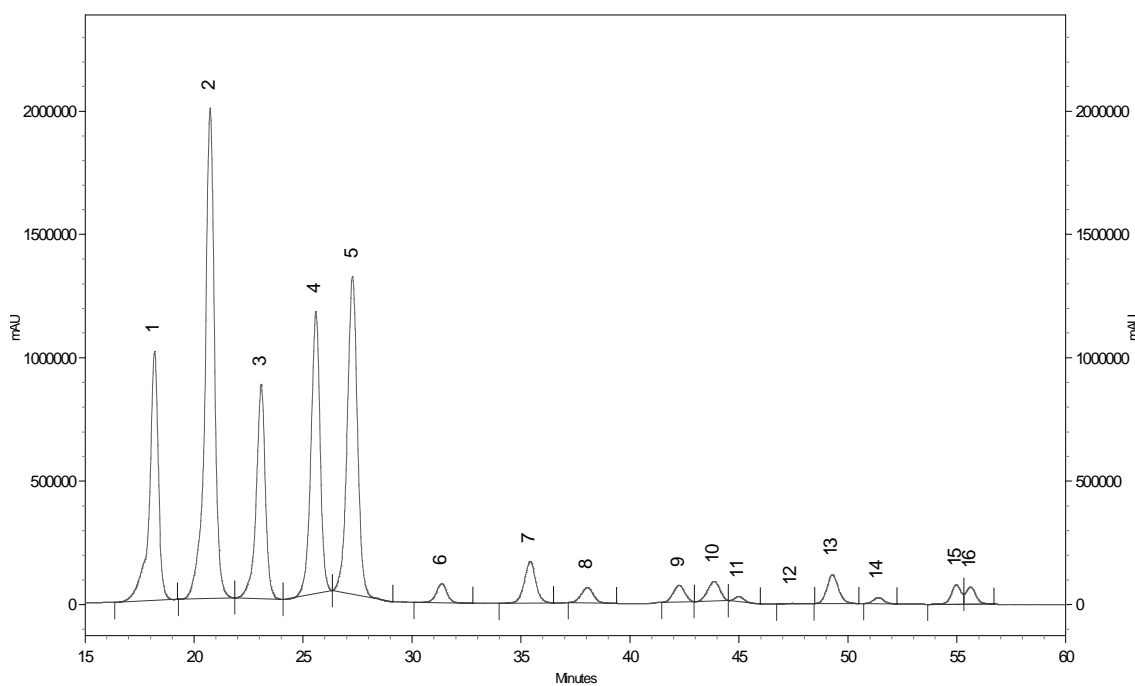


Figura 3.5. Profilo degli antociani di un estratto di bucce di Raboso Veronese.

Il profilo antocianico del Raboso Piave risulta in parte diverso da quello del Veronese: il Raboso Piave è infatti caratterizzato da una maggiore presenza di Pn-3-monoglucoside e di Mv-3-monoglucoside, in accordo con quanto già riportato da Mattivi *et al.* (2004), mentre il Raboso Veronese risulta caratterizzato da un più elevato contenuto di Cy-3-monoglucoside, Dp-3-

monoglucoside, e da un più basso contenuto di Pn-3-monoglucoside. Il Raboso Veronese risulta avere un contenuto tendenzialmente superiore di antociani acetati. Dalla Figura 3.6 è inoltre evidente come l'annata praticamente non influenzi il profilo degli antociani.

antociani	Area % (Abs 520 nm)												Media R. Veronese	
	PIAVE I	PIAVE I	PIAVE II	PIAVE II	PIAVE III	PIAVE III	Media R. Piave	VERON. I	VERON. I	VERON. II	VERON. II	2004	2005	
	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004 2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	
Dp-glu	6.3	6.8	7.4	7.3	9.1	7.8	7.6 7.3	12.2	11.8	12.9	12.0	12.6	11.9	
Cy-glu	10.3	13.5	18.0	9.8	14.4	12.6	14.3 12.0	20.9	24.6	26.8	23.4	23.8	24.0	
Pt-glu	8.0	8.3	8.3	9.5	10.0	9.0	8.7 8.9	12.0	11.5	11.4	11.5	11.7	11.5	
Pn-glu	30.5	32.8	32.1	27.6	28.4	30.0	30.4 30.1	12.4	13.7	16.0	13.5	14.2	13.6	
Mv-glu	32.6	26.3	23.4	32.8	28.1	28.9	28.0 29.4	26.9	23.2	19.8	22.6	23.4	22.9	
Dp-gluAc	0.5	0.4	0.5	0.6	0.6	0.5	0.5 0.5	1.5	1.3	1.2	1.1	1.4	1.2	
Cy-gluAc	0.8	0.9	1.1	0.8	0.9	0.9	0.9 0.9	2.7	2.7	2.8	3.0	2.7	2.9	
Pt-gluAc	0.7	0.5	0.5	0.7	0.6	0.5	0.6 0.6	1.6	1.3	1.2	1.4	1.4	1.3	
Pn-gluAc	1.5	1.7	1.6	1.5	1.2	1.4	1.4 1.5	1.1	0.9	1.1	1.2	1.1	1.0	
Mv-gluAc	1.7	1.6	1.0	2.1	1.2	1.6	1.3 1.8	2.5	2.4	1.6	2.6	2.0	2.5	
Dp-pcum	0.3	0.4	0.2	0.5	0.3	0.5	0.3 0.5	0.4	0.7	0.4	0.8	0.4	0.7	
Mv-caff	0.1	0.2	0.1	0.1	0.0	0.2	0.1 0.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.1	0.1	
Cy-pcum	1.0	1.5	1.4	1.0	1.0	1.2	1.1 1.2	2.1	2.3	2.0	2.7	2.0	2.5	
Pt-pcum	0.5	0.5	0.4	0.7	0.5	0.5	0.5 0.6	0.6	0.7	0.4	0.8	0.5	0.7	
Pn-pcum	2.5	2.7	2.3	2.4	1.8	2.6	2.2 2.6	1.0	1.1	1.1	1.3	1.1	1.2	
Mv-pcum	2.8	1.7	1.6	2.7	1.9	1.9	2.1 2.1	2.0	1.9	1.0	2.2	1.5	2.0	

Tabella 3.2. Composizione media percentuale degli antociani nei 5 campioni di Raboso studiati nelle due annate.

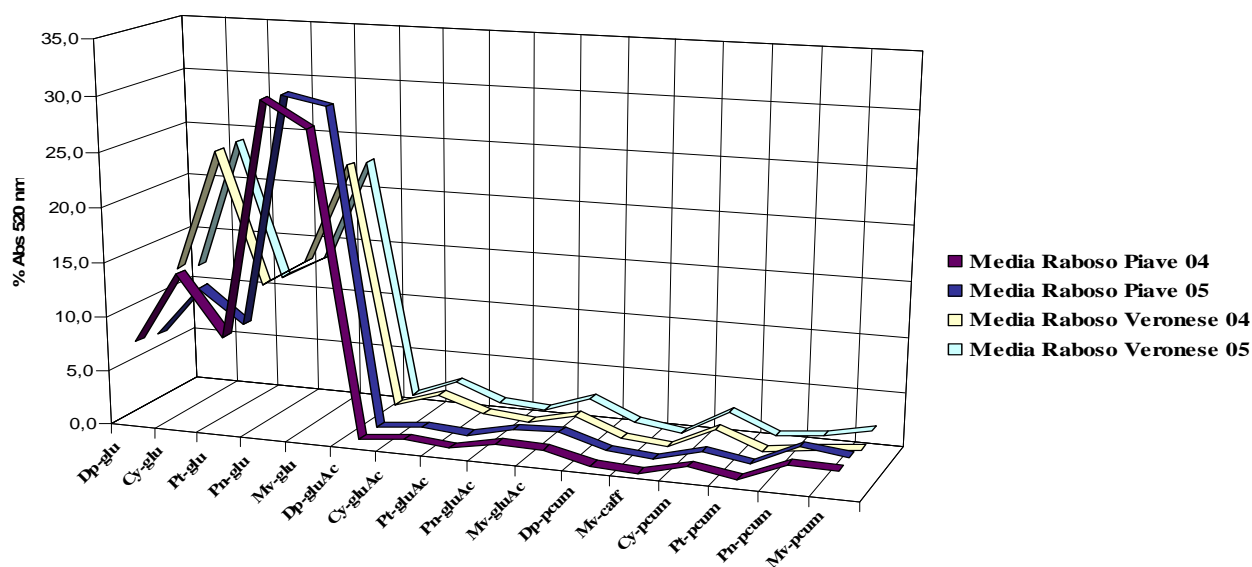


Figura 3.6. Composizione media percentuale degli antociani del Raboso Piave e del Raboso Veronese. Confronto tra le due varietà nelle annate 2004 e 2005.

In generale, l'uva di Raboso risulta caratterizzata da una elevata presenza di antociani monoglucosidi, mentre i composti acilati, anche se rappresentati da tutti i composti che possono essere presenti in un estratto d'uva di *Vitis vinifera*, risultano in basse quantità. Dal confronto con i profili degli antociani di altre varietà riportati in letteratura (Figura 3.7), si evidenzia che nel Raboso il livello di Cy-3-monoglucoside (il primo composto che viene formato nella biosintesi degli antociani) è più abbondante rispetto alle altre varietà, il contrario si osserva per la Mv-3-monoglucoside (l'ultimo antociano formato nella biosintesi) e questa caratteristica risulta più marcata nel Raboso Veronese. I livelli degli altri antociani monoglucosidi sono nella media delle altre varietà (Calò *et al.*, 1991; Cravero *et al.*, 1992; Calò *et al.*, 2000; Laboratorio Chimico CRA-VIT, dati non pubblicati).

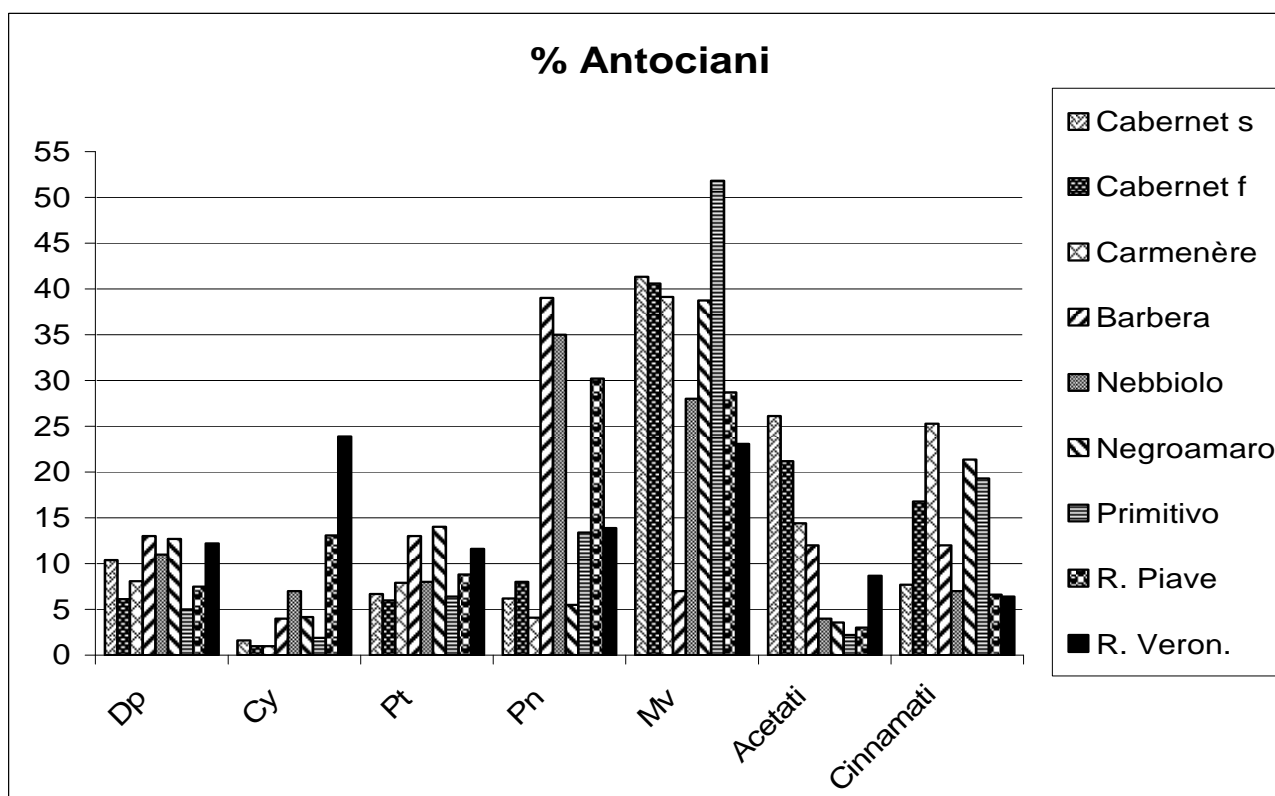


Figura 3.7. Confronto tra i profili degli antociani di diverse varietà: sono riportati i cinque antociani monoglucosidi e le somme degli antociani acetati e paracumarati.

3.1.1.5 Studio degli Acidi Idrossicinnamiltartarici

In Figura 3.8 è riportato il profilo degli acidi idrossicinnamiltartarici (HCTA) di un estratto delle bucce di Raboso Piave. La sequenza di eluizione è data da 1. acido *cis*-caffeiltartarico, 2. acido *trans*-caffeiltartarico, 3. acido *cis*-paracumaroiltartarico, 4. acido *trans*-paracumaroiltartarico, 5. acido 2-S-glutationil-caffeiltartarico, 6. acido *trans*-feruliltartarico. In Tabella 3.3 sono riportati i contenuti di HCTA determinati nelle bucce e nelle polpe. La differenza quantitativa tra le due annate è piuttosto evidente soprattutto nel caso degli estratti delle bucce. Un'alta variabilità si nota inoltre per la stessa varietà nei campioni provenienti da diverse zone di produzione (elevata deviazione standard), più evidente nel caso del Raboso Veronese. In entrambe le annate il campione di Raboso Veronese proveniente dalla zona II presenta i maggiori contenuti di HCTA. L'acido *trans*-caffeiltartarico e l'acido *trans*-*p*-cumaroiltartarico sono i composti cinnamici presenti in quantità maggiori, ed il loro rapporto può essere studiato per differenziare le due varietà.

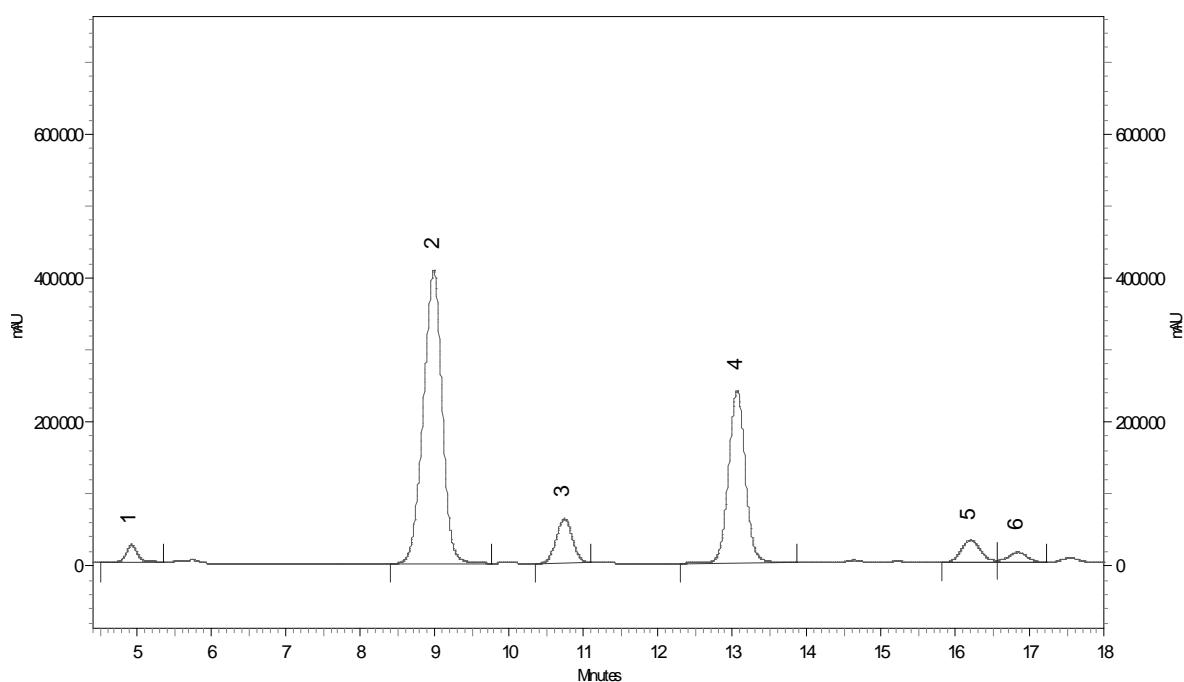


Figura 3.8. Profilo degli acidi idrossicinnamiltartarici di un estratto delle bucce di Raboso Piave. 1. acido *cis*-caffeiltartarico, 2. acido *trans*-caffeiltartarico, 3. acido *cis*-paracumaroiltartarico, 4. acido *trans*-paracumaroiltartarico, 5. acido 2-S-glutationil-caffeiltartarico, 6. acido *trans*-feruliltartarico.

bucce	acido <i>cis</i> -caffeiltartarico		acido <i>trans</i> -caffeiltartarico		acido <i>cis</i> - <i>p</i> -cumaroiltartarico		acido <i>trans</i> - <i>p</i> -cumaroiltartarico		acid <i>trans</i> -feruliltartarico	
	(mg/Kg uva)									
	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005
Media R. Piave	0.79±0.17	0.10±0.04	21.80±3.08	1.35±0.47	4.97±2.33	0.18±0.06	22.85±9.63	0.71±0.21	1.09±0.13	0.59±0.41
Media R. Veronese	0.89±0.18	0.35±0.10	30.53±10.81	3.82±2.99	3.85±0.69	0.50±0.46	18.54±7.35	0.95±0.84	1.02±0.16	0.53±0.40

polpe	acido <i>cis</i> -caffeil tartarico		acido <i>trans</i> -caffeil tartarico		acido <i>cis</i> - <i>p</i> -cumaril tartarico		acido <i>trans</i> - <i>p</i> -cumaril tartarico		acido <i>trans</i> -ferulil tartarico	
	(mg/L succo)									
	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005
Media R. Piave	1.31±0.78	0.35±0.26	27.14±20.21	21.77±16.34	2.78±1.98	1.06±0.84	7.14±5.46	4.52±3.28	1.76±1.15	0.27±0.09
Media R. Veronese	1.89±0.34	0.66±0.37	57.42±11.89	51.81±30.93	2.03±0.26	1.44±0.84	6.71±0.89	5.52±3.81	2.08±0.27	0.39±0.18

Tabella 3.3. Contenuti medi degli acidi idrossicinnamiltartarici determinati nelle bucce e nelle polpe dei campioni di Raboso Piave e Raboso Veronese nelle due annate.

3.1.1.6 Studio dei Flavonoli nelle Bucce

In Figura 3.9 è riportato il cromatogramma del profilo dei flavonoli nell'estratto delle bucce di un campione di Raboso Piave. La sequenza di eluizione è 1. Miricetina (Mr) glucuronide; 2. Mr-glucoside; 3. Quercetina (Q) glucuronide; 4. Q-glucoside; 5. Campferolo (Kf) glucuronide; 6. Kf-glucoside.

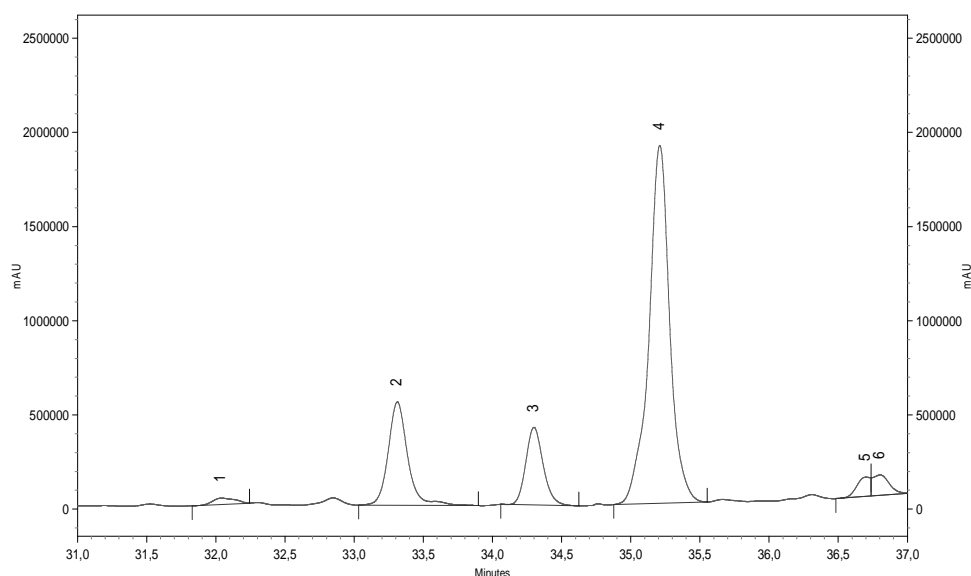


Figura 3.9. Profilo dei flavonoli nell'estratto delle bucce di un campione di Raboso Piave. 1. miricetina (Mr) glucuronide; 2. Mr-glucoside; 3. quercetina (Q) glucuronide; 4. Q-glucoside; 5. campferolo (Kf) glucuronide; 6. Kf-glucoside.

Il Kf-glucoside ed il Kf-glucuronide escono nel cromatogramma molto vicini tra loro e spesso coeluiscono rendendo impossibile una quantificazione separata. Pertanto le aree dei picchi sono state integrate insieme ed il valore è stato espresso come contenuto totale di Kf in forma glicosidata. In Tabella 3.4 sono riportati i contenuti di flavonoli nelle bucce.

In generale la Q-glucoside è il flavonolo più abbondante presente nel Raboso. In entrambe le annate il Raboso Veronese presentava maggiori contenuti di flavonoli glucosidi, ma come nel caso degli HCTA il risultato è risultato parzialmente influenzato dal campione Raboso Veronese zona II.

campioni	Mr-glucuronide		Mr-glucoside		Q-glucuronide		Q-glucoside		Kf-glicoside	
	mg/kg uva									
	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005	2004	2005
Media R. Piave	1.16±0.31	1.36±0.22	8.11±2.37	8.48±1.56	5.88±3.37	6.41±1.83	10.98±6.42	16.19±7.59	1.23±0.29	1.21±0.61
Media R. Veronese	1.20±0.72	1.12±0.66	13.94±4.87	8.93±4.45	9.78±2.08	7.34±4.03	42.03±16.64	33.59±22.63	3.81±0.62	4.20±2.95

Tabella 3.4. Contenuti medi di flavonoli determinati nelle bucce e nelle polpe dei campioni di Raboso Piave e Raboso Veronese nelle due annate.

In Tabella 3.5 sono riportati alcuni dati medi riportati in letteratura relativi ai contenuti di flavonoli nelle bucce di diverse varietà (Pigella *et al.*, 1998; Laboratorio Chimico CRA-VIT, dati non pubblicati; Calò *et al.*, 2000; Di Stefano *et al.*, 1995b). Dal confronto con il Raboso, si osserva per il Raboso Veronese un contenuto di Q-glucoside particolarmente elevato, mentre i contenuti medi degli altri flavonoli risultano in linea con quelli delle altre varietà messe a confronto. Anche in questo caso il campione Raboso Veronese zona II rivela parametri superiori alla media.

varietà	Mr-glucuronide	Mr-glucoside	Q-glucuronide	Q-glucoside	Kf-glicoside
Pinot Nero	/	5	8.5	8.5	3.5
Primitivo	7.5		26		2.2
Negroamaro	/	25	9.5	20	4
Negroamaro precoce	/	15	14	25	3.5
Brachetto d'Acqui	/	3.5	5	13	/
Malvasia Lunga	/	1.5	14.5	19.5	/
Raboso Piave	1.2	3	6.2	13.6	2
Raboso Veronese	1.2	11.4	8.6	37.8	4

Tabella 3.5. Dati medi espressi in mg/Kg uva dei flavonoli nelle bucce di Raboso Piave e Raboso Veronese messi a confronto con i dati riportati in letteratura per altre varietà.

3.1.1.7 Studio dei Flavanoli Monomeri nei Vinaccioli

In Figura 3.10 è riportato il cromatogramma del profilo dei flavanoli dell'estratto dei vinaccioli di un campione di Raboso Piave. In Tabella 3.6 sono riportati i dati dei contenuti di flavanoli monomeri nei vinaccioli. Il Raboso Veronese presenta maggiori livelli sia di (+)-catechina che di (-)-epicatechina.

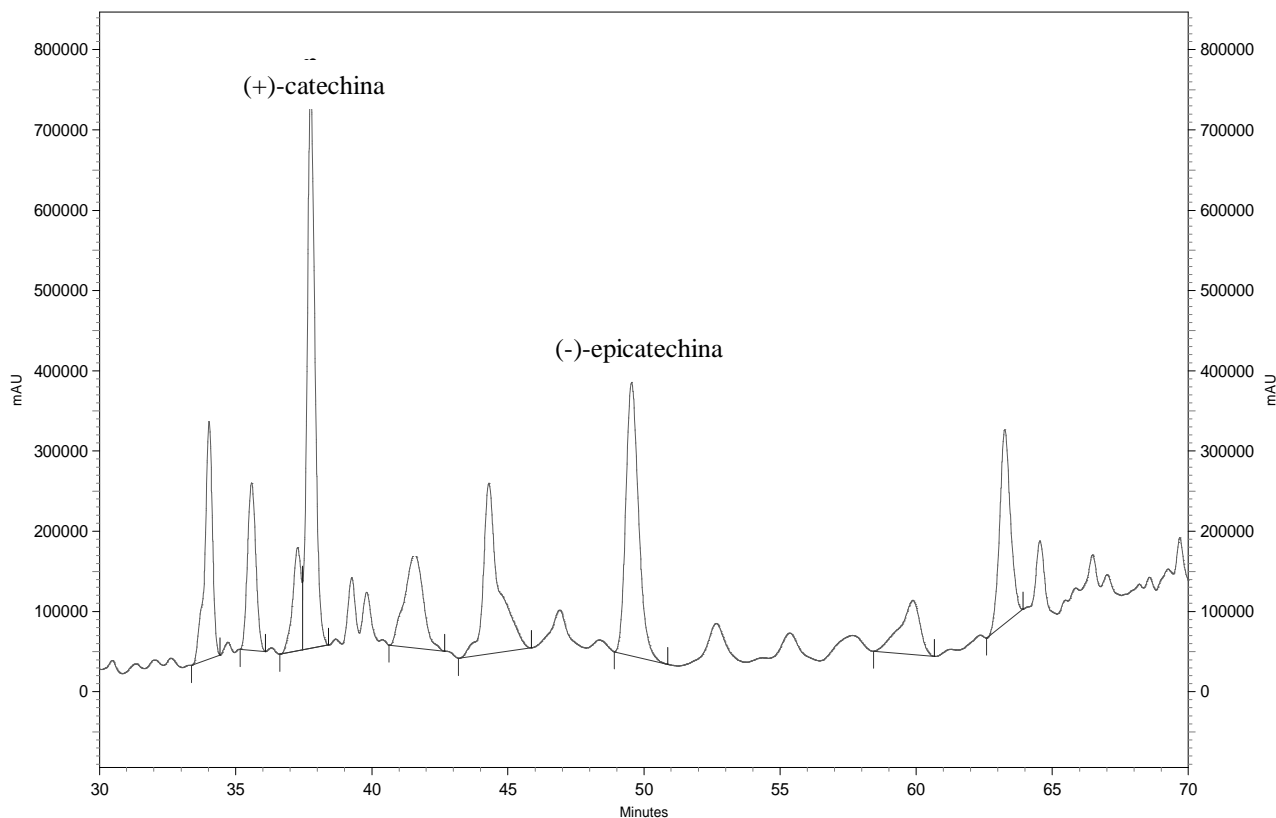


Figura 3.10. Profilo di flavanoli monomeri dell'estratto di vinaccioli di un campione Raboso Piave.

campioni	(+) - catechina (mg/100 g vinaccioli)		(-) - epicatechina (mg/100 g vinaccioli)	
	2004	2005	2004	2005
Media R. Piave	67.71±11.37	63.73±22.12	57.93±11.98	34.23±12.24
Media R. Veronese	213.92±20.15	95.29±4.64	120.54±15.27	61.94±8.26

Tabella 3.6. Contenuti medi di flavan-3-oli monomeri nei vinaccioli determinati nei campioni di Raboso Piave e Raboso Veronese nelle due annate

3.1.2 Studio del Profilo Aromatico del Raboso Piave e del Raboso Veronese

Poiché gli estratti hanno evidenziato una scarsa presenza di composti volatili liberi, lo studio è stato focalizzato sui composti volatili liberati dai precursori glicosilati e formati in seguito ad idrolisi acida (Favaro 2006, tesi di laurea). In Figura 3.11 è riportato il cromatogramma dei composti liberati da idrolisi enzimatica di un estratto di Raboso Piave.

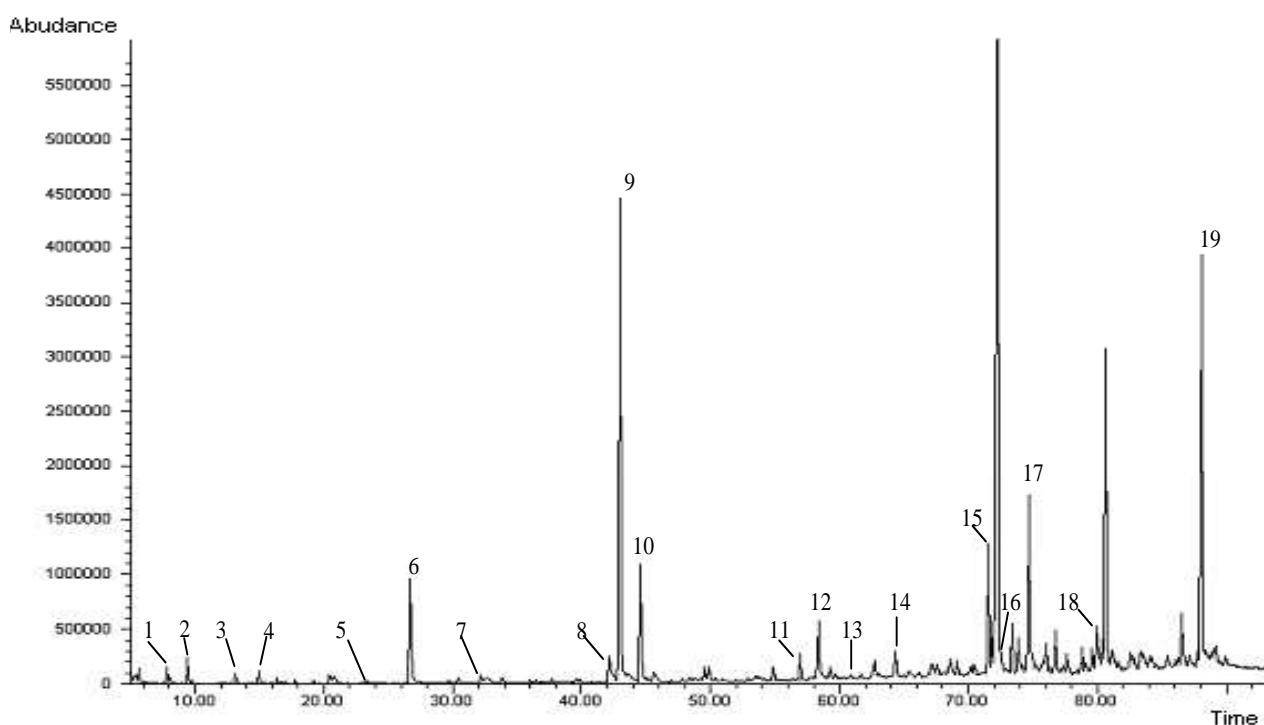


Figura 3.11. Esempio di cromatogramma ottenuto dall'idrolisi enzimatica di un estratto d'uva di Raboso Piave: 1. alcol isoamilico; 2. 3-metil-3-buten-1-olo; 3. 3-metil-2-buten-1-olo; 4. esanolo; 5. benzaldeide; 6. 1-ottanolo (S.I.); 7. α -terpineolo; 8. geraniolo; 9. alcol benzilico; 10. β -feniletanolo; 11. eugenolo; 12. vinilguaiacolo; 13. 3,4-dimetossifenolo; 14. OH-geraniolo; 15. 7-OH- α -terpineolo; 16. vanillina; 17. 3-oxo- α -ionolo; 18. alcol omovanillico; 19. vomifoliolo.

3.1.2.1 Composti Alifatici e Benzenoidi Glicosilati

E' stata determinata la composizione aromatica dei campioni preparati riunendo pari volumi di estratto di bucce e di polpe, i valori riportati in Tabella 3.7 rappresentano la composizione media dell'acino e sono espressi in $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva di 1-ottanolo. In entrambe le varietà i composti alifatici identificati più rilevanti sotto il profilo sensoriale sono 2-esenale, esanolo ed esenoli, composti caratterizzati da note sensoriali di erbaceo e soglie di percezione negli alimenti rispettivamente di 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 500-2500 $\mu\text{g}/\text{L}$ (in acqua, Berger, 2007) e 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Porretta, 2000). Tra i benzenoidi glicosilati l'alcol benzilico è risultato il più abbondante (livelli compresi tra 540-1140 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva, nota pungente e soglia di percezione 10 mg/kg), seguito dall'alcol omovanillico (380-960 $\mu\text{g}/\text{kg}$, nota balsamica dolce). Si riscontra una importante presenza di derivati benzenici che sono anche caratteristici delle cessioni di sostanze legnose, come 4-vinilguaiacolo (100-340 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva, nota speziata), 4-vinilfenolo (20-125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva, nota di vernice, Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998), eugenolo (10-70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva, nota speziata, soglia di percezione 0.3 ppm nel vino, Boidron *et al.*, 1988), vanillina (60-260 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva, soglia di percezione di 0.5 ppm nel vino Boidron *et al.*, 1988), metilvanillato e metossifenoli (Tateo *et al.*, 1995; Porretta, 2000; Flamini *et al.*, 2007).

composti glicosilati ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ uva)	Raboso Piave		Raboso Veronese	
	media 2004	media 2005	media 2004	media 2005
Composti alifatici				
1-butanolo	15 \pm 4	32 \pm 1	19 \pm 2	14 \pm 3
alcol isoamilico	26 \pm 8	42 \pm 3	31 \pm 8	21 \pm 9
2-esenale	8 \pm 4	14 \pm 4	11 \pm 5	27 \pm 5
3-metil-3-buten-1-olo	40 \pm 4	30 \pm 9	30 \pm 12	34 \pm 6
1-pentanolo	7 \pm 3	6 \pm 1	8 \pm 3	6 \pm 2
3-metil-2-buten-1-olo	18 \pm 4	25 \pm 9	25 \pm 3	27 \pm 8
esanolo	41 \pm 17	32 \pm 10	57 \pm 24	45 \pm 10
3-esen-1-olo	15 \pm 6	14 \pm 6	17 \pm 7	11 \pm 3
2-esen-1-olo	16 \pm 9	13 \pm 7	23 \pm 7	13 \pm 1
Benzenoidi				
benzaldeide	11 \pm 1	12 \pm 4	7 \pm 1	12 \pm 1
alcol benzilico	888 \pm 126	741 \pm 188	647 \pm 106	1102 \pm 37
β -feniletanolo	307 \pm 64	356 \pm 116	340 \pm 29	415 \pm 17
eugenolo	20 \pm 3	48 \pm 24	16 \pm 5	30 \pm 8
4-vinilguaiacolo	216 \pm 81	154 \pm 50	273 \pm 71	328 \pm 10
2,6-dimetossifenolo	22 \pm 4	15 \pm 9	16 \pm 1	45 \pm 26
4-vinilfenolo	56 \pm 1	40 \pm 18	52 \pm 1	105 \pm 21
acido benzoico	42 \pm 36	63 \pm 23	73 \pm 20	31 \pm 7
vanillina	95 \pm 34	88 \pm 24	258 \pm 10	99 \pm 5
metilvanillato	119 \pm 30	119 \pm 63	104 \pm 13	112 \pm 14
3,4-dimetossifenolo	27 \pm 13	27 \pm 9	40 \pm 14	51 \pm 7
4-idrossi-3-metossi benzil				
alcol	87 \pm 50	70 \pm 18	142 \pm 14	185 \pm 8
alcol omovanillico	454 \pm 77	585 \pm 91	557 \pm 8	900 \pm 56
4-idrossi-benzaldeide	37 \pm 8	43 \pm 16	30 \pm 9	87 \pm 21
acido siringico	26 \pm 11	34 \pm 14	23 \pm 2	33 \pm 3
3,4,5-trimetossifenolo	105 \pm 24	110 \pm 17	153 \pm 11	170 \pm 21

Tabella 3.7. Composti volatili identificati dopo idrolisi enzimatica degli estratti d'uva Raboso Piave e Raboso Veronese nelle due annate. Sono riportati i contenuti medi e la deviazione standard calcolati per i tre campioni di *Raboso Piave* e due campioni di *Raboso Veronese* (due prelievi per ciascun campione) espressi in μg 1-ottanolo/Kg uva.

3.1.2.2 Terpenoli e Norisoprenoidi Glicosilati

In Tabella 3.8 sono riportati i contenuti medi di terpenoli e norisoprenoidi agliconi identificati dopo idrolisi enzimatica nei campioni di *Raboso Piave* e *Raboso Veronese*. L'uva di Raboso è risultata essere caratterizzata da una modesta presenza di terpenoli in forma glicosidata, tra cui i più significativi sono *cis*- e *trans*-8-idrossilinalolo (livelli compresi rispettivamente tra 10-210 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva e 40-95 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva), *cis*- e *trans*-furanlinalolo ossidi e piranlinalolo ossidi, mentre il linalolo risulta praticamente assente. Il geraniolo (nota floreale e soglia di percezione olfattiva 130 $\mu\text{g}/\text{L}$, Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998) è presente in livelli significativi, così come l'idrossigeraniolo (livelli compresi tra 60-150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva) e l'acido geranico. Questo è in linea con quanto già riportato per il vino di *Raboso*, dove geraniolo ed idrossigeraniolo glicosilati risultavano più rappresentativi del linalolo e del linalolo idrossilato (Dalla Serra *et al.*, 2004). Il terpenolo più abbondante è il 7-idrossi- α -terpineolo con livelli compresi tra 40-500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva. Anche la presenza di norisoprenoidi glicosilati risulta rilevante, in particolare 3-idrossi- β -damascone (40-80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva), 3-oxo- α -ionolo (275-600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva), 4-oxo- β -ionolo (30-75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva), 3,9-diidrossimegastigma-5-ene (o 3-idrossi-7,8-diidro- β -ionolo, 40-120 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva), 3-idrossi-7,8-dideidro- β -ionolo (30-70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ uva) e vomifoliolo (fino a 1.6 mg/kg uva). Alla presenza di 3-idrossi- β -damascone e 3-oxo- α -ionolo è associata una nota di tabacco (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998). Interessante risulta la presenza del 3-idrossi-7,8-dideidro- β -ionolo, composto riportato essere il precursore del β -damascenone caratterizzato da un complesso odore di fiori, frutta esotica, miele e soglia olfattiva nel vino dell'ordine di 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ (Ribèreau-Gayon *et al.*, 1998) e del 3-idrossi- β -damascone (Figura 3.12).

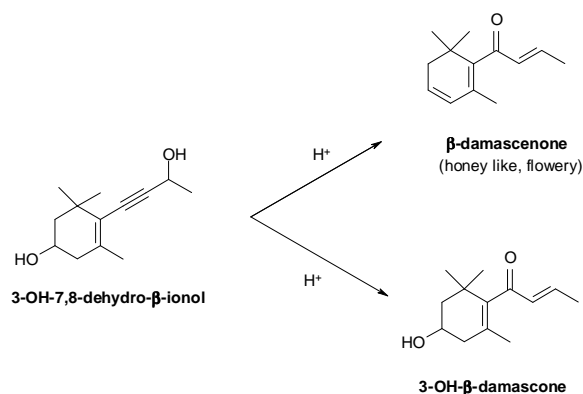


Figura 3.12. Composti norisoprenoidi formati dal precursore 3-idrossi-7,8-dideidro- β -ionolo (Winterhalter *et al.*, 1988; 1990; Sefton *et al.*, 1993).

composti glicosilati ($\mu\text{g/Kg}$ uva)	Raboso Piave		Raboso Veronese	
	media 2004	media 2005	media 2004	media 2005
terpenoli				
cis-furanlinalolo ossido	11 \pm 5	13 \pm 4	22 \pm 3	21 \pm 2
trans-furanlinalolo ossido	13 \pm 4	tc	18 \pm 5	28 \pm 13
α -terpineolo	17 \pm 3	21 \pm 6	2 \pm 1	20 \pm 1
cis-piranlinalolo ossido	13 \pm 7	15 \pm 8	17 \pm 1	25 \pm 7
trans-piranlinalolo ossido	12 \pm 5	12 \pm 1	19 \pm 2	24 \pm 3
eso-2-idrossicineolo	48 \pm 11	61 \pm 11	33 \pm 19	74 \pm 10
geraniolo	28 \pm 8	38 \pm 12	29 \pm 8	39 \pm 3
trans-8-idrossilinalolo	66 \pm 19	52 \pm 10	86 \pm 8	76 \pm 19
idrossigeraniolo	114 \pm 35	68 \pm 10	99 \pm 5	132 \pm 13
cis-8-idrossilinalolo	18 \pm 5	14 \pm 6	170 \pm 44	114 \pm 10
acido geranico	34 \pm 17	29 \pm 14	12 \pm 7	31 \pm 1
7-idrossi- α -terpineolo	342 \pm 154	323 \pm 113	51 \pm 8	294 \pm 34
norisoprenoidi				
3-idrossi- β -damascone	60 \pm 12	62 \pm 20	68 \pm 1	77 \pm 2
3-oxo- α -ionolo	404 \pm 129	462 \pm 165	344 \pm 33	572 \pm 25
4-oxo- β -ionolo	39 \pm 9	55 \pm 16	44 \pm 11	74 \pm 2
diidrossi-megastigma-5-ene	89 \pm 27	57 \pm 14	105 \pm 2	106 \pm 14
3-idrossi-7,8-dideidro- β -ionolo	44 \pm 10	49 \pm 21	50 \pm 6	64 \pm 7
vomifoliolo	1145 \pm 275	1000 \pm 144	1360 \pm 72	1463 \pm 118

Tabella 3.8. Terpenoli e norisoprenoidi identificati dopo idrolisi enzimatica degli estratti d'uva Raboso Piave e Raboso Veronese nelle due annate. Sono riportati i contenuti medi e la deviazione standard nei tre campioni di uva *Raboso Piave* e due campioni di uva *Raboso Veronese* (due prelievi per ciascun campione) espressi in μg 1-ottanolo/Kg uva.

3.1.2.3 Composti Volatili Formati per Idrolisi Acida

Nelle tabelle 3.9 e 3.10 sono riportati rispettivamente i contenuti medi di alcoli, composti benzenici, terpenoli e norisoprenoidi identificati dopo idrolisi acida degli estratti. In Figura 3.13 è riportato il cromatogramma relativo l'analisi di un estratto di Raboso Piave dopo idrolisi acida.

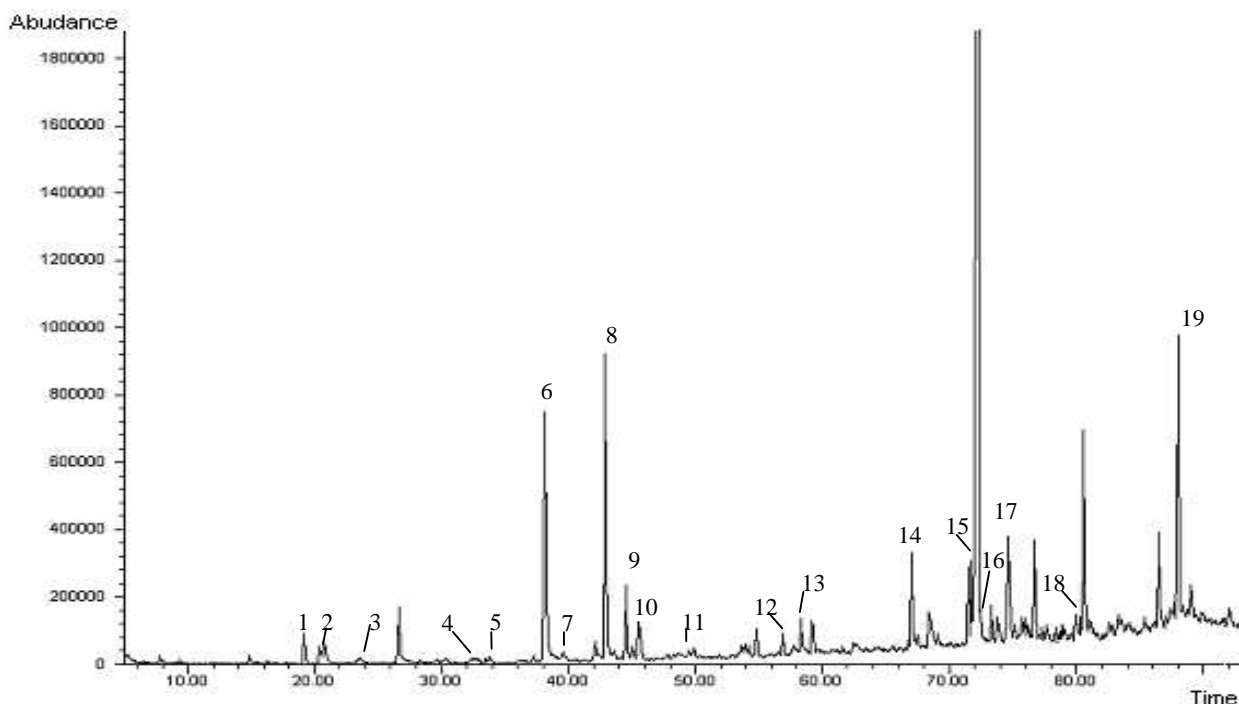


Figura 3.13. Esempio di cromatogramma ottenuto dall'idrolisi acida di un estratto d'uva di Raboso Piave: 1. *cis* furanlinalolo ossido; 2. *trans* furanlinalolo ossido; 3. vitispirani; 4. *cis* ocimenolo; 5. *trans* ocimenolo; 6. 1-decanolo (S.I.); 7. β -damascenone; 8. alcol benzilico; 9. β -feniletanolo; 10. actinidoli; 11. endiolo; 12. eugenolo; 13. vinilguaiacolo; 14. acido benzoico; 15. 7-OH- α -terpineolo; 16. vanillina; 17. 3-oxo- α -ionolo; 18. alcol omovanillico; 19. vomifoliolo.

I composti alifatici ed i benzenoidi sono gli stessi identificati dopo idrolisi enzimatica. In seguito all'idrolisi chimica si osserva un incremento di 4-vinilfenolo ed acido benzoico.

Dalla Tabella 3.10 si evidenzia che l'idrolisi chimica induce la formazione di nuovi terpenoli, quali *cis*- e *trans*-ocimenolo ed endiolo, l'incremento di *cis*- e *trans*-furanlinalolo ossido, e la parallela scomparsa di geraniolo, piranlinalolo ossidi, idrossilinaloli ed idrossigeraniolo in accordo con quanto riportato dallo studio delle trasformazioni dei terpenoli in ambiente acido (Usseglio-Tomasset, 1995; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

La formazione dei nuovi norisoprenoidi in seguito all'idrolisi acida - vitispirani, β -damascenone, actinidoli, 3-idrossi- β -damascone - è accompagnata dalla diminuzione di 3-idrossi-

7,8-deidro- β -ionolo dei quali è il precursore (Figura 3.12). Ai vitispirani, che si sviluppano nel vino durante l'invecchiamento in bottiglia, ed agli actinidoli, è associata una nota di canfora (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998). Vitispirani e β -damascenone sono stati riportati nel Riesling (concentrazioni nel vino fino a 200 $\mu\text{g/L}$) (Simpson e Miller, 1983; Strauss *et al.*, 1987; Winterhalter *et al.*, 1990), in alcune uve a bacca rossa quali Sangiovese, Canaiolo, Grenache, Nebbiolo, Barbera assieme a 3-idrossi- β -damascenone, 3-oxo- α -ionolo, 3-idrossi-7,8-diidro- β -ionolo, vomifoliolo, actinidoli (Di Stefano *et al.*, 1998), nello Chardonnay (Sefton *et al.*, 1993), nel Prosecco (Di Stefano *et al.*, 1997; Tomasi *et al.*, 2000), nel Torbato (Flamini *et al.*, 2006).

composti identificati dopo idrolisi acida ($\mu\text{g/Kg}$ uva)	Raboso Piave		Raboso Veronese	
	media 2004	media 2005	media 2004	media 2005
alcoli				
alcol isoamilico	12 \pm 2	7 \pm 1	16 \pm 1	16 \pm 2
2-esenale	4 \pm 1	3 \pm 1	7 \pm 3	8 \pm 2
3-metil-3-buten-1-olo	6 \pm 2	3 \pm 1	2 \pm 1	2 \pm 1
1-pentanololo	3 \pm 1	tc	5 \pm 2	3 \pm 1
esanolo	21 \pm 10	10 \pm 5	22 \pm 5	40 \pm 26
E-3-esen-1-olo	8 \pm 2	4 \pm 1	8 \pm 3	6 \pm 3
Z-2-esen-1-olo	6 \pm 1	4 \pm 1	10 \pm 3	6 \pm 3
benzenoidi				
benzaldeide	8 \pm 2	5 \pm 1	9 \pm 2	7 \pm 4
alcol benzilico	439 \pm 102	237 \pm 75	207 \pm 66	237 \pm 8
β -feniletanolo	211 \pm 33	90 \pm 20	209 \pm 86	182 \pm 36
eugenolo	14 \pm 6	19 \pm 9	10 \pm 3	11 \pm 2
4-vinilguaiacolo	141 \pm 24	40 \pm 16	260 \pm 194	172 \pm 60
2,6-dimetossifenolo	22 \pm 5	9 \pm 2	23 \pm 12	14 \pm 6
4-vinilfenolo	137 \pm 29	82 \pm 14	137 \pm 90	146 \pm 66
acido benzoico	204 \pm 59	64 \pm 17	321 \pm 44	100 \pm 59
vanillina	84 \pm 15	33 \pm 8	154 \pm 11	57 \pm 5
metilvanillato	97 \pm 22	35 \pm 6	77 \pm 35	48 \pm 9
alcol omovanillico	343 \pm 59	172 \pm 37	379 \pm 206	316 \pm 123
3,4,5-trimetossifenolo	123 \pm 13	62 \pm 14	175 \pm 114	118 \pm 11

Tabella 3.9. Alcoli e composti benzenoidi identificati dopo idrolisi acida degli estratti. Sono riportati i contenuti medi e la deviazione standard nei tre campioni di uva *Raboso Piave* e due campioni di uva *Raboso Veronese* (due prelievi per ciascun campione) espressi in μg 1-decanolo/Kg uva.

composti identificati dopo idrolisi acida ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ uva)	Raboso Piave		Raboso Veronese	
	media 2004	media 2005	media 2004	media 2005
terpenoli				
cis-furanlinalolo ossido	48 \pm 11	42 \pm 11	44 \pm 19	39 \pm 5
trans-furanlinalolo ossido	26 \pm 6	24 \pm 3	25 \pm 13	34 \pm 8
cis-ocimenolo	12 \pm 4	5 \pm 2	6 \pm 2	4 \pm 2
trans-ocimenolo	15 \pm 6	6 \pm 4	7 \pm 3	5 \pm 2
α -terpineolo	27 \pm 12	13 \pm 5	13 \pm 4	7 \pm 3
eso-2-idrossi -cineolo	61 \pm 11	32 \pm 11	29 \pm 7	28 \pm 11
endiolo	11 \pm 4	10 \pm 4	8 \pm 4	7 \pm 2
7-idrossi- α -terpineolo	230 \pm 69	102 \pm 20	46 \pm 28	34 \pm 16
norisoprenoidi				
vitispirani	12 \pm 4	19 \pm 7	22 \pm 10	9 \pm 3
β -damascenone	8 \pm 2	10 \pm 4	9 \pm 4	11 \pm 3
actinidolo 1	27 \pm 2	15 \pm 5	37 \pm 16	17 \pm 6
actinidolo 2	43 \pm 5	23 \pm 7	61 \pm 27	36 \pm 7
3-idrossi- β -damascone	103 \pm 12	66 \pm 9	99 \pm 34	52 \pm 18
3-oxo- α -ionolo	302 \pm 79	135 \pm 19	339 \pm 136	152 \pm 11
4-oxo- β -ionolo	18 \pm 2	15 \pm 4	27 \pm 16	19 \pm 5
diidrossi-megastigma-5- ene	60 \pm 9	20 \pm 3	75 \pm 42	30 \pm 7
3-idrossi-7,8-deidro- β - ionolo	18 \pm 4	19 \pm 4	24 \pm 9	29 \pm 13
vomifoliolo	679 \pm 78	273 \pm 41	900 \pm 478	498 \pm 1

Tabella 3.10. Terpeni e norisoprenoidi identificati dopo idrolisi acida degli estratti. Sono riportati i contenuti medi e la deviazione standard nei tre campioni di uva *Raboso Piave* e due campioni di uva *Raboso Veronese* (due prelievi per ciascun campione) espressi in μg 1-decanolo/Kg uva.

3.1.2.4 Confronto del Profilo Aromatico con Altre Varietà Riportate in Letteratura

Interessante risulta il confronto dei profili dei composti aromatici delle due varietà di Raboso con quelli di altre due varietà non aromatiche, una a bacca rossa ed una a bacca bianca, già riportati in letteratura, quali il Refosco dal peduncolo rosso ed il Torbato (ERSA, 2005; Flamini *et al.*, 2006). La Figura 3.14 riporta l'istogramma con la somma dei contenuti di terpenoli e norisoprenoidi glicosilati e prodotti per idrolisi acida. Complessivamente il Raboso risulta caratterizzato da un maggiore potenziale aromatico rispetto alle altre due varietà a sapore semplice, sia nel caso dei precursori glicosilati che in quelli derivanti dall'idrolisi acida (invecchiamento vino).

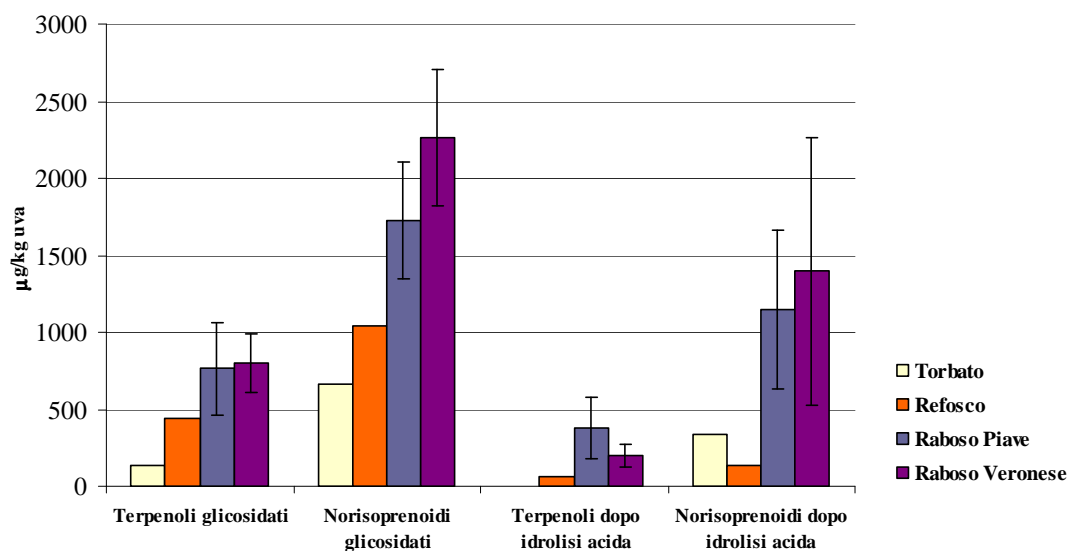


Figura 3.14. Contenuti dei composti aromatici del Raboso Piave e Raboso Veronese messi a confronto con altre due varietà a sapore semplice riportate in letteratura.

3.1.3 Differenziazione Chimica tra Raboso Piave e Raboso Veronese

Tramite analisi Anova (Statistica 4.5, StatSoft Inc.) sono stati individuati tra i polifenoli i fattori discriminanti tra le due varietà ($p < 0.05$).

Il profilo antocianico (Figura 3.6) permette in maggior misura di distinguere il Raboso Piave dal Veronese, confermando come la percentuale relativa di ogni antociano sia effettivamente in funzione della varietà. Anche se quantitativamente gli acidi idrossicinnamil tartarici subiscono ampie variazioni, lo studio dei rapporti tra i due composti principali, ac. *trans*-caffeiltartarico/ac. *trans-p*-cumaroiltartarico (Figura 3.15a), può essere utilizzato nella caratterizzazione varietale (Di Stefano, 1996b). In figura 3.15b sono riportati i flavonoli che maggiormente discriminano le due varietà dove si evidenzia che il Raboso Veronese è risultato tendenzialmente è più ricco di flavonoli glucosidi.

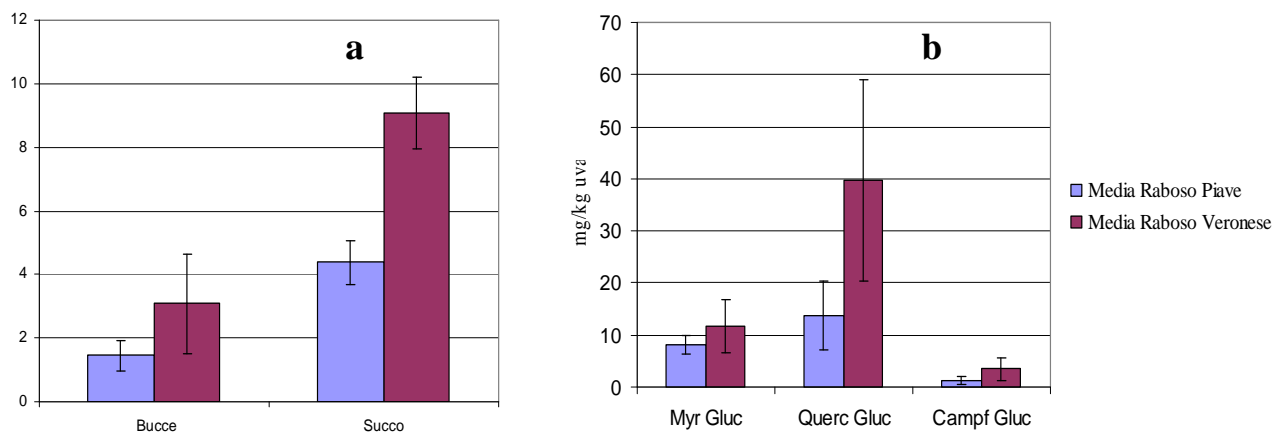


Figura 3.15. (a) Rapporti ac. *trans* caffeiltartarico/ac. *trans-p*-cumaroiltartarico nelle bucce e nel succo; (b) concentrazioni medie di miricetina glucoside, quercetina glucoside e campferolo glucoside nelle bucce (mg/kg uva).

Dal punto di vista aromatico le due varietà sono risultate molto simili. Le eventuali differenze riscontrabili sono di carattere quantitativo, legate quindi più a fattori ambientali (annata, zona di provenienza) che varietali. Tramite l'analisi Anova cinque fattori (composti glicosilati) sono risultati discriminanti tra le due varietà con un coefficiente di significatività (p) minore di 0.05. Il loro valore medio con relativa deviazione standard è riportato in Figura 3.16.

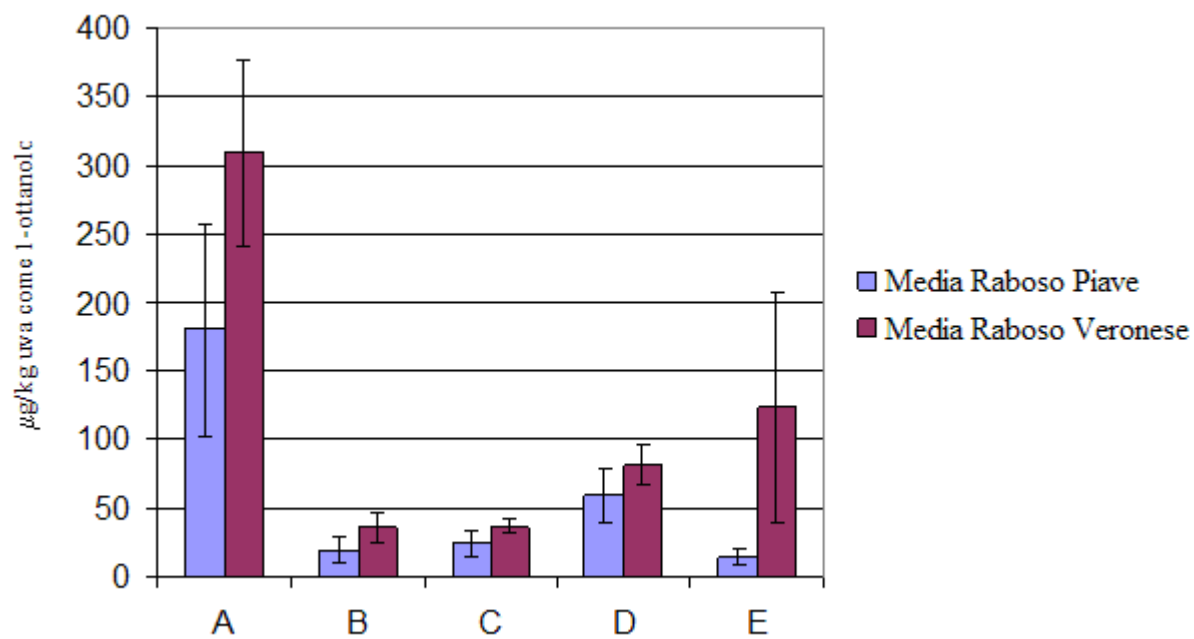


Figura 3.16. Composti glicosilati risultati discriminanti tra il Raboso Piave ed il Raboso Veronese: (A) 4-vinilguaiacolo, (B) *cis+trans* furanlinalolo ossido, (C) *cis+trans* piranlinalolo ossido, (D) *trans*-8-idrossilinalolo, (E) *cis*-8-idrossilinalolo.

3.1.4 Studio Delle Proteine a Basso Peso Molecolare dei Vinaccioli dell'Uva. Applicazione Nella Caratterizzazione Varietale delle Uve e Studio del Rapporto Parentale tra Raboso Piave e Raboso Veronese

3.1.4.1 Studio delle Proteine a Basso Peso Molecolare dei Vinaccioli dell'Uva

I vinaccioli sono costituiti per il 10% in peso da proteine (Manzoni, 1956) ed il primo problema da affrontare è individuare il metodo più efficace per l'estrazione che è influenzata dalla loro stessa natura (solubilità diverse in solventi acquosi o organici). Per tale motivo sono stati studiati tre diversi solventi di estrazione: acqua+0.1% acido trifluoroacetico (TFA), acetonitrile, la miscela acetonitrile/metanolo 1:1 (v/v). Per eseguire l'analisi MALDI/MS delle proteine negli estratti sono state inoltre testate tre diverse matrici: acido 2,5-diidrossibenzoico (DHB), acido 3,5-dimetossi-4-idrossicinnamico (acido sinapico, SA), acido α -ciano-4-idrossicinnamico (HCCA). Per l'eliminazione di eventuali sostanze interferenti i campioni sono stati sottoposti a differenti processi di purificazione: lavaggio con esano (per la rimozione degli acidi grassi), dialisi contro acqua bidistillata (per la rimozione dei sali), entrambe le procedure. Tutte queste procedure di estrazione e purificazione sono state applicate agli estratti dei vinaccioli di campioni di uve Raboso Piave e Prosecco (72 campioni preparati) nell'intento di ricavare la combinazione migliore tra purificazione, estrazione e modalità di ionizzazione.

Come è evidenziato nelle figure 3.17 e 3.18, l'uso della matrice DHB dà luogo a migliori spettri sia nel caso del Raboso Piave che del Prosecco. Sono infatti rilevabili con tale matrice un maggior numero di proteine con un migliore rapporto segnale/rumore, mentre l'HCCA risulta più efficace per i peptidi a più basso peso molecolare. L'acido sinapinico risulta in ogni caso la matrice che porta ai risultati peggiori (Pesavento 2007, tesi di laurea).

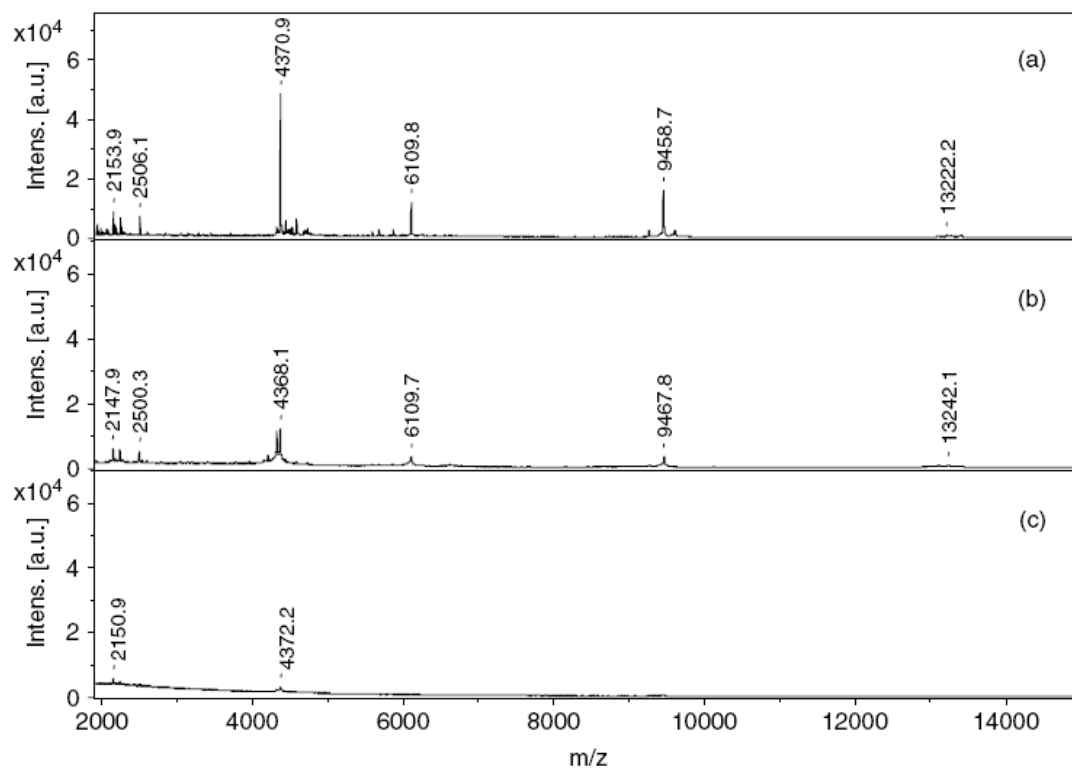


Figura 3.17. Spettri MALDI/MS dei campioni sgrassati e dializzati dei vinaccioli di Raboso Piave estratti con $H_2O+0,1\%TFA$ con l'uso di diverse matrici: a) DHB, b) HCCA, c) SA.

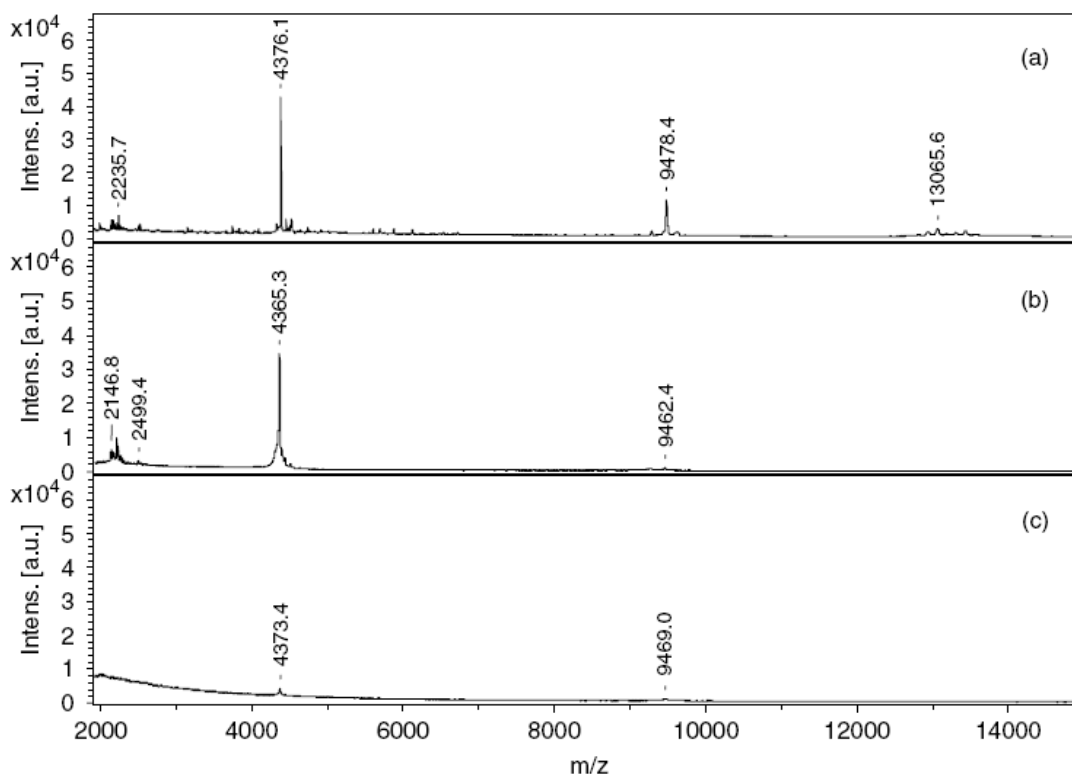


Figura 3.18. Spettri MALDI/MS dei campioni sgrassati e dializzati dei vinaccioli di Raboso Piave estratti con $H_2O+0,1\%TFA$ con l'uso di diverse matrici: a) DHB, b) HCCA, c) SA.

Tra le tre procedure di estrazione, utilizzate per questa indagine, la soluzione acquosa acidificata con TFA (0.1%) ha portato i migliori risultati, come è visibile in Figura 3.19.

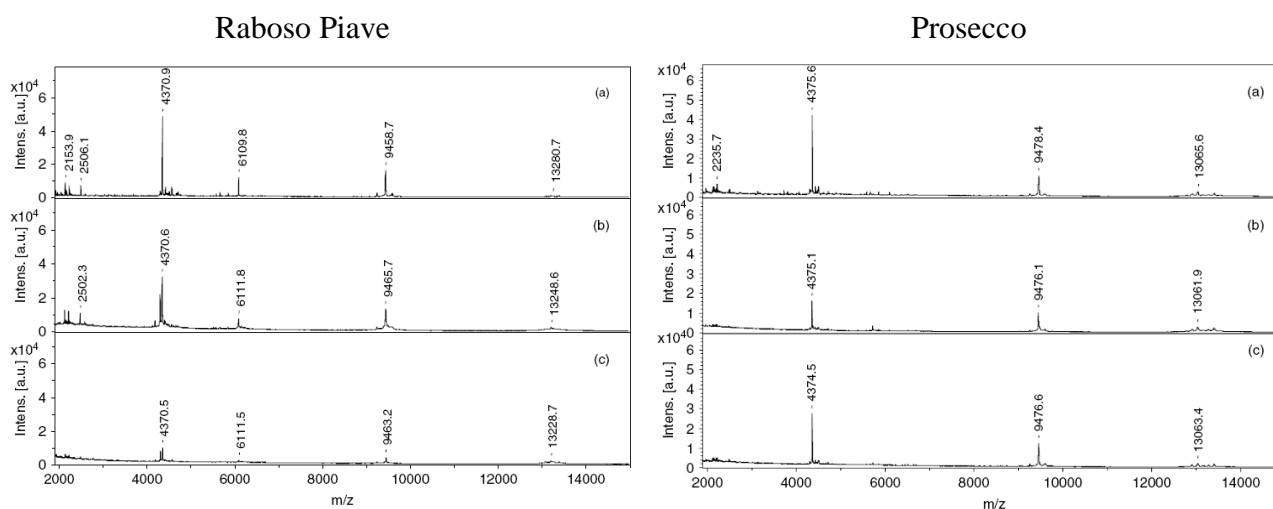


Figura 3.19. Spettri MALDI/MS dei campioni sgrassati e dializzati dei vinaccioli (DHB come matrice) estratti con: a) $\text{H}_2\text{O}+0,1\% \text{TFA}$, b) CH_3CN , c) $\text{CH}_3\text{CN}:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1).

L'efficacia del trattamento dei campioni prima dell'estrazione può essere valutato con gli spettri riportati in Figura 3.20.

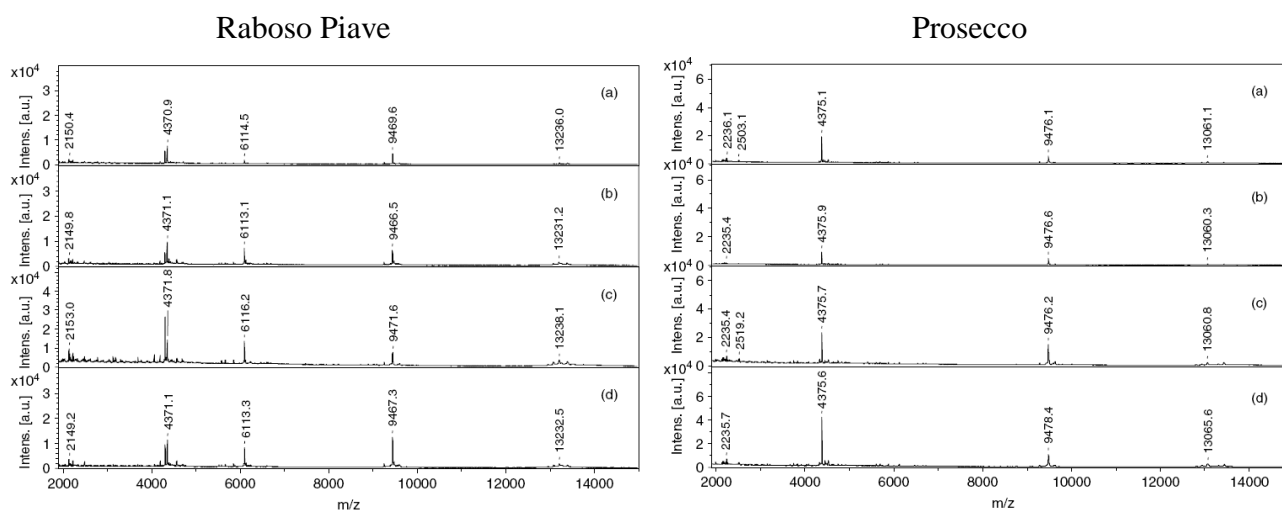


Figura 3.20. Spettri MALDI/MS dei campioni di vinaccioli pretrattati in modi diversi e estratti con $\text{H}_2\text{O}+0,1\% \text{TFA}$ (DHB come matrice): a) non trattati, b) sgrassati, c) dializzati, d) sgrassati e dializzati.

3.1.4.2 Caratterizzazione Varietale dell'Uva sulla Base del Profilo delle Proteine dei Vinaccioli

Individuato anche il metodo migliore di purificazione dei campioni (sgrassatura con esano e dialisi), lo studio è stato allargato ad un'altra varietà di uva rossa (Malvasia Nera di Brindisi) per valutarne l'effettiva efficacia nella caratterizzazione varietale.

Gli spettri MALDI evidenziano come le tre diverse varietà abbiano in comune alcune specie ioniche, presentando nel contempo dei segnali altamente specifici (Figura 3.21). In virtù del fatto che le tre varietà appartengono allo stesso genere di vite (*V. vinifera*), non desta sorpresa che la maggior parte delle proteine espresse dal loro genoma sia risultata la stessa.

Dal punto di vista della caratterizzazione varietale la Malvasia Nera presenta un segnale evidente a m/z 4305 Da non rilevabile nelle altre due varietà, come è evidenziato nell'ingrandimento dello spettro compreso tra m/z 4000-5000 Da. Il Raboso Piave è caratterizzato da un'abbondanza maggiore dello ione m/z 6110 Da (ingrandimento compreso tra m/z 5500-6500 Da).

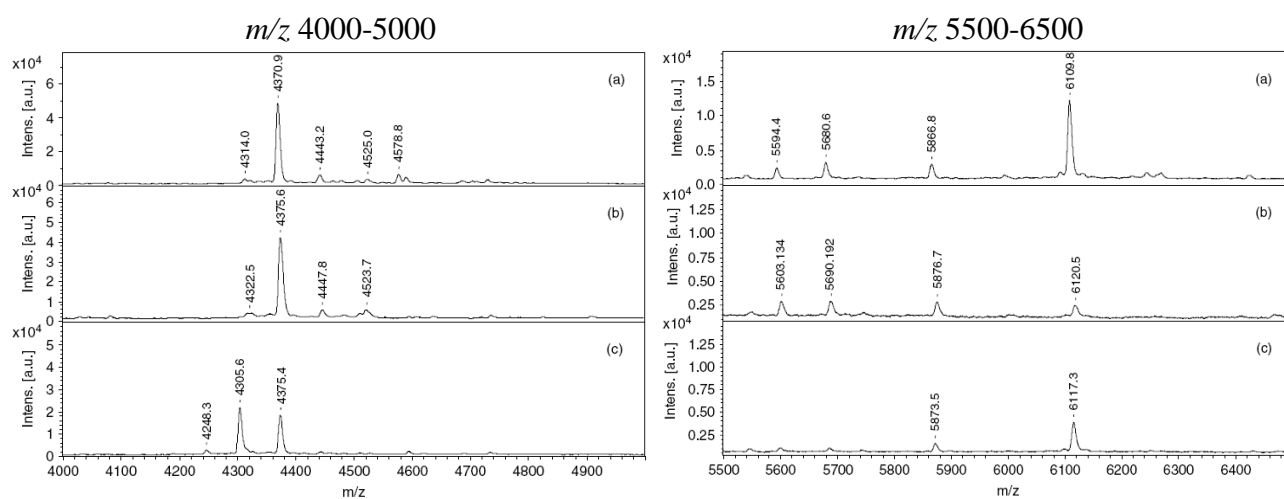


Figura 3.21. Ingrandimenti dell'intervallo m/z 4000–5000 e m/z 5500-6500 Da degli spettri MALDI/MS di Raboso Piave (a), Prosecco (b) e Malvasia Nera di Brindisi (c).

Le tre varietà possono essere ulteriormente distinte dall'analisi dei profili proteici a rapporti m/z più elevati (12500-15000 Da) come evidenziato in Figura 3.22.

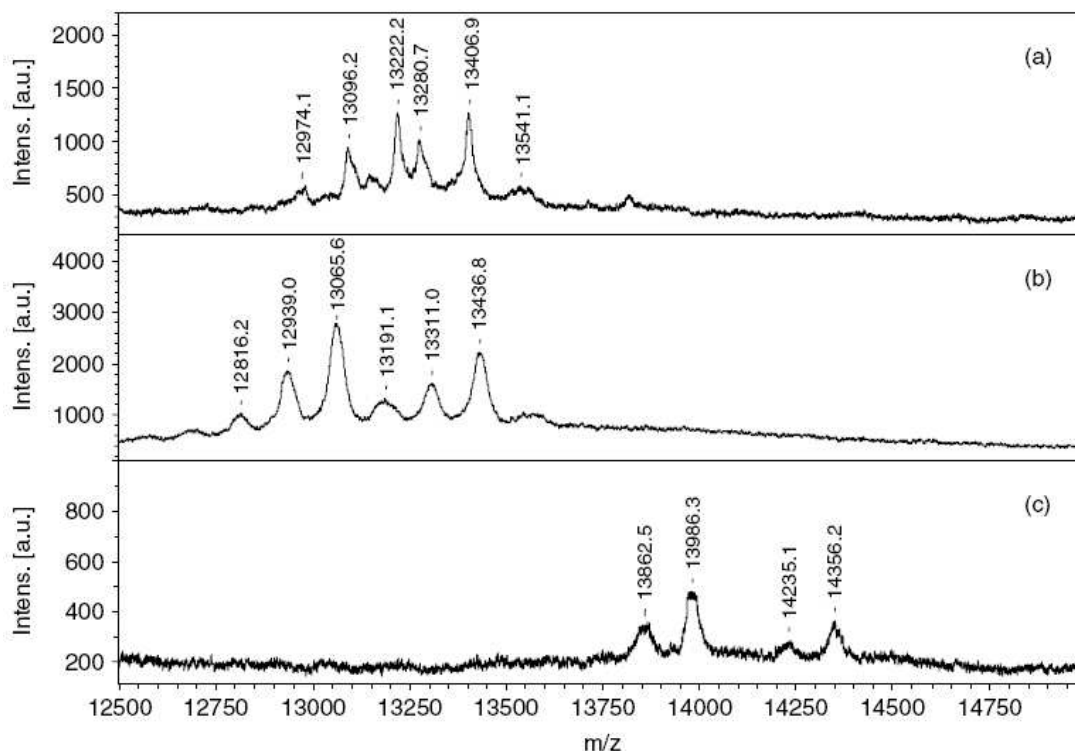


Figura 3.22. Ingrandimento dell'intervallo m/z 12500-15000 Da degli spettri MALDI/MS di Raboso Piave (a), Prosecco (b) e Malvasia Nera di Brindisi (c).

3.1.4.3 Differenziazione tra Raboso Piave e Raboso Veronese

Una volta messo a punto e verificato il metodo di analisi del profilo proteico dei vinaccioli lo studio è stato applicato alla differenziazione tra Raboso Piave e Raboso Veronese. Utilizzando gli stessi campioni raccolti per la caratterizzazione polifenolica ed aromatica (due annate e cinque zone di provenienza diverse) è stato possibile controllare eventuali effetti dovuti all'annata o a differenti condizioni ambientali.

Nelle figure 3.23 e 3.24 sono riportati gli spettri MALDI (m/z fino a 15000 Da) degli estratti dei vinaccioli di Raboso Piave e Veronese. Come si può notare, i profili proteici non sono influenzati né dall'annata né dalla differente provenienza dei campioni. Il rapporto di parentela tra le due varietà è confermato dalla sostanziale uguaglianza delle proteine espresse, in entrambi i campioni è ben visibile il peptide a m/z 6110 che come visto in precedenza differenzia il Raboso dalle altre varietà.

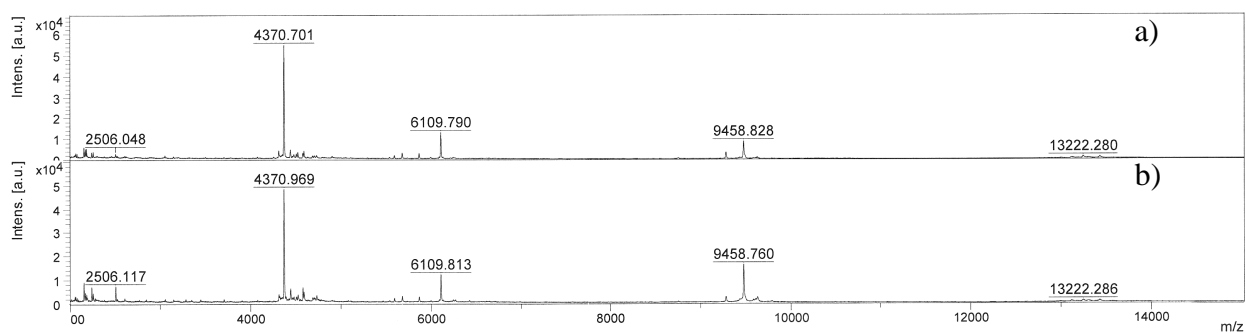


Figura 3.23. Spettri MALDI/MS di due estratti di vinaccioli di Raboso Piave: a) Mareno di Piave 2005, b) Salgareda 2004.

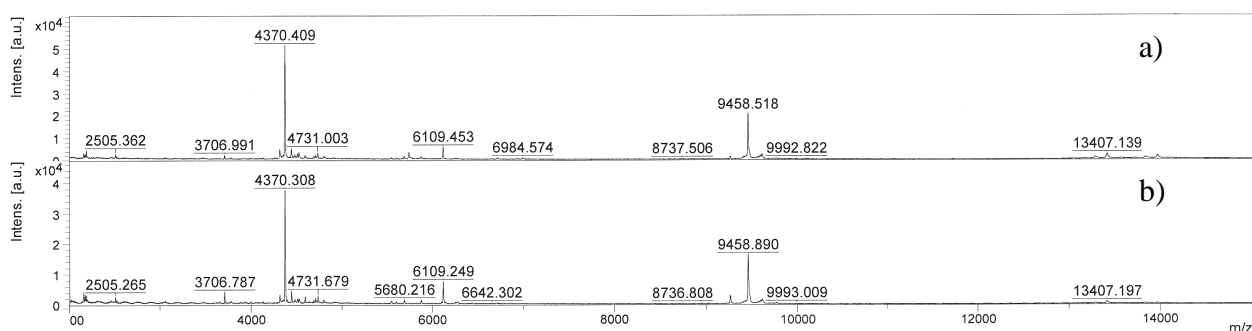


Figura 3.24. Spettri MALDI/MS di due estratti di vinaccioli di Raboso Veronese: a) Mareno di Piave 2005, b) Noventa di Piave 2004.

Malgrado le due varietà presentino profili molto simili possono comunque essere differenziate analizzando l'ingrandimento degli spettri MALDI compreso tra 2000-4000 Da (figure 3.25 e 3.26). Il Raboso Piave mostra un maggior numero di segnali tra 2050-2070 Da (m/z) ed è inoltre caratterizzato da due picchi a m/z 2241 e 2254 Da. Il Raboso Veronese è caratterizzato da una maggiore espressione dello ione a m/z 3707 e dalla presenza di un segnale a m/z 3778 assente nei campioni di Raboso Piave.

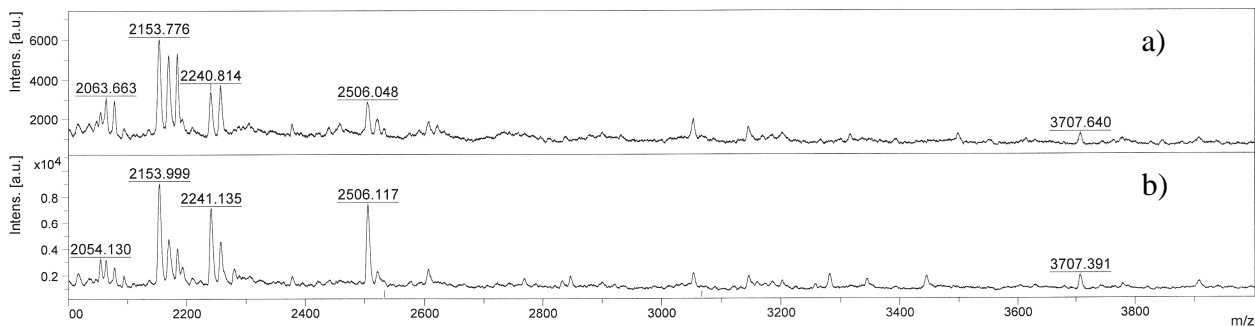


Figura 3.25. Ingrandimento dell'intervallo m/z 2000-4000 Da degli spettri MALDI/MS di due estratti di vinaccioli di Raboso Piave: a) Mareno di Piave 2005, b) Salgareda 2004.

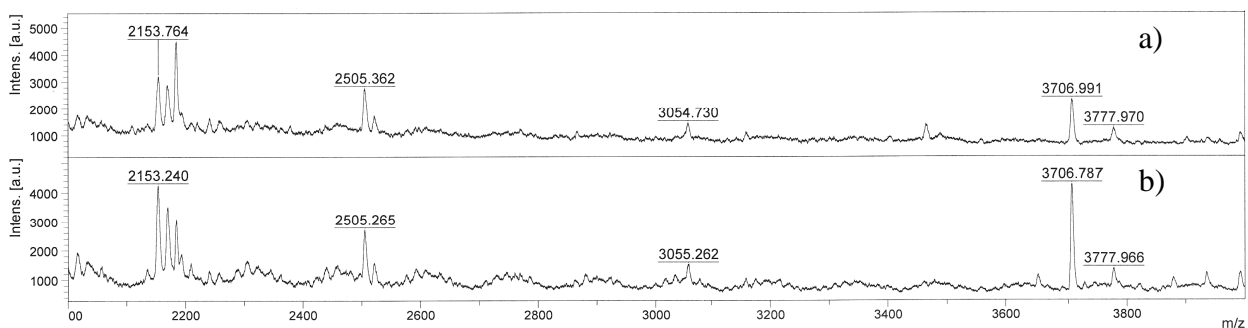


Figura 3.26. Ingrandimento dell'intervallo m/z 2000-4000 Da degli spettri MALDI/MS di due estratti di vinaccioli di Raboso Veronese: a) Mareno di Piave 2005, b) Noventa di Piave 2004.

3.1.4.4 Studio del Rapporto Parentale tra Raboso Piave e Raboso Veronese

Da quanto visto in precedenza, le differenze presenti nei profili proteici dei vinaccioli delle due varietà Raboso Piave e Raboso Veronese confermano la loro diversità genetica, ma allo stesso tempo certe similitudini confermano il loro grado di parentela. Da uno studio genetico (Crespan *et al.*, 2006) il Raboso Veronese è risultato essere un incrocio spontaneo tra il Raboso Piave (la madre) e la Marzemina Bianca (il padre), varietà anch'essa diffusa in Veneto. Dal punto di vista ampelografico la Marzemina Bianca si discosta molto dal Raboso, si tratta infatti di una varietà a maturazione precoce a bacca bianca. In Figura 3.27 sono riportati i profili proteici delle tre varietà, nell'ordine Raboso Veronese, Raboso Piave e Marzemina Bianca (a, b, c).

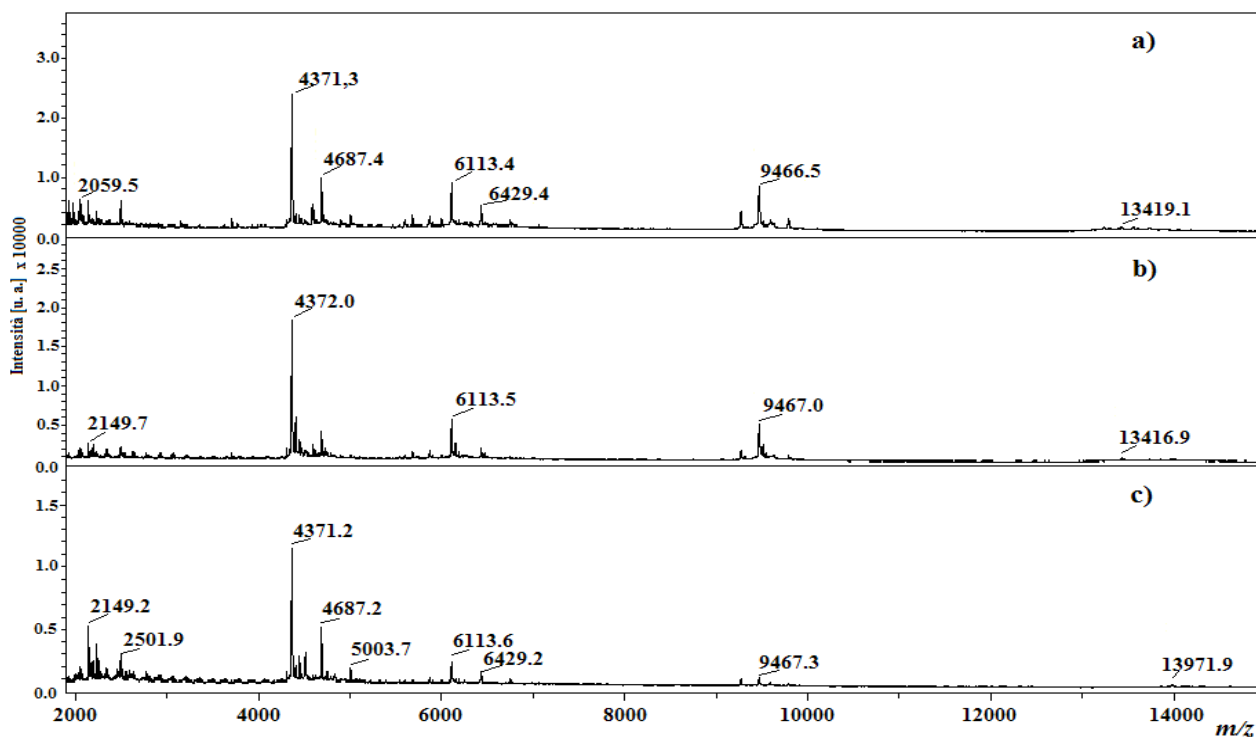


Figura 3.27. Confronto tra i profili MALDI/MS delle proteine dei vinaccioli: a) Raboso Veronese, b) Raboso Piave, c) Marzemina Bianca.

La semplice analisi qualitativa dei profili proteici può effettivamente dare un'indicazione nella caratterizzazione varietale, ma per confermare un'eventuale affinità parentale e quantificare in modo oggettivo le eventuali differenze è stato calcolato il fattore di discrepanza D definito come:

$$D_{n,q} = \sum_i |m_i^n - m_i^q|$$

dove per $D_{n,q}$ si intende il fattore di discrepanza tra due diversi campioni n e q , per m_i si intende l'abbondanza dello stesso ione ricavata dallo spettro MALDI. Più elevato si presenta tale valore più i campioni presentano profili differenti (Galletti *et al.*, 1989).

In un primo momento sono stati valutati eventuali effetti strumentali su tale valore ripetendo in giorni diversi l'analisi dello stesso campione (Raboso Piave I, Tabella 2.1) ottenendo valori di D compresi tra 3 e 10, considerando le abbondanze relative rispetto al picco più abbondante a m/z 4371 Da. I valori D calcolati dal confronto di spettri ottenuti dalle stesse varietà coltivate in zone e annate differenti sono riportati in Tabella 3.11.

Raboso Piave	I 2004	I 2005	III 2004	III 2005	Raboso Veronese	I 2004	I 2005	II 2004	II 2005
I 2004	0	18	26	21	I 2004	0	15	25	28
I 2005		0	21	27	I 2005		0	21	22
III 2004			0	15	II 2004			0	13
III 2005				0	II 2005				0

Tabella 3.11. Valori D relativi a campioni di Raboso Piave e Raboso Veronese provenienti da annate e zone differenti (per gli indici I, II, III si veda la Tabella 2.1).

Si evidenzia che il calcolo di D risulta utile per la caratterizzazione varietale quando confrontando varietà diverse si ottengono valori più alti di quelli riportati in Tabella 3.11 cioè l'annata e l'ambiente influiscono sul profilo proteico in modo marginale. In Tabella 3.12 sono riportati i valori di discrepanza tra gli spettri MALDI relativi alle varietà Raboso Piave, Raboso Veronese, Marzemina Bianca e Prosecco.

varietà	Raboso Piave	Raboso Veronese	Marzemina Bianca	Prosecco
Raboso Piave	0	145	161	543
Raboso Veronese		0	172	543
Marzemina Bianca			0	499
Prosecco				0

Tabella 3.12. Valori D relativi a campioni di Raboso Piave, Raboso Veronese, Marzemina Bianca, Prosecco.

I dati in tabella dimostrano come lo studio dei profili proteici ottenuti attraverso la tecnica MALDI riesca a discriminare le differenti varietà (un ordine di grandezza maggiore rispetto ai fattori D influenzati dalle condizioni strumentali e/o ambientali). Interessante la vicinanza tra Raboso Piave e Marzemina Bianca rispetto ad una varietà totalmente diversa quale il Prosecco. Si conferma quindi come il Raboso Veronese sia un incrocio di tali varietà e che esse siano comunque più simili di quanto si possa intuire dal semplice studio ampelografico.

3.1.5 CONCLUSIONI

Confrontando gli indici polifenolici con quelli di altre comuni varietà a bacca nera riportate in letteratura, si sono riscontrati nel Raboso elevati contenuti di flavonoidi totali e di antociani totali (intensità colorante). Gli antociani ed i polifenoli estraibili dalle bucce e dai vinaccioli con la vinificazione sono risultati molto elevati. Il profilo degli antociani ha evidenziato che il Raboso spicca dalle altre varietà per l'importante contenuto di cianina e per i bassi livelli di antociani acilati. Il Raboso ha pertanto evidenziato un elevato potenziale polifenolico e che questo può essere trasferito con la vinificazione.

La quercetina glucoside è risultata il flavonolo più abbondante nel Raboso: questa sostanza è riportato avere proprietà nutraceutiche, quali la capacità di bloccare l'aggregazione piastrinica, e di essere un inibitore delle sostanze cancerogene e di crescita di cellule cancerose in molti tumori (Flamini 2003 e riferimenti riportati). Dal confronto con i dati riportati in letteratura per altre varietà sono stati riscontrati contenuti di quercetina glucoside particolarmente elevati nel Raboso Veronese.

Nel caso del campione Raboso Veronese II (zona Noventa di Piave), che presentava acini mediamente più piccoli, i più elevati valori di molti dei parametri polifenolici ed il differente stato di maturazione riscontrati potrebbero essere riconducibili ad un suolo, apporti idrici, forme di allevamento o tecniche colturali diversi dagli altri campioni.

Pur non rientrando tra il gruppo di vitigni annoverati come Moscati o Malvasie, il profilo aromatico dell'uva di Raboso è risultato caratterizzato da una significativa presenza di terpenoli in forma glicosilata, e da un'importante presenza di composti norisoprenoidi glicosilati e che sono prodotti per idrolisi acida. I norisoprenoidi, composti varietali importanti per i vini destinati all'invecchiamento, rappresentano pertanto i principali aromi del Raboso, e le due varietà hanno evidenziato un potenziale aromatico comparabile.

L'approccio MALDI/MS è risultato un valido strumento per una caratterizzazione varietale basata sullo studio del profilo proteico dei vinaccioli. Le specie di *Vitis vinifera* studiate (Raboso, Prosecco e Malvasia nera) hanno evidenziato la presenza di alcune proteine comuni a tutti i campioni, ed altre specifiche per ciascuna varietà. E' stato ad esempio riscontrato che nell'intervallo m/z 4000-5000 il campione Malvasia nera presentava uno ione caratteristico m/z 4305 risultato assente negli altri due campioni, nell'intervallo m/z 5500-6500 il campione Raboso Piave presentava un intenso segnale m/z 6113 presente in minor abbondanza nella Malvasia nera e nel Prosecco, e nell'intervallo m/z 12500-15000 il campione Malvasia nera presentava un gruppo di proteine con valori di massa più elevati rispetto agli altri campioni. Lo studio di campioni di Raboso

Piave raccolti in annate e vigneti differenti ha dimostrato che tale approccio non è influenzato significativamente dai fattori ambientali e/o colturali (Pesavento *et al.*, 2008).

La differenziazione tra le due varietà di Raboso è risultata possibile in particolare sulla base del profilo degli antociani: nel Raboso Piave la peonidina e la malvidina glucoside sono gli antociani più rappresentativi, nel Raboso Veronese è più abbondante la cianidina glucoside. Inoltre il Raboso Veronese è risultato tendenzialmente più ricco di flavonoli glucosidi. Anche lo studio delle proteine dei vinaccioli ha evidenziato alcune importanti differenze tra le due varietà: il Raboso Veronese (varietà figlio) mostra la presenza soprattutto di proteine del Raboso Piave (madre) ma anche di proteine del padre (Marzemina Bianca) che sono assenti nella varietà madre.

Attualmente lo studio è rivolto alla determinazione della sequenza aminoacidica di alcune delle proteine identificate mediante approcci di digestione enzimatica e studi MS/MS.

3.2 La Composizione Chimica dei Vini: Invecchiamento in Legno ed Evoluzione del Raboso

3.2.1 Studio dei Composti Volatili e Polifenolici Estratti Da Cinque Tipi Di Legno Diversi: Acacia, Castagno, Ciliegio, Gelso e Rovere

3.2.1.1 Composti Volatili Estratti da Una Soluzione di Distillato Modello

I composti volatili negli estratti di una soluzione idroalcolica al 50% in etanolo (distillato modello) dei cinque campioni di legno sono stati identificati mediante analisi GC/MS e ricerca nel database degli spettri di frammentazione NIST98 ed in base ai tempi di ritenzione in colonna. I composti identificati sono riportati in Tabella 3.13 con i dati semi-quantitativi espressi in $\mu\text{g/g}$ legno di 1-eptanolo.

composti	acacia	castagno	ciliegio	gelso	rovere
furfurale	*	*			*
benzaldeide			**		
metilbenzaldeide			*		
idrossibenzaldeide	*		*		
ansaldeide	*				
cinnamaldeide			*		
vanillina	**	***	*	**	**
siringaldeide	***	***	**		***
coniferaldeide	**	**		*	**
acetofenone	*	**	**	*	*
benzofenone				*	*
acetovanillone	**	**			
3-metossiacetovanillone	**				
2-butanone-4-guaiacolo				**	
2,4-diidrossibenzaldeide	***			**	
4-fenil-3-buten-2-one			**		
α -terpineolo	*	**	*	*	*
3-oxo- α -ionolo		**	**		**
β -feniletanolo	*	*	*	*	*
benzenopropanolo			*		
α -metilbenzenopropanolo			**		
alcol coniferilico					*
benzotriazolo	*	**	*	*	**
4-metilfenolo				*	

continua nella pagina seguente

composti	acacia	castagno	ciliegio	gelso	rovere
4-etilfenolo			*		
4-metilguaiacolo				*	
etilguaiacolo				*	
vinilguaiacolo		*		tr	*
eugenolo		***	tr	tr	***
metossieugenolo	*	***	*		**
3-metossifenolo				*	
dimetossifenolo				**	
trimetossifenolo	**		**	**	*
1,2,3-trimetossibenzene	**				
etil benzoato			*		
2,5-diidrossi etil benzoato	**				
metil salicilato					*
trans-β-metil-γ-octalattone					***
cis-β-metil-γ-octalattone					***
acido omovanillico		**	*		**
acido capronico	**	**	*	*	**
acido caprilico	*	*	*	*	**
acido laurico	*	**	*	*	**
acido miristico	**	**	*	**	**
acido pentadecanoico	**	**	*	**	*
acido palmitico	***	***	**	***	***
acido margarico	**	*	*	**	*
acido stearico	**	**	**	**	**
acido oleico	*	**	*	**	**
acido linoleico	**	**	*	***	**
acido linolenico	*			**	

Tabella 3.13. Profilo semi-quantitativo dei composti volatili identificati negli estratti idroalcolici al 50% dei cinque tipi di legno calcolati come µg/g legno di 1-eptanolo. tr tracce; * 0.1-0.9 µg/g; ** 1-10 µg/g; *** > 10 µg/g.

Nell'estratto di acacia sono riscontrabili livelli elevati di aldeidi aromatiche, in particolare vanillina, siringaldeide e 2,4-diidrossibenzaldeide, mentre è totalmente assente l'eugenolo. Negli estratti di castagno e rovere si riscontrano maggiori quantità di vanillina, eugenolo, metossieugenolo, siringaldeide e α-terpineolo. Il *trans*-β-metil-γ-octalattone e *cis*-β-metil-γ-octalattone sono caratteristici dell'estratto di rovere. Il ciliegio ha rilasciato diverse sostanze aromatiche ma in quantità ridotte: l'estratto presenta bassi livelli di eugenolo, metossieugenolo, il minor contenuto di acidi grassi, ma è caratterizzato da un contenuto rilevante di trimetossifenolo. Complessivamente gli estratti di rovere e castagno mostrano una maggiore ricchezza di composti aromatici, mentre il più povero risulta essere l'estratto di gelso anche se con rilevanti contenuti di acidi grassi. In generale i principali composti aromatici rilasciati dal legno sono vanillina ed eugenolo seguiti dai metossi derivati. Livelli particolarmente abbondanti di vanillina e siringaldeide

si riscontrano negli estratti di acacia, castagno e rovere. Per quanto riguarda gli acidi grassi, l'acido palmitico è il più abbondante in tutti gli estratti.

3.2.1.2 Studio dei Fenoli Volatili

La determinazione semiquantitativa dei fenoli volatili è stata integrata con l'analisi quantitativa GC/MS operando in ionizzazione chimica positiva (PCI). In Figura 3.28 è riportato il cromatogramma GC/MS-PICI dell'estratto di rovere in cui sono stati registrati i segnali delle sole specie delle molecole protonate $[M+H]^+$ (PCI-reconstructed ion chromatogram).

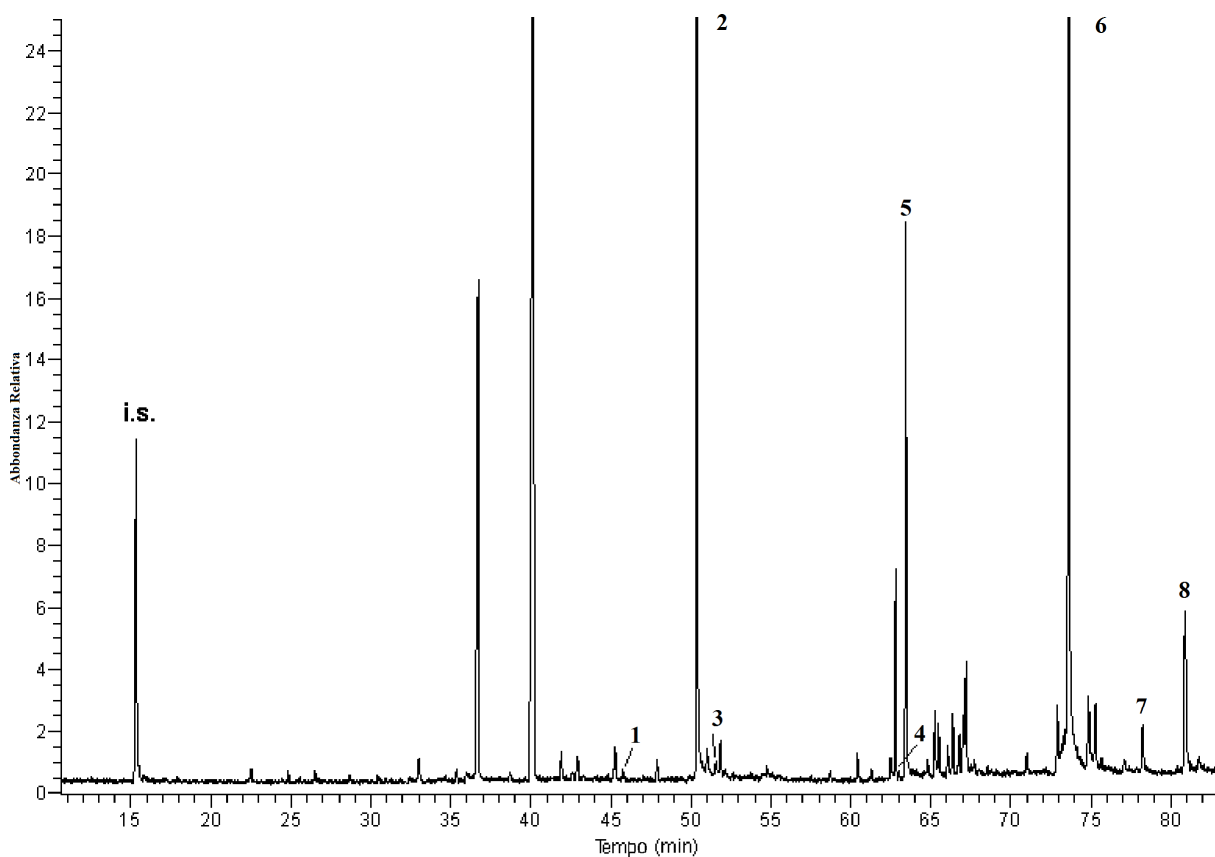


Figura 3.28. Cromatogramma (PCI-reconstructed ion chromatogram) di un estratto idroalcolico al 50% di rovere. Principali fenoli volatili identificati: 1. anisaldeide (segnale registrato della specie $[M+H]^+$ a m/z 137); 2. eugenolo (m/z 165); 3. vinilguaiacolo (m/z 151); 4. metossieugenolo (m/z 195); 5. vanillina (m/z 153); 6. siringaldeide (m/z 183); 7. trimetossifenolo (m/z 185); 8. coniferaldeide (m/z 179). 1-eptanolo (m/z 55) come standard interno (i.s.).

L'identificazione dei composti è stata confermata con lo studio delle frammentazioni ottenute mediante gli esperimenti di dissociazione indotta per collisione (CID) in trappola ionica usando come ioni precursori le specie protonate $[M+H]^+$ (Tabella 2.4). Nella frammentazione MS^2 della coniferaldeide ($[M+H]^+$ m/z 179) e della sinapinaldeide ($[M+H]^+$ m/z 209) si osserva una

prima perdita di metanolo e formazione rispettivamente dei frammenti di m/z 147 e 177, si formano inoltre altri due ioni rispettivamente a m/z 105 e 107. Dissociando ulteriormente gli ioni m/z 147 e 177 (esperimenti MS^3 e MS^4) si riscontrano perdite consecutive di 28 Da ($MS^3 \Rightarrow m/z$ 119 e 149, $MS^4 \Rightarrow m/z$ 91 e 121) riconducibili ai gruppi CO e C_2H_4 . L'aldeide cinnamica è caratterizzata dalla perdita di 42 Da (chetene, CH_2CO) con formazione dello ione di m/z 91. Nel caso dei derivati della benzaldeide gli ioni molecolari perdono generalmente il gruppo CO, mentre l'ansaldeide mostra anche la perdita del gruppo metilico. Per il guaiacolo ed i suoi derivati monometossilati (dimetossifenolo) e dimetossilati (trimetossifenolo) si osservano, come nel caso dei derivati della cinnamilaldeide, le perdite dei gruppi metilici e metanolici e perdita del gruppo CO con i successivi esperimenti di dissociazione (MS^3 degli ioni di m/z 93, 123 e 153). Anche per la vanillina e la siringaldeide si ha principalmente la perdita del gruppo CO e si riscontrano i rispettivi frammenti privati dei gruppi metilici e metanolici. Dal processo di frammentazione dell'eugenolo e del metossieugenolo si rilevano le perdite dei gruppi vinilici e metanolici ed in maggior misura di frammenti di 15 Da (CH_3 , metile). L'ulteriore frammentazione degli ioni m/z 137 e 167 porta alla formazione rispettivamente delle specie di m/z 105 e 107.

In Tabella 3.14 sono riportati i 16 composti identificati e quantificati negli estratti idroalcolici dei differenti campioni di legno.

composti	m/z [M+H] ⁺	$\mu\text{g/g}$ legno				
		acacia	castagno	ciliegio	gelso	rovere
benzaldeide^a	107	/	/	2.25	/	/
metilbenzaldeide^a	121	/	/	1.05	/	/
ansaldeide	137	0.81	0.05	/	/	0.01
idrossi-benzaldeide	123	1.13	/	1.12	0.33	0.59
cinnamaldeide	133	0.01	/	0.05	/	/
coniferaldeide^b	179	0.17	0.25	0.03	0.25	0.28
alcol coniferilico^b	181	/	/	/	/	0.02
eugenolo	165	/	0.73	/	/	2.01
metossieugenolo	195	/	0.20	/	/	0.01
vinilguaiacolo^c	151	/	/	/	/	0.07
vanillina	153	1.65	5.15	0.13	0.05	1.96
siringaldeide	183	10.30	4.23	0.37	0.53	9.25
trimetossibenzene^c	169	0.29	/	/	/	/
guaiacolo	125	/	/	/	0.04	/
2,6-dimetossifenolo^c	155	/	/	0.11	/	0.04
trimetossifenolo^c	185	0.34	/	29.94	2.07	0.20

Tabella 3.14. Fenoli volatili determinati negli estratti idroalcolici dei cinque tipi di legno. Le quantificazioni sono state eseguite sui segnali delle specie $[M+H]^+$ formate mediante ionizzazione chimica. ^aquantificato con la curva di calibrazione dell'ansaldeide; ^bquantificato con la curva di calibrazione della cinnamaldeide; ^cquantificato con la curva di calibrazione del guaiacolo.

Eugenolo e metossieugenolo sono assenti negli estratti di acacia, ciliegio e gelso. Gli estratti di acacia, castagno e rovere si confermano essere ricchi in vanillina e siringaldeide. Il ciliegio mostra i maggiori contenuti di aldeidi benzoiche, e di gran lunga il più alto livello di trimetossifenolo. L'estratto di gelso presenta i minori contenuti di volatili benzenici.

L'analisi evidenzia come la coniferaldeide, l'eugenolo ed il metossieugenolo siano stati sovrastimati quando calcolati in $\mu\text{g/g}$ legno di 1-eptanolo (Tabella 3.13).

3.2.1.3 Composti Polifenolici Estratti da Soluzioni di Vino Modello e Distillato Modello

Gli estratti dei legni presentano diverse colorazioni: rovere e castagno giallo pallido, gelso e acacia giallo con sfumature diverse, ciliegio rosso-giallo. In Figura 3.29 sono riportati gli spettri di assorbimento degli estratti idroalcolici al 50%. L'assorbimento dei composti fenolici a 280 nm è evidente negli estratti di acacia, ciliegio e gelso, anche nel caso del castagno è relativamente elevato anche se con un picco poco evidente. Gli estratti di acacia e gelso mostrano un massimo intorno a circa 320 nm potenzialmente legato alla presenza di vinilfenoli.

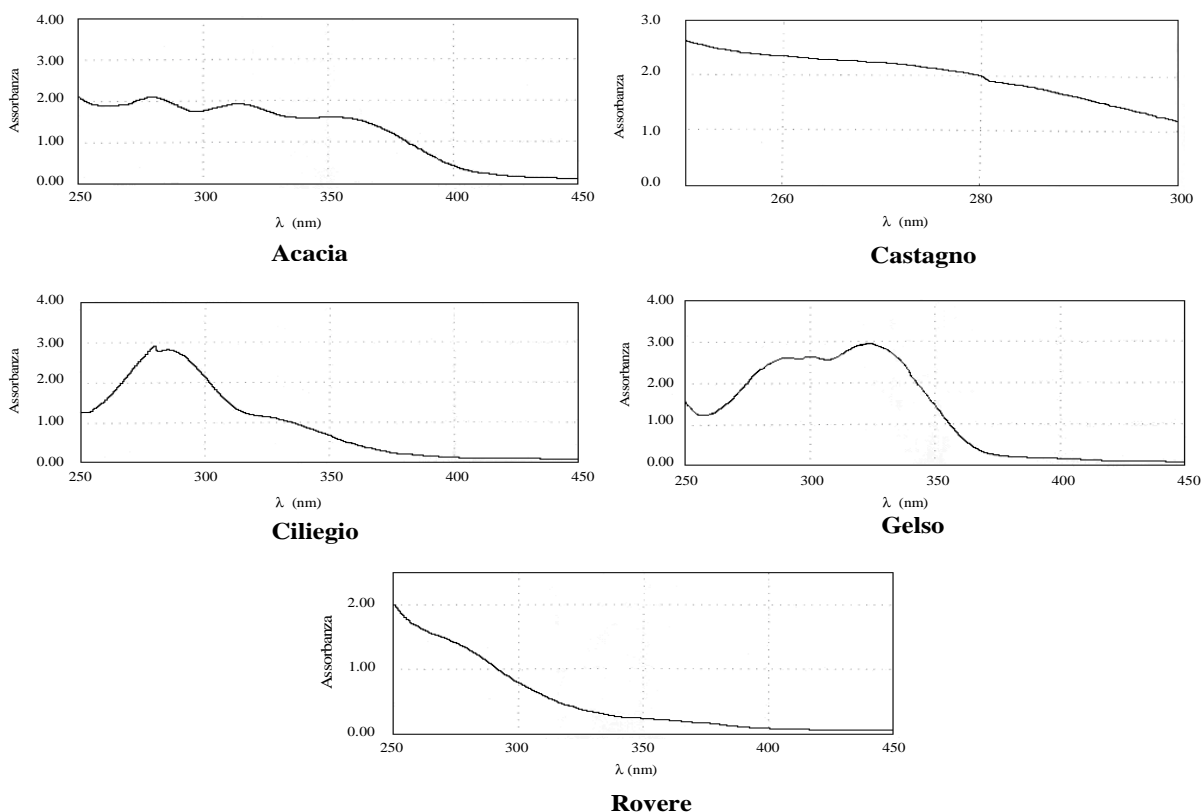


Figura 3.29. Spettri di assorbimento ($\lambda=250-450$ nm) degli estratti di distillato modello (soluzione idroalcolica al 50%) dei cinque tipi di legno.

In Tabella 3.15 sono riportati gli indici di polifenoli totali (Folin-Ciocalteu) e la densità ottica ($D.O.=abs_{280nm} \times n^{\circ}_{diluizioni}$) alla lunghezza d'onda di 280 nm. Come si può notare i due dati concordano tra loro: ad un più alto indice di polifenoli corrisponde una maggiore densità ottica a 280 nm.

campioni di legno	estratto distillato modello		estratto vino modello	
	indice di Folin-Ciocalteu	D.O. 280 nm	indice di Folin-Ciocalteu	D.O. 280 nm
	[mg/L (+)-catechina]		[mg/L (+)-catechina]	
castagno	5312±28	190	3428±11	114
acacia	2724±5	106	786±18	39
gelso	5421±62	238	1074±24	45
ciliegio	3599±10	144	898±10	20
rovere	1936±18	64	1269±4	39

Tabella 3.15. Polifenoli totali (indice di Folin-Ciocalteu) e densità ottica (D.O.) degli estratti di distillato modello (soluzione idroalcolica al 50%) e vino modello (tampono tartrato pH 3.2, etanolo 12% v/v).

La soluzione distillato modello estrae maggiormente i polifenoli dal legno. Castagno e gelso presentano le cessioni maggiori in soluzione idroalcolica (più di 5 g/L), seguiti in ordine decrescente da ciliegio, acacia e rovere. Nel caso della soluzione vino modello, l'estratto di castagno conferma un maggior contenuto polifenolico seguito dal rovere.

L'estraibilità dei tannini dipende in generale dalla loro polarità e peso molecolare (Puech *et al.*, 1999), e questo spiega le differenti cessioni al variare del solvente utilizzato. Nel caso di castagno e rovere l'indice dei polifenoli totali determinato nella soluzione di vino modello ha un valore pari rispettivamente al 65% e 66% di quello della soluzione di distillato modello, mentre per acacia, ciliegio e gelso tali valori si riducono rispettivamente a 29%, 25% e 20%. Si evidenziano pertanto differenti cessioni di composti fenolici tra i diversi campioni anche sotto il profilo qualitativo.

Per valutare l'ossidabilità dei polifenoli degli estratti è stato eseguito il POM-Test (indice sostanze Polifenoliche ossidabili in Mezzo Ossidativo) sviluppato per stimare l'ossidabilità dei vini bianchi (Muller Spath, 1992). Il test consiste nel misurare l'assorbanza a 420 nm, relativa ai flavan-3-oli ed ai tannini condensati presenti nel vino, prima e dopo il trattamento ossidativo con acqua ossigenata. Nel caso degli estratti del legno sono state eseguite anche le misure dell'assorbanza a 380 nm, riconducibile alle molecole contenenti gruppi *orto*-benzochinoni provenienti

dall'ossidazione degli *o*-difenoli dei tannini idrolizzabili. Le prove sono state effettuate sugli estratti di vino modello ed i risultati sono riportati in Tabella 3.16.

estratto vino modello	Abs 420 nm		Abs 380 nm		% ossidazione	
	p.o.	d.o.	p.o.	d.o.	420 nm	380 nm
castagno	0,62	0,66	2,21	2,46	6,5	11,3
acacia	0,40	0,39	2,00	2,20	-2,5	10,0
gelso	0,27	0,29	1,25	1,32	7,4	5,6
ciliegio	0,18	0,19	0,47	0,51	5,6	8,5
rovere	0,55	0,54	1,64	1,65	-1,8	0,6

Tabella 3.16. Assorbanze (Abs) a 420 e 380 nm registrate con il POM-Test. p.o, prima dell'ossidazione; d.o., dopo l'ossidazione.

Il POM-Test fornisce ulteriori informazioni sulla natura dei polifenoli estraibili dai diversi campioni. Il castagno, che mostra la percentuale più alta di polifenoli estraibili (65%), presenta anche la maggiore ossidabilità, al contrario i polifenoli del rovere non subiscono praticamente ossidazione. L'acacia presenta la quantità minore di polifenoli estraibili ed al contempo un'alta percentuale di composti ossidabili. Gelso e ciliegio si attestano su livelli medi sia riguardo la quantità che l'ossidabilità dei polifenoli estraibili.

3.2.2 Studio dell'Evoluzione di Vino Raboso Piave Durante l'Invecchiamento in Botti Diverse

3.2.2.1 Evoluzione dei Composti Aromatici

In Tabella 3.17 è riportato l'andamento dei principali composti volatili durante l'invecchiamento del vino Raboso Piave nelle barrique fabbricate con i cinque diversi tipi di legno. Gli analiti studiati (cromatogramma in Figura 3.30) sono rappresentativi delle sostanze aromatiche riscontrabili in un vino: aromi primari (terpenoli tipici del Raboso, capitolo 3.1.2), secondari (di origine fermentativa: esteri dalle note fruttate, composti di origine microbica come 4-etilfenolo) e terziari (da cessioni del legno: vanillina, eugenolo, furfurali).

Quantità significative di furfurale e 5-metilfurfurale si riscontrano solo nel campione invecchiato in rovere, l'unico legno che ha subito un processo di tostatura, seppur lieve.

Tra gli esteri di origine fermentativa, l'etil-ottanoato risulta presente nel Raboso in concentrazioni particolarmente elevate, fino a 10 volte rispetto a quanto riportato in altri vini. In generale i composti fermentativi presentano una riduzione dal 20% al 40% durante l'invecchiamento. L'acetato di isoamile sembra avere un andamento più irregolare (nel gelso aumenta negli ultimi tre mesi), ma nel rovere comunque diminuisce in modo sostanziale.

Le maggiori cessioni di vanillina ed eugenolo sono riscontrate nei campioni invecchiati in acacia, castagno e rovere, confermando quanto osservato nello studio degli estratti con le soluzioni modello (paragrafo 3.2.1.2). Un costante aumento di etilfenolo ed etilguaiacolo si riscontra nel campione conservato in acacia. L'etilfenolo, che conferisce un difetto al vino (nota di animale, sudore di cavallo), si trova in quantità rilevante anche nel campione invecchiato in gelso già dopo i primi tre mesi di conservazione (1.0-1.3 mg/L).

Non si osservano effetti a carico degli aromi varietali durante l'invecchiamento, comunque presenti in piccole quantità (dati non riportati).

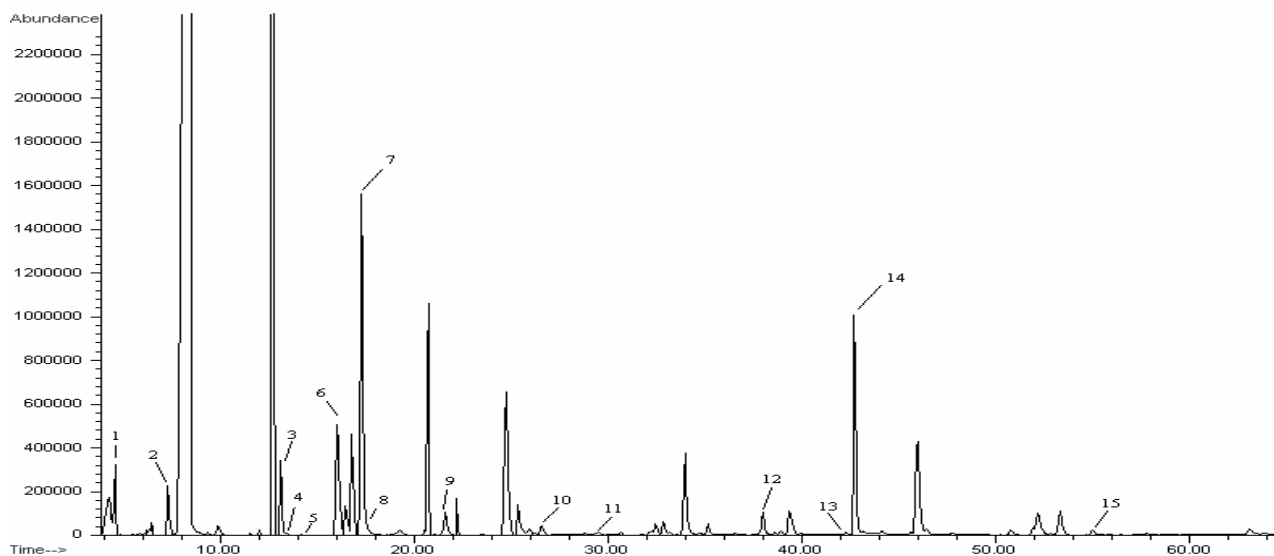


Figura 3.30. Cromatogramma GC/MS registrato operando in modalità Selected Ion monitoring (SIM) dei composti volatili di un campione di vino Raboso Piave invecchiato in legno di rovere estratti tramite microestrazione in fase solida (SPME). 1. isoamil acetato (m/z 70); 2. etil esanoato (m/z 88); 3. 1-esanolo (m/z 69); 4. 3-esen-1-olo (m/z 69); 5. 3-esen-1-olo (m/z 69); 6. etil ottanoato (m/z 88); 7. 1-eptanolo (S.I. m/z 70); 8. furfurale (m/z 96); 9. metilfurfurale (m/z 110); 10. α -terpineolo (m/z 93); 11. citronellolo (m/z 69); 12. etilguaiacolo (m/z 152); 13. eugenolo (m/z 164); 14. 4-etilfenolo (m/z 107); 15. vanillina (m/z 152).

barrique	composti (mg/L)									
	mesi di conservazione	acetato di isoamile	etil esanoato	etil ottanoato	4-etil fenolo	4-etil guaiacolo	furfurale	5-metil furfurale	eugenolo	vanillina
Acacia	3	3.37±0.80	1.99±0.23	14.78±2.81	0.67±0.07	2.24±0.21	0.02±0.01	0.03±0.01	0.009±0.001	0.09±0.03
	6	3.67±0.35	1.91±0.23	11.17±1.23	0.92±0.08	2.94±0.14	0.04±0.01	0.03±0.01	0.015±0.001	0.16±0.01
	9	3.57±0.07	1.56±0.15	8.95±1.73	1.29±0.41	3.25±0.67	0.03±0.01	0.03±0.01	0.021±0.005	0.31±0.07
Ciliegio	3	4.14±0.32	1.57±0.25	10.22±0.12	1.00±0.44	3.01±1.13	nd	nd	0.008±0.004	0.08±0.04
	6	6.81±1.68	1.82±0.04	8.64±0.14	1.04±0.06	3.13±0.26	tr	nd	0.009±0.001	0.10±0.01
	9	4.13±0.01	1.62±0.32	7.57±1.47	0.86±0.18	2.79±0.51	nd	nd	0.007±0.001	0.12±0.03
Castagno	3	3.36±0.65	1.73±0.17	11.91±0.57	0.84±0.20	2.53±0.43	0.04±0.02	0.03±0.01	0.024±0.004	0.45±0.06
	6	3.51±0.70	2.18±0.34	10.53±0.60	0.74±0.08	2.30±0.12	0.04±0.01	0.02±0.02	0.035±0.003	0.60±0.02
	9	3.25±0.19	1.47±0.18	9.14±0.56	0.64±0.04	1.84±0.18	0.07±0.01	0.04±0.01	0.026±0.002	0.43±0.03
Gelso	3	5.85±0.58	2.45±0.69	14.19±0.60	1.06±0.26	2.69±0.75	tr	nd	0.004±0.001	0.09±0.03
	6	2.94±0.56	1.54±0.05	12.06±2.15	1.27±0.26	2.72±0.44	tr	nd	0.006±0.001	0.08±0.02
	9	4.21±0.31	1.66±0.28	10.31±2.79	1.19±0.07	1.84±0.20	tr	tr	0.006±0.001	0.08±0.01
Rovere	3	5.27±2.27	1.89±0.47	11.15±2.67	0.90±0.07	2.51±0.14	0.18±0.08	0.14±0.04	0.009±0.001	0.27±0.04
	6	3.43±0.39	1.40±0.07	9.60±0.23	0.75±0.05	2.08±0.02	0.56±0.16	0.19±0.05	0.012±0.003	0.34±0.08
	9	2.09±0.03	1.45±0.21	7.61±0.14	1.06±0.36	2.90±0.75	0.60±0.06	0.32±0.04	0.018±0.005	0.36±0.09

Tabella 3.17. Valori medi dei principali composti volatili determinati mediante analisi SPME-GC/MS nei campioni di vino Raboso Piave invecchiato in cinque barrique diverse. nd, non determinato; tr, tracce (<0.01 ppm).

3.2.2.2 Evoluzione dei Composti Polifenolici

Il vino di Raboso Piave è caratterizzato da elevati contenuti di antociani e polifenoli (capitolo 3.1.5), quindi risulta interessante seguire l'evoluzione di tali composti durante l'invecchiamento in botti caratterizzate da differenti cessioni ed ambienti ossidativi. In Tabella 3.18 sono riportati i dati dell'andamento dei principali acidi idrossicinnamici (HCA) ed idrossicinnamiltartarici (HCTA), dei flavonoli e della (+)-catechina dei diversi campioni di vino.

barrique	mesi	polifenoli (mg/L vino)										
		HCTA					HCA			flavonoli		(+) catechina
		<i>cis</i> -caftarico	<i>trans</i> -caftarico	<i>cis</i> -p cutarico	<i>trans</i> -p cutarico	<i>trans</i> -fertarico	caffeico	<i>p</i> -cumarico	ferulico	Mr-glucoside	Q-glucoside	
acacia	3	0,67±0,01	24,53±0,54	3,46±0,12	12,76±0,41	1,95±0,12	2,89±0,04	0,96±0,06	0,08±0,03	2,20±0,05	3,49±0,35	20,92±0,20
	6	0,56±0,01	23,74±0,87	3,13±0,18	12,49±0,76	2,06±0,06	2,99±0,33	1,03±0,41	0,09±0,02	1,93±0,07	4,90±0,75	22,44±0,33
	9	0,61±0,01	24,11±0,28	3,11±0,04	12,59±0,15	1,92±0,11	3,18±0,07	1,23±0,04	0,05±0,01	1,78±0,01	3,89±0,32	18,45±0,26
ciliegio	3	0,72±0,02	23,19±1,17	3,44±0,07	11,94±0,81	1,87±0,12	2,25±0,26	0,62±0,15	0,11±0,01	1,67±0,07	1,86±0,13	17,21±0,01
	6	0,67±0,02	22,96±0,86	3,33±0,10	11,68±0,65	1,84±0,09	2,42±0,43	0,61±0,11	0,11±0,01	1,43±0,05	1,57±0,17	15,38±0,15
	9	0,65±0,06	23,28±1,12	3,36±0,20	12,24±0,72	1,89±0,09	2,66±0,17	0,74±0,08	0,10±0,01	1,27±0,05	1,49±0,08	10,22±0,47
castagno	3	0,94±0,01	22,80±0,49	3,50±0,09	11,62±0,33	1,86±0,02	3,31±0,36	1,4±0,25	0,11±0,02	1,8±0,02	3,90±0,05	19,27±0,01
	6	0,77±0,01	23,72±0,65	3,18±0,12	12,07±0,55	1,86±0,14	3,50±0,23	1,89±0,34	0,08±0,03	1,44±0,03	3,26±0,01	19,56±0,01
	9	0,79±0,02	24,97±0,35	3,26±0,04	12,66±0,24	1,87±0,02	3,5±0,18	1,82±0,14	0,11±0,03	1,54±0,03	2,92±0,07	19,70±0,14
gelso	3	0,77±0,05	25,16±0,50	3,56±0,05	13,59±0,27	2,17±0,01	3,77±0,15	1,41±0,04	0,27±0,02	2,41±0,03	5,90±0,63	27,31±0,08
	6	0,62±0,01	24,04±0,31	3,23±0,05	12,89±0,28	2,08±0,04	3,82±0,17	2,15±0,15	0,36±0,02	2,27±0,02	3,80±0,12	27,93±0,09
	9	0,64±0,02	22,57±0,14	2,15±0,01	10,40±0,08	1,93±0,03	7,17±0,43	3,71±0,27	0,33±0,02	1,32±0,02	4,35±0,14	26,17±0,01
rovere	3	0,73±0,01	25,62±0,41	3,52±0,08	13,45±0,53	2,13±0,07	2,94±0,25	0,84±0,15	0,11±0,03	2,27±0,07	2,79±0,17	23,53±0,20
	6	0,67±0,01	23,73±0,79	3,11±0,10	12,00±0,60	1,94±0,07	3,33±0,36	1,21±0,16	0,16±0,03	1,83±0,08	2,47±0,15	23,55±0,15
	9	0,68±0,01	23,39±0,72	3,17±0,09	12,51±0,44	2,00±0,06	3,43±0,42	1,21±0,17	0,15±0,02	1,82±0,02	2,67±0,12	21,9±0,4

Tabella 3.18. Andamento degli acidi idrossicinnamil tartarici (HCTA) e idrossicinnamici (HCA), miricetina (Mr) glucoside e quercetina (Q) glucoside, (+)-catechina nei campioni di vino Raboso Piave invecchiato in barrique diverse.

In generale per gli acidi idrossicinnamici e idrossicinnamiltartarici non si riscontrano particolari variazioni, nel gelso si può notare un leggero aumento delle forme libere (HCA) a scapito degli esteri tartarici. Al contrario, flavonoli e (+)-catechina risultano influenzati sia dal tempo d'invecchiamento che dalla diversa tipologia di botte (Figura 3.31). Già dopo i primi tre mesi il campione conservato in ciliegio presenta i minori contenuti di miricetina e quercetina glucosidi, che a nove mesi risultano inferiori rispettivamente del 30% e 44% rispetto al campione invecchiato in rovere.

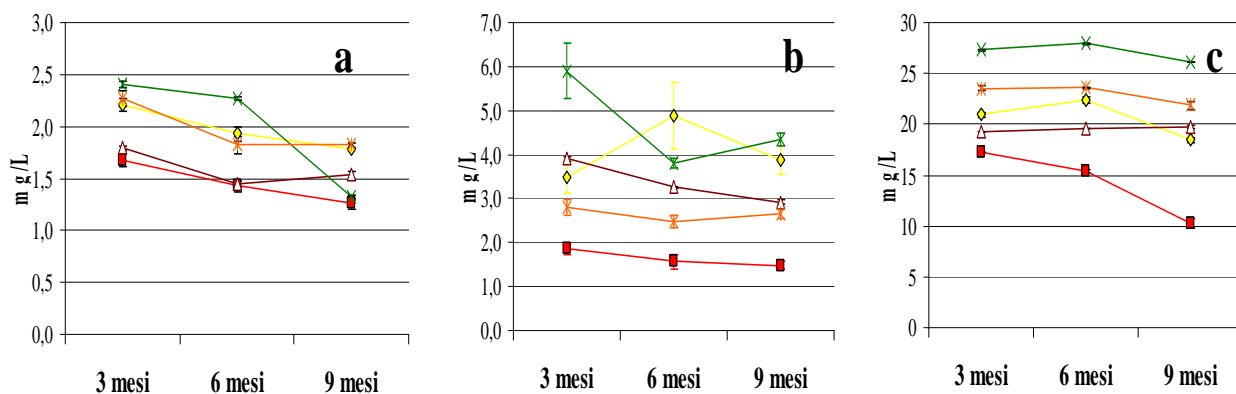


Figura 3.31. Andamento della miricetina glucoside (a), quercetina glucoside (b), (+)-catechina (c) nei campioni prelevati dalle diverse botti: \blacklozenge , acacia; \blacktriangle , castagno; \blacksquare , ciliegio; \blackcross , gelso; \blackast , rovere.

La quercetina glucoside presenta un andamento particolare nei campioni contenuti nelle botti di gelso ed acacia e dopo 9 mesi presenta valori più elevati rispetto agli altri campioni (rispetto al rovere +63% nel gelso e +46% nell'acacia). Il campione invecchiato in ciliegio si distingue anche per la evidente riduzione della (+)-catechina, che nelle altre botti risulta invece relativamente contenuta.

Nel periodo preso in considerazione non si registrano particolari variazioni degli indici di polifenoli totali: dopo nove mesi i campioni in gelso ed acacia presentano gli indici più alti (rispettivamente 1906 mg/L e 1929 mg/L), seguiti da quelli in rovere e castagno (rispettivamente 1730 mg/L e 1756 mg/L); ancora una volta il campione invecchiato in ciliegio presenta valori inferiori (1398 mg/L). Anche nel caso dell'indice di antociani totali il ciliegio si distingue con 139 mg/L, mentre negli altri campioni i valori sono compresi tra 204-240 mg/L. I dati degli indici di antociani totali sono stati approfonditi con la determinazione dei profili HPLC degli antociani: dal punto di vista dell'abbondanza relativa dei singoli composti non si riscontrano particolari differenze legate al tempo d'invecchiamento e/o al tipo di legno utilizzato, solo il ciliegio presenta una evidente scomparsa progressiva di ogni antociano monoglucoside durante l'invecchiamento (Figura 3.32). In Figura 3.33 sono riportati gli istogrammi delle abbondanze relative (% assorbimento a 520 nm) di ogni singolo antociano, il calo dei composti monoglucosidi osservato nel ciliegio è evidenziato dalla crescita della percentuale di composti acilati.

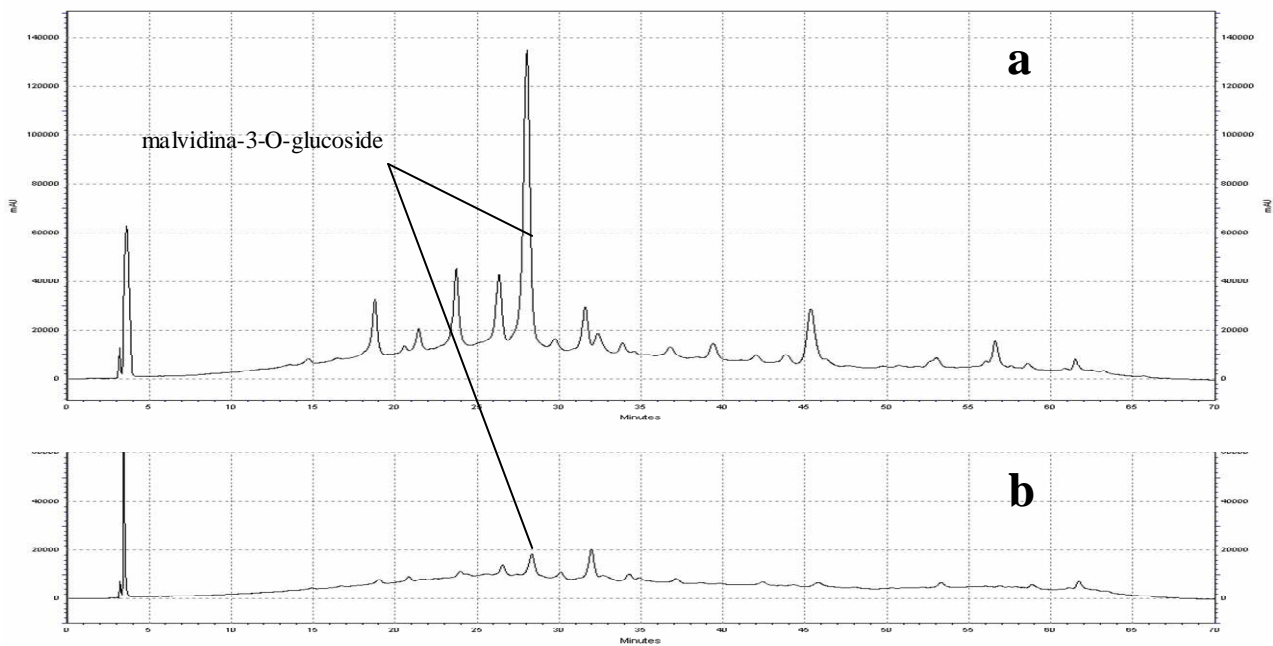


Figura 3.32. Confronto tra i profili antocianici di campioni di vino Raboso Piave prelevati dopo 9 mesi d'invecchiamento in botte: (a) di rovere, (b) di ciliegio

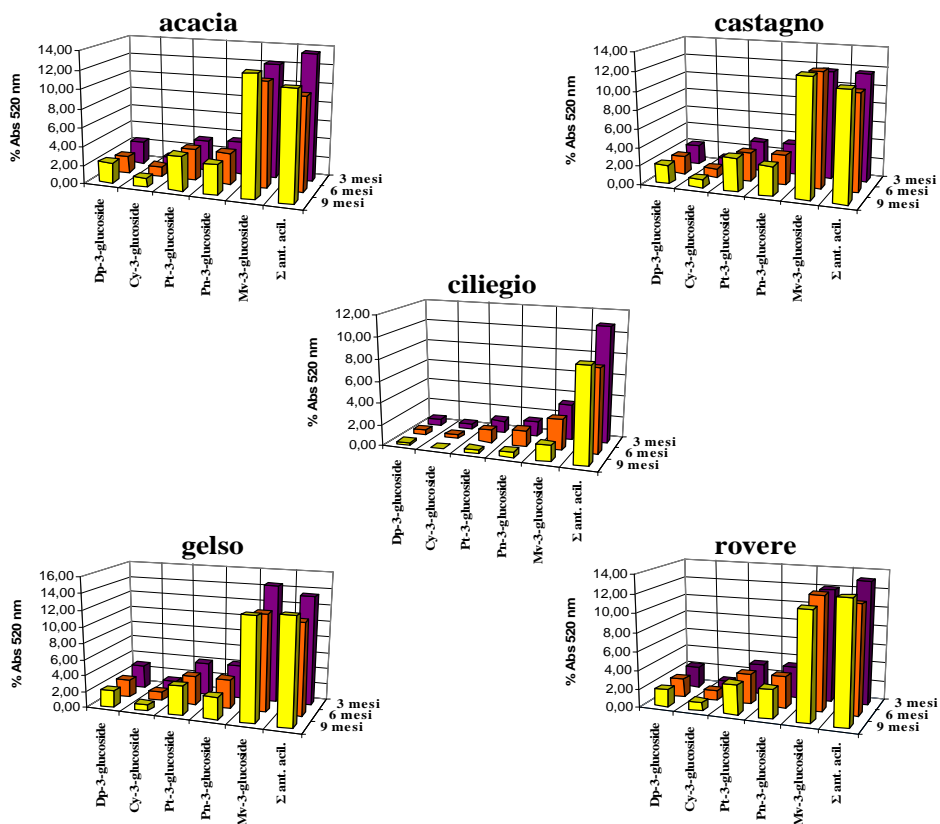


Figura 3.33. Antociani nei campioni di vino Raboso Piave invecchiati nelle diverse botti espressi come area % dell'assorbanza a 520 nm. Σ ant. acil., somma degli antociani acetati e *p*-cumarati.

3.2.2.3 Analisi LC/MS

L'analisi degli acidi cinnamici (cromatogramma registrato a 320 nm) nel vino dopo l'invecchiamento in ciliegio e gelso ha evidenziato la presenza di segnali non riscontrati negli altri campioni. L'analisi di spettrometria di massa accoppiata alla cromatografia liquida (LC/MS) ha fornito gli spettri di massa dei composti incogniti permettendone l'identificazione.

In Figura 3.34 sono riportati il cromatogramma ottenuto registrando il segnale della corrente relativa a tutti gli ioni (Total Ion Current, TIC) con lo spettrometro di massa ed il cromatogramma registrato a 320 nm relativi all'analisi del campione invecchiato in ciliegio. L'attenzione è stata posta sui segnali con un tempo di ritenzione di 51.51, 52.08 e 52.61 min che non sono stati registrati negli altri campioni.

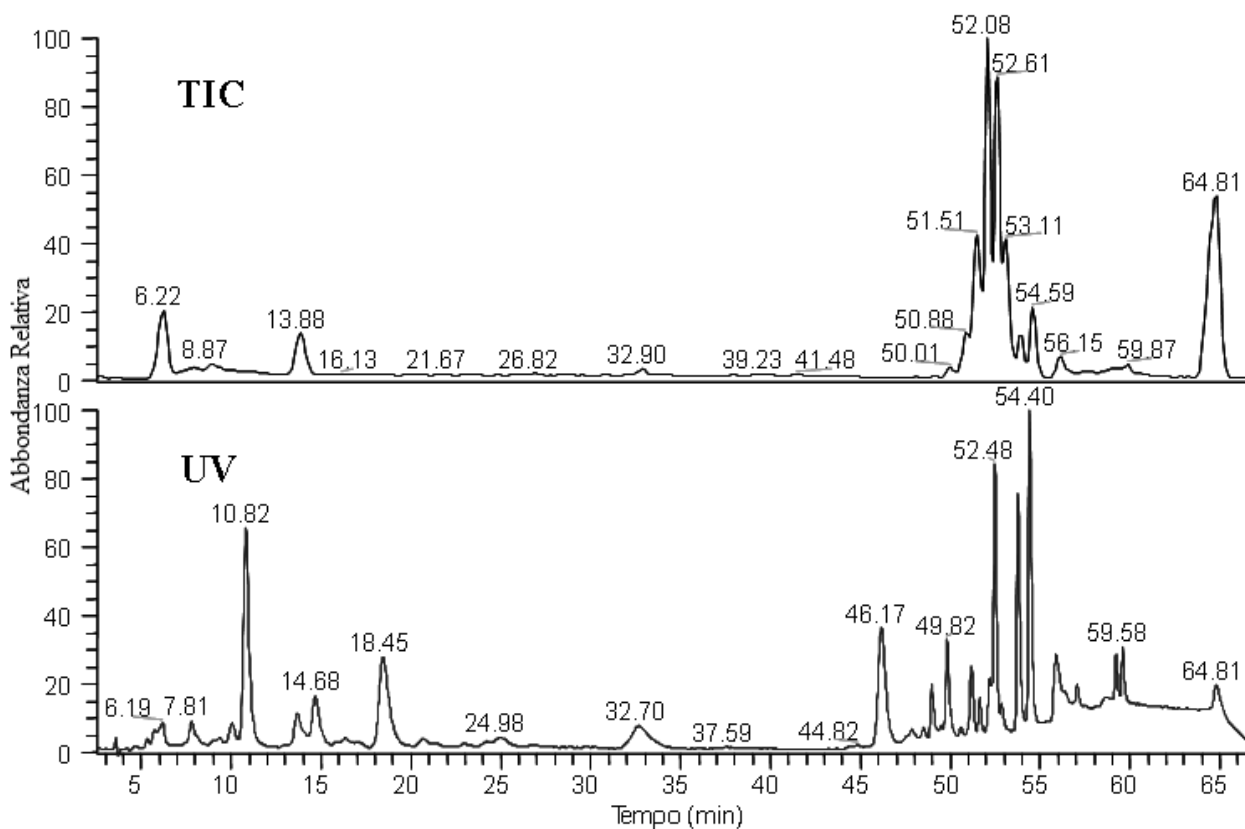


Figura 3.34. Analisi del campione di vino invecchiato in ciliegio: cromatogramma LC/MS ottenuto registrando il segnale della corrente relativa a tutti gli ioni (Total Ion Current, TIC), cromatogramma LC/UV registrato a 320 nm.

Gli spettri di massa relativi ai tre segnali presentano tutti il caratteristico cluster isotopico riconducibile all'esistenza nella molecola di un atomo di cloro, mentre i composti che li generano hanno masse molecolari separate tra loro di 14 Da (rispettivamente di 346, 360 e 374 Da). La presenza di cloro è stata confermata dall'analisi MS/MS effettuata sugli ioni precursori [M-H]⁻ (analisi ESI/MS impostata al rilevamento degli ioni negativi), dai quali la perdita di HCl porta alla formazione dei rispettivi frammenti carichi con *m/z* 309, 323 e 337. MS³ condotta su questi frammenti ha evidenziato sempre la formazione dello ione *m/z* 183 e la perdita finale di CO₂, con conseguente perdita intermedia dei tre frammenti neutri rispettivamente di 126, 140, 154 Da. Il frammento con *m/z* 183 potrebbe corrispondere ad un residuo metossigallato. Dalle informazioni complessivamente raccolte dagli esperimenti MS/MS e MS³ è quindi possibile ipotizzare che i tre composti incogniti potrebbero corrispondere a derivati clorurati provenienti dalla decomposizione della lignina, distinti tra loro da catene alifatiche di diversa lunghezza, probabilmente legati ad interventi di sanitizzazione effettuati sul legno ciliegio (Figura 3.35).

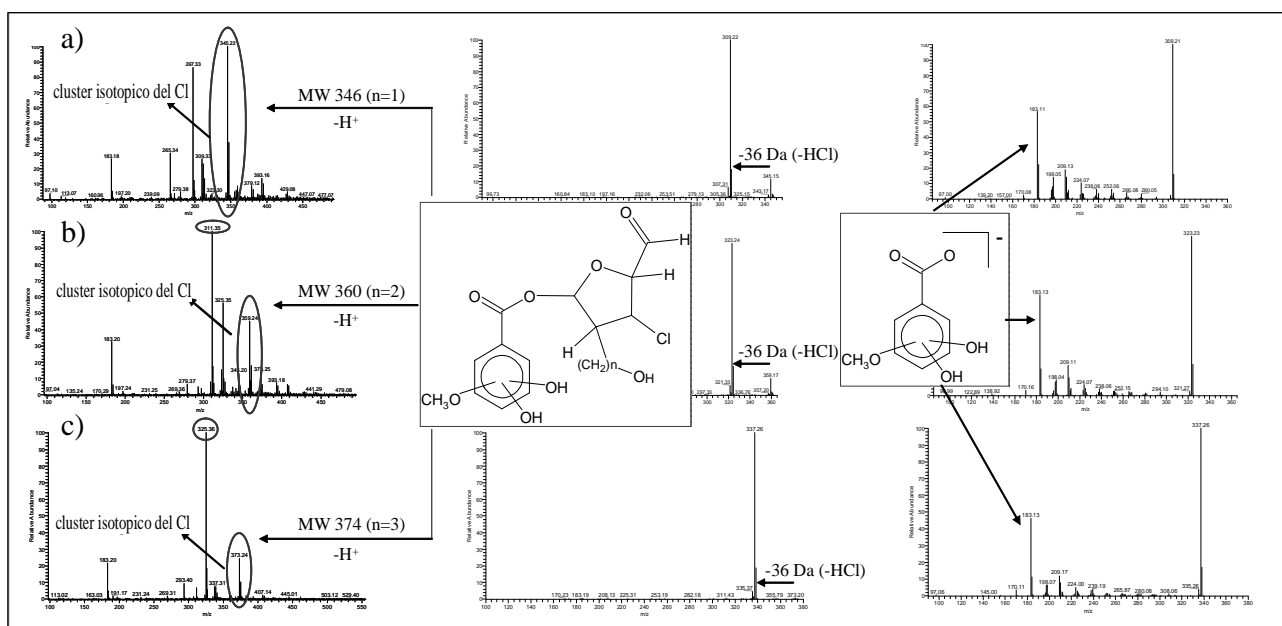


Figura 3.35. Spettri di massa full-scan ESI(-) relativi agli esperimenti MS/MS e MS³ sui tre picchi con tempo di ritenzione 51.51, 52.08 e 52.61 min (a, b, c) riscontrati nel vino invecchiato in ciliegio. Le strutture sono ipotizzate sulla base delle frammentazioni ottenute.

Nel cromatogramma LC-UV registrato a 320 nm del campione invecchiato in gelso è evidente un peculiare picco a tempo di ritenzione 26.44 min. Lo spettro di massa del segnale presenta un picco base con m/z 243 probabilmente corrispondente allo ione $[M-H]^-$ e, come evidente nel Reconstructed Ion Chromatogram a m/z 243 (RIC), lo stesso ione è visibile anche ad un tempo di ritenzione di 18.33 min (Figura 3.36).

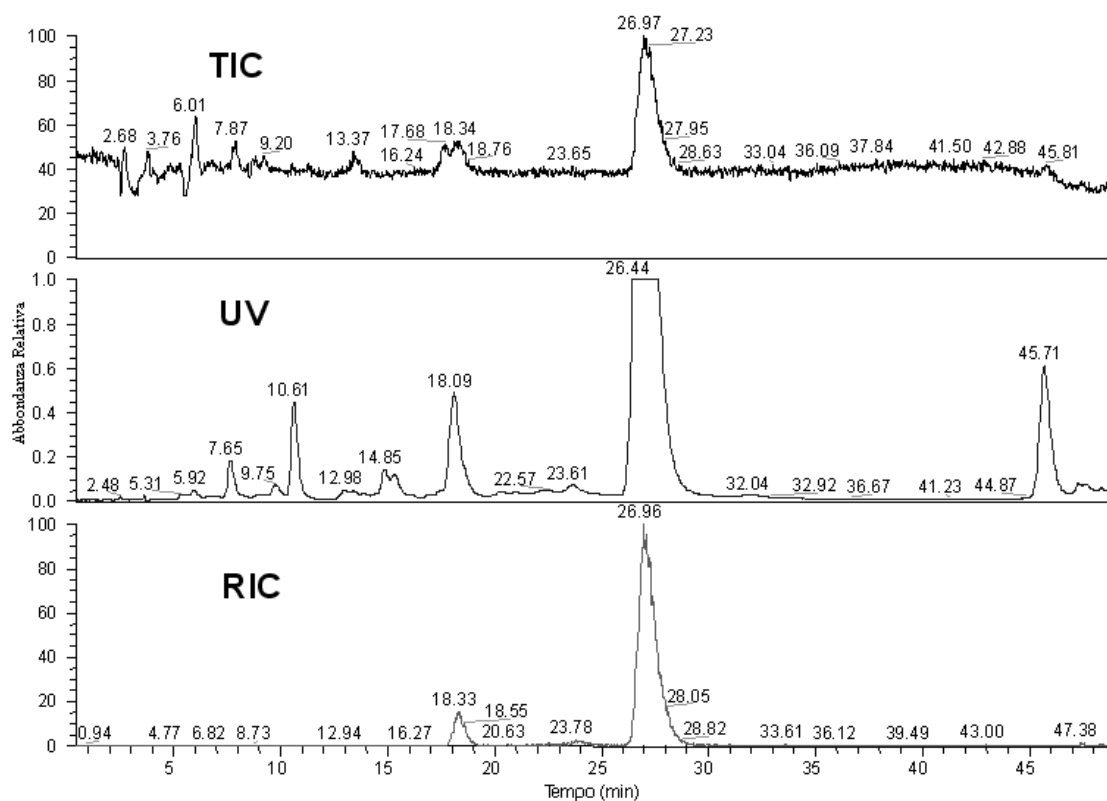


Figura 3.36. Cromatogrammi TIC (total ion current), UV (320 nm) e RIC (reconstructed ion chromatogram dello ione m/z 243) del campione di vino Raboso Piave invecchiato in barrique di gelso.

Gli esperimenti MS/MS sugli ioni con m/z 243 (18.33 e 26.96 min) producono spettri di frammentazione riconducibili alle forme *cis*- e *trans*- del piceatannolo, composto appartenente alla famiglia degli stilbeni. Per confermare l'identità del composto, che desta particolare interesse dal punto di vista salutistico, sono stati eseguiti gli esperimenti di frammentazione anche di uno standard di *trans*-piceatannolo, il confronto con le molecole trovate nel vino è riportato in Figura 3.37. La similitudine tra gli spettri di frammentazione è evidente, confermata anche dal tempo di ritenzione in colonna dell'analita.

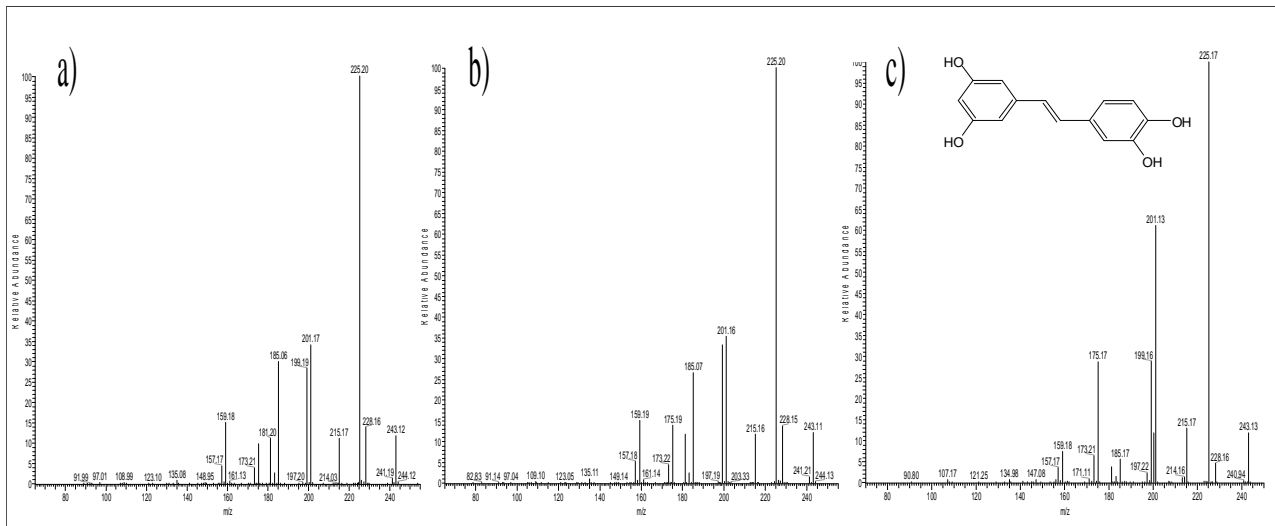


Figura 3.37. Spettri ESI-MS/MS di frammentazione delle specie con m/z 243, corrispondenti ai segnali con tempo di ritenzione di 18.33 min (a) e 26.96 min (b) registrati per il campione di vino invecchiato in gelso, e del *trans*-piceatannolo standard (c).

3.2.3 Conclusioni

Questo è il primo studio trovato in letteratura riguardante le cessioni polifenoliche e di composti volatili dei legni di acacia, castagno, ciliegio e gelso finalizzato a fini enologici. Nei cromatogrammi GC/MS degli estratti idroalcolici sono stati identificati complessivamente 51 diversi composti volatili ed ogni tipo di legno ha mostrato un profilo caratteristico. L'acacia ha rilasciato quantità significative di aldeidi aromatiche, mentre rovere e castagno quantità elevate di vanillina, eugenolo, metossieugenolo, siringaldeide e α -terpineolo. Nell'estratto di rovere è stata riscontrata inoltre la caratteristica presenza di *cis*- e *trans*- β -metil- γ -octalattone, assenti negli altri campioni. Nell'estratto di gelso sono stati evidenziati i più alti livelli di sostanze volatili, ed il quadro aromatico è risultato peggiorato dalla maggior presenza di acidi grassi. Per quanto riguarda le cessioni polifenoliche castagno e rovere hanno presentato le maggiori quantità di composti estraibili dal vino, seguiti da gelso, ciliegio ed acacia. L'acacia si è dimostrata povera di polifenoli estraibili ed oltretutto facilmente ossidabili. Il castagno ha confermato avere una grande ricchezza in polifenoli ma anche un'alta percentuale di composti ossidabili. Il ciliegio aveva alti contenuti di polifenoli che erano però al contempo poco solubili nel vino ed instabili, rendendo consigliabile il suo uso solo per brevi tempi d'invecchiamento. Il rovere, con ricchezza di polifenoli estraibili dal vino e stabili all'ossidazione, è risultato il legno che maggiormente adatto alla fabbricazione di botti per i vini destinati a lunghi tempi d'invecchiamento (De Rosso *et al.*, 2009a). Il metodo GC/MS mediante ionizzazione chimica positiva sviluppato per l'analisi dei fenoli volatili negli estratti ha mostrato rendimenti elevati nella produzione delle specie $[M+H]^+$ (il segnale $[M+H]^+$ era il picco di base degli spettri di massa) e fornire importanti informazioni sul peso molecolare dei composti (Flamini *et al.*, 2007).

Lo studio dell'invecchiamento in botte di gelso del vino Raboso Piave ha evidenziato una diminuzione significativa degli esteri etilici a nota fruttata e dell'etilguaiacolo, ed una elevata cessione di etilfenolo, indicando questo legno come il meno adatto per l'invecchiamento dei vini. Il più basso tenore di polifenoli del vino facilmente ossidabili trovati nel campione conservato in ciliegio ha confermato che questo legno è l'ambiente più ossidativo e meno adatto per lunghi invecchiamenti. Le botti di rovere, gelso ed acacia sono risultate gli ambienti meno ossidativi nei confronti dei polifenoli del vino. Interessante è il livello di piceatannolo riscontrato nel vino invecchiato in gelso essendo questo composto una idrossistilbene-fitoalessina con attività anti-leucemica e antimelanomica di interesse per la produzione di farmaci anti-cancro ed anti-Epstein-Barr virus (De Rosso *et al.*, 2009b). Le conoscenze acquisite con lo studio del vino Raboso Piave potranno essere trasferite ai vini rossi destinati all'affinamento in legno.

BIBLIOGRAFIA

Ariga T., Hamano M. (1990) Radical scavenging action and its mode in procyanidins B-1 and B-3 from azuki beans to peroxy radicals. *Agric. Biol. Chem.*, **54**: 2499-2504.

Asen S., Stewart R.N., Norris H. (1972) Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effects on color. *Phytochemistry*, **11(3)**: 1139-1144.

Berger R. (2007) *Flavours and fragrances-Chemistry, bioprocessing and sustainability*. Springer, Heidelberg, Germania.

Boidron J.N., Chatonnet P., Pons M. (1988) The influence of wood on certain odorous substances in wines. *Connaiss. Vigne Vin.*, **22**: 275-294.

Boller T. (1987) Hydrolytic enzymes in plant disease resistance. *In Plant-Microbe Interactions Molecular and Genetic Perspectives*. Ed. Kosuge T., Nester E.W. Macmillan Publishing Company, New York, USA.

Borsa D., Carniel D., Asproudi A., Monticelli L., Crespan M., Costacurta A. (2005) Caratterizzazione di uve Malvasia attraverso lo studio dei metaboliti secondari. *Riv. Vitic. Enol.*, **58(2-3-4)**: 167-182.

Boukharta M., Girardin M., Metche M. (1988) Procyanidines galloylées du sarment de vigne (*Vitis vinifera*): Séparation et identification par chromatographie liquide haute performance et chromatographie en phase gazeuse. *J. Chromatogr.*, **455**: 406-409.

Boukharta M., Girardin M., Metche M. (1994) Procyanidols oligomères des sarments de vigne, cépage Carignan. *Vitis*, **33(1)**: 5-10.

Calò A., Costacurta A., Catalano V., Di Stefano R., Tamborra P., De Rinaldis G., Petito M. (2000) Negro amaro precoce. *Riv. Vitic. Enol.*, **53(2/3)**: 3-26.

Calò A., Di Stefano R., Costacurta A., Calò G. (1991) Caratterizzazione di Cabernet Franc e Carmenère (*vitis sp.*) e chiarimenti sulla loro coltura in Italia. *Riv. Vitic. Enol.*, **44(3)**: 3-25.

Calò A., Scienza A., Costacurta A. (2001a) Raboso Piave. *In* Vitigni d'Italia, Ed. Edagricole, Bologna.

Calò A., Scienza A., Costacurta A. (2001b) Raboso Veronese. *In* Vitigni d'Italia, Ed. Edagricole, Bologna.

Canas S., Quaresma H., Belchior A.P., Spranger M.I., Bruno-De-Sousa R. (2004) Evaluation of wine brandies authenticity by the relationships between benzoic and cinnamic aldehydes and between furanic aldehydes. *Ciência Téc. Vitiv.*, **19(1)**: 13-27.

Cancian D. Tesi di laurea STVE, Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Padova, a.a. 2004-2005, dal titolo: Caratterizzazione chimica e sensoriale degli estratti di differenti tipi di legno impiegati per la fabbricazione delle botti destinate all'invecchiamento dei vini.

Carrillo J.D., Garrido-López A., Tena M.T. (2006) Determination of volatile oak compounds in wine by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **1102(1-2)**: 25-36.

Ceccarelli A., Frangipane M.T., De Santis D., Anelli G. (2002) Il ruolo del legno durante la maturazione dei vini: caratterizzazione qualitativa. *L'Enologo*, **5**: 97-106.

Chassagne D., Alexandre H., Massoutier C., Salles C., Feuillant M. (2000) The aroma glycosides composition of Burgundy Pinot noir must. *Vitis Research Note*, **39(4)**: 177-178.

Cheyrier V., Basire N., Rigaud J. (1989a) Mechanism of trans-caffeoyltartaric acid and catechin oxidation in model solutions containing grape polyphenoloxidase. *J. Agric. Food Chem.*, **37(4)**: 1069-1071.

Cheyrier V., Rigaud J. (1986) HPLC separation and characterization of flavonols in the skin of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am. J. Enol. Vitic.*, **37(4)**: 248-252.

Cheyrier V., Rigaud J., Moutounet M. (1989b) High-performance liquid chromatographic determination of the free *o*-quinones of trans-caffeoyltartaric acid, 2-*S*-glutathionylcaffeoyltartaric acid and catechin in grape must. *J. Chromatography*, **472**: 428-432.

Citron G. (2003) Uso del legno in enologia: specie botaniche utilizzate, anatomia e classificazione. *L'Informatore Agrario*, **50**: 69-72.

Cosmo I., Polsinelli M. (1966a) Raboso Piave. *In* Principali vitigni da vino coltivati in Italia. 2. Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste.

Cosmo I., Polsinelli M. (1966b) Raboso Veronese. *In* Principali vitigni da vino coltivati in Italia. 2. Ministero dell'Agricoltura e delle Foreste.

Costacurta A., Calò A., Crespan M., Milani M., Carraro R., Aggio L., Flamini R., Ajmone-Marsan P. (2001) Caractérisation morphologique, aromatique et moléculaire des cèpages de Moscato et recherches sur leurs rapports phylogénétique. *Bulletin de l'O.I.V.*, **74(841-842)**: 133-139.

Cravero M.C. (1991) Gli acidi idrossicinnamiltartarici dell'uva e del vino. *Ann. Ist. Sperim. Enol. Asti*, **22**: 275-294.

Cravero M.C., Di Stefano R. (1992) Composizione fenolica di alcune varietà di vite coltivate in Piemonte. *Vignevini*, **19(5)**: 47-54.

Crespan, M., Cancellier, S., Chies, R., Giannetto, S., Meneghetti, S. (2006) Individuati i genitori del Raboso veronese: una nuova ipotesi sulla sua origine. *Riv. Vitic. Enol.*, **59(1)**: 3-12.

Crespan M., Cancellier S., Giannetto S. (2004) Raboso Piave e Raboso Veronese: padre e figlio? *Riv. Vitic. Enol.*, **57(1-2)**: 51-57.

Cutzach I., Chatonnet P., Henry R., Dubourdiou D. (1997) Identification of volatile compounds with a "toasty" aroma in heated oak used in barrellmaking. *J. Agric. Food Chem.*, **45(6)**: 2217-2223.

Dalla Serra A., Versini G., Carlin S., Moser S. (2004) Varietà autoctone venete: profilo aromatico in forma libera e glicosidica, anche in relazione ad una vinificazione tramite macerazione carbonica. Recupero, conservazione e valorizzazione del germoplasma viticolo veneto. Osservatorio Innovazione Veneto Agricoltura.

Da Silva R., Darmon N., Fernandez Y., Mitjavila S. (1991) Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agric. Food Chem.*, **39(9)**: 1549-1552.

De Freitas V.A.P., Glories Y., Monique A. (2000) Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition to respective wines. *Am. J. Enol. Vitic.*, **51(4)**: 397-303.

Delgado T, Gómez-Cordovés C, Villarroya B. (1990) Relationship between phenolic compounds of low molecular weight as indicators of the aging conditions and quality of brandies. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41(4)**: 342-345.

De Rosso M., Cancian D., Panighel A., Dalla Vedova A., Flamini R. (2009a) Chemical compounds released from five different woods used to make barrels for aging wines and spirits: volatile compounds and polyphenols. *Wood Sci. Technol.*, **43**: 375–385.

De Rosso M., Panighel A., Dalla Vedova A., Stella L., Flamini R. (2009b) Changes in chemical composition of a red wine aged in acacia, cherry, chestnut, mulberry, and oak wood barrels. *J. Agric. Food Chem.*, **57(5)**: 1915–1920.

Di Stefano R. (1996a) Metodi chimici nella caratterizzazione varietale. Valutazioni attraverso lo studio dei composti volatili liberi e legati. *Annali dell'Ist. Sper. Enol. Asti*, **27**: 33-53.

Di Stefano R. (1996b) Metodi chimici nella caratterizzazione varietale. *Riv. Vitic. Enol.*, **49(1)**: 51-56.

Di Stefano R., Bottero S., Pigella R., Borsa D., Bezzo G., Corino L. (1998) Precursori d'aroma glicosilati presenti nelle uve di alcune cultivar a frutto colorato. *L'Enotecnico*, **24(3)**: 63-74.

Di Stefano R., Corino L. (1984) Terpeni ed antociani di alcune uve rosse aromatiche. *Riv. Vitic. Enol.*, **37(10)**: 581-595.

Di Stefano R., Cravero M.C. (1991) Metodi per lo studio dei polifenoli dell'uva. *Riv. Vitic. Enol.*, **44(2)**: 37- 45.

Di Stefano R., Cravero M.C., Gentilini N. (1989) Metodi per lo studio dei polifenoli dei vini. *L'Enotecnico*, **5**: 83-89.

Di Stefano R., Flamini R. (2008) High performance liquid chromatography analysis of grape and wine polyphenols. *In Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry*, pp. 33-79. Curatore Flamini R. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, Inghilterra.

Di Stefano R., Gentilini N. (1995b) Estrazione dei composti fenolici dalle parti solide dell'uva. *Atti Acc. Ital. della Vite e del Vino*, **47**: 97-105.

Di Stefano R., Maggiorotto G., Di Bernardi D., Melia V., Sparacio A., Fina B., Sparla S. (1995a) Evoluzione dei composti terpenici durante il processo di appassimento dell'uva Zibibbo di Pantelleria. *L'Enotecnico*, **31(10)**: 73-84.

Di Stefano R., Pigella R., Gentilini N., Calò A., Costacurta A., Crespan M. (1997) Caratterizzazione di alcuni biotipi di "Prosecco" attraverso lo studio dei metabolici secondari. *Ann. Ist. Sperim. Enol.*, **27**: 137-149.

ERSA (2005) *In Dei Refoschi "L'identificazione e la caratterizzazione dei Refoschi"*. Agenzia regionale per lo sviluppo rurale, Gorizia.

Escribano-Bailón T., Álvarez-García M., Rivas-Gonzalo J.C., Heredia F.J., Santos-Buelga C. (2001) Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin 3-O-glucoside and (+)-catechin. *J. Agric. Food Chem.*, **49(3)**: 1213-1217.

Favaro A. Tesi di laurea STVE, Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Padova, a.a. 2005-2006, dal titolo: Caratterizzazione aromatica varietale dell'uva di Raboso.

Favretto D., Flamini R. (2000) Application of electrospray ionization mass spectrometry to the study of grape anthocyanins. *Am. J. Enol. Vitic.*, **51(1)**: 55-64.

Flamini, R. (2003) Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. *Mass Spectrom. Rev.*, **22(4)**: 218-250.

Flamini R., Dalla Vedova A., Calò A. (2001) Studio sui componenti monoterpenici di 23 accessioni di uve Moscato: correlazioni tra profilo aromatico e varietà. Riv. Vitic. Enol., **54(2-3)**: 35-49.

Flamini R., Dalla Vedova A., Cancian D., Panighel A., De Rosso M. (2007) GC/MS-positive ion chemical ionization and MS/MS study of volatile benzene compounds in five different woods used in barrel making. J. Mass Spec. **42(5)**: 641-646.

Flamini R., Dalla Vedova A., Panighel A., Biscaro S., Borgo M., Calò A. (2006) Caratterizzazione aromatica del Torbato (*V. vinifera*) e studio degli effetti dell'accartocciamento fogliare sui composti aromatici delle uve. Riv. Vitic. Enol., **59(1)**: 13-25.

Flamini R., De Rosso M. (2006) Mass spectrometry in the analysis of grape and wine proteins. Expert Review of Proteomics, **3(3)**: 321-331.

Flamini R., De Rosso M., Smaniotto A., Panighel A., Dalla Vedova A., Seraglia R., Traldi P. (2009) Fast analysis of isobaric grape anthocyanins by Chip-liquid chromatography/mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Sp., **23(18)**: 2891-2896.

Flamini R., Tomasi D. (2000) The Anthocyanin content in berries of the hybrid grape cultivars Clinton and Isabella. Vitis, **39(2)**:79-81.

Flamini R., Traldi P. (2010) MS/MS methodologies. In Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry, pp. 76-93. Ed. John Wiley & Sons INC, Hoboken, USA.

Galletti G.C., Traldi P., Bonaga G. (1989) Do ion trap and quadrupole lead to identical results in the analysis of terpenoid compounds? Rapid Commun. Mass Spec., **3(7)**: 241-243.

Graham L.S., Sticklen M.B. (1994) Plant chitinases. Canadian Journal of Botany, **72(88)**: 1057-1083.

Ibern-Gómez M., Andrés-Lacueva C., Lamuela-Raventós R.M., Lao-Luque C., Buxaderas S., De La Torre-Boronat M.C. (2001) Differences in phenolic profile between oak wood and stainless steel fermentation in white wines. Am. J. Enol. Vitic., **52(2)**: 159-164.

- MacNamara K., Van Wyk C.J., Brunerie P., Augustyn O.P.H., Rapp A. (2001) Flavour components of whiskey. III. Ageing changes in the low-volatility fraction. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **22(2)**: 82-91.
- Manzoni L. (1956) Anatomia della vite. Il vinacciolo, sua struttura e sua composizione. *Riv. Vitic. Enol.*, **5**: 131.
- Masson G., Puech J.L., Moutounet M. (1996) Composition chimique du bois de chêne de tonnellerie. *Bullettin de l'O.I.V.*, **634**: 785-786.
- Mateo J.J., Gentilini N., Huerta T., Jiménez M., Di Stefano R. (1997) Fractionation of glycoside precursor of aroma in grapes and wine. *J. Chromatogr. A*, **778(1-2)**: 219-224.
- Mattivi F., Cova G., Dalla Serra A., Soligo S. (2004) Classificazione delle varietà di uva a bacca nera del Veneto in base al contenuto di polifenoli. *In* Recupero, Conservazione e Valorizzazione del Germoplasma Vitivinicolo Veneto. Primo intervento: valutazione delle potenzialità viticologiche di vecchi vitigni a bacca nera, Veneto Agricoltura.
- Mattivi F., Prast A., Nicolini G., Valenti L. (2003) Il potenziale polifenolico delle uve rosse e la sua applicazione in enologia. *L'Enologo*, **10**: 105-114.
- Mattivi F., Versini G., Sarti S. (1989) Study on the presence of scopoletin in commercial wood-aged brandies. *Riv. Vitic. Enol.*, **42(3)**: 23-30.
- Muller Spath H. (1992) Activer et favoriser les réactions naturelles en vinification de Chardonnay à l'aide d'oxygène. *Revue des Oenologues*, **65**: 39-41.
- Oszmianski J., Ramos T., Bourzeix M. (1988) Fractionation of phenolic compounds in red wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **39(3)**: 259-262.
- Pastor del Rio J.L., Kennedy J.A. (2006) Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera L.* cv Pinot noir grapes and extraction into wine. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57(2)**: 125-132.

Peng Z., Hayasaka Y., Iland P.G., Sefton M., Høj P., Waters E.J. (2001) Quantitative analysis of polymeric procyanidins (tannins) from grape (*Vitis vinifera*) seeds by reverse phase high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, **49(1)**: 26-31.

Peng Z., Pockoc K.F., Waters E.J., Francis I.L., Williams P.J. (1997) Taste properties of grape (*Vitis vinifera*) pathogenesis-related proteins isolated from wine. *J. Agric. Food Chem.*, **45(12)**: 4639-4643.

Pérez-Coello M.S., Sanz J., Cabezudo M.D. (1999) Determination of volatile compounds in hydroalcoholic extracts of French and American oak wood. *Am. J. Enol. Vitic.*, **50(2)**: 162-165.

Pesavento I.C. (2007) Tesi di laurea, Facoltà di Farmacia dell'Università Degli Studi di Padova, a.a. 2006-2007, dal titolo: Caratterizzazione di diverse varietà di *Vitis vinifera* mediante spettrometria di massa MALDI.

Pesavento I.C., Bertazzo A., Flamini R., Dalla Vedova A., De Rosso M., Seraglia R., Traldi, P. (2008) Differentiation of *Vitis vinifera* varieties by MALDI-MS analysis of the grape seed proteins. *J. Mass Spec.* **43(2)**: 234-241.

Pigella R., Bosso A., Di Stefano R., Corino L., Malerba G. (1998) Caratterizzazione varietale del Pinot nero attraverso lo studio dei polifenoli e dei precursori d'aroma. *Riv. Vitic. Enol.*, **51(1)**: 45-62.

Pocock K.F., Hayasaka Y., McCarthy M.G., Waters E.J. (2000) Thaumatin-like proteins and chitinases, the haze forming proteins of wine, accumulate during ripening of grape (*Vitis vinifera*) berries and drought stress does not affect the final levels per berry at maturity. *J. Agric. Food Chem.*, **48(5)**: 1637-1643.

Pocock K.F., Waters E.J. (1998) The effect of mechanical harvesting and transport of grapes, and juice oxidation, on the protein stability of wines. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **4(3)**: 136-139.

Porretta S. (2000) *Analisi Sensoriale & Consumer Science*. Chiriotti Editori, Pinerolo, Torino.

Puech J.L. (1981) Extraction and evolution of lignin products in Armagnac matured in oak. *Am. J. Enol. Vitic.*, **32(2)**: 111-114.

Puech J.L., Feuillat F., Mosedale J.R. (1999) The tannins in oak heartwood: structure, properties, and their influence on wine flavor. *Am. J. Enol. Vitic.*, **50(4)**: 469-476.

Ribereau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (1998) *Trattato di enologia II*. Ed. Edagricole, Bologna.

Sefton M.A., Francis I.L., Williams P.J. (1993) The volatile composition of Chardonnay juices: a study by flavour precursor analysis. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44(4)**: 359-370.

Simpson R.F., Miller G.C. (1983) Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis*, **22**: 51-63.

Singleton U.L., Rossi J.A. (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, **16(3)**: 144-158.

Skouroumounis G.K., Massy Westropp R.A., Sefton M.A., Williams P.J. (1992) Precursors of damascenone in fruit juices. *Tetrahedron Lett.*, **33**: 3533-3536.

Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemannmerdinoglu S., Kauffman S., Geoffroy P., Legrand M., Fritting B. (1995) Plant pathogenesis-related proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, **75(8)**: 687-706.

Strauss C.R., Dimitriadis E., Wilson B., Williams P.J. (1986) Studies on the hydrolysis of two megastigma-3,6,9-triols rationalizing the origin of some volatile C₁₃ norisoprenoids of *Vitis Vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **34(1)**: 145-149.

Strauss C.R., Wilson B., Anderson R., Williams P. (1987) Development of precursors of C₁₃ norisoprenoid flavorants in Riesling grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, **38(1)**: 23-27.

Tateo F., Bonomi M. (1995) *Chimica analitica degli aromi vol. 2*. Giuseppe Maria Ricciuto Editore, Bussolengo, Verona.

Tattersall D.B., van Heeswijck R., Hoj P.B. (1997) Identification and characterization of a fruit-specific thaumatin-like protein which accumulate at very high levels in conjunction with the onset of sugar accumulation and berry softening in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology*, **114**(3): 759-769.

Tomasi D., Flamini R., Calò A., Pol M., Dalla Vedova A., Costacurta A. (2000) Studio dei precursori di aromi varietali contenuti nel mosto di uva Prosecco. *L'Enologo*, **36**(6): 97-102.

Uchida S., Edamatsu R., Hiramatsu M., Mori A., Nonaka G., Nishioka I., Niwa M., Ozaki M. (1987) Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. *Med. Sci. Res.*, **15**: 831-832.

Ummarino I., Guidoni S., Di Stefano R. (1999) Profilo terpenico di vitigni aromatici. *Quaderni della Scuola di Special. in Sci. Vitic. ed Enol.*, **23**: 83-100.

Usseglio Tomasset L. (1995) *Chimica enologica* (4th ed.). Edizioni AEB Brescia.

Voirin S.G., Baumes R.L., Bittour S.M., Gunata Z.Y., Bayonove C.L. (1990) Novel monoterpene disaccharide glycosides of *Vitis vinifera* grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **38**(6): 1373-1378.

Wang H., Race E.J., Shrikhande A.J. (2003) Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **51**(7): 1839-1844.

Waters E.J., Hayasaka Y., Tattersall D.B., Adams K.S., Williams P.J. (1998) Sequence analysis of grape (*Vitis vinifera*) berry chitinase that cause haze formation in wines. *J. Agric. Food Chem.*, **46**(12): 4950-4957.

Weiss K.C., Yip T.T., Hutchens T.W., Bisson L.F. (1998) Rapid and sensitive fingerprinting of wine proteins by matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Am. J. Enol. Vitic.*, **49**(3): 231-239.

Williams P., Strauss C.R., Wilson B. (1980) Hydroxylated linalool derivatives as precursors of volatile monoterpenes of muscat grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **28**(4): 766-771.

Winterhalter P. (1993) *In* Flavour precursors-thermal and enzymatic conversion. Ed. Teranishi R., Takeoka G., Günter M., ACS series 490.

Winterhalter P., Schreier P. (1988) Free and bound C₁₃ norisoprenoids in quince (*Cydonia oblonga*, Mill.) fruit. *J. Agric. Food Chem.*, **36**(6): 1251-1256.

Winterhalter P., Sefton A.M., Williams P. J. (1990) Volatile C₁₃-Norisoprenoid compounds in Riesling wine are generated from multiple precursors. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**(4): 277-283.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Professore Andrea Curioni che mi ha seguito e consigliato in questi tre anni di dottorato.

Il Dott. Riccardo Flamini per il suo continuo sostegno durante il mio lavoro di tesi e per il tempo dedicato alla mia formazione scientifica e lavorativa.

L'Enologo Antonio Dalla Vedova e la Dott.ssa Annarita Panighel per la disponibilità e l'aiuto che mi hanno dato nel portare a termine questo lavoro.

L'ente CRA-VIT di Conegliano per avermi dato la possibilità di seguire questo corso di dottorato e per aver fornito le strutture e le apparecchiature necessarie al mio studio.

Il personale del CNR-ISTM, Sezione di Padova, e in particolare il Dott. Pietro Traldi, la Dott.ssa Roberta Seraglia, la Dott.ssa Ivana Chiara Pesavento, la Dott.ssa Laura Stella, per il supporto essenziale nelle tecniche MALDI/MS e LC-ESI-MSⁿ.

Desidero ringraziare inoltre la Confraternita del Raboso e l'Az. Agr. Cecchetto per aver fornito il materiale necessario allo svolgimento dei miei studi.

Un grazie speciale alla mia famiglia che non mi ha mai fatto mancare il suo sostegno.