

**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova**

**Dipartimento Territorio e Sistemi Agro-Forestali**

**Scuola di Dottorato di Ricerca in Territorio, Ambiente, Risorse e Salute**

**Ciclo XXVI**

**STUDIO DEI METABOLITI CHIMICI DELL'UVA FINALIZZATO A  
VALUTARE LE POTENZIALITÀ ENOLOGICHE,  
NUTRACEUTICHE ED INDUSTRIALI DI ALCUNE VARIETÀ DI  
VITE E NUOVI APPROCCI DI METABOLOMICA**

**Direttore della scuola:** Ch.mo Prof. Mario Aristide Lenzi

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Andrea Curioni

**Co-Supervisore:** Dott. Riccardo Flamini

**Dottoranda:** Fabiola De Marchi







# SOMMARIO

RIASSUNTO.....	VI
ABSTRACT .....	VII
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
1.1 IL POTENZIALE ANTIOSSIDANTE DEL VINO.....	2
1.2 I POLIFENOLI E I FLAVONOIDI NELLE PIANTE.....	4
1.3 I METABOLITI SECONDARI DELL'UVA E DEL VINO.....	7
1.4 PROPRIETÀ BIOLOGICHE DEI POLIFENOLI DELL'UVA.....	11
1.4.1 Proprietà antiossidanti .....	11
1.4.2 Proprietà preventive nei confronti di malattie cardiovascolari .....	13
1.4.3 Proprietà anticancro.....	13
1.4.4 Proprietà antinfiammatorie .....	14
1.4.5 Proprietà anti-invecchiamento .....	14
1.4.6 Proprietà antimicrobiche .....	14
1.4.7 Metabolismo e biodisponibilità dei polifenoli.....	15
1.5 GLI ANTOCIANI.....	16
1.5.1 Utilizzi industriali degli antociani .....	18
1.6 L'OLIO DI VINACCIOLI .....	21
1.6.1 I lipidi nell'olio di vinaccioli.....	22
1.7 IL POTENZIALE ANTIOSSIDANTE DEGLI ESTRATTI DI VINACCIOLI.....	25
1.7.1 I tannini dell'uva e del vino.....	27
1.7.2 I tannini nell'industria enologica.....	31
1.8 I FLAVONOLI DELL'UVA .....	33
1.9 VARIETÀ <i>VITIS VINIFERA</i> STUDIATE.....	35
1.9.1 BOSCHERA .....	36
1.9.2 CABRUSINA .....	37
1.9.3 DINDARELLA .....	38
1.9.4 GRAPARIOL.....	39
1.9.5 CJANORIE .....	39
1.9.6 FUMAT .....	40
1.9.7 PIGNOLO .....	40
1.9.8 CIVIDIN .....	41
1.9.9 SAGRESTANA .....	42
1.10 GLI IBRIDI PRODUTTORI DIRETTI .....	43
1.10.1 Le varietà ibride studiate .....	44
1.11 METODI ANALITICI UTILIZZATI .....	46
1.11.1 La spettrometria di massa MALDI.....	47
1.11.2 Metodi LC/MS in precursor-ion analysis .....	49
1.12 NUOVI APPROCCI DI METABOLOMICA PER LO STUDIO DELL'UVA .....	51
1.12.1 La metabolomica.....	51
1.12.2 La spettrometria di massa ad alta risoluzione .....	53
<b>2. SCOPO DELLA TESI .....</b>	<b>55</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>57</b>
3.1 MATERIALI E METODI PER LO STUDIO DELLE VARIETÀ <i>VITIS VINIFERA</i> .....	58
3.1.1 Campioni di uve <i>V. vinifera</i> .....	58

3.1.2 Preparazione degli estratti per l'analisi dei polifenoli delle bucce .....	58
3.1.3 Determinazione dei profili degli antociani.....	58
3.1.4 Determinazione degli acidi idrossicinnamiltartarici (HCTA) e dei flavonoli delle bucce .....	59
3.1.5 Determinazione dell'indice di antociani e flavonoidi totali delle bucce .....	59
3.1.6 Determinazione dei flavan-3-oli dei vinaccioli .....	60
3.1.7 Preparazione degli estratti per l'analisi degli aromi.....	61
3.1.8 Determinazione dei terpeni liberi.....	61
3.1.9 Determinazione dei terpeni glicosidati.....	61
3.1.10 Analisi GC/MS .....	62
3.1.11 Microvinificazione delle uve .....	62
<b>3.2 MATERIALI E METODI PER LO STUDIO DEGLI ANTOCIANI DELLE VARIETÀ ROSSE IBRIDE .....</b>	<b>63</b>
3.2.1 Campioni e preparazione del campione.....	63
3.2.2 Analisi HPLC/DAD. ....	63
3.2.3 LC/MS precursor-ion analysis.....	63
<b>3.3 MATERIALI E METODI PER LO STUDIO DEI TRIGLICERIDI.....</b>	<b>65</b>
3.3.1 Campioni di uve ibride.....	65
3.3.2 Estrazione dell'olio dai vinaccioli.....	65
3.3.3 Analisi ESI/MS e ESI/MS/MS .....	65
3.3.4 Analisi MALDI-TOF MS .....	65
3.3.5 Analisi statistica .....	66
<b>3.4 MATERIALI E METODI PER LO STUDIO DELLE PROANTOCIANIDINE DEI VINACCIOLI .....</b>	<b>67</b>
3.4.1 Campioni .....	67
3.4.2 Estrazione delle proantocianidine .....	67
3.4.3 Indice di polifenoli totali .....	67
3.4.4 Analisi MALDI-TOF .....	67
3.4.5 Analisi statistica .....	68
<b>3.5 MATERIALI E METODI PER IL NUOVO APPROCCIO DI METABOLOMICA.....</b>	<b>69</b>
3.5.1 Preparazione dei campioni di uve di varietà ibride.....	69
3.5.2 Spettrometria di massa LC/QTOF.....	69
3.5.3 Analisi dei dati .....	70
<b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>	<b>71</b>
<b>4.1 VALUTAZIONE DELLE POTENZIALITÀ ENOLOGICHE DELLE VARIETÀ <i>V. VINIFERA</i> .....</b>	<b>72</b>
4.1.1 Indici di antociani totali e di flavonoidi totali delle bucce.....	72
4.1.2 Studio del profilo degli antociani.....	74
4.1.3 Studio del profilo di HCTA e flavonoli delle bucce.....	76
4.1.4 Flavonoli nei vinaccioli.....	79
4.1.5 Studio dei composti volatili liberi e precursori di aromi glicosilati nelle varietà Boschera e Dindarella.....	80
4.1.6 Analisi sensoriale dei vini.....	84
<b>4.2 VALUTAZIONE DELLE POTENZIALITÀ INDUSTRIALI DELLE VARIETÀ IBRIDE: GLI ANTOCIANI .....</b>	<b>88</b>
4.2.1 Determinazione dell'indice di antociani totali.....	88
4.2.2 Identificazione degli antociani mediante LC/MS precursor ion analysis .....	90
4.2.3 Determinazione degli antociani mediante analisi HPLC/DAD.....	95
<b>4.3 VALUTAZIONE DELLE POTENZIALITÀ INDUSTRIALI DELLE VARIETÀ IBRIDE: L'OLIO DI VINACCIOLI .....</b>	<b>98</b>
4.3.1 Caratterizzazione dei trigliceridi mediante ESI-MS/MS .....	98
4.3.2 Profilo MALDI-TOF dei trigliceridi nell'olio di vinaccioli.....	101
4.3.3 Produzione e resa di olio dei vinaccioli .....	107

<b>4.4 VALUTAZIONE DELLE PROPRIETÀ NUTRACEUTICHE DELLE VARIETÀ IBRIDE.....</b>	<b>109</b>
<b>4.4.1 Identificazione dei segnali degli spettri MALDI-TOF .....</b>	<b>109</b>
<b>4.4.2 Caratterizzazione delle varietà .....</b>	<b>116</b>
<b>4.5 L'APPROCCIO DI "SUSPECT SCREENING ANALYSIS" PER LO STUDIO DEL METABOLOMA DELL'UVA</b>	
.....	<b>120</b>
<b>4.5.1 Metabolomica del Clinton: studio degli antociani .....</b>	<b>124</b>
<b>4.5.2 Metabolomica del Seibel 19881 e del Seyve Villard 12-347: studio dei flavonoli .....</b>	<b>126</b>
<b>4.5.2.1 Identificazione dei flavonoli .....</b>	<b>126</b>
<b>4.5.2.2 I flavonoli del Seibel 19881 .....</b>	<b>133</b>
<b>4.5.2.3 I flavonoli del Seyve Villard 12-347 .....</b>	<b>135</b>
<b>4.5.2.4 Confronto tra le due varietà .....</b>	<b>136</b>
<b>5. CONCLUSIONI .....</b>	<b>139</b>
<b>5.1 POTENZIALITÀ ENOLOGICHE DELLE VARIETÀ <i>V. VINIFERA</i> .....</b>	<b>140</b>
<b>5.2 POTENZIALITÀ INDUSTRIALI DELLE VARIETÀ IBRIDE.....</b>	<b>141</b>
<b>5.3 POTENZIALITÀ NUTRACEUTICHE DELLE VARIETÀ IBRIDE.....</b>	<b>142</b>
<b>5.4 NUOVO APPROCCIO DI "SUSPECT SCREENING ANALYSIS" PER LO STUDIO DELLA METABOLOMICA</b>	
<b>DELL'UVA.....</b>	<b>142</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>144</b>



## Riassunto

L'uva, il vino ed i sottoprodotti dell'industria enologica sono ricche fonti di polifenoli e flavonoidi, quali flavonoli, antociani, flavanoli e proantocianidine. Questi composti determinano le caratteristiche sensoriali delle uve e dei vini, come il colore, il sapore e l'astringenza.

Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che questi composti esercitano un'azione benefica sulla salute umana e proteggono dall'insorgere di patologie croniche e degenerative soprattutto a carico dell'apparato cardiovascolare, grazie alle loro proprietà antiossidanti, anticancro, antinfiammatorie ed antimicrobiche. Questi biocomponenti, una volta estratti dalle varie parti della pianta, possono trovare importanti applicazioni come principi attivi di supplementi farmaceutici con attività antiossidante, ingredienti a valore aggiunto in alimenti fortificati, coloranti e conservanti naturali per l'industria alimentare.

Lo scopo della ricerca è quello di studiare, mediante le moderne tecniche analitiche di spettrofotometria, cromatografia e spettrometria di massa (MALDI/MS, LC/MS, GC/MS), i metaboliti nelle uve di alcune varietà di *Vitis vinifera* e di viti ibride ad oggi poco conosciute al fine di individuarne le potenzialità enologiche, nutraceutiche ed industriali.

Sono state valutate le potenzialità enologiche di nove varietà di *V. vinifera* appartenenti a vitigni autoctoni del Friuli Venezia Giulia e del Veneto, attraverso lo studio delle principali classi di polifenoli e aromi delle uve e dei principali parametri chimici e profili organolettici dei vini.

Inoltre, sono state studiate le uve di 32 varietà di viti ibride (21 rosse e 11 bianche) presenti nella collezione del Germoplasma viticolo del CRA-VIT al fine di valutarne le potenzialità per i loro impieghi industriali e nella nutraceutica.

Lo studio degli antociani delle varietà ibride rosse ha evidenziato alcune varietà particolarmente ricche di pigmenti (es. il Seibel 8357) e quindi interessanti per la produzione di coloranti naturali che vengono impiegati in particolare nell'industria alimentare e farmaceutica. Lo studio dei trigliceridi dell'olio di vinaccioli delle uve ibride ha evidenziato che in generale queste varietà hanno un elevato contenuto di acido linoleico (superiore al 70%), un acido grasso essenziale avente la proprietà di diminuire i livelli di colesterolo LDL, ed alcune varietà particolarmente interessanti per la loro produttività (Bacò 1 e Seibel 10878). Le potenzialità nutraceutiche di queste varietà sono state investigate anche studiando le proantocianidine negli estratti di vinaccioli. Sono state determinate numerose proantocianidine oligomere e polimere aventi diversi gradi di galloilazione, utilizzabili, oltre che come preparati antiossidanti, anche come tannini enologici per la chiarifica di mosti e vini.

Infine, è stato sviluppato un nuovo metodo per lo studio della metabolomica dell'uva mediante analisi di spettrometria di massa ad alta risoluzione (HR-MS) con un approccio di "suspect screening analysis". Il metodo è risultato molto efficace, ed ha permesso l'identificazione di centinaia di metaboliti con una singola analisi, incluse diverse classi di polifenoli dell'uva.

## Abstract

Grape, wine and oenology by-products are rich in polyphenols and in particular flavonoids: flavonols, anthocyanins, flavanols and proanthocyanidins. Those molecules are plants secondary metabolites and may also contribute to the bitterness and astringency of grapes and wines. In recent years, epidemiological studies have revealed the great potential of polyphenols and flavonoids in human diet on protection against cancers, infections, their role in anti-aging and also against the development of several chronic diseases such as cardiovascular diseases (CVDs) or diabetes. Their role for human health is attributed mainly to their antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial activities. Therefore these bio-compounds could find promising applications in pharmaceutical, nutraceutical and food industries as active ingredients in supplements with antioxidant activity, value-added ingredients in fortified foods or as natural dyes and preservatives.

The aim of this research is to investigate the contents of chemical metabolites in several unique *Vitis vinifera* varieties and hybrids, and to examine their potential for oenological, nutraceutical and industrial applications. Modern spectrophotometry, chromatography and mass spectrometry (MALDI/MS, LC/MS, GC/MS) analytical techniques were applied in order to achieve the aims of the research.

Nine *Vitis vinifera* italian native grape varieties from Friuli Venezia Giulia and Veneto regions, were investigated for their enological potential, by studying the main classes of polyphenols and aroma compounds of grapes and their organoleptic wine characteristics.

In addition 32 hybrid varieties (21 red, 11 white) that belong to the CRA-VIT Grapevine Germplasm Collection located in Conegliano (TV) were studied to evaluate their nutraceutical and industrial potential.

The study of anthocyanins of red hybrids showed that some varieties (e.g. Seibel 8357) have rich content of pigments and are therefore attractive for the production of natural dyes that are used in the food and pharmaceutical industry. Moreover, some varieties (Bacò 1 and Seibel 10878) were also found interesting for their triglycerides content in grape seed oil with high linoleic acid content (up to 70%), which is essential fatty acid effective in reducing LDL cholesterol.

The nutraceutical potential of hybrid varieties was investigated by studying grape seed proanthocyanidins. Oligomeric and polymeric proanthocyanidins with different degree of galloylation were determined in grape seed extracts suggesting potential application of the extracts as antioxidants in nutraceutical products and also as oenological tannins.

Eventually, a new methodology was established for grape metabolome study based on High-Resolution Mass Spectrometry (HR-MS) analysis and the “suspect screening analysis” approach. This method was proved to be very effective due to the ability to identify hundreds of compounds in one single run and also individual classes of grape polyphenols.

# **1. INTRODUZIONE**

## 1.1 Il potenziale antiossidante del vino

I costituenti dell'uva e del vino quali polifenoli, antociani, flavonoli, flavanoli e stilbeni sono oggetto di studio da diversi anni in quanto svolgono un ruolo importante non solo nella qualità delle uve e dei vini, ma anche per i loro effetti benefici sulla salute umana legati in particolare alle proprietà antiossidanti.

Studi epidemiologici condotti nei primi anni '90, hanno evidenziato che in Francia, dove il consumo di vino è elevato e l'alimentazione si basa su una dieta ricca di grassi, la mortalità in seguito a malattie cardiovascolari era ridotta rispetto ad altri paesi. Tale fenomeno, denominato "paradosso francese", risultava positivamente correlato con il consumo di vino, una bevanda caratterizzata dall'abbondante presenza di composti polifenolici dell'uva, quali proantocianidine e resveratrolo che, tra le varie proprietà, hanno la capacità di abbassare i livelli di colesterolo LDL nel sangue (Renaud e De Lorgeril, 1992; Frankel *et al.*, 1993; Teissedre *et al.*, 1996).

I polifenoli sono metaboliti secondari delle piante coinvolti nei meccanismi di difesa contro la radiazione solare e l'aggressione di patogeni. Nella frutta, verdura, cereali e negli alimenti e bevande da essi derivati questi contribuiscono alla sensazione di amaro, all'astringenza, al colore, al sapore, all'odore, e conferiscono stabilità ossidativa (Pandey e Rizvi, 2009). Sono inoltre componenti fondamentali della dieta umana per la loro dimostrata attività antiossidante, la capacità di catturare i radicali liberi e mitigare lo stress ossidativo prodotto nel corso di malattie croniche e degenerative (Martin e Appel, 2010).

In seguito, molti studi hanno confermato che il consumo regolare di frutta e verdura e prodotti derivati, apporta benefici alla salute umana e permette di prevenire l'insorgere di disturbi cronici e degenerativi quali forme di cancro, diabete, malattie cardiovascolari, disturbi neurologici. La capacità dei polifenoli di catturare i radicali liberi generati nei processi di ossidazione, come quelli derivati dall'ossidazione dei lipidi e degli acidi nucleici, e l'interazione con le vie di comunicazione cellulare che mediano le funzioni cellulari sia in condizioni normali che patologiche, sono riconosciuti come i principali meccanismi che determinano la riduzione del rischio di sviluppare malattie degenerative e legate all'invecchiamento (Quideau *et al.*, 2011; Vauzour *et al.*, 2010).

Per questo motivo, molte sono state le ricerche effettuate sulla composizione e sulle proprietà dell'uva, del vino e dei sottoprodotti dell'industria enologica, che rappresentano ricche fonti di metaboliti secondari e biocomponenti da utilizzare nell'industria agroalimentare come ingredienti funzionali, e con promettenti applicazioni nell'industria alimentare, nutraceutica, farmaceutica e cosmetica in alternativa alle sostanze sintetiche comunemente utilizzate e sempre più rigettate dai consumatori.

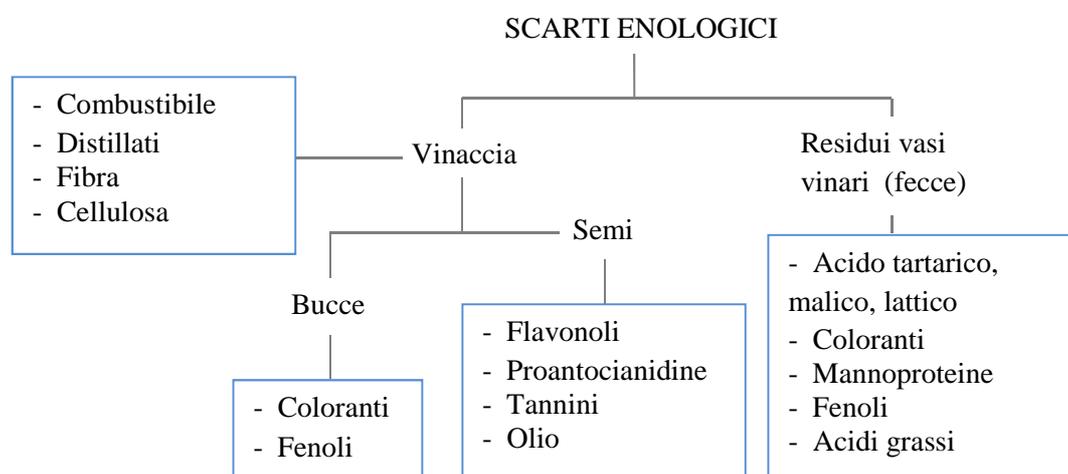
I polifenoli delle piante hanno suscitato l'attenzione non solo della comunità scientifica, ma anche del grande pubblico interessato alla diffusione di supplementi dietetici ricchi in polifenoli o di prodotti alimentari arricchiti di questi antiossidanti per aumentarne la qualità e il valore nutrizionale (Martin e Appel, 2010; Gil-Chávez *et al.*, 2013). Ad esempio, i vinaccioli dell'uva contengono proantocianidine oligomere ed una

combinazione di flavonoidi e polifenoli biologicamente attivi che hanno dimostrato di esercitare uno spettro di proprietà biologiche, farmacologiche, terapeutiche e chemopreventive contro i radicali reattivi all'ossigeno e lo stress ossidativo (Bagchi *et al.*, 2003).

Secondo i dati FAO (FAOSTAT, 2011), l'uva è una delle principali colture agricole del mondo e, con una produzione mondiale di circa 69 milioni di tonnellate nel 2011 ed una superficie coltivata pari a 7 milioni di ettari, circa l'80% è utilizzata per la produzione di vino.

Una buona parte dei componenti biologicamente attivi che sono presenti nelle diverse parti dell'uva rimangono presenti in livelli significativi nei sottoprodotti della vinificazione, quali la vinaccia, i raspi, i depositi dei lieviti nei vasi vinari. Dal momento che i residui vitivinicoli costituiscono un evidente problema ambientale, vi è un crescente interesse a sviluppare nuove applicazioni e strategie di sfruttamento per queste risorse, tenendo in considerazione l'importante potenziale in esse contenuto.

Il più abbondante residuo derivante dal processo di vinificazione è lo scarto solido rimanente in seguito alla pressatura dell'uva, la vinaccia, che costituisce il 20-25% in peso dell'uva utilizzata e per la quale si stima una produzione annua mondiale di 10.5-13.1 milioni di tonnellate (Kammerer *et al.*, 2004; Peralbo-Molina e de Castro, 2013). Dalla distillazione della vinaccia dell'uva è possibile ottenere oltre all'etanolo, utilizzato per la produzione di bevande spiritose, come solvente o combustibile, anche estratti polifenolici, tannini e coloranti, tartrati, fibra e cellulosa (**Figura 1.1**) (Nerantzis e Tataridis, 2006).



**Figura 1.1:** Possibili utilizzi dei sottoprodotti dell'industria enologica.

La più comune rivalutazione di questi sottoprodotti facilmente disponibili consiste nella produzione di antiossidanti e di estratti polifenolici da utilizzare come supplementi nel cibo sotto forma di ingredienti a valore aggiunto, o il loro utilizzo come mangimi o fertilizzanti (González-Centeno *et al.*, 2012).

Talvolta i costituenti bioattivi sono commercializzati sotto forma di prodotti farmaceutici (capsule, tavolette, polveri, sciroppi) che incorporano gli estratti fitochimici a cui è stata

direttamente o indirettamente attribuita una funzione fisiologica. Questi preparati non possono essere propriamente definiti “alimenti”, e sono stati definiti come “nutraceutici” dalla combinazione dei termini nutrienti e farmaceutici, in Canada vengono definiti “natural health products” (Shahidi, 2004; Espín *et al.*, 2007).

## **1.2 I polifenoli e i flavonoidi nelle piante**

I composti chimici che vengono estratti dalle piante (estratti fitochimici) si suddividono in metaboliti primari e secondari.

I metaboliti primari sono rappresentati da zuccheri, amminoacidi, acidi grassi, acidi nucleici ed altri composti che si trovano in tutte le piante in quanto utili alla loro crescita e sviluppo, come i regolatori della crescita e i componenti della parete cellulare.

I metaboliti secondari hanno funzioni diversificate all'interno del ciclo vitale della pianta e possono essere implicati in ruoli diversi, quali la resistenza della pianta ai microbi patogeni, agli erbivori e agli insetti, la protezione contro i danni provocati al DNA dei tessuti vegetali dalla radiazione UV, ma anche la riproduzione, la nutrizione e la crescita, attraverso interazioni con altri organismi (insetti, funghi simbiotici e batteri) (Quideau *et al.*, 2011; Shahidi e Naczk, 2003).

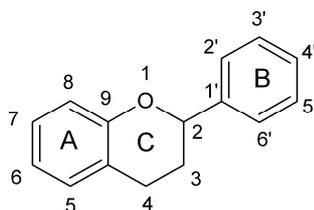
Composti fenolici e polifenolici sono metaboliti secondari e costituiscono uno dei gruppi di fitocomposti più numerosi e maggiormente diffusi nel regno vegetale. Attualmente più di 8.000 strutture chimiche di polifenoli sono state identificate e riportate in letteratura, e comprendono sia acidi fenolici semplici che molecole altamente polimerizzate quali tannini, lignani e lignine (Martin e Appel, 2010).

Dal punto di vista chimico questi composti sono costituiti da uno o più anelli benzenici a cui sono legati uno o più gruppi ossidrilici (-OH). La loro reattività è dovuta al carattere acido della funzione fenolica ed al carattere nucleofilo dell'anello benzenico. Nelle piante si trovano solitamente in forma di glicosidi, con uno o più residui di zucchero legati ai gruppi ossidrilici.

La distribuzione dei composti fenolici nei tessuti cellulari e subcellulari delle piante non è uniforme: i fenoli insolubili si trovano nelle pareti cellulari, mentre quelli solubili si trovano nei vacuoli delle cellule. Il contenuto di alcuni polifenoli può aumentare in condizioni di stress come l'irradiazione UV, l'infezione da patogeni e parassiti, ferite, inquinamento atmosferico ed esposizione a temperature estreme. Ad esempio, la sintesi degli stilbeni nell'uva è indotta da infezione fungina (*Botrytis cinerea*), ferita, radiazione UV e siccità, oltre a fattori quali cultivar, stadio di sviluppo dell'acino e pratiche di coltivazione (Naczk e Shahidi, 2000; Bavaresco *et al.*, 2012).

A seconda della loro struttura chimica i polifenoli sono suddivisi in diverse classi: i più comuni ed importanti composti fenolici a basso peso molecolare sono gli acidi fenolici, che rappresentano un terzo dei polifenoli ingeriti con la dieta, ed i flavonoidi, per i quali sono stati descritti più di 5.000 composti (Martin e Appel, 2010).

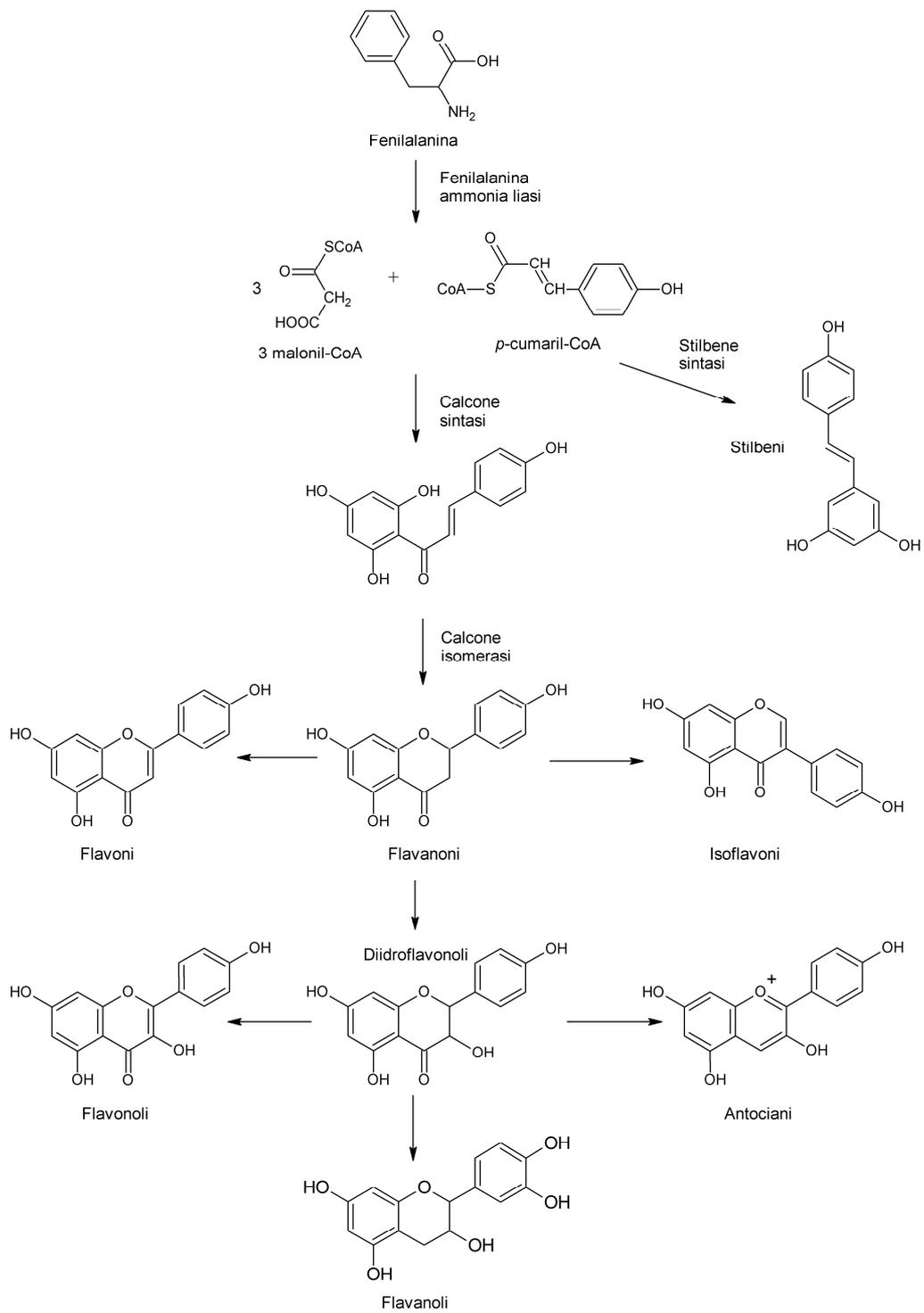
Chimicamente i flavonoidi sono costituiti da due anelli aromatici legati da un ponte a tre atomi di carbonio (C6-C3-C6) che forma un anello piranico con gradi diversi di ossidazione (**Figura 1.2**).



**Figura 1.2:** Struttura chimica dei flavonoidi.

Tutti i composti fenolici sono sintetizzati a partire dall'amminoacido fenilalanina attraverso la via metabolica dei fenilpropanoidi. La biosintesi dei flavonoidi avviene mediante la condensazione del 4-cumaril-CoA e di tre molecole di malonil coenzima A. La presenza dell'enzima calcone sintasi porta alla formazione dei calconi che successivamente ciclizzano in condizioni acide, mentre la presenza dell'enzima stilbene sintasi porta attraverso la stessa via metabolica alla formazione degli stilbeni (Martin e Appel, 2010; Shahidi e Naczki, 2003).

A seconda della variazione sull'eterociclo, i flavonoidi possono essere suddivisi in 6 principali sottoclassi: flavonoli, flavoni, flavanoni, flavanoli, antociani ed isoflavoni (**Figura 1.3**). La natura cromofora della struttura chimica di flavonoidi quali antociani e calconi determina l'assorbimento della luce nelle lunghezze d'onda UV-visibile e la capacità di attrarre gli insetti utili all'impollinazione e alla dispersione dei semi; altri flavonoidi, quali flavan-3-oli e tannini, sono dei deterrenti per gli erbivori a causa del sapore amaro e astringente che conferiscono alle piante (Downey *et al.*, 2006).



**Figura 1.3:** Schema di biosintesi dei flavonoidi.

### 1.3 I metaboliti secondari dell'uva e del vino

La composizione polifenolica dei vini dipende dalla varietà dell'uva e da altri fattori che influenzano lo sviluppo e la maturazione dell'uva, quali il suolo, la posizione geografica, il clima. Le tecniche di vinificazione giocano un ruolo importante nell'estrazione dei polifenoli dall'uva e nella loro stabilità nel vino: il tempo di macerazione e fermentazione in contatto con le bucce ed i vinaccioli, la pressatura, l'affinamento e l'invecchiamento in bottiglia sono tutti fattori che influenzano la composizione fenolica dei vini ed il loro potenziale antiossidante.

I polifenoli dell'uva e del vino vengono distinti in flavonoidi e non flavonoidi; i composti non flavonoidi comprendono acidi benzoici e idrossicinnamici, che sono presenti soprattutto nella polpa e nel succo dell'acino, e gli stilbeni, nella buccia delle uve rosse. I composti flavonoidi sono localizzati nella buccia, nei semi e nei raspi dell'uva e i principali sono antociani, flavanoli e tannini. Essi sono i composti che durante il processo di vinificazione vengono estratti dalle diverse parti dell'acino in cui sono localizzati e contribuiscono maggiormente all'intensità e alla stabilità del colore, all'astringenza e all'aroma del vino.

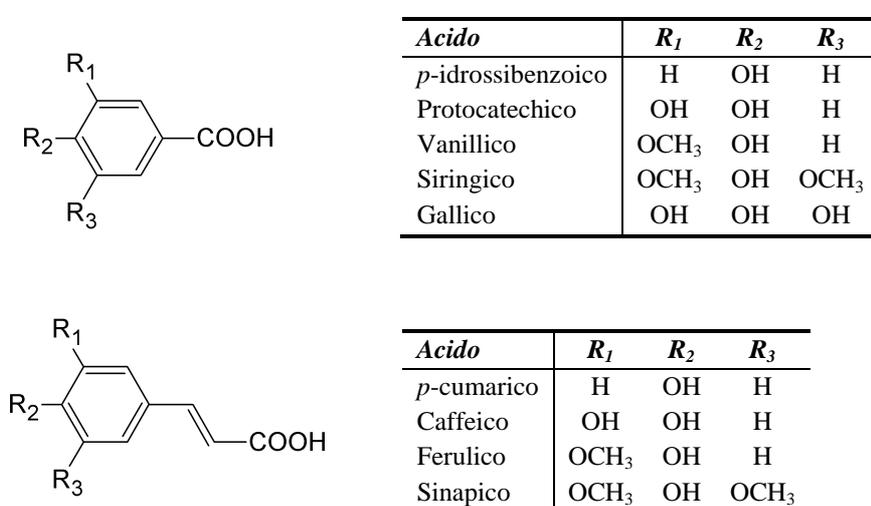
Il profilo degli antociani, che sono i pigmenti responsabili della colorazione di uve e vini rossi, viene impiegato per gli studi chemotassonomici, e la loro concentrazione nell'uva è un parametro utile a predire il colore e la qualità del vino (Mattivi *et al.*, 2006). Durante la fase di maturazione e di invecchiamento del vino, gli antociani reagiscono con flavan-3-oli, proantocianidine e tannini mediante reazioni di polimerizzazione, condensazione ed idrolisi che provocano modificazioni qualitative e quantitative nel profilo iniziale. La reazione tra antociani e flavanoli e la formazione di piroantocianidine, strutture più stabili derivate dalla reazione tra antociani e acetaldeide, acido piruvico, vinilfenolo, vinilcatecolo, vinilguaiacolo e vinil(epi)catechina, sono i principali responsabili del cambiamento di colore dei prodotti da rosso rubino con sfumature violacee, tipico dei vini giovani, a rosso mattone e più aranciato, tipico dei vini invecchiati. Nei vini rossi sono state identificate più di un centinaio di strutture di antociani derivati prodotti della condensazione diretta antociani-flavanoli o mediata dall'acetaldeide (Flamini, 2010).

I flavan-3-oli sono una delle principali classi di polifenoli dell'uva e comprendono (+)-catechina, (-)-epicatechina, (+)-gallo catechina e (-)-galloepicatechina. Da questi derivano oligomeri e polimeri definiti proantocianidine o tannini condensati. Durante il processo di vinificazione, in particolare nel caso dei vini rossi, i tannini condensati vengono estratti dalle bucce e dai vinaccioli passando nel vino e determinandone le caratteristiche sensoriali. Grazie alla capacità dei tannini di formare complessi e precipitare le proteine della saliva, essi conferiscono le sensazioni di astringenza e di amaro tipiche dei vini rossi. La sensazione di astringenza dipende strettamente dalla natura dei tannini: un maggior grado di polimerizzazione, come quello dei tannini nelle bucce, determina una maggiore astringenza.

I flavonoli sono un'altra classe di polifenoli con importanti proprietà antiossidanti presenti nei vacuoli dei tessuti epidermici dell'uva. Essi sono i principali polifenoli coinvolti nel fenomeno di copigmentazione nei vini rossi che provoca l'intensificazione del colore rosso con uno spostamento batocromico verso lunghezze d'onda violacee, colore tipico dei vini rossi giovani (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007).

Oltre ai flavonoidi, che sono la classe più rappresentativa di metaboliti secondari nell'uva, anche composti non flavonoidi quali acidi fenolici (benzoici e idrossicinnamici) e stilbeni contribuiscono alla qualità dell'uva e del vino.

Gli acidi fenolici sono importanti precursori per la sintesi di molti altri composti (Shahidi e Chandrasekara, 2010). Si dividono in acidi idrossicinnamici e idrossibenzoici e si trovano raramente in forma libera più spesso in forma di glicosidi o esteri dell'acido chinico, shikimico e tartarico (**Figura 1.4**).



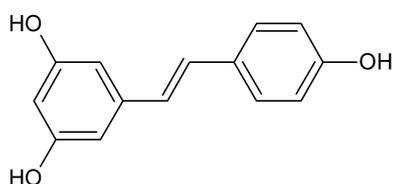
**Figura 1.4:** Principali acidi benzoici ed idrossicinnamici dell'uva.

Gli acidi benzoici sono presenti nell'uva soprattutto sotto forma di eterosidi del glucosio, da cui si liberano per idrolisi acida, e di esteri con le catechine nei semi (es. epicatechina-3-O-gallato). Si trovano in forma libera nei vini, soprattutto in quelli rossi, dove vengono rilasciati in seguito all'idrolisi.

Gli acidi idrossicinnamici (*p*-cumarico, caffeico, ferulico, sinapico) sono presenti nei vacuoli delle cellule della buccia e della polpa dell'uva nella forma di esteri tartarici o si possono trovare legati al residuo di zucchero degli antociani. Gli acidi *p*-cumariltartarico (cutarico), caffeoiltartarico (caftarico) e feruliltartarico (fertarico) sono presenti prevalentemente nella forma *trans* e in quantità inferiori nella forma isomerica *cis*. Tra questi, l'acido caftarico è il più abbondante sia nelle uve bianche che rosse.

Gli acidi idrossicinnamiltartarici non rivestono un ruolo diretto nel sapore o nell'odore dei vini ma, in particolare l'acido caftarico e cutarico, sono i substrati delle fenol ossidasi dell'uva che provocano l'imbrunimento dei mosti (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).

La via metabolica dei fenilpropanoidi, oltre ai flavonoidi, porta alla sintesi degli stilbeni, il più famoso dei quali è la fitoalessina *trans*-resveratrolo (*trans*-3,5,4'-triidrossistilbene; **Figura 1.5**).

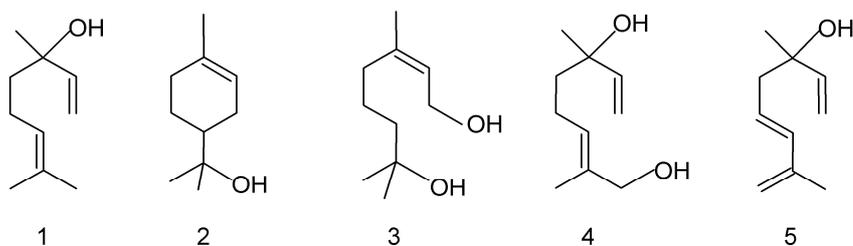


**Figura 1.5:** Struttura chimica del *trans*-resveratrolo.

Le fitoalessine sono un gruppo di composti chimici a basso peso molecolare che le piante producono come meccanismo di difesa dagli attacchi di microrganismi patogeni o in risposta a stress abiotici, come la radiazione UV (Langcake e Pryce, 1977; Bavaresco *et al.*, 1997). Recentemente il *trans*-resveratrolo presente nei vini rossi è stato al centro dell'attenzione scientifica e mediatica per la sua dimostrata capacità di agire come agente chemiopreventivo contro il cancro e di prevenire i disturbi cardiovascolari (Frémont, 2000). Questo composto presente nelle bucce delle uve rosse si trova anche nelle parti non edibili della vite, quali foglie e raspi. Durante la vinificazione viene estratto dalle bucce e trasferito al vino dove si trova sia la forma libera degli isomeri *cis* e *trans* sia glicosidata (piceidi), e sotto forme oligomere (dimeri, trimeri e tetrameri).

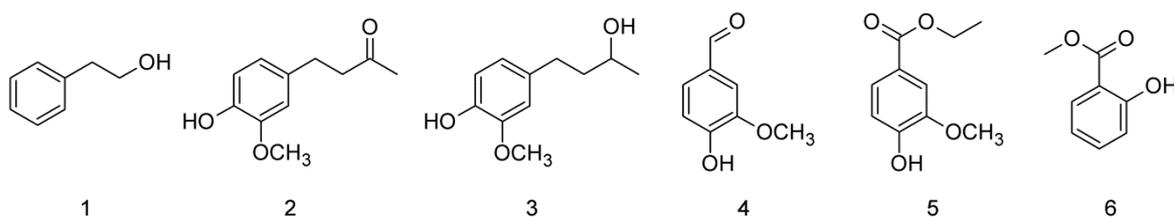
Le proprietà organolettiche delle uve e dei vini sono anche legate alla presenza di composti responsabili degli aromi varietali, quali terpeni, composti benzenoidi e norisoprenoidi. Nell'uva questi composti sono presenti prevalentemente in forma di precursori glicosidati che durante la vinificazione subiscono l'idrolisi e liberano le molecole odorose (Flamini, 2010).

I terpeni dell'uva sono idrocarburi, alcoli, aldeidi chetoni o esteri responsabili di odori fruttati (agrumi) e floreali, sebbene alcuni presentino sentori resinosi ( $\alpha$ -terpinene, *p*-cimene, mircene e farnesolo). I monoterpene più odorosi sono alcoli, quali linalolo,  $\alpha$ -terpineolo, nerolo, geraniolo, citronellolo e hotrienolo (**Figura 1.6**). Questi composti, sono caratteristici di varietà aromatiche, quali i Moscati, le Malvasie, i Gewürtztraminer e i Riesling. Possiedono soglie di percezione molto basse comprese tra i 10 e i 100  $\mu\text{g/l}$  ed il loro impatto olfattivo è sinergico (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998).



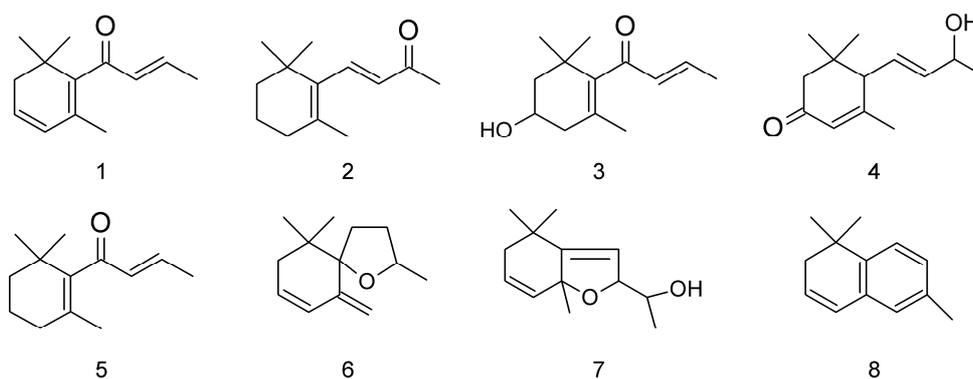
**Figura 1.6:** Strutture chimiche dei principali terpenoli dell'uva. 1) linalolo; 2)  $\alpha$ -terpineolo; 3) nerolo (Z), geraniolo (E); 4) citronellolo; 5) hotrienolo.

I principali composti benzenoidi dell'uva sono alcol benzilico e  $\beta$ -feniletanolo (dai tipici sentori di rosa), zingerone, zingerolo, vanillina, salicilato di metile (Flamini, 2008) (**Figura 1.7**).



**Figura 1.7:** Principali composti benzenoidi dell'uva: 1)  $\beta$ -feniletanolo; 2) zingerone; 3) zingerolo; 4) vanillina; 5) vanillato di etile; 6) salicilato di metile.

I norisoprenoidi derivano dalla degradazione ossidativa dei carotenoidi e sono composti a 13 atomi di carbonio che, sebbene presenti in tracce, possiedono una soglia olfattiva molto bassa (es. 700 ng/l per il  $\beta$ -ionone e 200 ng/l per il  $\beta$ -damascenone) che contribuisce in modo significativo all'aroma di vini bianchi quali Chardonnay e Sauvignon Blanc e di vini rossi quali Shiraz, Grenache, Merlot e Cabernet Sauvignon. Si dividono in due gruppi principali: megastigmani e non megastigmani. I megastigmani comprendono il  $\beta$ -damascenone (sentori di rosa, fiori e frutti esotici),  $\beta$ -ionone, 3-oxo- $\alpha$ -ionolo (tabacco),  $\beta$ -damascone (sentore di tabacco e fruttato) e 3-idrossi- $\beta$ -damascone (tè e tabacco). I non megastigmani comprendono actinidoli e vitispirani, con odore di canfora, e il TDN (1,1,6-trimetil-1,2-diidronaftalene), che si forma nel corso dell'invecchiamento del vino in bottiglia ed è responsabile della nota di cherosene dei vini Riesling vecchi (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998; Flamini, 2008) (**Figura 1.8**).



**Figura 1.8:** Principali norisoprenoidi dell'uva. 1)  $\beta$ -damascenone; 2)  $\beta$ -ionone; 3) 3-idrossi- $\beta$ -damascone; 4) 3-oxo- $\alpha$ -ionolo; 5)  $\beta$ -damascone; 6) vitispirano; 7) actinidoli; 9) TDN.

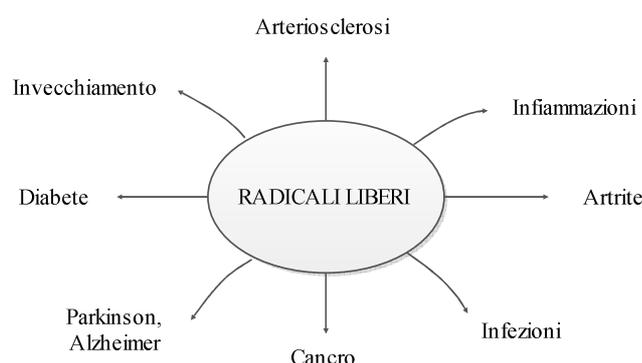
## 1.4 Proprietà biologiche dei polifenoli dell'uva

Antociani, flavonoli, catechine, procianidine, acidi fenolici e stilbeni sono i principali costituenti fenolici presenti nell'uva, nel vino e nei residui di vinificazione. In generale questi composti polifenolici sono caratterizzati da proprietà:

- Antiossidanti;
- Protettive del sistema circolatorio;
- Anticancro;
- Antinfiammatorie;
- Anti-età;
- Antimicrobiche.

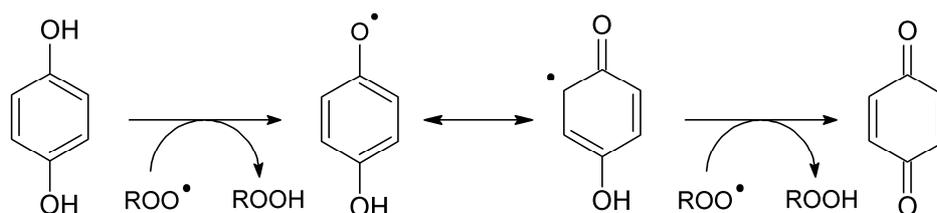
### 1.4.1 Proprietà antiossidanti

L'attività antiossidante rappresenta una delle più importanti proprietà dei composti fenolici dell'uva e del vino. Lo stress ossidativo provoca l'alterazione di macromolecole biologiche, quali lipidi, proteine e acidi nucleici ed è considerato il fattore responsabile non solo dell'insorgere di disturbi degenerativi ma anche dei processi di alterazione dei cibi (**Figura 1.9**) (Han *et al.*, 2007; Shahidi e Naczk, 2003).



**Figura 1.9:** Patologie legate ai processi ossidativi nell'organismo umano.

I polifenoli, in qualità di antiossidanti naturali, agiscono come eccellenti donatori di elettroni o di idrogeno verso le molecole radicaliche che si formano nei tessuti e substrati per opera di iniziatori, quali radiazioni UV, ossigeno, metalli, calore, enzimi. Il fenossil radicale che si forma dalla reazione del fenolo con la molecola radicalica, è stabilizzato attraverso la delocalizzazione degli elettroni spaiati sull'anello aromatico (**Figura 1.10**).



**Figura 1.10:** Meccanismo di stabilizzazione degli ioni radicali da parte del gruppo fenolico.

Il gruppo chimico funzionale che determina la capacità antiossidante dei polifenoli è il gruppo ossidrilico, e maggiore è il numero di sostituenti ossidrilici nei polifenoli, maggiore è la loro attività antiossidante, mentre la sostituzione con gruppi metilici provoca una diminuita capacità antiossidante (Xia *et al.*, 2010). Le caratteristiche antiossidanti dei polifenoli sono legate anche alla loro capacità di chelare i metalli e di influenzare le vie di segnalazione cellulare e l'espressione genica (Xia *et al.*, 2010).

I polifenoli sono presenti nelle varie parti nell'uva, e molti metodi (Folin, DPPH, TEAC, ORAC, FRAP) sono stati impiegati per stimare l'attività antiossidante degli estratti polifenolici di uva, vino ed altri sottoprodotti (Huang *et al.*, 2005; De Beer *et al.*, 2002) (**Tabella 1.1**).

	<i>TEAC</i> <i>μmol TE/g</i>	<i>Folin-Ciocalteu</i> <i>mg GAE/100 g</i>	<i>DPPH</i> <i>mg dm/mg</i> <i>DPPH</i>	<i>Rif.</i>
Vino	0.6-5.8 mmol TE/l	2.3-3.7 g GAE/l		Di Majo <i>et al.</i> , 2008
Raspi		87.3-116 g GAE/kg	0.46-0.79	Llobera e Cañellas, 2008
Acini	15.3	247.7		
Bucce	12.8	374.5		Pastrana-Bonilla <i>et al.</i> , 2003
Semi	281.3	2178.8		(in <i>Vitis rotundifolia</i> )
Polpa	2.4	23.8		
Foglie	236.1	351.5		
Vinaccia	193-485	32-75 mg GAE/g		Rockenbach <i>et al.</i> , 2011
Vinaccia uve bianche		34.9 g GAE/kg	1.32	Llobera e Cañellas, 2008
Vinaccia uve rosse		2.63 g GAE/100g	1.41	Llobera e Cañellas, 2007

**Tabella 1.1:** Attività antiossidante degli estratti di varie parti dell'uva e di altri prodotti. TE: equivalenti Trolox; GAE: equivalenti di acido gallico; DPPH: difenil picril idrazil test; dm: peso secco (dry matter).

Secondo i dati (riportati in **Tabella 1.1**) dello studio effettuato da Pastrana-Bonilla *et al.* (2003), il contenuto di polifenoli totali nei semi è 5 volte superiore che nelle bucce, 6 volte maggiore rispetto alle foglie e ben 80 volte maggiore che nella polpa. Tuttavia il rapporto tra capacità antiossidante e polifenoli totali è 6 volte maggiore nelle foglie rispetto ai semi, probabilmente per la presenza nelle foglie di composti diversi dai polifenoli ed aventi un'elevata attività antiossidante.

Studi *in vivo* hanno dimostrato che supplementi di estratti di vinaccioli contenenti procianidine dimere o polimere hanno maggiori capacità di scavenger dei perossi radicali rispetto ai monomeri (Yilmaz e Toledo, 2004; Xia *et al.*, 2010). Sebbene si possa dare un ordine indicativo della capacità antiossidante dei singoli polifenoli (procianidine dimere > flavanoli > acidi idrossicinnamici > acidi fenolici) bisogna tenere in considerazione che i polifenoli agiscono in modo sinergico e la composizione globale influenza l'attività antiossidante di un estratto (Xia *et al.*, 2010).

Perciò le varie parti dell'uva, ma anche della vite, con elevati contenuti di polifenoli, possono essere processate e trovare un promettente utilizzo nella riduzione dello stress

ossidativo dei sistemi biologici in qualità di supplementi dietetici o conservanti, per prevenire il deterioramento dei cibi in alternativa agli antiossidanti sintetici (es. BHT, BHA, TBHQ e alchil gallati), i cui livelli sono sotto stretta regolamentazione a causa dei loro effetti avversi (Shahidi *et al.*, 2010a).

#### **1.4.2 Proprietà preventive nei confronti di malattie cardiovascolari**

Il rischio di malattie cardiovascolari è associato ad alti livelli di colesterolo e di proteine ad alta densità (LDL) nel plasma, oltre all'eccessiva perossidazione dei lipidi e del colesterolo LDL stesso. Lo sviluppo dell'arteriosclerosi, secondo la "teoria ossidativa", è legato ai macrofagi che attaccano l'LDL ossidato e si trasformano in cellule schiumose, precursori delle placche fibrose. Un endotelio sano produce ossido nitrico e prostaciline che prevengono l'adesione delle placche, mentre quando è danneggiato le fibre di collagene sottostanti vengono esposte e le placche vi aderiscono dando inizio all'aterogenesi (Cos *et al.*, 2003).

Studi *in vitro* hanno dimostrato che tannini, flavonoli, acidi cinnamici e benzoici, stilbeni e antociani hanno la capacità di inibire l'ossidazione di LDL e che la loro azione è addirittura superiore a quella esercitata da più comuni antiossidanti, quali vitamina E e D (Yilmaz e Toledo, 2004).

I polifenoli dell'uva agiscono anche attraverso altri meccanismi, come l'attivazione dei recettori di LDL SREBP-2, fondamentali nel processo di rimozione di LDL dal sangue e dai tessuti, o aumentando l'espressione del gene CYP7A1, che regola l'escrezione degli acidi biliari facendo aumentare i livelli di colesterolo nel fegato e diminuendoli nel plasma (Chen *et al.*, 2011).

La quercetina inibisce l'espressione della metalloproteinase 1 (MMP 1) promuovendo la distruzione delle placche arteriosclerotiche. Il resveratrolo previene la formazione delle placche inibendo l'attività della ciclossigenasi 1 (COX 1) e del tromboxane 2 (un potente vaso-costrittore e promotore dell'aggregazione delle placche) prodotto da questa. L'abilità di stimolare i canali  $Ca^{2+}$ - $K^{+}$  e di aumentare la segnalazione dell'ossido nitrico nell'endotelio sono altri meccanismi attraverso cui il resveratrolo esercita la sua attività vaso-rilassante (Pandey e Rizvi, 2009).

#### **1.4.3 Proprietà anticancro**

I polifenoli agiscono nei meccanismi di prevenzione del cancro interagendo prontamente con le specie reattive all'ossigeno (ROS) e con i radicali liberi per formare composti relativamente stabili, proteggendo in tal modo le cellule dallo stress ossidativo. Essi possono inoltre interrompere o invertire il processo di carcinogenesi agendo sulle molecole segnale coinvolte nel processo di iniziazione e contribuendo alla regolazione della proliferazione e alla risposta immunitaria (Yu e Ahmedna, 2013).

Gli estratti dei semi d'uva, grazie alla forte capacità antiossidante, hanno dimostrato di proteggere i tessuti della pelle dai radicali liberi, inibendo lo stress ossidativo causato

dalla radiazione UV (Bagchi *et al.*, 2000). Inoltre possiedono la proprietà di inibire la proliferazione delle cellule tumorali nel pancreas e di indurre l'apoptosi delle stesse (Yu e Ahmedna, 2013).

Gli antociani hanno dimostrato di possedere *in vitro* attività anticancro verso diversi tipi di cellule tumorali, riducendo la proliferazione, l'infiammazione ed inducendone l'apoptosi. Studi *in vivo* hanno dimostrato che gli antociani inibiscono il cancro nel tratto gastrointestinale e, quando utilizzati come agenti topici, il cancro della pelle (Wang e Stoner, 2008; de Pascual-Teresa e Sanchez-Ballesta, 2008)

Il resveratrolo, in qualità di agente chemo-preventivo, ha dimostrato di inibire l'iniziazione, la promozione e lo sviluppo dei tumori; studi farmaco-chinetici e farmacodinamici dimostrano che i principali organi di interesse sono il fegato e i reni (Yu e Ahmedna, 2013).

#### **1.4.4 Proprietà antinfiammatorie**

Il fattore di trascrizione nucleare NF- $\kappa$ B è un importante regolatore dell'espressione genetica e un induttore di citochine ed interleuchine; esso svolge un ruolo centrale nella risposta immunitaria dei mammiferi e nelle infiammazioni croniche, quali l'artrite reumatoide (Cos *et al.*, 2003). Studi *in vitro* in molti tipi di cellule hanno dimostrato le capacità degli antociani di inibire l'espressione delle proteine NF- $\kappa$ B e COX-1 e 2 (ciclossigenasi 1 e 2), oltre a varie interleuchine (Wang e Stoner, 2008).

#### **1.4.5 Proprietà anti-invecchiamento**

Grazie alla loro attività antiossidante e antiradicalica, i polifenoli sono utili nel prevenire il danneggiamento dei tessuti del sistema nervoso centrale.

Balu *et al.* (2006) riportano che il supplemento di estratto di semi d'uva (100 mg per kg di peso corporeo) in ratti per 30 giorni inibisce l'accumulo di danni ossidativi legati all'invecchiamento nel DNA di tessuti neurali.

Studi recenti hanno dimostrato che il resveratrolo, mediante l'inibizione della NADPH ossidasi, può esercitare un ruolo neuroprotettivo contro ischemia e disturbi neurodegenerativi (Markus e Morris, 2008; Zhang *et al.*, 2010).

L'epigallocatechina gallato (EGCG) in modelli animali ha dimostrato di esercitare un ruolo protettivo verso la neurotossina MPTP (N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina), un induttore della malattia di Parkinson. L'EGCG protegge inoltre i neuroni attivando varie vie di comunicazione cellulare che coinvolgono le chinasi MAP, fondamentali per la sopravvivenza cellulare (Pandey e Rizvi, 2009).

#### **1.4.6 Proprietà antimicrobiche**

Gli estratti polifenolici vegetali hanno dimostrato potenziali attività antibatteriche, antifungine e antivirali, confermando la possibile applicazione di questi composti come conservanti naturali nei cibi (Xia *et al.*, 2010).

I polifenoli dell'uva e del vino hanno dimostrato attività antimicrobica verso specifici ceppi di batteri, quali *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* nei quali provocano la distruzione della parete batterica. Il resveratrolo presenta una forte attività antifungina e antibatterica verso vari patogeni umani e batteri Gram-positivi (Yu e Ahmedna, 2013).

#### **1.4.7 Metabolismo e biodisponibilità dei polifenoli**

L'assunzione di polifenoli da fonti quali frutta, bevande, verdura e legumi è largamente influenzata da abitudini e preferenze alimentari individuali; si stima che l'assunzione di polifenoli giornaliera sia variabile tra i 500-1.000 mg. Anche se il consumo di polifenoli dalla dieta è elevato, tali composti sono metabolizzati velocemente ed il loro assorbimento nel tratto digestivo è basso, variabile tra il 2% e il 20%, e quantitativi minimi di polifenoli sono stati ritrovati nel plasma.

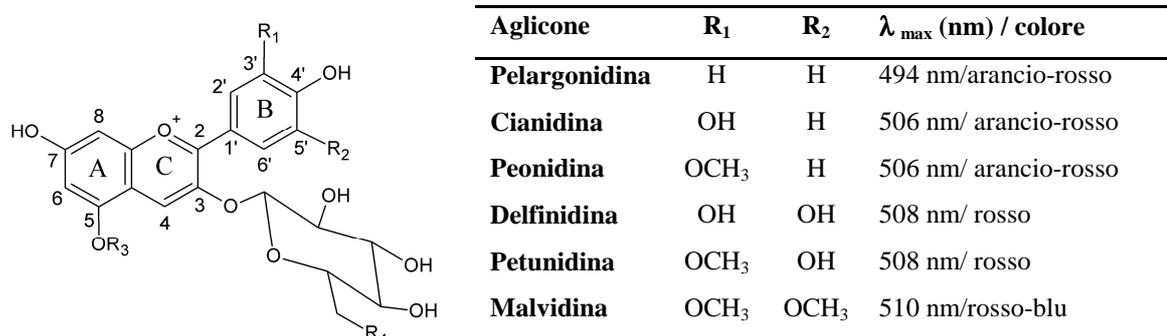
La concentrazione di composti bioattivi, e di conseguenza il loro assorbimento, possono essere significativamente aumentati mediante l'assunzione di supplementi dietetici ed alimenti arricchiti con polifenoli. Ciò comporta però un accresciuto rischio derivante da concentrazioni troppo elevate di polifenoli che da antiossidanti possono iniziare un processo di auto-ossidazione e comportarsi da pro-ossidanti, cioè iniziare e favorire il processo di ossidazione (Martin e Appel, 2010).

Numerosi studi epidemiologici hanno dimostrato che basse concentrazioni di polifenoli sembrano essere adeguate per esercitare una forte attività protettiva antiossidante *in vivo*; quindi l'aggiunta di polifenoli specifici o in combinazione con altri dovrebbe essere strettamente controllata per limitare il consumo ad una concentrazione in cui sono stati dimostrati effetti benefici e la mancanza di effetti nocivi (Martin et Appel, 2010; Manach *et al.*, 2004; Shahidi e Naczk, 2003).

## 1.5 Gli antociani

Gli antociani sono i pigmenti naturali responsabili delle colorazioni rosse, blu e viola di frutta, piante e fiori. In natura sono noti più di 600 antociani la cui funzione è quella di attrarre gli insetti, facilitando il processo di impollinazione e dispersione dei semi o di proteggere le cellule delle piante dai danni provocati dalla luce UV (He e Giusti, 2010). Gli antociani sono presenti non solo nei vacuoli delle cellule della buccia di uve rosse ma anche nelle foglie, quando la vite è alla fine del proprio ciclo vegetativo (arrossamento autunnale) (Ribéreau-Gayon, 1998).

La molecola degli antociani è costituita da due anelli benzenici uniti da un eterociclo ossigenato, insaturo e dotato di carica positiva, lo ione flavilio (**Figura 1.11**). Nelle uve si possono trovare sei comuni antociani presenti con diversi tipi di glicosilazione e acilazione: cianidina, peonidina, malvidina, delphinidina e petunidina e tracce di pelargonidina. Gli antociani sono raramente presenti in forma di agliconi, a causa della loro bassa stabilità; più spesso, infatti, i gruppi ossidrilici degli antociani agliconi sono legati a zuccheri per mezzo di legami glicosidici a loro volta esterificati da acidi organici alifatici (malonico, acetico, malico, succinico o ossalico) o aromatici (acido *p*-cumarico, caffeico, ferulico, sinapico, gallico o *p*-idrossibenzoico) al gruppo ossidrilico sul carbonio 6 o, meno frequentemente, sul carbonio 4 dello zucchero (Giusti e Wrolstad, 2003).



**Figura 1.11:** Struttura chimica degli antociani; R<sub>3</sub>=H, glucosio; R<sub>4</sub>=H, acetil, *p*-idrossicinnamil, caffeoil (Giusti *et al.*, 2003).

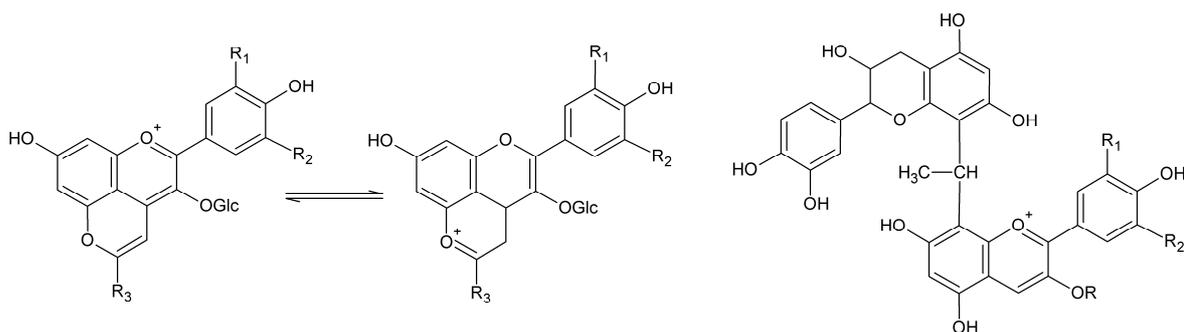
Nella forma eterosidica, cioè quando sono legate ad una molecola di glucosio, le antocianidine vengono denominate antocianine (es. malvidina-3-O-glucoside: oenina; malvidina-3,5-diglucoside: malvina). Il glucosio e il ramnosio sono gli zuccheri più comunemente legati all'aglicone ma si possono trovare altri zuccheri, quali galattosio e arabinosio, o disaccaridi (rutinosio, sambubiosio) (He e Giusti, 2010). Il diverso numero e i vari tipi di sostituenti acilici e glicosidici legati alle antocianidine, sono responsabili della grande variabilità di strutture chimiche antocianiche presenti in natura.

Sia la glicosilazione che l'acilazione influenzano le proprietà fisiche e chimiche degli antociani, in quanto modificano la dimensione e la polarità della molecola; ad esempio, la glicosilazione aumenta la solubilità in soluzione acquosa, l'acilazione la diminuisce.

A causa dell'esteso gruppo cromoforo costituito da otto doppi legami coniugati e una carica positiva, gli antociani sono intensamente colorati in condizioni acide, con due massimi di assorbimento tra i 465 nm e i 550 nm nel visibile e tra i 270 nm e i 280 nm nell'UV (He e Giusti, 2010). La sostituzione con gruppi ossidrilici e metossilici dell'anello B causa negli antociani uno spostamento batocromo del massimo di assorbimento verso lunghezze d'onda maggiori, cioè verso il color malva (blu shift) (ved. **Figura 1.11**). La glucosilazione causa, invece, un effetto ipsocromo, cioè lo spostamento della lunghezza d'onda massima verso lunghezze d'onda minori (red shift).

Tuttavia ciò che contribuisce maggiormente al colore nei vini è il fenomeno della copigmentazione, che consiste nell'interazione tra gli antociani ed una varietà di composti (copigmenti) quali flavonoidi, polifenoli, alcaloidi, amminoacidi, acidi organici e gli antociani stessi. La copigmentazione provoca l'aumento dell'intensità del colore (effetto ipercromico) e lo spostamento del massimo dell'assorbanza verso lunghezze d'onda maggiori (effetto batocromico) (Davies e Mazza, 1993; Malien-Aubert *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2005).

Durante il periodo di invecchiamento dei vini rossi si osserva un cambiamento del colore da rosso a bruno aranciato, attribuito alla progressiva scomparsa di antociani ed alla formazione di pigmenti più complessi quali ad esempio le vitisine, la cui struttura contiene due forme flavilio mesomere, e la formazione di legami con flavan-3-oli attraverso una molecola di acetaldeide (**Figura 1.12**). I primi derivano dalla cicloadizione sul C4 ed il gruppo ossidrilico nella posizione C5 degli antociani di sostanze quali 4-vinilfenolo, acido piruvico, acetaldeide o addotti etil-flavanoli; i secondi derivano dalla reazione di sostituzione elettrofila dell'acetaldeide, prodotta dal metabolismo dei lieviti e dall'ossidazione dell'alcol etilico, sulle posizioni elettronegative C6 o C8 dei flavanoli dando origine a dimeri legati da un ponte etilico (Santos-Buelga e Scalbert, 2000).



**Figura 1.12:** Forme mesomere della vitisina (a sinistra) e prodotti di condensazione tra antociani e flavanoli mediata dall'acetaldeide (a destra).

Queste reazioni di condensazione che coinvolgono catechine, proantocianidine e antociani, portano alla formazione di pigmenti polimerici ad alto peso molecolare relativamente stabili che possono parzialmente precipitare durante il periodo di invecchiamento del vino. Essi sono associati ad un cambiamento nella qualità del vino, quali la diminuita astringenza e lo spostamento del massimo di assorbimento della

lunghezza d'onda. Somers (1971) afferma che questi composti siano responsabili di più del 50% della densità del colore nel primo anno e di più dell'80% dopo 10 anni di invecchiamento dei vini rossi.

Nello studio dei profili delle uve, la composizione antocianica, come anche quella di flavonoli, è peculiare e caratteristica della varietà ed è utilizzata come importante parametro tassonomico per la classificazione delle varietà. Infatti, sebbene nelle diverse annate possano cambiare i contenuti assoluti dei singoli composti, la composizione relativa dei singoli antociani rimane stabile e costante (Mattivi *et al.*, 2006; Ortega Regules *et al.*, 2006).

In particolare la presenza di antociani monoglucosidi e diglucosidi, cioè aventi due molecole di zucchero legate all'ossidrile sul carbonio in posizione 3 e 5, è un parametro utilizzato per distinguere specie di *V. vinifera*, che contengono solo antociani monoglucosidi, da quelle non-*V. vinifera*, quali *V. riparia*, *labrusca* e *rupestris*, che presentano anche rilevanti contenuti di antociani diglucosidi. Questo parametro è spesso utilizzato per rivelare eventuali adulterazioni nel vino, soprattutto nei paesi della Comunità Europea (Regolamento CE n. 479/2008) in cui è vietata la produzione e la commercializzazione di prodotti derivati da uve di varietà non-*V. vinifera*.

Inoltre, in generale nei profili antocianici delle varietà *V. vinifera* è dominante la malvidina monoglucoside, mentre nelle varietà non-*V. vinifera* cresce la proporzione di composti derivati della delphinidina e della cianidina (Liang *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2009), e la presenza di antociani acilati è maggiore nelle uve di *V. vinifera*, anche se in alcune varietà (es. Sangiovese) è scarsa o assente.

### **1.5.1 Utilizzi industriali degli antociani**

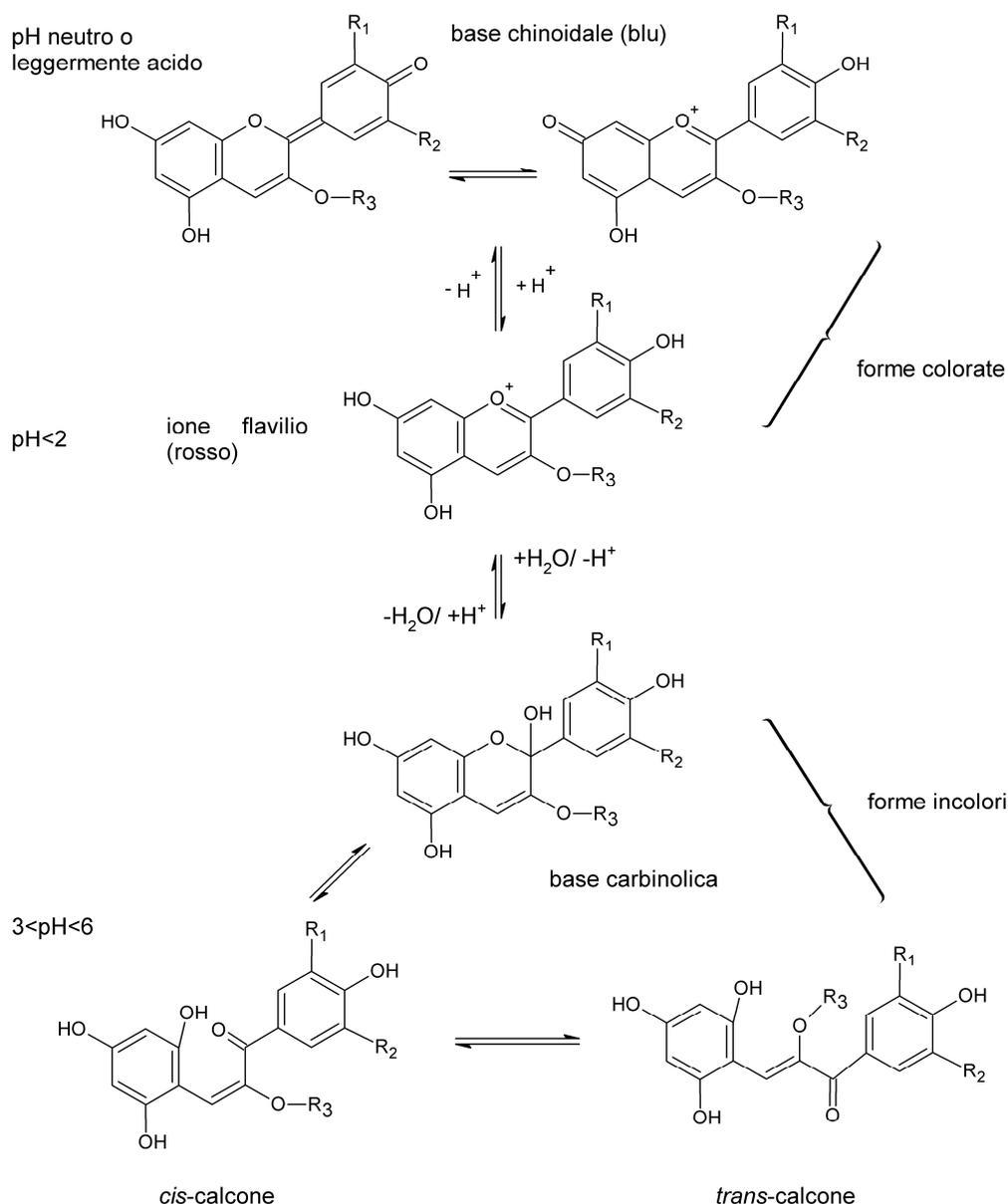
Gli antociani sono sostanze colorate idrosolubili ampiamente diffuse in natura che, anche per le loro proprietà antiossidanti, sono utilizzate come additivi nei cibi (E163) in alternativa ai coloranti sintetici, quali ad esempio il rosso allura (E129) che provoca effetti nocivi sulla salute umana.

I coloranti antocianici possono essere estratti con diversi solventi (acqua solforata o acidulata, etanolo, metanolo, anidride carbonica) da diversi materiali di origine naturale (bucce d'uva, ribes, mirtilli, mais, cavoli, carote, ecc.), sotto forma di concentrati liquidi o polveri essiccate. Gli estratti antocianici più abbondanti ed economici, poiché ottenuti da un prodotto di scarto dell'industria enologica, sono ottenuti dalla vinaccia di uve rosse (enocianina). Commercializzata fin dal 1879, l'enocianina è utilizzata in bevande acide (sciropi, bevande alcoliche e non), cibi (marmellate, confetture, prodotti caseari, dolci, gelati), prodotti farmaceutici e nei vini rossi per aumentarne il colore nei paesi dove questo è permesso (Prodanov *et al.*, 2005; Braga *et al.*, 2002).

Il principale problema nell'utilizzo degli antociani come coloranti nell'industria alimentare è rappresentato dalla loro non elevata stabilità e dal mantenimento del colore, che dipende dalla composizione del mezzo (pH, SO<sub>2</sub>), dalla struttura molecolare e dalle

altre sostanze presenti (Malién-Aubert *et al.*, 2001). Anche il processo di lavorazione, il tempo di conservazione e la matrice del cibo a cui sono addizionati influenzano la stabilità del colore.

In seguito a variazioni di pH in soluzione acquosa la struttura molecolare degli antociani subisce trasformazioni reversibili e si hanno tre diverse forme tra loro in equilibrio: il catione flavilio rosso, la base chinoidale blu e il calcone incolore (**Figura 1.13**).



**Figura 1.13:** Schema di interconversione strutturale degli antociani monoglucosidi in funzione del pH.  $R_1$ ,  $R_2$ : H, OH o  $OCH_3$ ;  $R_3$ : O-glucoside (He e Giusti, 2010; Malién-Aubert *et al.*, 2001).

A valori di pH molto acidi (inferiore a 2), gli antociani si trovano principalmente nella forma di cationi flavilio, ed il colore varia da arancio a rosso-blu a seconda della

struttura chimica. Aumentando il pH (tra 3 e 6) si osserva una decolorazione causata dall'idratazione dello ione flavilio al C-2 e la formazione della base carbinolica incolore che dà ulteriormente origine alla forma con l'anello aperto, il calcione. In condizioni neutre o leggermente acide avviene la deprotonazione del catione flavilio per dare origine alla base anionica chinoidale, di colore viola-blu (He e Giusti, 2010).

A causa dell'instabilità degli antociani ai cambiamenti di pH la loro addizione nei cibi è limitata ad alimenti acidi ( $\text{pH} < 3$ ) per assicurare la predominanza della forma del catione flavilio.

Giusti e Wrolstad (2003) riportano che l'acilazione negli antociani protegge lo ione flavilio dall'attacco nucleofilo dell'acqua, impedendo il passaggio alle forme incolore ed aumentando la stabilità della molecola ai cambiamenti di pH: in questo modo, è possibile mantenere la colorazione anche in soluzioni debolmente acide, neutre e leggermente basiche. Inoltre gli antociani polimeri sono più stabili dei corrispondenti monomeri e l'aggiunta a soluzioni antocianiche di anche piccole quantità di flavonoidi, acidi organici, alcaloidi, amminoacidi, polisaccaridi o ioni metallici, noti come copigmenti, provoca un aumento dell'intensità del colore (effetto ipercromico) e della stabilità chimica (Prodanov *et al.*, 2005). La presenza di catechine e proantocianidine provoca invece una diminuzione della stabilità del colore, oltre ad un'indesiderata sensazione di amaro e astringenza nel prodotto finale mentre un'alta concentrazione di proteine e polisaccaridi provoca la formazione di torbidità (Malien-Aubert *et al.*, 2001 e 2002; Prodanov *et al.*, 2005).

## 1.6 L'olio di vinaccioli

I semi dell'uva rappresentano la parte dell'acino con il più elevato potenziale nutrizionale e nutraceutico, poiché, oltre al loro utilizzo come antiossidanti per l'elevata concentrazione polifenolica, sono anche fonte di un olio vegetale dalle apprezzate caratteristiche.

I vinaccioli rappresentano dal 2 al 4% circa del peso complessivo dell'acino e con una produzione mondiale di 69 milioni di tonnellate d'uva (FAOSTAT, 2011) sono circa 3 milioni le tonnellate di semi che vengono scartate annualmente (Lachman *et al.*, 2013). Essi rappresentano la parte più importante della vinaccia (38-52% di materia secca) (Maier *et al.*, 2009) e sono costituiti principalmente dal 40% (in peso) di fibre, 16% di olio, 11% di proteine, 7% di composti fenolici quali tannini, zuccheri, minerali e altre sostanze (de Campos *et al.*, 2008).

L'alto contenuto di acidi grassi insaturi (circa il 90%) e di vitamina E, ed il basso contenuto di colesterolo, rendono l'olio di vinaccioli una valida alternativa agli oli culinari tradizionali. L'olio è inoltre caratterizzato da un elevato punto di fumo (216 °C) e, quando ottenuto per spremitura a freddo, da un piacevole aroma vinoso e fruttato che lo rende adatto all'uso culinario e per frittture (Pardo *et al.*, 2009).

L'acido linoleico rappresenta il 70-75% degli acidi grassi totali, ed è un acido grasso essenziale con un'importante attività biologica utile nella prevenzione di problemi cardiocircolatori e dell'arteriosclerosi, per la sua capacità di abbassare il colesterolo LDL (Low Density Lipoprotein) e di aumentare i livelli di colesterolo HDL (High Density Lipoprotein) (Wijendran *et al.*, 2004). Il suo contenuto nell'olio di vinaccioli è superiore a quello nell'olio di cartamo (70-72%), di girasole (60-62%) e mais (52%) (Tangolar *et al.*, 2009) (**Tabella 1.2**).

	<i>Girasole</i>	<i>Cartamo</i>	<i>Vinaccioli</i>
LLL	24.5	43.3	25.8
OLL	21.4	19.8	21.5
LLP	12.1	13.6	15.4
OLO	7.3	4.8	8
SLL	7.1	2.9	5.4
OLP	6.3	3.9	8.9

**Tabella 1.2:** Composizione percentuale dei principali trigliceridi dell'olio di vinaccioli e di altri oli ad alto contenuto di acidi grassi insaturi, in particolare acido linoleico (Lísa e Holčapek, 2008).

L'alto contenuto di acidi grassi insaturi (che raggiunge circa il 90%) è responsabile dell'alto valore nutritivo dell'olio di vinaccioli, ma anche dello stress ossidativo che l'olio subisce soprattutto nelle prime fasi di estrazione, quando enzimi e microrganismi presenti nel materiale di fondo derivante dalla pressatura ne causano l'alterazione. Per questo motivo la produzione dell'olio viene eseguita sui semi seccati all'aria immediatamente dopo la separazione dal succo e dalle bucce dell'uva; l'olio deve poi essere purificato per filtrazione o sedimentazione al fine di impedire la degradazione microbica.

Oltre che per spremitura a freddo, è possibile eseguire l'estrazione con solventi chimici (esano, etere di petrolio, ecc.) seguita da rettifica; in questo caso però l'olio risulta di sapore e odore neutro e anche le sostanze antiossidanti come tocotrienoli e vitamina E diminuiscono drasticamente.

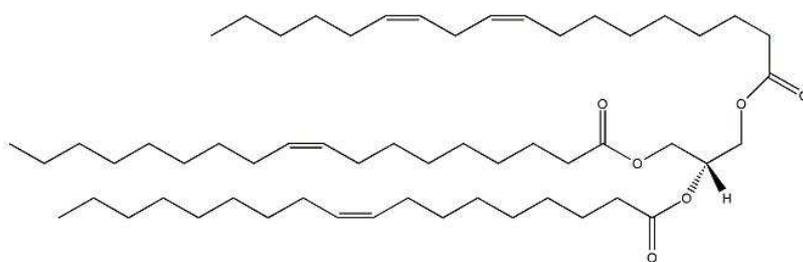
E' possibile effettuare l'estrazione anche utilizzando CO<sub>2</sub> supercritica: questo metodo ha il vantaggio di non lasciare indesiderati residui di solvente nell'olio e di utilizzare anidride carbonica, che è un gas economico, facilmente reperibile, non tossico e non infiammabile. E' necessario però ottimizzare i parametri di estrazione, cioè temperatura, pressione, dimensione dei granuli dei semi, velocità di flusso, rapporto CO<sub>2</sub>/massa dei semi (Beveridge *et al.*, 2005).

L'olio di vinaccioli trova utilizzo anche nel settore farmaceutico e cosmetico per le sue proprietà emollienti ed idratanti.

### 1.6.1 I lipidi nell'olio di vinaccioli

I lipidi che costituiscono gli olii vegetali si trovano prevalentemente sotto forma di trigliceridi, detti anche triacilgliceroli. I trigliceridi sono i prodotti dell'esterificazione del glicerolo, un alcol triossidrilico, con tre molecole di acidi grassi uguali (trigliceridi semplici) o che differiscono tra loro (trigliceridi misti). Gli acidi grassi esterificati al glicerolo possono avere diverse lunghezze di catena e diversi gradi di insaturazione (**Figura 1.14**).

Nell'olio di vinaccioli i principali acidi grassi costituenti i trigliceridi sono quattro: acido linoleico, L, (*cis*-9, *cis*-12-octadecadienoico, C18:2), acido oleico, O, (*cis*-9-octadecenoico, C18:1), acido palmitico, P, (acido esadecanoico, C16:0), stearico, S, (acido octadecanoico, C18:0) ed in quantità inferiore (1,8 % degli acidi grassi totali) acido linolenico, Ln, (*cis*-9, *cis*-12, *cis*-15-octadecatrienoico, C18:3) (Crews *et al.*, 2006).



**Figura 1.14:** Esempio della struttura chimica di un trigliceride: dioleoil-linoleoil-gliceride (LOO).

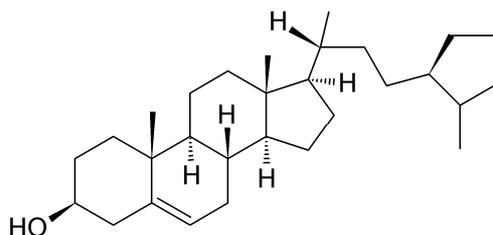
I principali trigliceridi presenti nell'olio di semi d'uva sono: trilinoleina, LLL, il più abbondante (37% dei trigliceridi totali), seguito da trilinoleoilpalmitina, LPL (21,4%), dilinoleoiloleina, LOL (15,1%), dioleoilinoleina, OLO (11%), linoleoiloleoilpalmitina, LOP (5,3%) e linoleoilstearoilpalmitina, LSP (4%) (Bail *et al.*, 2008). L'acido linoleico, presente in ciascun trigliceride, è l'acido grasso presente in maggiore quantità (70%),

seguito dall'oleico, 15%, palmitico, 10%, e stearico, 5 % (Crews *et al.*, 2006; Pardo *et al.*, 2009).

Gli oli di semi forniscono inoltre una buona quantità di componenti insaponificabili, utilizzabili come ingredienti attivi nella prevenzione o nel controllo dei processi degenerativi. La parte non trigliceridica negli oli di semi è costituita principalmente da tocoferoli e tocotrienoli (collettivamente noti come tocoli o vitamina E), fenoli e flavonoidi, steroli, fosfolipidi, carotenoidi e alcoli triterpenici (Shahidi, 2000).

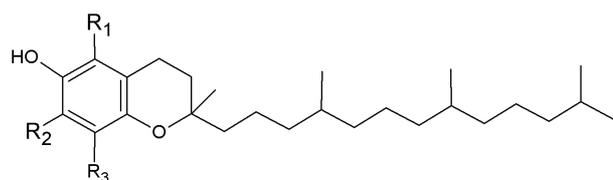
I fitosteroli sono alcoli steroidei naturalmente presenti negli oli vegetali che svolgono anche questi un ruolo importante nella riduzione dell'LDL, essendo competitori dei recettori NPC1L1 del colesterolo nel lumen intestinale (Chen *et al.*, 2011).

L'olio di vinaccioli è caratterizzato da un basso contenuto di colesterolo (0.1-1.0% degli steroli totali) mentre gli steroli totali sono in concentrazioni variabili tra 2.580 e 11.250 mg/kg (Rubio *et al.*, 2009; Crews *et al.*, 2006; Pardo *et al.*, 2009); fra tutti il  $\beta$ -sitosterolo è il più abbondante (fino a più del 70% degli steroli totali) (**Figura 1.15**), seguito da stigmasterolo (11-14%) e campesterolo (7-11%) (Crews *et al.*, 2006; Pardo *et al.*, 2009).

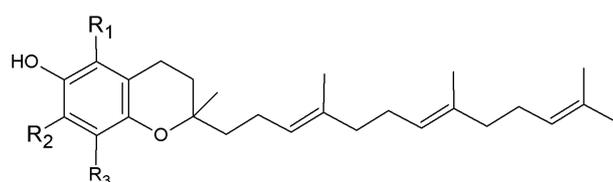


**Figura 1.15:** Struttura chimica del  $\beta$ -sitosterolo.

I tocoli sono composti lipofili ampiamente diffusi nei tessuti vegetali e negli oli da essi derivati e possiedono l'attività biologica della vitamina E. Tocoferoli e tocotrienoli sono classificati in  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  a seconda del numero e delle posizioni dei gruppi metilici sull'anello cromano (**Figura 1.16**). Inoltre, la catena laterale isoprenoide è satura nei tocoferoli e insatura nei tocotrienoli. Tra i tocoli, l' $\alpha$ -tocoferolo è la sostanza con maggiore attività vitaminica, mentre le altre forme di tocoferoli possiedono un'attività biologica inferiore, nell'ordine  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$  (Shahidi, 2000; Baydar *et al.*, 2006).



Tocoferoli



Tocotrienoli

	$R_1$	$R_2$	$R_3$
$\alpha$	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\beta$	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
$\gamma$	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
$\delta$	H	H	CH <sub>3</sub>

**Figura 1.16:** Strutture chimiche di tocoferoli e tocotrienoli.

Nell'olio di vinaccioli i tocoli predominanti sono  $\gamma$ -tocotrienolo,  $\alpha$ -tocotrienolo e  $\alpha$ -tocoferolo. Secondo risultati riportati in letteratura, la concentrazione dei tocoli è variabile a seconda della cultivar d'uva e del metodo di estrazione e la quantità di tocotrienoli (l'isomero  $\gamma$  è il più abbondante) è superiore a quella dei tocoferoli (**Tabella 1.3**).

$\alpha$ - tocoferolo	$\alpha$ - tocotrienolo	$\gamma$ - tocotrienolo	Tocoli totali	Metodo di estrazione	Rif.
77.3-225.4	137.2-264.3	74.8-322.2	394-755	Pressatura a freddo	Demirtas <i>et al.</i> , 2013
86-244	69-319	499-1575	749-2192	Etere di petrolio	Fernandes <i>et al.</i> , 2013
14-229	nd-352	nd-785	63-1208	Esano	Crews <i>et al.</i> , 2006

**Tabella 1.3:** Contenuti in mg/kg di tocoli nell'olio di vinaccioli riportati in letteratura.

Anche se i vinaccioli sono ricchi di composti polifenolici, come le proantocianidine caratterizzate da una forte attività antiradicalica, la quantità di queste sostanze nell'olio è limitata, a causa della natura polare della loro struttura chimica (Pardo *et al.*, 2009; Nakamura, 2003).

Maier *et al.* (2009) riportano che nell'olio non raffinato, in cui sono presenti sedimenti, il contenuto di polifenoli, principalmente acidi fenolici e flavonoidi, raggiunge i 359.3 mg/kg, mentre in seguito a centrifugazione tale quantità diminuisce a 2.9 mg/kg, diventando trascurabile. Perciò anche i sedimenti e i residui della lavorazione dell'olio possono rappresentare una ricca fonte di sostanze antiossidanti.

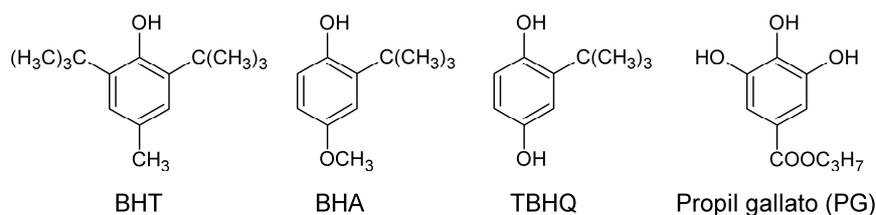
## 1.7 Il potenziale antiossidante degli estratti di vinaccioli

I polifenoli e i flavonoidi giocano un ruolo importante nella prevenzione di disturbi cardiovascolari e di malattie degenerative e tale proprietà appare correlata all'attività antiossidante che questi composti possiedono *in vivo* e *in vitro*.

L'uva ed in particolare i vinaccioli sono una ricca fonte di sostanze benefiche tra cui flavanoli monomeri (catechina ed epicatechina) e dimeri, proantocianidine oligomere e polimere e acidi fenolici. La capacità di catturare i radicali liberi e di inibire l'ossidazione dei lipidi di questi composti hanno portato allo studio di possibili applicazioni industriali in qualità di nutraceutici, alimenti funzionali e conservanti.

I nutraceutici sono supplementi dietetici contenenti una forma concentrata di componenti bioattivi estratti da alimenti e presenti in una matrice non alimentare (pillole, capsule, polveri, fiale, ecc.). Lo scopo del loro utilizzo è di apportare benefici alla salute mediante l'assunzione di dosi superiori a quelle ottenibili dal normale consumo alimentare ma più sicure rispetto ai farmaci, che spesso provocano indesiderati effetti collaterali (Gil-Chávez *et al.*, 2013). I cosiddetti alimenti funzionali sono in apparenza simili ai cibi convenzionali ma contengono ingredienti aventi la dimostrata capacità di apportare benefici alla salute umana, sia migliorando le condizioni fisiche generali che diminuendo il rischio di manifestarsi di malattie (Siró *et al.*, 2008).

Le industrie alimentari per stabilizzare i lipidi nei cibi e quindi prevenire l'alterazione e aumentare il periodo di conservazione dei prodotti alimentari utilizzano come antiossidanti e conservanti composti fenolici sintetici, quali butilidrossitoluene (BHT), butilidrossianisolo (BHA), terbutil idrochinone (TBHQ) e alchil gallati (**Figura 1.17**) che hanno dimostrato di possedere deboli effetti cancerogeni e tossici a concentrazioni elevate (Shahidi, 2000).



**Figura 1.17:** Composti polifenolici sintetici comunemente utilizzati come antiossidanti nell'industria alimentare.

Perciò l'interesse dei consumatori ed i regolamenti governativi si sono rivolti verso la ricerca di ingredienti alternativi, soprattutto polifenoli di origine naturale che sono antiossidanti più sicuri e con proprietà benefiche aggiuntive.

L'elevata capacità antiossidante degli estratti di vinaccioli è dovuta alla presenza di flavanoli e di proantocianidine oligomere a cui sono state attribuite proprietà antiradicaliche, antivirali e antimicrobiche, anticancro, antinfiammatorie e protettive del sistema cardiovascolare. I meccanismi alla base della loro attività antiossidante includono la cattura di specie radicaliche, la chelazione di metalli di transizione e l'inibizione di

enzimi (Cos *et al.*, 2003). In numerosi studi è stato trovato che l'attività antiossidante delle proantocianidine aumenta fino ai trimeri per poi decrescere con ulteriore polimerizzazione; anche l'introduzione di un'unità di acido gallico esterificato in posizione 3 aumenta la capacità di catturare i radicali liberi, mentre la glucosilazione la diminuisce (Plumb *et al.*, 1998; Lizarraga *et al.*, 2007).

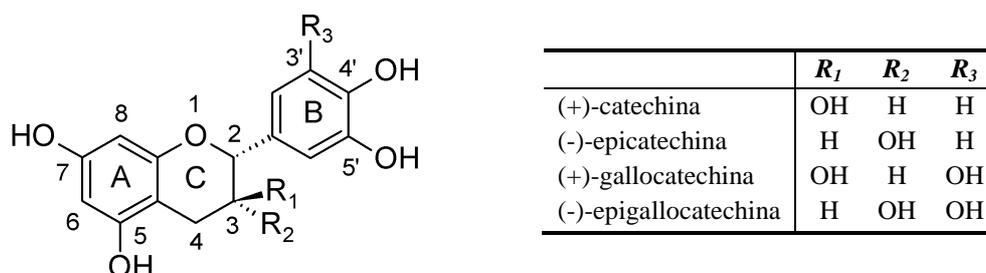
Lo stress ossidativo è implicato nell'insorgere del cancro e di varie malattie degenerative, e flavanoli e proantocianidine agiscono mediante la regolazione dei meccanismi di apoptosi cellulare. Le proantocianidine proteggono inoltre il sistema cardiovascolare inibendo la perossidazione dei lipidi, l'aggregazione piastrinica e la fragilità capillare, e stimolando la produzione da parte delle cellule endoteliali dell'ossido nitrico (o EDR, endothelium-derived relaxing factor) (Cos *et al.*, 2003).

Gli estratti di semi d'uva contenenti catechina, epicatechina e proantocianidine oligomere, sono comunemente commercializzati come supplementi (es. Leucoselect®, ActiVin™, ActiVin Plus™ Resveratrol, exGrape®) grazie ai benefici apportati dalle loro proprietà antiossidanti e antiradicaliche (Nassiri-Asl e Hosseinzadeh, 2009). La loro attività antibatterica ed antimicrobica potrebbe permetterne l'utilizzo anche in qualità di conservanti per prevenire il deterioramento dei cibi (Baydar *et al.*, 2004; Adámez *et al.*, 2012; Yu e Ahmedna, 2013; Peng *et al.*, 2010).

Gli stessi vinaccioli, caratterizzati da un elevato contenuto di fibre (40%) oltre che di polifenoli, in seguito ad essiccazione e macinazione, danno una farina dalle notevoli proprietà antiossidanti utilizzabile in alimenti fortificati quali carne, pane ed oli ad elevato contenuto di acidi grassi insaturi (Lutterodt *et al.*, 2011; Özvural e Vural, 2011; Ross *et al.*, 2011).

### 1.7.1 I tannini dell'uva e del vino

Le proantocianidine, o tannini condensati, sono oligomeri e polimeri costituiti da unità di flavan-3-oli (**Figura 1.18**). Il termine 'proantocianidina' deriva dalla proprietà di questi composti di liberare antocianidine quando sottoposti a trattamento caldo in acido minerale; il tipo di antociano rilasciato determina il nome del sottogruppo (proantocianidine, prodelfinidine, propelargonidine, ecc.).



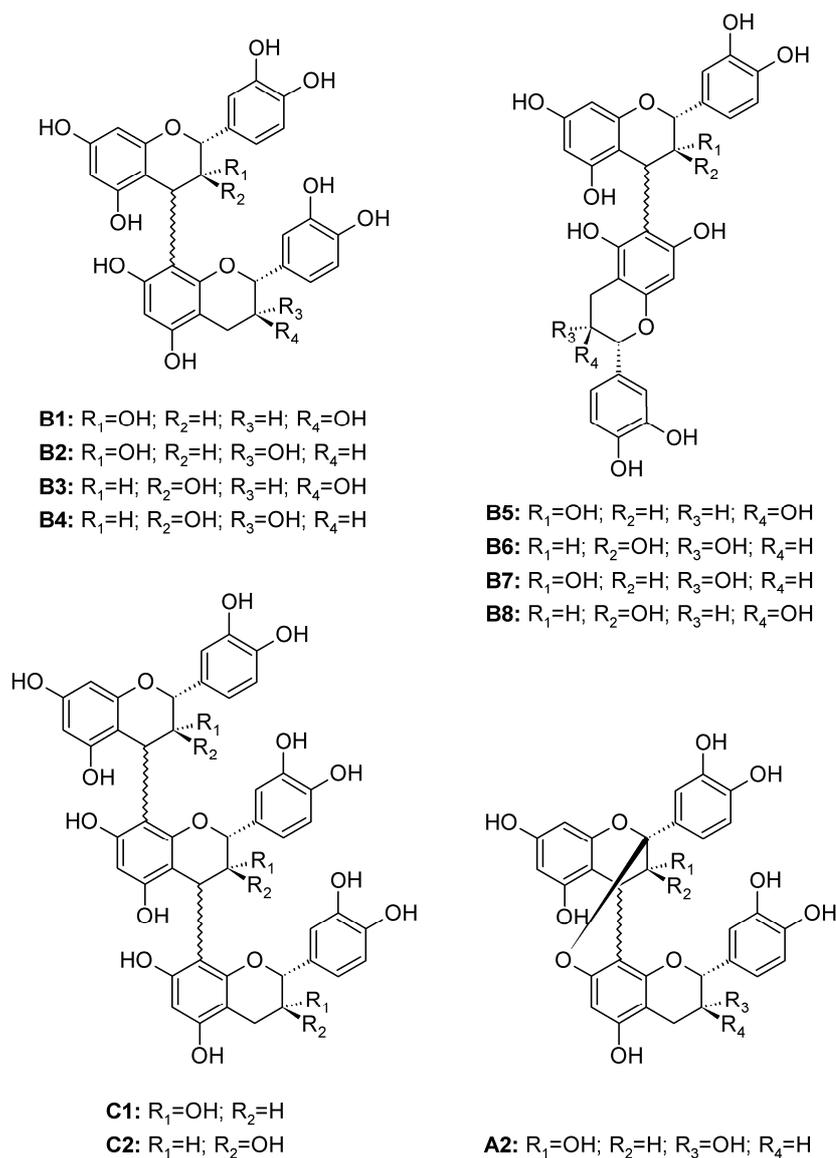
**Figura 1.18:** Struttura chimica dei flavan-3-oli.

Le proantocianidine sono suddivise in vari sottogruppi a seconda del numero di gruppi ossidrilici presenti negli anelli A e B dello scheletro del flavonoide. Le procianidine (aventi sostituzione 3',4'-diidrossi nell'anello B) e le prodelfinidine (sostituzione 3',4',5'-triidrossi) sono le più diffuse negli alimenti (Santos-Buelga e Scalbert, 2000).

Le proantocianidine si distinguono anche a seconda della stereochimica dei carboni asimmetrici C2 e C3 dell'eterociclo: il legame C2-C3 può essere presente sia in forma *trans* (2R, 3S) che *cis* (2R, 3R) come nella (+)-(gallo)catechina ed (-)-epi(gallo)catechina rispettivamente.

Le unità monomeriche sono legate da legame diretto carbonio-carbonio, detto interflavanico, C4-C8 o C4-C6; queste proantocianidine vengono definite di tipo B (o B-type), nel caso dei dimeri, o di tipo C, nel caso dei trimeri. Nelle proantocianidine di tipo A (o A-type) oltre ai legami interflavanici è presente anche un legame etero, tra i carboni C2-C7 o C2-C5, derivante da reazione ossidativa intramolecolare (Kondo *et al.*, 2000) (**Figura 1.19**).

Le proantocianidine di tipo A non sono molto diffuse in natura e sono caratteristiche solo di alcuni frutti, quali litchi e mirtilli rossi, ai quali è stata attribuita la capacità di prevenire infezioni del tratto urinario (Xu *et al.*, 2010; Foo *et al.*, 2000), oltre a prugne, avocado, arachidi e spezie quali curry e cannella (Gu *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2003a). La presenza di proantocianidine di tipo A, anche in forma galloilata, è stata recentemente determinata nei vinaccioli dell'uva (Passos *et al.*, 2007).



**Figura 1.19:** Struttura chimica di proantocianidine dimere e trimere di tipo B e di dimeri di tipo A.

Le proantocianidine si trovano nelle parti solide dell'uva (bucce, semi, raspi) ma sono state determinate, in quantità minori, anche nella polpa (Mané *et al.*, 2007). La quantità, la struttura, il grado di polimerizzazione e di galloilazione delle proantocianidine varia a seconda della parte dell'acino in cui sono localizzate.

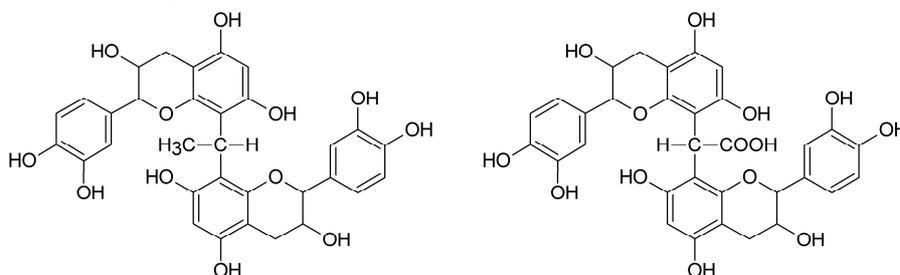
Nei vinaccioli sono presenti solo procianidine costituite da oligomeri e polimeri di unità (+)-catechina, (-)-epicatechina e (-)-epicatechina-3-O-gallato (Ricardo da Silva *et al.*, 1991; Prieur *et al.*, 1994; Reed *et al.*, 2005); nelle bucce e nei raspi dell'uva vi sono sia procianidine che prodelfinidine e si trovano quindi anche (+)-gallocatechina, (-)-epigallocatechina e (-)-epigallocatechina-3-O-gallato (Souquet *et al.*, 1996; Souquet *et al.*, 2000).

Le proantocianidine dei vinaccioli hanno un grado di polimerizzazione medio (calcolabile mediante tioacidolisi) pari a 10 con lunghezza di catena compresa tra 2 e 20 unità, mentre polimeri tra 2 e 30 unità sono state determinate nei raspi. Le proantocianidine

delle bucce presentano un grado di polimerizzazione medio superiore, pari a 30, con un numero di subunità compreso tra 2 e 80, ed una minore proporzione di subunità galloilate rispetto ai semi (Prieur *et al.*, 1994; Souquet *et al.*, 1996; Labarbe *et al.*, 1999; Souquet *et al.*, 2000; Monagas *et al.*, 2003). Nel vino la concentrazione di proantocianidine dipende, oltre che dal contenuto di iniziale nell'uva, anche dalla tecnica di vinificazione, e sono state determinate sia procianidine che prodelfinidine con grado di polimerizzazione compreso tra 6.4 e 15.6 (Fulcrand *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001; Monagas *et al.*, 2003).

Durante la fermentazione, la struttura dei tannini estratti dall'uva subisce processi di ossidazione sia enzimatica che chimica che coinvolgono, oltre agli antociani, anche altre molecole quali acetaldeide, acido piruvico e gliossalico. L'acetaldeide è prodotta durante la fermentazione sia per via enzimatica che per accoppiamento ossidativo con i polifenoli auto-ossidati quali catechine o proantocianidine, l'acido gliossalico (HCO-COOH) deriva dall'ossidazione dell'acido tartarico dell'uva, mentre l'acido piruvico deriva dal metabolismo dei lieviti.

I flavanoli in soluzione acida formano con l'acetaldeide legami a ponte etile tra le unità di flavonoidi in seguito a reazioni di sostituzione elettrofila sulle posizioni elettronegative C6 o C8 dell'anello A, mentre la condensazione tra flavanoli e acido gliossalico forma prodotti incolori contenenti un legame a ponte carbossi-metino che riarrangiano in strutture di lattone o xantilio di colore giallo/arancio aventi un massimo di assorbimento intorno a 440-460 nm (**Figura 1.20**). I prodotti di condensazione formati sono incolori quando derivati solo dai flavanoli o rosso/viola quando sono presenti anche antociani (Santos-Buelga e Scalbert, 2000).

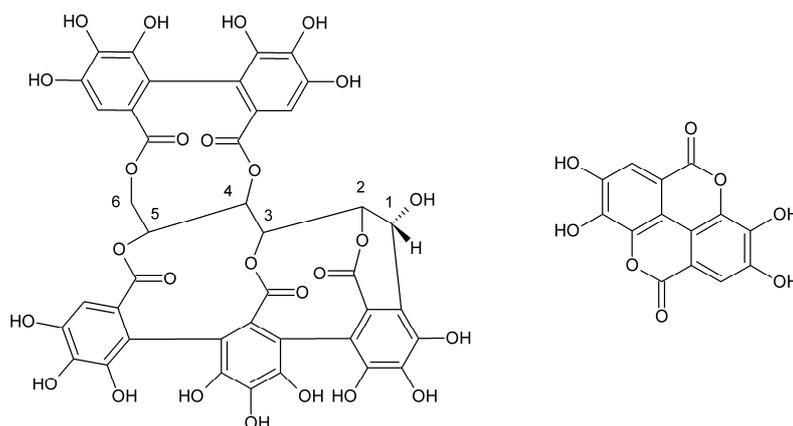


**Figura 1.20:** Prodotti di condensazione tra flavanoli mediata dall'acetaldeide (a sinistra) o dall'acido gliossalico (a destra).

Il grado di polimerizzazione e di galloilazione delle proantocianidine influenza le proprietà tanniche, cioè l'astringenza provocata dalla capacità dei tannini condensati di legarsi alle glicoproteine della saliva. La sensazione di astringenza aumenta all'aumentare del grado di polimerizzazione, mentre un crescente grado di galloilazione aumenta la sensazione di ruvidità in bocca (Vidal *et al.*, 2003).

La capacità dei tannini di interagire con le proteine formando complessi solubili o insolubili è una caratteristica comune sia delle proantocianidine, cioè dei tannini condensati, che dei tannini idrolizzabili.

I tannini idrolizzabili del vino comprendono i gallo- e gli ellagitannini, che nel primo caso sono polimeri di D-glucosio ed acido gallico e nel secondo sono polimeri di glucosio e acido gallico, ellagico e/o esaidrossidifenico. I tannini idrolizzabili, quali la vescalagina ed il suo epimero C-1 castalagina, derivano dal legno delle botti in cui il vino è fatto invecchiare e poiché sono instabili in soluzione idroalcolica sono facilmente idrolizzati ad acido gallico ed ellagico per mezzo di acidi, basi o enzimi (Jordão *et al.*, 2005; Versari *et al.*, 2012) (**Figura 1.21**).



**Figura 1.21:** Struttura chimica della vescalagina (a sinistra) e dell'acido ellagico (a destra).

Le interazioni tannino-proteina sono specifiche e dipendono da diversi fattori, quali la struttura chimica dei tannini e delle proteine, il rapporto stechiometrico tannino/proteina ed il pH. Le caratteristiche che favoriscono una forte interazione sono (Mc Rae e Kennedy, 2011):

- elevato peso molecolare sia dei tannini che delle proteine;
- struttura molecolare aperta e flessibile;
- proteine contenenti molte unità di prolina.

La precipitazione del complesso tannino-proteina è influenzata dal pH e si osserva maggiore precipitazione in prossimità del punto isoelettrico della proteina.

Il meccanismo di legame proteina-tannino è spiegato dall'insieme di interazioni idrofobiche e legami a idrogeno che intercorrono tra essi (Sarni-Manchado *et al.*, 1999; Frazier *et al.*, 2010). Per esempio è stato dimostrato che l'acido tannico, un tannino idrolizzabile con otto gruppi ossidrilici, possiede un'alta ed inusuale affinità per le proteine dovuta al fatto che ciascun gruppo gallato fornisce tre gruppi ossidrilici ed un anello benzenico che possono stabilire rispettivamente legami a idrogeno ed interazioni idrofobiche con l'albumina del siero bovino (BSA) (Hofman *et al.*, 2006; Soares *et al.*, 2007).

Allo stesso modo, la sensazione di astringenza causata dall'interazione dei tannini con le proteine della saliva umana è dovuta alla presenza di molte proteine ricche di prolina che forniscono numerosi siti idrofobici atti a formare legami con i tannini (Sarni-Manchado *et al.*, 1999; McRae e Kennedy, 2011).

## 1.7.2 I tannini nell'industria enologica

Le proantocianidine, insieme ai tannini idrolizzabili, svolgono un ruolo fondamentale nella qualità dei vini e, per assicurare vini colorati, con una buona struttura e rotondità, l'estrazione dei polifenoli dalle uve dovrebbe essere elevata.

In enologia si ricorre all'aggiunta di tannini commerciali con lo scopo di (Versari *et al.*, 2012):

- aumentare l'astringenza e l'aroma dei vini;
- precipitare le proteine;
- inibire l'attività delle laccasi;
- stabilizzare il colore dei vini rossi e aumentarne il potenziale d'invecchiamento, anche in combinazione con una micro-ossigenazione, mediante la formazione di pigmenti polimerici con gli antociani (Bautista-Ortín *et al.*, 2005).

Sono anche utilizzati come additivi nei cibi (n. 181 dal Codex Alimentarius) in qualità di coadiuvanti tecnologici ed agenti chiarificanti.

I tannini enologici commerciali sono prodotti naturali estratti da diverse fonti botaniche, e grazie alla loro affinità per le proteine e alla capacità di prevenire la chelazione ferrica sono autorizzati dall'OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 2012) per la chiarifica di mosti e vini. Possono essere estratti da una sola specie botanica o provenienti da specie diverse, quali semi d'uva, legno di quercia, sommaco, castagno, quebracho (un legname ottenuto da piante di varie famiglie e utilizzato per la concia delle pelli).

Secondo il Codice Enologico Internazionale, dovrebbe essere chiaramente indicato in etichetta l'origine botanica, il solvente utilizzato per l'estrazione ed il contenuto approssimativo di polifenoli totali. Inoltre dovrebbe essere stabilito il livello minimo di flavanoli totali, acido digallico e scopoletina, a seconda che l'estratto provenga da semi d'uva, sommaco o quercia rispettivamente (OIV, 2013). Poiché spesso l'informazione sull'origine botanica dell'estratto non è specificata, è possibile risalire alla provenienza in base alla presenza o meno di marker caratteristici di ciascuna specie, ad esempio il quercitolo per il legno di quercia, oppure la presenza di arabinosio e xilosio permette di distinguere i tannini provenienti da legno di quercia, quebracho e castagno da quelli di semi d'uva, nei quali si trovano solo glucosio e fruttosio (Sanz *et al.*, 2008).

Le variabili legate ai benefici dell'aggiunta di tannini enologici sulla qualità del vino, sono la natura, la struttura e purezza dei prodotti, la quantità utilizzata ed il tempo in cui viene effettuata l'aggiunta, oltre al contenuto polifenolico iniziale del vino.

Nel processo di chiarifica e stabilizzazione dei vini le interazioni tra proantocianidine e proteine aumentano significativamente con l'aumentare del grado di polimerizzazione e galloilazione, poiché aumenta il numero di gruppi *ortho*-diidrossifenolici che sono i siti per la formazione dei complessi tannini-proteine (Ricardo da Silva *et al.*, 1991a).

La capacità dei tannini enologici di migliorare il colore dei vini è stata investigata da numerosi autori con risultati contrastanti: alcuni studi riportano un piccolo ma significativo

aumento dell'intensità del colore dei vini, in particolar modo quelli prodotti da uve infette da *Botrytis cinerea*, probabilmente per l'inibizione delle laccasi data dall'aggiunta dei tannini enologici (Versari *et al.*, 2012; Bautista-Ortín *et al.*, 2005).

Al contrario, secondo altri autori l'aggiunzione di tannini commerciali non altera significativamente la composizione dei vini, se non in quelli poveri in polifenoli. Inoltre l'aggiunta dei tannini dopo la fermentazione alcolica avrebbe un effetto più positivo sulla qualità del vino rispetto a quelli aggiunti prima (Neves *et al.*, 2010).

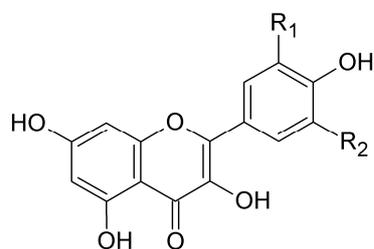
## 1.8 I flavonoli dell'uva

I flavonoli sono i pigmenti gialli che contribuiscono direttamente al colore dei vini bianchi, mentre nei vini rossi sono mascherati dagli antociani. Nell'uva si trovano nelle bucce dove agiscono da agenti schermanti verso la radiazione UV della luce solare, per il forte assorbimento in corrispondenza delle lunghezze d'onda UV-A (325-400 nm) e UV-B (280-325 nm) (Castillo-Muñoz *et al.*, 2007). Le cultivar d'uva cosiddette "tintoree" sono note per contenere flavonoli ed antociani anche nella polpa degli acini (Hermosín-Gutiérrez *et al.*, 2011) (**Figura 1.22**).

I flavonoli sono i principali polifenoli coinvolti nel fenomeno di copigmentazione nei vini rossi, che provoca un aumento dell'estrazione delle sostanze antocianiche durante il processo di vinificazione e l'intensificazione del colore rosso con uno spostamento batocromico verso lunghezze d'onda violacee dando il colore tipico dei vini rossi giovani.

Il contenuto totale e la composizione di flavonoli dipendono essenzialmente dal genotipo, anche se possono in parte essere influenzati da fattori biotici e abiotici. Le varietà d'uva bianche e rosate sintetizzano principalmente i derivati mono- e disostituiti nell'anello B, quali campferolo, quercetina e isoramnetina, mentre le varietà rosse sintetizzano anche i composti trisostituiti miricetina, laricetina e siringetina (Mattivi *et al.*, 2006; Castillo-Munoz *et al.*, 2010; Figueiredo-González *et al.*, 2012). Il contenuto totale di flavonoli nelle varietà di *V. vinifera* è compreso tra 1 e 80 mg/kg uva, e le varietà rosse sono solitamente più ricche di quelle bianche (Mattivi *et al.*, 2006).

La sintesi dei flavonoli ha inizio nel fiore e raggiunge la concentrazione massima poche settimane dopo l'invasatura per poi stabilizzarsi ed infine decrescere con l'aumento delle dimensioni dell'acino durante la maturazione (Downey *et al.*, 2003). Inoltre, la biosintesi dei flavonoli appare legata all'irradiazione solare maggiormente rispetto ad altri metaboliti dell'uva. In particolare la radiazione UV-B attiva la biosintesi dei flavonoli, e tutte le pratiche viticole che favoriscono l'esposizione diretta dei grappoli alla luce solare determinano un incremento della concentrazione dei flavonoli nell'acino (Haselgrove *et al.*, 2000).



	$R_1$	$R_2$
Campferolo	H	H
Quercetina	H	OH
Miricetina	OH	OH
Isoramnetina	H	OCH <sub>3</sub>
Laricetina	OH	OCH <sub>3</sub>
Siringetina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Figura 1.22:** Struttura chimica degli agliconi dei principali flavonoli dell'uva.

I principali flavonoli dell'uva sono miricetina, quercetina e campferolo presenti principalmente come glucosidi e glucuronidi; recentemente sono stati determinati anche

laricetina, isoramnetina e siringetina nelle forme di glucosidi, glucuronidi e galattosidi (Mattivi *et al.*, 2006; Castillo-Munoz *et al.*, 2010).

Le comuni pratiche di vinificazione, quali il contatto con le bucce ed i processi di stabilizzazione e di invecchiamento, sono responsabili di significativi cambiamenti del contenuto di flavonoli dei vini sia dal punto di vista qualitativo che quantitativo. La vinificazione dei vini bianchi preclude il contatto del mosto con la vinaccia, di conseguenza l'estrazione dei flavonoli nelle bucce è limitata rispetto ai vini rossi nei quali si trovano anche gli agliconi liberati dall'idrolisi acida (Makris *et al.*, 2006; Hermosín-Gutiérrez *et al.*, 2011).

La biosintesi dei polifenoli nelle uve *V. vinifera* è controllata da fattori genetici e le differenze tra cultivar sono spesso sufficientemente grandi da poter utilizzare la composizione polifenolica dell'uva come uno strumento per l'autenticazione e la differenziazione delle varietà. Nel caso di uve rosse i profili antocianici sono stati ampiamente utilizzati per fini di identificazione varietale. Anche i flavonoli, che rispetto agli antociani hanno il vantaggio di essere presenti sia nelle uve rosse che bianche, sono utilizzati per differenziare le cultivar, ed insieme agli antociani rappresentano gli indicatori chimici per la caratterizzazione varietale delle uve e dei vini (Mattivi *et al.*, 2006; Hermosín-Gutiérrez *et al.*, 2011).

## 1.9 Varietà *Vitis vinifera* studiate

Tra i Paesi viticoli europei, l'Italia, con più di 1.500 vitigni da vino ufficialmente registrati, è il più ricco di diversità ampelografica, e il numero aumenta notevolmente se si considerano i vitigni minori, rari e in via di abbandono che sono stati recuperati negli ultimi 20 anni.

In seguito alla diffusione della flavescenza dorata della vite, verso la fine del secolo scorso, si è assistito alla sostituzione delle varietà locali con vitigni di importazione, accentuando il processo di "erosione ampelografica" iniziato nell'800 con la comparsa della fillossera. Vitigni ben adattati alle condizioni ambientali di specifiche località sono stati via via sostituiti dai cosiddetti vitigni "internazionali", perché erano meno produttivi o meno resistenti alle malattie o perché i vini ottenuti non corrispondevano ai gusti del mercato. I vitigni autoctoni o tradizionali tuttavia rappresentano un patrimonio biologico che deve essere salvaguardato ed un patrimonio culturale locale, originale e autentico (Schneider, 2006).

Da alcuni anni l'attenzione delle istituzioni e dei produttori italiani si è concentrata sulla valorizzazione ed il recupero dei vecchi vitigni, come risorsa per difendere la produzione vitivinicola nazionale, vista la forte concorrenza che interessa il commercio nel mercato mondiale dei vini internazionali. Sono quindi sorti progetti per la salvaguardia, il recupero e la valorizzazione di vecchi vitigni d'interesse regionale, varietà autoctone che siano in grado di dare prodotti originali e di qualità, espressione del territorio da cui derivano.

Il Veneto ed il Friuli Venezia Giulia sono due regioni di antiche tradizioni viticole con un ricco patrimonio di varietà autoctone che sono anche la base di vini famosi. La valorizzazione di questi vitigni comporta una conoscenza approfondita della varietà e la ricerca delle tecniche colturali ed enologiche che possano esaltarne le componenti varietali (Schneider, 2006).

Il progetto RGV/FAO per la salvaguardia e l'utilizzo delle Risorse Genetiche Vegetali è stato istituito a partire dal 1994 dal Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali (MiPAAF) ed è finalizzato alla conservazione, caratterizzazione, uso e valorizzazione delle risorse genetiche vegetali per l'alimentazione e l'agricoltura. Nell'ambito del progetto, che vede la partecipazione di diverse istituzioni tra cui il Centro di Ricerca per la Viticoltura (CRA-VIT), è stato attuato lo screening e la caratterizzazione di nove vitigni autoctoni del Veneto e del Friuli Venezia Giulia per i quali si dispone di informazioni limitate e frammentarie, studiando i parametri chimici che maggiormente determinano le caratteristiche organolettiche e la tipicità dei vini.

Le nove varietà *V. vinifera* provenienti da zone diverse del Friuli Venezia Giulia e del Veneto sono: Boschera, Grapariol, Cividin e Sagrestana a bacca bianca; Cabrusina, Dindarella, Cjanorie, Fumat e Pignolo a bacca rossa (**Tabella 1.4**).

VARIETA'	Colore	Zona di coltivazione
<b>Boschera</b>	B	Veneto (TV)
<b>Cabrusina</b>	R	Veneto (VR)
<b>Dindarella</b>	R	Veneto (VR)
<b>Grapariol</b>	B	Veneto
<b>Cjanorie</b>	R	Friuli Venezia Giulia
<b>Fumat</b>	R	Friuli Venezia Giulia
<b>Pignolo</b>	R	Friuli Venezia Giulia (UD)
<b>Cividin</b>	B	Friuli Venezia Giulia
<b>Sagrestana</b>	B	Friuli Venezia Giulia

**Tabella 1.4:** Varietà *Vitis Vinifera* studiate e zona di provenienza e coltivazione (R: varietà a bacca rossa, B: varietà a bacca bianca).

La conoscenza dei contenuti polifenolici della buccia e dei vinaccioli e dei loro rapporti permette di valutare le attitudini enologiche delle uve al fine di poter attuare le tecniche di vinificazione più idonee in cantina (Di Stefano e Cravero, 1991); lo studio della composizione di antociani e flavonoli è uno strumento utile per la classificazione chemotassonomica delle uve e può risultare utile a differenziare anche varietà apparentemente simili (Mattivi *et al.*, 2006).

Vengono di seguito riportate le principali caratteristiche riportate nel Registro Nazionale delle Varietà di Vite per le nove varietà studiate.

### 1.9.1 BOSCHERA

#### ▪ Origine

Vitigno coltivato da tempo antico sulle colline intorno a Vittorio Veneto (TV) ed attualmente diffuso nel comune di Fregona (TV) dove costituisce uno dei vitigni fondamentali nella produzione del vino bianco passito denominato “Torchiato di Fregona” (Cancellier, 1992). La varietà è iscritta al Catalogo Nazionale delle Varietà di Vite con D.M. 30/10/1992.

#### ▪ Descrizione ampelografica

**Germoglio:** apice semi-aperto, cotonoso, giallo con bordi leggermente carminati.

**Foglia:** grande, pentagonale, pentalobata; profilo del lembo e dei lobi revoluto; seno peziolare a V aperto; seni laterali superiori ed inferiori ad U aperta.

**Grappolo a maturità industriale:** medio, piramidale, alato, di media compattezza.

**Acino:** medio, ellittico, irregolare; buccia con leggera pruina, spessa, consistente, verde-giallastra punteggiata da macchioline marroni.

#### ▪ Fenologia

**Germogliamento:** precoce.

**Fioritura:** media.

**Invaiaura:** medio-tardiva.

**Maturazione:** medio-tardiva.

#### ▪ Utilizzazione

Per la vinificazione.

## 1.9.2 CABRUSINA

### ▪ Origine

Vecchio vitigno a bacca nera del veronese, di cui si hanno pochi riscontri bibliografici. Poche sono le notizie storiche su questa varietà coltivata nella provincia di Verona. La prima descrizione ampelografica si trova nei “Vecchi vitigni veronesi” (Cancellier *et al.*, 1980) dove viene definita varietà vigorosa, ma equilibrata, in grado di dare produzione elevata; il vino che si ottiene dalle sue uve è definito “*interessante come base di taglio per acidità e colore*”. Questa varietà non è iscritta al Catalogo Nazionale delle Varietà di vite.

### ▪ Descrizione ampelografica

**Germoglio:** medio, vellutato, di colore biancastro con sfumature bronzate, eretto di colore verde con striature rossastre;

**Tralcio erbaceo:** sezione trasversale circolare; contorno leggermente costoluto, glabro di colore verde rosso dalla parte esposta al sole;

**Vitici:** intermittenti bifidi o trifidi, lunghi, grossi di colore verde con sfumature bronzate;

**Infiorescenza:** lunghezza 20-25 centimetri piramidale;

**Foglia:** medio grande, pentagonale, quinquelobata, seno peziolare a U aperto che qualche volta segue le nervature: denti laterali molto pronunciati irregolari, convessi a base larga. Colore della pagina superiore verde cupo inferiore verde chiaro. Lucida;

**Grappolo:** grosso, compatto, piramidale corto, con una o due ali, peduncolo lungo molto grosso;

**Acino:** grande di forma discoide irregolare, buccia ricca di pruina, spessa di colore del frutto del rovo. Succo incolore di sapore neutro;

**Vinaccioli:** 2-3, piriformi sottili.

### ▪ Fenologia

**Germogliamento:** medio-tardivo;

**Fioritura:** media;

**Invaiaura:** medio-tardiva;

**Maturazione:** medio-tardiva.

### ▪ Caratteristiche ed attitudini colturali

**Vigoria:** vigoria elevata ma equilibrata, portamento vegetativo ricadente;

**Produzione:** media-elevata;

**Fertilità delle gemme basali:** media;

**Fertilità media:** medio-buona;

**Resistenza alle malattie:** resistente alle principali crittogame.

### ▪ Giudizio organolettico sul vino

Colore rubino violaceo non molto intenso. Odore neutro. Sapore abbastanza acido, di buon corpo, molto sapido. Complessivamente può risultare interessante per il buon corredo polifenolico ed antocianico e in particolare per la sua acidità.

### 1.9.3 DINDARELLA

- **Origine**

Varietà della Valpolicella, che, per i problemi di allegagione che presentano alcuni biotipi, viene chiamata anche “Pelara”. Le analisi genetiche recenti hanno definito la Dindarella e la Pelara come biotipi diversi della stessa varietà (Angelini *et al.*, 1980). La varietà, iscritta al Catalogo Nazionale delle Varietà di vite con D.M.: 23/07/1987, è stata successivamente inserita tra le varietà autorizzate alla coltura per la provincia di Verona e tra quelle che compongono l’uvaggio del Valpolicella. La sua coltivazione è comunque ancora molto limitata (Cancellier e Giacobbi, 2004).

- **Descrizione ampelografica**

**Germoglio:** medio, vellutato, di colore biancastro, asse leggermente curvo;

**Tralcio erbaceo:** sezione trasversale ellittica, contorno leggermente angoloso, di colore verde, un po’ arrossato dalla parte del sole;

**Vitici:** bifidi o trifidi, lunghi grossi di colore verde;

**Infiorescenza:** lunghezza 25-30 centimetri con grandi ali;

**Foglia:** pentagonale, medio grande, quinquelobata, Seno peziolare a U seguente per un tratto le nervature, seni laterali superiori a lira chiusa a volte a bordi sovrapposti seni laterali inferiori a U o a lira, di colore verde cupo alla pagina superiore, verde chiaro la parte inferiore. Lucida;

**Grappolo:** grosso di media compattezza, di forma piramidale, con 1 o 2 ali a volte molto pronunciate, peduncolo visibile grosso, semi-legnoso;

**Acino:** di media grossezza, di forma irregolare, buccia ricca di pruina, di colore rosso-blu e con riflessi violacei a maturazione. Di sapore caratteristico;

**vinaccioli:** 1-2, piriformi, con becco sottile, di dimensioni piuttosto piccole.

- **Fenologia**

**Germogliamento:** medio;

**Fioritura:** media;

**Invaiatura:** media-tardiva;

**Maturazione:** media.

- **Caratteristiche ed attitudini culturali**

**Vigoria:** buona, equilibrata, ricca di femmine;

**Produzione:** buona (inferiore nel biotipo Pelara);

**Fertilità delle gemme basali:** media;

**Fertilità media :** buona;

**Resistenza alle malattie:** buona.

- **Giudizio organolettico sul vino**

Colore rosso rubino brillante. Odore fine, vagamente aromatico, dal floreale allo speziato. Di medio corpo, molto sapido. Complessivamente molto interessante per il particolare corredo aromatico, vinificata in purezza produce vini freschi, sapidi, aromatici mediamente alcolici e di facile beva.

## 1.9.4 GRAPARIOL

### ▪ Origine

Nei lavori di recupero dei vecchi vitigni veneti sono stati trovati a Zenson di Piave due diversi vitigni a bacca bianca denominati “Grapariol”, che, a detta dei viticoltori, sembrano corrispondere alla Rabosa e infatti vengono chiamati anche “Rabosa bianca”.

### ▪ Descrizione ampelografica

**Germoglio:** l'apice è di colore biancastro, con orlo leggermente carminato; foglioline spiegate sono di colore verde-giallastro; portamento eretto.

**Foglia:** di medie dimensioni, tondeggianti o pentagonali, pentalobate, di colore verde medio, bollosa, un po' a coppa; seno peziolare che sembra chiuso, ma a foglia stesa su un piano diventa aperto e ha la base a V; denti lunghi, concavo-convessi, a base stretta; pagina superiore glabra, quella inferiore presenta delle setole sulle nervature.

**Grappolo a maturità:** di media grandezza, allungato, cilindrico, spesso alato, abbastanza spargolo e termina generalmente a punta doppia, come il Raboso Piave; peduncolo lungo e parzialmente lignificato.

**Acino:** di medie dimensioni, arrotondato, di grossezza uniforme; buccia, spessa e punteggiata, di colore giallo dorato nella parte rivolta verso la luce; polpa molle, succosa, a sapore molto dolce e insieme acidulo, non aromatico.

### ▪ Fenologia

**Germogliamento:** abbastanza precoce

**Maturazione dell'uva:** medio-tardiva; la raccolta infatti avviene tra la fine di Settembre e l'inizio di Ottobre.

### ▪ Caratteristiche ed attitudini culturali

**Vigoria:** buona; nella zona classica di coltivazione veniva allevato tradizionalmente a cassone, ma nei nuovi impianti è stato sostituito dal Sylvoz.

**Produzione:** buona e regolare. Elevata la gradazione zuccherina e buoni i contenuti acidi delle bacche.

**Fertilità:** buona (1,5-1,7), anche sulle gemme basali.

**Resistenza ai parassiti ed altre avversità:** è molto rustico, poco sensibile alla peronospora e alle altre crittogame, e non è soggetto a marciume.

### ▪ Utilizzazione

Per la vinificazione.

(Fonte bibliografica: Cancellier e Michelet, 2006)

## 1.9.5 CJANORIE

### ▪ Origine

Vitigno autoctono del Friuli, maggiormente diffuso nel circondario di Gemona. Il suo nome deriva da canna, che in friulano si dice *chiane*.

### ▪ Descrizione ampelografica

**Germoglio:** apice aperto, cotonoso.

**Foglia:** medio-piccola, pentagonale, trilobata; seno peziolare aperto.

**Grappolo a maturità:** medio e spargolo.

**Acino:** medio, ellittico, irregolare; buccia sottile pruinosa, di colore bleu-nero.

▪ **Fenologia**

**Germogliamento:** tardivo.

**Fioritura:** media.

**Invaiaura:** tardiva.

**Maturazione:** medio-tardiva.

▪ **Dati produttivi**

**Peso medio del grappolo:** basso (119.4 g)

**Peso medio dell'acino:** molto basso (1.3 g)

**Tenore in zuccheri del mosto :** medio (16.7-17.5 g % ml)

**Acidità totale del mosto:** medio (9.5 g ac. tart. ‰ ml)

**Produzione per ceppo:** 3.5-4.7 kg

▪ **Utilizzazione**

Per la vinificazione.

*(Fonte bibliografica: Estratto dalla domanda di iscrizione della varietà al Registro Nazionale presso il MIPAAF)*

### 1.9.6 FUMAT

▪ **Origine**

Vecchio vitigno del Friuli.

▪ **Descrizione ampelografica**

**Tralcio:** color cannella-rossiccio, rigato, internodi medi o lunghi.

**Foglia:** a 3 o 5 lobi, più larga che lunga, pagina superiore liscia, verde-carico, inferiore verde-chiaro, con tomento corto vellutato; seni superiori aperti, quello peziolare molto aperto, dentatura marcata.

**Grappolo:** medio o piccolo, conico, o cilindrico ad acini radi, raramente alato; peduncolo lungo, lavato di rosso;

**Acino:** medio, sferico; buccia consistente; succo abbondante, dolce. Non è però molto produttivo.

▪ **Fenologia**

**Maturazione:** precoce.

*(Fonte bibliografica: <http://www.sangiorgioinsieme.it/ampelografia-friuli-1923.htm>)*

### 1.9.7 PIGNOLO

▪ **Origine**

Vitigno autoctono rosso del Friuli. In Friulano "Pignul", da non confondersi con l'omonimo vitigno a frutto bianco della vicina provincia di Treviso.

▪ **Descrizione ampelografica**

**Germoglio:** di colore rosso vivo, peloso, con foglioline terminali diversamente colorate.

**Foglia:** piccola, caratteristica, trilobata, di colore verde intenso nella pagina superiore; lamina sottile, ma consistente, a margini leggermente revoluti; pagina superiore vescicolosa; pagina inferiore di colore verde chiaro, vellutata o feltrata; seni laterali aperti, profondi, arrotondati; seno peziolare aperto, profondo; denti finali uncinati; dentatura della foglia non molto profonda, abbastanza regolare, larga, mucronata; nervature rilevate, rosse alla base.

**Picciolo:** lungo quanto la nervatura centrale, di colore rosso vivo, ruvido, rotondo, leggermente peloso.

**Tralcio legnoso:** sottile, sarmentoso, di media lunghezza, leggermente rugoso, di colore bruno tendente al rosso; nodi ingrossati; internodi di lunghezza media; gemme coniche, appuntite, poco sporgenti.

**Grappolo:** cilindrico, semplice, serrato, piccolo; peduncolo robusto, medio, erbaceo, di colore verde-giallo; raspo robusto, erbaceo, di colore verde chiaro; pedicelli corti, di colore verde chiaro.

**Acino:** piccolo, rotondo; pennello piccolo, incolore; buccia pruinata, nera, spessa, piuttosto coriacea, leggermente tannica; polpa molle, tendente al carnosio, di sapore semplice, dolcissima.

- **Fenologia**

**Maturazione:** piuttosto tardiva.

- **Caratteristiche ed attitudini culturali**

**Vigore:** medio; aspetto e portamento caratteristici (cespugliosi).

**Produttività:** piuttosto scarsa, costante.

**Resistenza alle malattie:** debole; soffre fortemente gli attacchi dell'oidium.

- **Utilizzazione**

Dà un vino di colore rosso chiaro, profumato, delicato, sapido, armonico, alcolico.

*(Fonte bibliografica: Poggi G., 1939)*

### 1.9.8 CIVIDIN

- **Origine**

E' un vecchio vitigno del Friuli che si trova ancora sparso e mescolato nei filari insieme ad altre varietà.

- **Descrizione ampelografica**

**Germoglio:** apice aperto, cotonoso.

**Foglia:** di grandezza media, pentagonale, trilobata; seno peziolare aperto.

**Grappolo a maturità:** piccolo, corto e compatto.

**Acino:** di dimensioni medio-piccole di forma ellittico corta; buccia di medio spessore pruinosa, di colore verde-giallo.

- **Fenologia**

**Germogliamento:** tardivo.

**Fioritura:** media.

**Invaiaatura:** media.

**Maturazione:** tardiva.

▪ **Dati produttivi**

**Peso medio del grappolo:** basso (121.7 g)

**Peso medio dell'acino:** basso (1.4 g)

**Tenore in zuccheri del mosto :** basso (15.2 g % ml)

**Acidità totale del mosto:** elevata (11.0 g ac. tart. ‰ ml)

**Produzione per ceppo:** 2.4 kg

▪ **Utilizzazione**

Per la vinificazione.

*(Fonte bibliografica: Estratto dalla domanda di iscrizione della varietà al Registro Nazionale presso il MIPAAF)*

### **1.9.9 SAGRESTANA**

Non sono state trovate informazioni in letteratura riguardanti la varietà Sagrestana.

## 1.10 Gli ibridi produttori diretti

Accanto alle varietà *Vitis vinifera*, utilizzate per la produzione di uva soprattutto per il settore enologico, esistono numerose varietà di ibridi provenienti da esperimenti condotti durante la seconda metà del XIX secolo per migliorare le caratteristiche di resistenza della vite alle malattie, quali oidio, peronospera e fillossera.

In seguito all'invasione della fillossera, l'afide che attaccava le radici delle viti causandone il disseccamento e la morte, molti vitigni autoctoni americani (*Vitis riparia*, *V. rupestris*, *V. berlandieri*, *V. labrusca*) e loro ibridi furono utilizzati come "portainnesti", cioè su di essi vennero innestate le antiche varietà *V. vinifera*.

La più antica delle viti americane conosciuta in Europa è l'Isabella (*V. vinifera* × *V. labrusca*; o *uva fragola* o semplicemente "uva americana") a cui si aggiunsero il Taylor, lo York Madeira, il Clinton (*V. riparia* × *V. labrusca*), il Clinton bianco o Noah, il Jacquez, l'Othello, l'Herbement, ed altri: si trattava dei cosiddetti "antichi produttori diretti" o "ibridi degli antichi cataloghi". Ben presto si dovette però constatare che tali vitigni si adattavano poco ai terreni europei calcarei. Inoltre le uve presentavano più o meno spiccato aroma e sapore "di fragola" (detto anche *foxy*, di volpino), che non era gradito soprattutto nel vino.

La scarsa adattabilità delle viti americane spinse i coltivatori a sperimentare ulteriori nuove soluzioni che permettessero di ottenere attraverso l'ibridazione tra viti americane e *V. vinifera* nuovi vitigni: gli Ibridi produttori diretti o Ibridi. Queste varietà, derivate da un incrocio interspecifico (ISC, Inter-Specific Crossing), sono il risultato degli sforzi di combinare la qualità delle tradizionali varietà europee (*V. vinifera*) con i tratti di resistenza alle malattie tipici delle varietà americane (*V. riparia*, *V. labrusca*, *V. aestivalis*, *V. berlandieri*, *V. amurensis*).

Un insieme di ibridatori francesi crearono una notevole quantità di nuovi ibridi produttori diretti dando vita alle lunghe liste di ibridi creati da Couderc, Seibel, Castel, Jourie, Bacò, Bertille Seyve, Seyve Villard ecc., dove ogni ibrido era contraddistinto dal nome del suo costituente e dal numero che esso portava nelle collezioni o nei vivai (Dalmaso, 1979).

Purtroppo però queste varietà spesso non possedevano rese e qualità delle varietà originarie, e davano vini di bassa qualità caratterizzati, oltre che dal tipico aroma "foxy", anche da una notevole acidità e dalla possibile presenza di metaboliti tossici, in particolare il metanolo derivato dall'idrolisi delle pectine. Vennero perciò presi una serie di provvedimenti legislativi intesi a proibire o almeno a disciplinare severamente la loro coltura e vinificazione.

In Italia, la legge n. 376 del 23 marzo 1931 proibiva dovunque la coltura di questi ibridi, fatta eccezione per gli Istituti di studio e sperimentazione, nonché per le province nelle quali gli organi ministeriali e sindacali ne avrebbero riconosciuta l'utilità. Questa legge non fu mai rigidamente applicata ma permise di mettere un freno all'eccessiva

diffusione di questi vitigni impedendo che questi addirittura si sostituissero ai vitigni autoctoni e tradizionali.

L'articolo 22 della Legge contro le frodi nei mosti e nei vini (D.P.R. 12 febbraio 1965) vietò la vendita di mosti e vini provenienti da vitigni diversi da *V. vinifera*, quindi da ibridi. La linea legislativa è rimasta invariata fino ad oggi e per ultimo il regolamento CE n. 479/2008 che all'articolo 24 stabilisce:

*“Gli Stati membri possono classificare come varietà di uve da vino soltanto quelle che soddisfano le seguenti condizioni:*

*a) la varietà in questione appartiene alla specie *Vitis vinifera* o proviene da un incrocio tra la specie *Vitis vinifera* e altre specie del genere *Vitis*;*

*b) la varietà non è una delle seguenti: Noah, Othello, Isabelle, Jacquez, Clinton e Herbemont”.*

Sebbene rigettati nei loro territori di nascita, gli ibridi produttori diretti vennero accettati e sono attualmente coltivati in molte regioni degli Stati Uniti (nella parte Nord-Settentrionale), del Canada, dell'America Latina in particolare in Brasile (Nixdorf e Hermosín-Gutiérrez, 2010), ma anche in altre regioni del mondo come il Giappone, dando origine a produzioni vinicole regionali tipiche.

### **1.10.1 Le varietà ibride studiate**

In generale i costituenti chimici delle uve delle varietà ibride sono stati poco studiati rispetto alle varietà *V. vinifera*, e potenzialmente presentano caratteristiche uniche che accomunano tali varietà ai progenitori americani. Per esempio, sono caratterizzate dall'aroma *foxy* e da pronunciati sapori fruttati, dovuti alla presenza di antranilato di metile, furaneolo e 2-ammino-acetofenone, assenti invece nell'uva di *V. vinifera*. Un'altra differenza a livello chimico è la presenza di antociani diglucosidi, mentre le uve di *V. vinifera* contengono essenzialmente antociani monoglucosidi. La presenza di antociani diglucosidi è un importante parametro legalmente utilizzato per rivelare frodi nel vino.

Gli ibridi produttori scelti come oggetto di studio presentano caratteristiche che li rendono potenzialmente interessanti anche per fini bioenergetici: sono caratterizzati da un'elevata produttività di uva per ceppo con alto contenuto zuccherino, elevata vigoria e resistenza alle malattie crittogamiche, buon adattamento alla coltivazione in zone marginali e non vocate alla viticoltura. Il loro impianto potrebbe portare a produrre bioetanolo di prima generazione dallo zucchero del mosto, olio di vinaccioli, bioetanolo di seconda generazione dalla cellulosa ed emicellulosa recuperabile da vinacce, raspi e residui di potatura (Progetto VITENERGY1: individuazione di varietà di vite (*vitis* sp.) e metodi di gestione del vigneto con produttività e sostenibilità idonee alla produzione di bioetanolo, olio e cellulosa da impiegare come fonti di bioenergie; finanziamento MiPAAF.).

I considerevoli livelli di composti bioattivi presenti in queste uve una volta recuperati dai residui di fermentazione (estratti polifenolici, antociani e flavonoli) possono trovare

impiego nell'industria dei coloranti e degli antiossidanti naturali, aumentando notevolmente la sostenibilità economica di una coltivazione viticola dedicata alla produzione di bioenergie (De Rosso *et al.*, 2012; De Marchi *et al.*, 2012).

La collezione del germoplasma viticolo del Centro di Ricerca per la Viticoltura comprende un grande numero di ibridi, presenti già a partire dal 1920, che non sono mai stati compiutamente studiati dal punto di vista chimico.

All'interno delle 150 varietà di ibridi produttori diretti presenti in collezione sono state selezionate, per il loro potenziale energetico, 32 varietà comprendenti 21 uve rosse e 11 bianche. Dai dati riportati in **Tabella 1.5** si può osservare che le varietà Bertille Seyve 4825, Seyve Villard 23-399 e Seibel 9110 potrebbero essere interessanti per produzioni di biomassa e bioetanolo, presentando una produttività pari o superiore a 14 kg d'uva per pianta.

<i>Varietà</i>		<i>Incrocio Interspecifico</i>	<i>Uva</i> (kg/ceppo)
Bacò 1	R	Folle Blanche ( <i>V. vinifera</i> ) × Grand Glabre ( <i>V. riparia</i> )	5.7
Bacò' 30-12	R	Bacò 1 × Chasselas Rose ( <i>V. vinifera</i> × <i>V. rupestris</i> )	6.0
Bertille Seyve 1808	R	Bertille Seyve 425 (Couderc 132-11 × Seibel 2003) × Bertille Seyve 227	8.6
Bertille Seyve 4825	R	Bertille Seyve 2667 × Seibel 6905	14.6
Burdin 4077	R	Seibel 6905 × Seibel 5455	11.9
Clinton	R	<i>V. riparia</i> × <i>V. labrusca</i>	5.1
Couderc 25	R	Couderc 7120 × ( <i>V. vinifera</i> × <i>V. lincecumii</i> )	9.8
Galibert 238-35	R	Seyve Villard 12 401 × Cinsaut ( <i>V. vinifera</i> )	9.7
Seibel 8357	R	Seibel 6150 × Seibel 5455	9.2
Seibel 8745	R	Seibel 5163 × Seibel 880	10.0
Seibel 10878	R	Seibel 2859 × Seibel 4643	7.7
Seyve Villard 12-347	R	Seibel 6468 × Seibel 6905	7.1
Seyve Villard 12-390	R	Seibel 6468 × Seibel 6905	8.2
Seyve Villard 23-369	R	?	10.4
Seyve Villard 23-399	R	?	14.5
Seyve Villard 29-522	R	?	9.8
Terzi 100-31	R	?	n.d.
Terzi 108-6	R	?	n.d.
Terzi 9746	R	?	n.d.
Sconosciuto 1	R	?	n.d.
Sconosciuto 2	R	?	10.1
Bacò 2-16	B	Bacò 45A (Baroque × Noah (= <i>V. riparia</i> × <i>V. labrusca</i> )) × Bacò1	6.9
Burdin 7419	B	Couderc Noir (Jaeger 70 × <i>Vitis vinifera</i> ) × ( <i>V. vinifera</i> × <i>V. lincecumii</i> )	11.8
GA 48-12	B	?	9.2
Galibert 152-26	B	?	8.3
Galibert 255-43	B	Villard blanc (Seibel 6468 × Seibel 6905) × Regina dei vigneti (= <i>V. vinifera</i> )	8.8
Galibert Treblanc	B	?	9.4
GF 84-21-9	B	?	9.9
Inc. Bruni 624	B	Picolit × Villard blanc (Seibel 6468 × Seibel 6905)	n.d.
Seibel 9110	B	Seibel 5455 × Seibel 4938	14.0
Seibel 10173	B	Plantet (Seibel 4461 × <i>V. berlandieri</i> ) × Seibel 6089	7.3
Seyve Villard 12-375	B	Seibel 6468 (Seibel 4614 (Seibel 752 × (Seibel 2003 × <i>V. berlandieri</i> )) × Seibel 3011) × Seibel 6905	10.1

**Tabella 1.5:** Varietà ibride studiate e produttività media determinata negli anni 2010-2013. R = varietà a bacca rossa; B = varietà a bacca bianca. n.d.: non determinato. ? = incrocio interspecifico sconosciuto.

## 1.11 Metodi analitici utilizzati

I metaboliti, in relazione alla loro natura chimica, sono stati studiati utilizzando diverse tecniche strumentali quali la spettrofotometria UV-Vis per la determinazione di indici colorimetrici (ad es. determinazione degli indici di antociani, polifenoli e flavonoidi totali), la cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) accoppiata a rivelatori spettrofotometrici, rifrattometrici e di spettrometria di massa (MS) per lo studio dei profili dei composti più polari (antociani, flavonoli, flavanoli, acidi idrossicinnamiltartarici), la gascromatografia abbinata alla spettrometria di massa (GC/MS) per la determinazione dei composti volatili (sostanze aromatiche, esteri volatili). Le tecniche di estrazione dei composti chimici dalle diverse parti dell'acino impiegate in laboratorio hanno visto l'utilizzo di processi di purificazione degli estratti mediante tecniche di estrazione in fase solida (SPE) e di estrazione liquido-liquido.

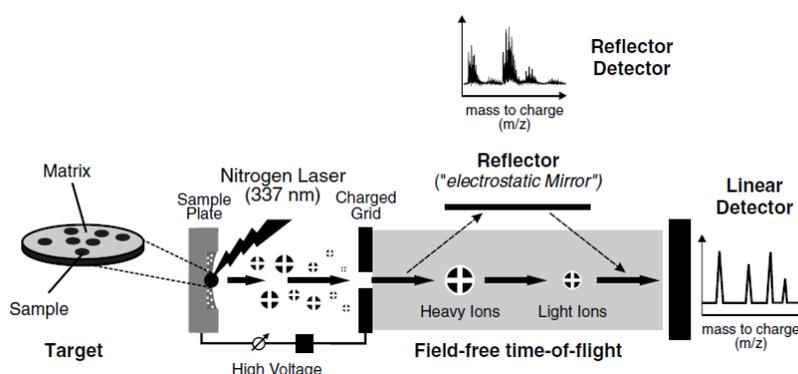
La cromatografia liquida (HPLC) accoppiata ad un rivelatore a serie di fotododi (Diode Array Detector, DAD) rappresenta un importante strumento per l'analisi dei polifenoli nell'uva e nel vino. I composti polifenolici presentano caratteristici massimi di assorbimento nella regione UV/Vis: gli antociani a 520 nm, i flavonoli a 360 nm, gli acidi idrossi-cinnamici a 320 nm ed i flavan-3-oli a 280 nm. Con questo metodo l'identificazione dei composti avviene registrando gli spettri di assorbimento caratteristici dei singoli composti e sulla base dell'ordine di eluizione dalla colonna (Favretto e Flamini, 2000).

L'accoppiamento di HPLC e spettrometria di massa (LC/MS) permette di effettuare la caratterizzazione strutturale delle molecole in particolare quando gli standard commerciali non sono disponibili, i picchi cromatografici si sovrappongono o i tempi di ritenzione e gli spettri di assorbimento dei composti sono molto simili (Wang *et al.*, 2003; Giusti *et al.*, 1999; Castillo-Muñoz *et al.*, 2007). I metodi LC/MS con l'impiego di analizzatori a triplo quadrupolo permettono inoltre di operare in modalità di scansione dello ione precursore (De Rosso *et al.*, 2012).

Le tecniche di ionizzazione di Electrospray Ionization (ESI) e Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) sono utilizzate per l'analisi di molecole con alti pesi molecolari (lipidi, proteine, oligosaccaridi, trigliceridi, proantocianidine), poiché forniscono il segnale dello ione pseudo-molecolare che consente di risalire alla massa del composto. I trigliceridi sono molecole stabili che danno pochi prodotti di frammentazione sia in ionizzazione MALDI che in Electrospray Ionization (ESI), perciò da un singolo spettro è possibile ottenere la composizione complessiva di trigliceridi (Schiller *et al.*, 2004). La tecnica di spettrometria di massa MALDI è spesso utilizzata come metodo di scelta per l'analisi di tannini poiché è un metodo efficace per la caratterizzazione di polimeri sintetici e naturali (Hanton *et al.*, 2001).

### 1.11.1 La spettrometria di massa MALDI

La tecnica di spettrometria di massa MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization) si basa sull'interazione di un fascio laser, di solito avente lunghezza d'onda  $\lambda=337$  nm, con i cristalli di un'opportuna matrice contenente l'analita d'interesse in quantità molto basse (solitamente il rapporto molare analita/matrice è dell'ordine di  $10^{-4}$ ). L'interazione tra il fascio laser e i cristalli porta alla vaporizzazione di un micro volume del campione solido ed alla formazione di una nuvola che si espande rapidamente nello spazio (**Figura 1.23**); le specie ioniche che costituiscono tale nube, formate attraverso reazioni ione-molecola in fase gassosa, danno origine agli ioni positivi dell'analita M, di solito in forma protonata  $[M+H]^+$  o come addotti di sodio e potassio  $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$ , che vengono accelerati verso l'analizzatore di massa.



**Figura 1.23:** Schema del processo di ionizzazione che avviene nello spettrometro di massa MALDI-TOF.

A causa della natura pulsata del fenomeno di ionizzazione (un laser ad azoto può operare con pulsazioni di 100 ns) l'analizzatore abitualmente impiegato per ottenere gli spettri MALDI è il tempo di volo (TOF, Time Of Flight). Il principio di funzionamento dell'analizzatore di massa a tempo di volo si basa sull'accelerazione, per applicazione di un opportuno voltaggio  $V$ , degli ioni generati dal laser in sorgente attraverso il tubo di volo, avente lunghezza fissa. L'energia potenziale viene trasformata in energia cinetica:

$$zV = \frac{1}{2} mv^2 \quad (1)$$

$$v = \left(\frac{2zV}{m}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (2)$$

dove  $z$  è la carica,  $m$  la massa,  $v$  la velocità dello ione. Dalle equazioni (1) e (2) segue che dopo l'accelerazione, ioni con diversi valori di  $m/z$  percorrono il tubo di volo con diverse velocità: il rapporto massa/carica è inversamente proporzionale al quadrato della velocità. Data la lunghezza  $l$  del tubo di volo, gli ioni con diversi  $m/z$  raggiungono il rivelatore a tempi  $t$  diversi:

$$t = l \left(\frac{m}{2zV}\right)^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

cioè gli ioni di massa minore sono più veloci e raggiungono il rivelatore in tempi inferiori, viceversa per gli ioni più pesanti. I "tempi di arrivo" vengono registrati e trasformati in spettri di massa per mezzo della relazione (3).

Per ottenere una maggiore risoluzione, intesa come capacità di distinguere, cioè risolvere, due segnali prossimi tra loro, si utilizza in MALDI la tecnologia Delayed Extraction. Poiché gli ioni si trovano in posizioni diverse all'interno della nube generata dal laser e possiedono velocità diverse, viene posta a pochi millimetri di distanza dal piatto su cui si trovano i cristalli di matrice e campione, una griglia a cui è applicato lo stesso voltaggio del portacampione, e la cui funzione è quella di intrappolare gli ioni. Quando gli impulsi laser sono terminati e non sono generati altri ioni, il voltaggio della griglia è invertito e gli ioni vengono tutti accelerati nello stesso momento verso il TOF.

Anche l'utilizzo del reflectron permette di aumentare la risoluzione. Gli ioni quando vengono accelerati nel TOF possiedono energie cinetiche diverse, cioè velocità diverse, pur avendo la stessa massa; il reflectron, che è costituito da una serie di elettrodi circolari a potenziali decrescenti, ricompatta gli ioni aventi la stessa massa e ora anche la stessa velocità in modo tale che la distribuzione del tempo di arrivo degli ioni sia minima e la risoluzione, di conseguenza, massima.

L'analisi MALDI-TOF può essere effettuata sia in modalità positiva che negativa ed utilizzando analizzatori lineari o reflectron. I principali vantaggi della tecnologia MALDI sono (Jerez *et al.*, 2009):

- formazione di un solo ione molecolare;
- alta sensibilità in un ampio intervallo di masse;
- capacità di rivelare composti ad alto peso molecolare;
- interpretazione del pattern isotopico per distinguere oligomeri con piccole differenze di massa.

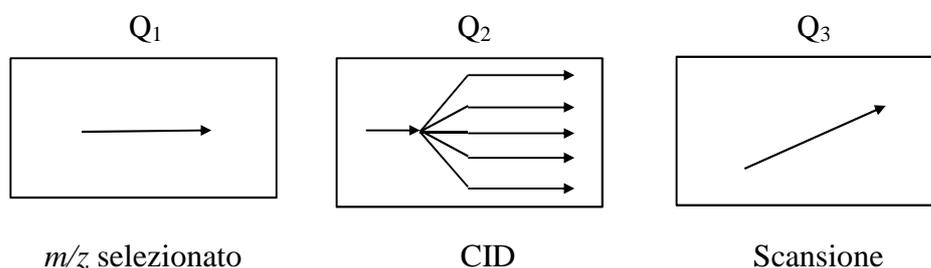
Uno svantaggio di questa tecnica è il limitato utilizzo nell'analisi quantitativa, in quanto spesso i segnali dello spettro non sono riproducibili anche a causa della disomogeneità dell'analita nei cristalli di matrice organica (Sleno *et al.*, 2006).

### 1.11.2 Metodi LC/MS in precursor-ion analysis

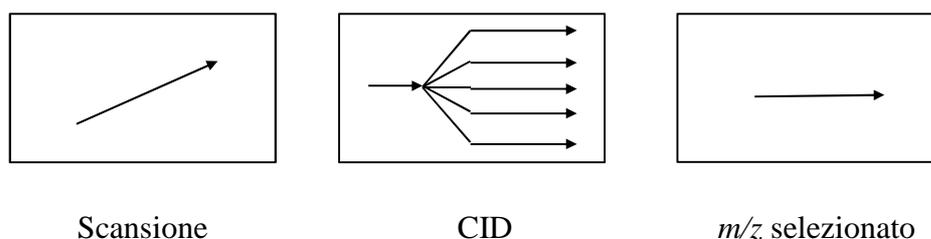
Nello studio degli antociani dell'uva, oltre alla consueta cromatografia liquida (LC) con rivelatore UV, è possibile utilizzare la cromatografia liquida accoppiata ad uno spettrometro di massa il cui analizzatore è un triplo quadrupolo che consente di eseguire esperimenti di frammentazione delle molecole (MS/MS). Tale sistema, operando in modalità di scansione dello ione precursore, permette l'identificazione dei composti che producono specifici ioni frammento opportunamente selezionati (precursor-ion analysis).

Il triplo quadrupolo ( $Q_1Q_2Q_3$ ) consiste di tre quadrupoli posti in serie che, a seconda di come operano, permettono di effettuare diversi tipi di esperimenti di spettrometria di massa tandem MS/MS. Solitamente in corrispondenza del quadrupolo centrale  $Q_2$  è introdotto un gas di collisione che provoca la frammentazione degli ioni selezionati dal primo quadrupolo  $Q_1$  (collision induced dissociation). Il terzo quadrupolo,  $Q_3$ , può operare rivelando tutte le specie  $m/z$  prodotte acquisendo uno spettro a scansione completa oppure registrare il segnale di uno o più ioni selezionati. I tipi di esperimenti possibili sono quindi principalmente tre (Flamini e Traldi, 2010):

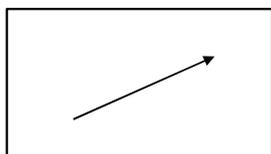
1. "Product Ion Scan": si identificano tutti i prodotti dallo ione precursore selezionato. In corrispondenza di  $Q_1$  viene selezionato un singolo valore di  $m/z$ , in  $Q_2$  avviene la frammentazione della specie ionica selezionata, in  $Q_3$  si registrano i segnali dei prodotti di frammentazione.



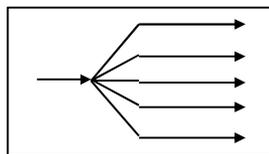
2. "Parent Ion Scan" o "Precursor Ion Scan": si identificano tutti i precursori dello ione d'interesse. In questo caso in corrispondenza di  $Q_1$  viene fatta la scansione di tutti gli ioni precursore, mentre in  $Q_3$  viene registrato il segnale generato da un frammento preselezionato.



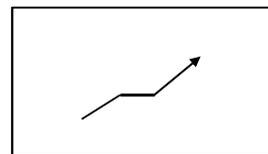
3. “Neutral Loss Scan”: si identifica la perdita di un frammento neutro (per es.  $H_2O$ ) da parte dei precursori.  $Q_1$  e  $Q_3$  operano entrambi in modalità scansione, viene registrato il segnale generato da frammenti con predefinita differenza di massa dal precursore.



Scansione di  $m/z = x$



CID



Scansione di  $m/z = x-a$

Il metodo “precursor ion scan” è stato applicato per lo studio degli antociani e nella determinazione degli ioni precursori di questa classe di composti: in particolare, ha permesso l’identificazione dei monoglucosidi dai segnali degli agliconi, e dei diglucosidi da quelli dei monoglucosidi (Capitolo 4.2).

## 1.12 Nuovi approcci di metabolomica per lo studio dell'uva

### 1.12.1 La metabolomica

La metabolomica, in parallelo ad altre scienze quali genomica, trascrittomica e proteomica, ha l'obiettivo di determinare l'insieme completo dei metaboliti chimici sintetizzati da una cellula, organismo o tessuto. L'insieme di tutti i metaboliti, o metaboloma, rappresenta il fenotipo molecolare del sistema biologico.

I metaboliti che devono essere identificati sono spesso centinaia di piccole molecole aventi diverse proprietà fisico-chimiche (pKa, polarità, dimensioni) e sono presenti in un vasto intervallo di concentrazioni in matrici complesse (Scalbert *et al.*, 2009). Perciò non vi è una singola tecnica analitica in grado di descrivere completamente l'intero metaboloma, ma diverse strumentazioni sono necessarie a tale fine. La Risonanza Magnetica Nucleare (NMR), la Spettroscopia Infrarossa in Trasformata di Fourier (FT-IR) e la Spettrometria di Massa (MS) accoppiata a tecniche cromatografiche vengono comunemente utilizzate negli studi di metabolomica. Attualmente nello studio degli estratti naturali la spettrometria di massa risulta la tecnica più efficacemente utilizzata dal momento che offre una serie di strumenti che possono essere utilizzati per la caratterizzazione chimica e strutturale dei vari composti, quali:

1. misura accurata del rapporto massa/carica ( $m/z$ ) degli ioni molecolare e frammento;
2. determinazione delle abbondanze isotopiche relative;
3. frammentazione dello ione pseudo-molecolare per definire il pattern di dissociazione;
4. confronto tra i dati ottenuti sperimentalmente con quelli riportati in database e banche dati contenenti proprietà chimico-fisiche o spettri di massa e dati cromatografici (Dunn *et al.*, 2013).

La gascromatografia (GC) accoppiata alla spettrometria di massa (GC/MS) è utilizzata per lo studio delle sostanze volatili mentre la cromatografia liquida (LC) accoppiata alla spettrometria di massa (LC/MS) per i composti più polari. La tecnica LC/MS può avvantaggiarsi di diversi tipi di ionizzazione, quali l'elettrospray (ESI), la ionizzazione chimica o la fotoionizzazione a pressione atmosferica (APCI e APPI). E' inoltre possibile utilizzare diversi analizzatori di massa quali il triplo quadrupolo (QqQ), quadrupolo e trappola ionica (QIT), tempo di volo (TOF), Q-TOF, Orbitrap e Risonanza Ionica di Ciclotrone in Trasformata di Fourier (FT-ICR). In generale le tecniche LC/MS offrono elevata sensibilità e selettività, e permettono l'identificazione di numerosi componenti (Mattoli *et al.*, 2006).

L'identificazione dei composti chimici che a seconda della complessità del campione possono essere diverse centinaia, rappresenta una vera e propria sfida che la metabolomica affronta mettendo a punto opportune strategie. Gli studi di metabolomica in generale sono eseguiti utilizzando approcci mirati (target) e non mirati (untarget).

Negli studi target viene identificata una lista di metaboliti di cui si ha già una conoscenza preliminare, quali caratteristiche di massa, spettro di frammentazione, tempo di ritenzione; l'identificazione è poi confermata con uno standard di riferimento (Griffiths *et al.*, 2010; Dunn *et al.*, 2013). La principale limitazione di questo approccio è che gli standard non sono sempre disponibili, e l'analisi viene così focalizzata su un numero limitato di composti di cui gli standard sono reperibili o che sono già stati identificati e validati.

L'approccio di metabolomica untarget è invece utilizzato per tentare di individuare tutti gli analiti presenti in un campione, anche se molti composti chimici non sono immediatamente identificabili. Comunque questi "sconosciuti conosciuti" possono essere rilevati in modo riproducibile ed utilizzati nella diagnostica di sistemi biologici, per esempio per la scoperta di nuovi biomarker (Kueger *et al.*, 2012).

L'identificazione dei metaboliti è un processo fondamentale per tradurre i dati grezzi in un'informazione con significato biologico e rappresenta un passaggio critico nell'analisi di composti chimici su larga scala come la metabolomica. Il Chemical Analysis Working Group, CAWG, parte di Metabolomics Standards Initiative, MSI, il cui fine è quello di formulare un insieme minimo di procedure standard per descrivere i metodi sperimentali in modo da massimizzare l'utilità dei dati agli altri ricercatori, ha proposto 4 livelli di identificazione dei metaboliti (Sumner *et al.*, 2007):

**I livello:** "confidently identified compounds", ovvero composti conosciuti, per i quali si dispone di almeno due dati ortogonali ed indipendenti (es. tempo/indice di ritenzione e spettro di massa, massa accurata e pattern isotopico, massa accurata e tandem MS) relativi ad uno standard autentico analizzato in condizioni sperimentali identiche rispetto al metabolita di interesse.

**II livello:** "putatively annotated compounds", composti putativi, la cui identificazione si basa su proprietà fisico-chimiche e spettri simili a quelli riportati nelle librerie commerciali pubblicamente disponibili.

**III livello:** "putatively characterized compound classes", la cui identificazione è basata su proprietà fisico-chimiche caratteristiche di una determinata classe di composti chimici o sulla somiglianza degli spettri con composti noti di una classe di composti chimici.

**IV livello:** "unknown compounds"; tali composti, sebbene non identificati né classificati, possono ancora essere differenziati e quantificati in base ai dati spettrali.

Nell'identificazione non ambigua dei numerosi composti chimici un ruolo importante è rappresentato dai database disponibili sul Web che contengono lunghi elenchi, basati su dati sperimentali e bibliografici, dei metaboliti che è possibile aspettarsi in diversi biotipi e matrici. Davanti alla complessità dei sistemi biologici questi database, pur contenendo migliaia di metaboliti, appaiono incompleti e devono essere continuamente aggiornati e implementati.

### 1.12.2 La spettrometria di massa ad alta risoluzione

La determinazione della composizione elementare a partire da misurazioni di massa accurata è un metodo utilizzato in chimica organica e in metabolomica per ottenere informazioni strutturali sugli analiti. Teoricamente ogni combinazione di atomi è caratterizzata da una massa unica che permette l'identificazione univoca del composto grazie alla sola massa esatta. Tuttavia all'aumentare della massa, il numero di combinazioni degli elementi e di formule molecolari possibili cresce esponenzialmente rendendo putativa l'identificazione dei composti chimici (Stoll *et al.*, 2006).

Per ottenere un'identificazione sicura dei composti in spettrometria di massa è necessaria un'elevata risoluzione e accuratezza di massa in modo da assegnare correttamente la formula molecolare ai composti sconosciuti ed aumentare la specificità eliminando le specie isobariche (cioè aventi la stessa massa) interferenti.

La **risoluzione** è definita come la capacità dello strumento di separare due picchi di massa adiacenti e negli strumenti TOF e QTOF è calcolata come l'ampiezza del picco misurata a metà dell'altezza del picco (Full Width at Half Maximum, FWHM).

La **massa esatta** è la massa teorica, calcolata utilizzando la massa dell'isotopo più leggero di ciascun elemento della molecola. Nel calcolo della massa esatta si tiene conto anche della carica singola o multipla espressa come massa dell'elettrone (0.00055 Da).

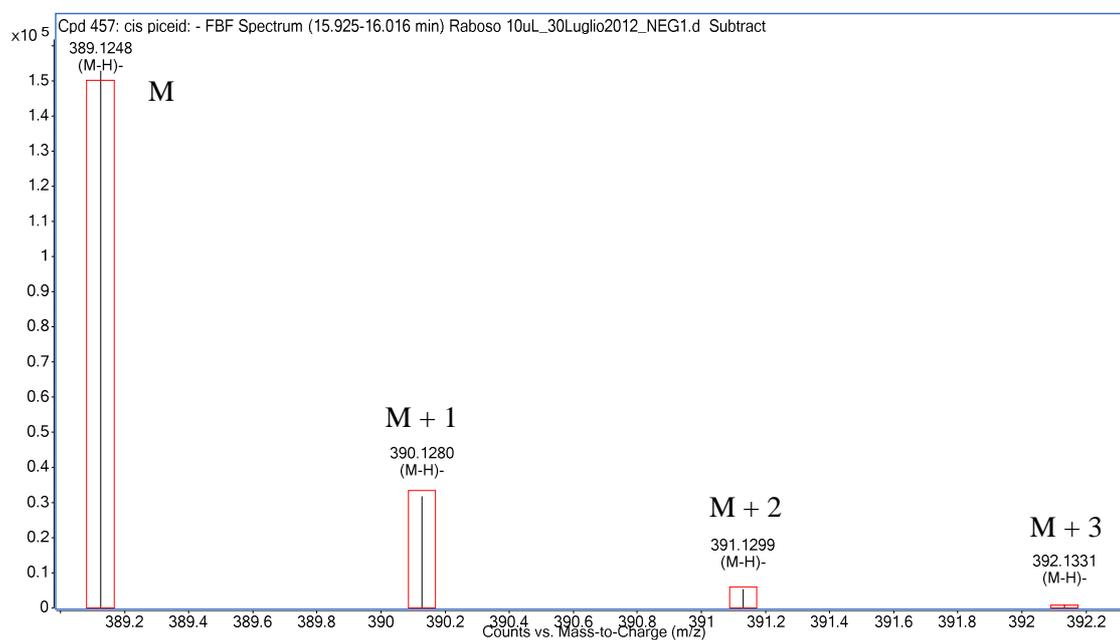
La **massa accurata** è la massa sperimentale di uno ione misurata con un appropriato grado di accuratezza e precisione.

La differenza tra il valore di massa misurato (massa accurata) ed il valore reale (massa esatta) rappresenta l'**accuratezza**, cioè l'errore della misurazione di massa calcolabile secondo la formula:  $(\text{massa accurata} - \text{massa esatta}) \times 10^6 / \text{massa esatta}$ , e solitamente espresso in ppm (Brenton e Godfrey, 2010).

Un'elevata risoluzione, tuttavia, non garantisce valori di massa  $m/z$  accurati (per questo proposito è necessaria una calibrazione adeguata) e la precisione può essere bassa anche con strumenti ad alta risoluzione se la calibrazione non è stabile (Reemtsma, 2009). Attualmente gli spettrometri di massa ad alta risoluzione sono capaci di effettuare misure di massa con un'accuratezza inferiore a 1 ppm, cioè una massa di 100 Da (Dalton) può essere misurata accuratamente fino alla quarta cifra decimale (Rojas-Chertó *et al.*, 2011). Il grado di accuratezza richiesto determina il tipo di strumento che può essere utilizzato: analizzatori di massa quali triplo quadrupolo (QqQ), quadrupolo-trappola ionica (Q-IT), TOF, QTOF, Orbitrap e FT-ICR (Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance) consentono di ottenere risoluzione via via crescente.

Oltre alla massa accurata, gli spettri di massa ad alta risoluzione contengono un'altra informazione che può essere utilmente impiegata per ridurre ulteriormente il numero di formule molecolari possibili: la distribuzione isotopica (o cluster isotopico). Il rapporto  $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ , in particolare, è utilizzato per calcolare il numero di atomi di carbonio del composto. In natura il carbonio è presente come isotopo  $^{13}\text{C}$  con un'abbondanza dell'1.1%, perciò se l'intensità di uno ione M avente 10 atomi di carbonio è pari a 100 il picco

isotopico  $^{13}\text{C}$  M+1 avrà un'abbondanza pari all'11% del picco  $^{12}\text{C}$ . Tenendo conto delle abbondanze isotopiche di tutti gli elementi (H, N, O,...) presenti è possibile calcolare la distribuzione e le intensità dei picchi del pattern isotopico del composto (**Figura 1.24**).



**Figura 1.24:** Pattern isotopico del *cis*-piceide (massa esatta:  $m/z$  390.1315; formula molecolare  $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_8$ ) determinato mediante analisi UPLC-QTOF-MS in modalità di ionizzazione negativa.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

La composizione polifenolica contribuisce alle proprietà sensoriali dell'uva e del vino, quali il colore, il sapore, l'astringenza, e determina il potenziale antiossidante degli estratti. I contenuti di polifenoli e flavonoidi dei sottoprodotti dell'industria enologica determinano un interesse come fonti di composti antiossidanti per l'industria agro-alimentare e nutraceutica.

La ricerca svolta in questo lavoro di tesi di dottorato è stata articolata secondo i seguenti obiettivi principali:

- a) la caratterizzazione chimica, attraverso lo studio dei metaboliti secondari dell'uva, di alcune varietà di *Vitis vinifera* di cui vi sono poche informazioni in letteratura, al fine di ottenere informazioni utili per la loro classificazione chemotassonomica, ed individuare quelle che possono essere rivalutate per la produzione di vini tradizionali e caratteristici;
- b) la caratterizzazione chimica di alcune varietà ibride al fine di indagare la presenza di peculiari metaboliti (es. antociani diglucosidi, flavonoli) e di individuare quelle che si distinguono per contenuti di polifenoli e flavonoidi potenzialmente utili per utilizzi industriali.

L'elaborato di tesi è stato suddiviso nei seguenti capitoli:

- valutazione delle potenzialità enologiche di nove varietà di *V. vinifera* autoctone del Friuli Venezia Giulia e del Veneto, attraverso la determinazione delle principali classi di polifenoli e aromi delle uve e dei parametri chimico-fisici ed organolettici dei vini ottenuti da microvinificazione (Capitolo 4.1);
- studio degli estratti antocianici delle bucce di 21 varietà ibride a bacca rossa per il loro utilizzo nell'industria dei coloranti naturali e degli antiossidanti (Capitolo 4.2);
- studio del profilo di trigliceridi dell'olio di vinaccioli di 32 varietà ibride che, per l'elevato contenuto di acidi grassi insaturi, trova numerose applicazioni nell'industria agro-alimentare e in altri settori (es. industria cosmetica) (Capitolo 4.3);
- studio delle proantocianidine dei vinaccioli di 32 varietà ibride e tre *Vitis vinifera* finalizzato al loro utilizzo come antiossidanti in supplementi dietetici e nutraceutici, e come tannini enologici per la chiarifica di mosti e vini (Capitolo 4.4).

E' stato infine sviluppato un nuovo approccio di metabolomica di 'suspect screening analysis' mediante analisi UHPLC/QTOF MS per lo studio dell'uva. A tal fine è stato costruito un database di metaboliti putativi dell'uva e del vino, denominato *GrapeMetabolomics*, che attualmente contiene un migliaio di composti (Capitolo 4.5).

### **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 Materiali e metodi per lo studio delle varietà *Vitis vinifera***

#### **3.1.1 Campioni di uve *V. vinifera***

Le uve sono state raccolte nelle vendemmie 2009 e 2010 alla maturazione tecnologica. Le uve di Boschera sono state campionate in due vigneti situati a Fregona (TV) e Conegliano (TV); quelle di Grapariol in due vigneti situati a Fossalta di Piave (VE) e Zenson di Piave (TV); Fumat e Pignolo in due vigneti ubicati a Pavia di Udine (UD) e Beano di Codroipo (UD); Cividin e Cjanorie in due vigneti situati a Pianzano al Tagliamento (PN) e Beano di Codroipo (UD); le uve di Sagrestana sono state campionate in un solo vigneto a Beano di Codroipo (UD); le uve di Cabrusina e Dindarella sono state campionate in due vigneti ubicati a Bardolino (VR) e San Floriano (VR) nell'annata 2010, mentre nell'annata 2009 sono state campionate nel solo vigneto di San Floriano.

Per ogni varietà il campionamento è stato effettuato raccogliendo 20 grappoli scelti casualmente da 10 ceppi rappresentativi all'interno della parcella prelevando i racimoli da diverse posizioni del grappolo (apicale, centrale, ali). Da questo materiale sono stati prelevati 200 acini sani dotati di pedicello che sono stati conservati a -20 °C fino alla preparazione degli estratti per le analisi.

#### **3.1.2 Preparazione degli estratti per l'analisi dei polifenoli delle bucce**

Per ciascun campione, le bucce di 20 acini congelati e pesati sono state manualmente separate dalle polpe e dai semi, asciugate su carta e poste in estrazione per 2 ore e mezza in 50 ml di tampone tartrato a pH 3.2 contenente 2 g/l di sodio metabisolfito e 12% in volume di etanolo al 95% (v/v). A fine estrazione le bucce sono state omogeneizzate mediante Ultraturrax<sup>®</sup> T18 basic (IKA<sup>®</sup> Labortechnik, Germania) e centrifugate a 4000 giri/min per 10 minuti. Il surnatante è stato raccolto e congelato fino al momento dell'analisi.

#### **3.1.3 Determinazione dei profili degli antociani**

Gli estratti delle bucce sono stati scongelati, sonicati e centrifugati a 4000 giri/min per 10 minuti. Un millilitro di estratto è stato addizionato con 1 ml di una soluzione di acido solforico 0.1 N. La soluzione è stata eluita in una cartuccia Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (Waters, Milford, USA) da 360 mg precedentemente attivata con 3 ml di metanolo e 5 ml di acqua. Dopo il caricamento del campione, la cartuccia è stata lavata con 2 ml di una soluzione di acido solforico 0.01 N e la frazione antocianica è stata eluita con 2 ml di metanolo, filtrata con filtro in polipropilene Acrodisc<sup>®</sup> GHP (Waters, Millord, USA) e la soluzione è stata raccolta in una vial da 2 ml.

Condizioni cromatografiche: l'analisi HPLC è stata eseguita con il cromatografo Spectra System Thermo Finnigan (Thermo, San Josè, CA) utilizzando una colonna a fase inversa LiChrospher 100 RP-18 (Merck, Darmstadt, Germany; 250 mm×4.6 mm; 5 µm) munita di precolonna. E' stato utilizzato un solvente binario costituito da A) H<sub>2</sub>O/HCOOH/CH<sub>3</sub>OH 40:10:50 (v/v/v) e B) H<sub>2</sub>O/HCOOH 90:10 (v/v) con il seguente

programma di eluizione a gradiente: dal 10% al 45% di A in 20 min; dal 45% al 70% di A in 25 min; dal 70% al 90% di A in 10 min; dal 90% al 99% di A in 2 min; 99% di A isocratica per 1 min; dal 99% al 10% di A in 4 min; 10% di A isocratica per 28 min. Flusso 0.70 ml/min; volume iniettato 20  $\mu$ l. La lettura di assorbanza è stata eseguita a 520 nm per gli antociani con un rivelatore a fotodiodi (DAD) che effettuava l'acquisizione dello spettro di assorbimento nell'intervallo 250-650 nm.

#### **3.1.4 Determinazione degli acidi idrossicinnamiltartarici (HCTA) e dei flavonoli delle bucce**

Gli estratti delle bucce sono stati scongelati e sonicati per riportare in soluzione i tartrati precipitati per 30 min. Un volume di 4.5 ml di estratto è stato trasferito in una provetta, addizionato di 0.5 ml di una soluzione di  $H_3PO_4$  1 M e la soluzione risultante è stata centrifugata a 4500 giri per 10 min. Il surnatante è stato filtrato con filtro a siringa in polipropilene Acrodisc<sup>®</sup> (Waters, Millord, USA) da 0.22  $\mu$ m e raccolto in una vial da 2 ml per l'analisi HPLC.

L'analisi HPLC è stata eseguita con il cromatografo Spectra System - Thermo Finnigan (Thermo, San Josè, CA) con una colonna Thermo Hypersil-Keystone ODS (Thermo Scientific) (dimensioni: lunghezza 200 mm; diametro interno 2.1 mm; particelle riempimento 5  $\mu$ m). E' stato utilizzato un solvente binario costituito da: A)  $CH_3OH$  e B)  $H_3PO_4$   $10^{-3}$  M con programma di eluizione a gradiente: dal 5% al 10% di A in 5 min; dal 10% al 30% di A in 15 min; dal 30% al 70% di A in 30 min; dal 70% al 100% di A in 10 min; 100% di A isocratica per 10 min; dal 100% al 5% di A in 5 min; 5% di A isocratica per 25 min. Flusso 0.25 ml/min; volume iniettato 10  $\mu$ l. La lettura di assorbanza è stata eseguita a 320 nm per gli HCTA e a 360 nm per i flavonoli con un rivelatore a fotodiodi (DAD) che effettuava l'acquisizione dello spettro di assorbimento nell'intervallo 200-700 nm.

#### **3.1.5 Determinazione dell'indice di antociani e flavonoidi totali delle bucce**

Le determinazioni degli indici polifenolici negli estratti sono state eseguite utilizzando i metodi già riportati da Di Stefano e Cravero (1991). Gli estratti delle bucce sono stati scongelati e centrifugati a 4000 giri per 10 min. Un millilitro di surnatante è stato trasferito in un matraccio da 25 ml e portato a volume con una soluzione EtOH/ $H_2O$ /HCl 70:30:1 (v/v/v). La soluzione è stata centrifugata a 4000 giri per 10 min e diluita quando l'assorbanza era superiore a 500 nm.

Le misure sono state effettuate con uno spettrofotometro UV-Vis Cary 50 SCAN (Varian, Milano) eseguendo la scansione da 250 a 350 nm per la determinazione dell'indice di flavonoidi totali, e da 350 a 700 nm per l'indice di antociani totali. L'indice di flavonoidi totali a 280 nm è stato espresso in mg/l di (+)-catechina, l'indice di antociani totali a 520 nm è stato espresso come mg/l di malvidina-3-glucoside.

Le espressioni utilizzate per calcolare gli indici sono riportate di seguito:

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

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

### 3.1.6 Determinazione dei flavan-3-oli dei vinaccioli

I semi di 20 acini di ciascuna varietà sono stati lavati con acqua distillata, asciugati, posti in 25 ml di soluzione estraente tampone tartrato a pH 3.2 e congelati. Sette giorni prima dell'analisi gli estratti sono stati scongelati e lasciati in estrazione al buio a 25 °C. Metà del volume degli estratti è stata portata a secco mediante evaporatore rotante, il residuo è stato risolubilizzato con 10 ml di metanolo e sonicato accuratamente. La soluzione è stata posta in una provetta in congelatore a -20 °C per una notte per favorire la stratificazione dei grassi. Successivamente la soluzione è stata scongelata e centrifugata a -8 °C a 4600 giri/min per 15 minuti. Il surnatante è stato trasferito in un imbuto separatore dove sono stati eseguiti 2 lavaggi con 20 ml di esano per rimuovere i residui di grassi. Nei campioni molto ricchi di grassi in seguito all'aggiunta di esano si è osservata la formazione di precipitato. In questo caso la soluzione è stata ricongelata e centrifugata. In seguito al lavaggio con esano, la soluzione è stata concentrata ad 1 ml mediante evaporatore rotante e ripresa con 20 ml di acqua. Si è quindi proceduto al frazionamento su cartuccia Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (Waters) da 1 g precedentemente attivata con 3 ml di metanolo e 5 ml di acqua allo scopo di separare i flavanoli monomeri e le proantocianidine oligomere dalle frazioni a più alto peso molecolare. Dopo caricamento del campione, la cartuccia è stata lavata con 5 ml di acqua e le frazioni monomere ed oligomere sono state eluite con 5 ml di una soluzione di CH<sub>3</sub>CN/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 M 20:80 (v/v). Prima dell'analisi HPLC il campione è stato filtrato con filtro da 0.2 µm in polipropilene idrofilico Acrodisc<sup>®</sup> GHP (Waters, Milford, USA).

Condizioni cromatografiche: l'analisi HPLC è stata eseguita con il cromatografo Spectra System AS3000 Thermo Finnigan (Thermo, San Josè, CA) rivelatore UV6000LP su colonna a fase inversa Merck LiChrospher 100 RP-18 (250×4.6 i.d. mm; 5 µm). È stato utilizzato un solvente binario costituito da A) H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 5·10<sup>-3</sup>M e B) CH<sub>3</sub>CN con un programma di eluizione a gradiente: 95% di A isocratica per 10 min; dal 95% all'88% di A in 20 min; 88% di A isocratica per 20 min; dall'88% al 68% di A in 30 min; dal 68% al 50% di A in 10 min; 50% di A isocratica per 5 min; dal 50% al 95% di A in 5 min; 95% di A isocratica per 10 min. Flusso 0.50 ml/min; volume iniettato 10 µl. La lettura di assorbanza è stata eseguita a 280 nm per i flavanoli con un rivelatore a fotodiodi (DAD) che effettuava l'acquisizione dello spettro di assorbimento nell'intervallo 200-700 nm.

### 3.1.7 Preparazione degli estratti per l'analisi degli aromi

Sono stati studiati i profili aromatici dei campioni di uve Dindarella e Boschera. Per la preparazione dei campioni da sottoporre ad analisi GC/MS sono stati utilizzati i metodi già riportati in letteratura (Di Stefano *et al.*, 1995; Mateo *et al.*, 1997; Flamini *et al.*, 2001) modificati per i nostri scopi.

Le bucce di 60 acini sono state manualmente separate da polpe e semi e poste a macerare in una beuta contenente 40 ml di metanolo per 4 ore. Dopo l'estrazione con metanolo, le bucce sono state omogeneizzate mediante Ultra-Turrax<sup>®</sup> e centrifugate a 4000 giri/min per 10 minuti. Il surnatante è stato recuperato in un pallone da 100 ml e ridotto al volume di 10 ml mediante evaporatore rotante; mentre il residuo solido è stato lavato con 30 ml di acqua, nuovamente centrifugato ed il surnatante unito alla fase organica in un matraccio da 200 ml. Dopo aver aggiustato il volume con acqua, la soluzione è stata mescolata per 20 minuti con 2 g di Polyclar AT (PVP insolubile) per diminuire il contenuto polifenolico, filtrata su filtro compatto e congelata fino al momento dell'analisi.

### 3.1.8 Determinazione dei terpeni liberi

Un volume pari a 100 ml di estratto è stato scongelato, addizionato con 200 µl di una soluzione di 1-eptanolo a concentrazione 1440 mg/l come standard interno e portato a volume con acqua in un matraccio da 200 ml. La soluzione viene fatta passare attraverso una cartuccia C<sub>18</sub> Sep-Pak<sup>®</sup> da 10 g (Waters, Milford, USA) preventivamente attivata mediante passaggio di 50 ml di diclorometano, 30 ml di metanolo e 50 ml di acqua. Dopo il caricamento del campione, la cartuccia è stata lavata con 50 ml di acqua per rimuovere sali e composti polari, e la frazione di aromi liberi è stata eluita con 50 ml di diclorometano. Una seconda frazione, contenente i composti glicosidati, è stata eluita con 30 ml di metanolo. La soluzione contenente i composti liberi è stata disidratata su sodio solfato, concentrata mediante distillazione su una colonna di Vigreux di 40 cm di lunghezza, portata a 200 µl sotto flusso di azoto e sottoposta ad analisi GC/MS.

### 3.1.9 Determinazione dei terpeni glicosidati

La soluzione metanolica è stata portata a secco mediante evaporatore rotante a 40 °C, ed il residuo ripreso con 5 ml di una soluzione di tampone citrato-fosfato a pH 5. La soluzione è stata addizionata di 100 mg di enzima AR 200 a forte attività glicosidica secondaria (Gist Brocades, Seclin, France) e lasciata in termostato a 40 °C per una notte. Successivamente la soluzione è stata centrifugata, addizionata di 200 µl di una soluzione di 1-decanolo a concentrazione 1260 mg/l come standard interno e fatta passare per gravità attraverso una cartuccia C<sub>18</sub> Sep-Pak<sup>®</sup> da 1 g (Waters) preventivamente attivata con 5 ml di diclorometano, 3 ml di metanolo e 5 ml di acqua. Dopo caricamento, la cartuccia è stata lavata con 5 ml di acqua ed i composti liberati per idrolisi enzimatica sono stati eluiti con 6 ml di diclorometano e la soluzione è stata concentrata a 200 µl sotto flusso di azoto prima dell'analisi GC/MS.

### **3.1.10 Analisi GC/MS**

Le analisi sono state eseguite con un sistema Hewlett Packard costituito da un gas cromatografo HP 5890, equipaggiato con una colonna in silica 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 autocampionatore 6890 Series Injector. Condizioni sperimentali: temperatura iniettore 200 °C; modalità di iniezione splitless; volume iniettato 1 µl; carrier gas: He. Programma di temperatura del forno: 3 min a 60 °C, 2 °C/min fino a 160 °C, 3 °C/min fino a 230 °C, 230 °C per 5 min. L'identificazione dei composti è stata eseguita mediante il confronto con le banche dati di spettri di massa NIST98 e la banca dati ESTRATTI del Laboratorio Chimico CRA-VIT.

### **3.1.11 Microvinificazione delle uve**

I campioni delle uve raccolte alla vendemmia sono stati sottoposti a microvinificazione seguendo un protocollo standardizzato e sul vino ottenuto sono state effettuate le analisi chimico-fisiche dei principali parametri enologici (alcol, estratto netto, pH, acidità totale e volatile, polifenoli totali). I profili organolettici sono stati determinati mediante degustazione svolta da panel di assaggiatori addestrati.

L'uva rossa conferita in cantina è stata diraspa-pigiata in giornata e addizionata di 40 mg/l di metabisolfito di potassio. Durante la fermentazione alcolica, avviata con l'inoculo di lieviti secchi attivi (30 g/hl, EC 1118), sono stati effettuati rimontaggi e follature manuali giornaliere. L'esaurimento della vinaccia è stato eseguito con una pressatura soffice (2.5 bar); quindi il vino di pressa è stato aggiunto al mosto-fiore che è stato sfecciato trascorse 24 ore. Al termine della fermentazione malolattica il mosto è stato addizionato di 20 mg/l di metabisolfito di potassio e travasato dopo 48 ore, 15 e 30 giorni. Il vino è stato imbottigliato tramite filtrazione su cartuccia di 1 µm.

L'uva bianca raccolta alla vendemmia è stata conservata in cella climatizzata a + 4°C fino al giorno successivo, quindi diraspa-pigiata e pressata mediante pressa pneumatica (2 bar). La pulizia del mosto è stata effettuata mediante l'aggiunta di enzimi pectolitici. Il mosto è stato addizionato di metabisolfito di potassio (40 mg/l), mantenuto per 24 ore in una stanza termocondizionata a +/- 10 °C e successivamente sfecciato. La fermentazione alcolica è stata avviata mediante aggiunta di lieviti secchi (30 g/hl IT 1118). Al termine della fermentazione il vino-fiore è stato sfecciato e addizionato di 20 mg/l di metabisolfito di potassio; tale operazione è stata ripetuta dopo 48 ore. Il vino è stato travasato dopo un mese e imbottigliato tramite filtrazione su cartuccia di 0.5 µm.

## 3.2 Materiali e metodi per lo studio degli antociani delle varietà rosse ibride

### 3.2.1 Campioni e preparazione del campione

I campioni di uve delle 21 varietà rosse elencate nella tabella 1.5 sono stati raccolti nell'anno 2010 dalle piante presenti nella collezione del germoplasma viticolo CRA-VIT di Susegana (TV). Il campionamento è stato effettuato raccogliendo 10 grappoli scelti casualmente da 5 ceppi presenti nella collezione prelevando i racimoli da diverse posizioni del grappolo (apicale, centrale, ali). Da questo materiale sono stati prelevati 100 acini sani dotati di peduncolo che sono stati conservati a -20°C fino alla preparazione degli estratti per le analisi che sono state ripetute in doppio.

Il metodo utilizzato per preparare gli estratti è lo stesso precedentemente descritto nei paragrafi 3.1.2 e 3.1.5 per le varietà *V. vinifera*. Gli estratti delle bucce sono stati scongelati e centrifugati; è stato prelevato 1 ml del surnatante ed addizionato di 1 ml di acido solforico 0.1 N; la soluzione è stata eluita su cartuccia C<sub>18</sub> Sep-Pak<sup>®</sup> (Waters, USA) da 360 mg e gli antociani sono stati recuperati con 2 ml di metanolo.

### 3.2.2 Analisi HPLC/DAD.

Un millilitro della soluzione metanolica è stato addizionato di 3 ml di una soluzione di H<sub>2</sub>O/HCOOH 85:15 (v/v) e la soluzione è stata filtrata con un filtro a siringa in polipropilene Acrodisc<sup>®</sup> GHP (Waters) da 0.22 µm.

Condizioni cromatografiche per l'analisi HPLC: è stato utilizzato un cromatografo Spectra System Thermo Finnigan (Thermo, San José, CA) munito di una colonna a fase inversa LiChrospher 100 RP-18 (Merck, Darmstadt, Germany; 250 mm × 4.6 mm; 5 µm). È stato utilizzato un solvente binario costituito da A) H<sub>2</sub>O/HCOOH 90:10 (v/v) e B) H<sub>2</sub>O/HCOOH/CH<sub>3</sub>OH 40:10:50 (v/v/v) con programma di eluizione a gradiente: 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; 99% di B isocratica per 1 min; dal 99% al 10% di B in 5 min; condizionamento per 28 min. Flusso 0.70 ml/min; volume di campione iniettato 20 µl. La lettura di assorbanza per gli antociani è stata eseguita a 520 nm con un rivelatore a fotodiodi (DAD) che effettuava l'acquisizione dello spettro di assorbimento nell'intervallo 200-700 nm. I composti sono stati identificati in base all'ordine di eluizione nella colonna, lo spettro di assorbimento ed i tempi di ritenzione relativi alla malvidina-3,5-O-diglucoside (Extrasynthese, Genay, Francia) utilizzata come standard.

### 3.2.3 LC/MS precursor-ion analysis

La soluzione metanolica è stata diluita 1:50 con una soluzione di H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN/HCOOH 90:10:0.1 (v/v/v) e filtrata con un filtro a siringa Acrodisc<sup>®</sup> GHP (Waters) da 0.22 µm. Le analisi sono state eseguite con un sistema UPLC Acquity equipaggiato con una colonna Acquity BEH C18 (2.1×100 mm, 1.7 µm) (Waters) e spettrometro di massa Xevo TQ (Waters Corporation, Milford, USA). È stato utilizzato un

solvente binario costituito da A) H<sub>2</sub>O/0.1% HCOOH (v/v) e B) CH<sub>3</sub>CN con un programma di eluizione a gradiente: 5 % di B per 0.25 min, da 5 a 70 % di B in 6.25 min; da 70 a 100% di B in 1.10 min; 100 % di B per 1 min. Flusso 0.45 ml/min; temperatura della colonna 40 °C; volume di campione iniettato 20 µl.

Condizioni sperimentali dello spettrometro di massa: voltaggio del capillare 1.5 kV (modalità positiva), temperatura della sorgente 150°C, flusso del gas di desolvatazione 1000 l/h, temperatura di desolvatazione 500°C, flusso del gas conico 20 l/h. Gli esperimenti collision-induced-dissociation (CID) sono stati eseguiti utilizzando Argon come gas di collisione ad un flusso di 0.20 ml/min.

Per la scansione dello ione precursore di pelargonidina (Pg, *m/z* 271), delphinidina (Dp, *m/z* 303), cianidina (Cy, *m/z* 287), petunidina (Pt, *m/z* 317), peonidina (Pn, *m/z* 301) e malvidina (Mv, *m/z* 331) l'energia di collisione è stata impostata a 4 eV ed il voltaggio del cono a 31 V. Per la scansione dei derivati monoglucosidi (Pg-3-O-glucoside, *m/z* 433; Dp-3-O-glucoside, *m/z* 465; Cy-3-O-glucoside, *m/z* 449; Pt-3-O-glucoside, *m/z* 479; Pn-3-O-glucoside, *m/z* 463; Mv-3-O-glucoside, *m/z* 493), l'energia di collisione era 25 eV e il voltaggio del cono 35 V. I valori di energia di collisione sono stati impostati automaticamente dallo strumento sull'intensità dei segnali a *m/z* 331 (Mv) e *m/z* 493 (Mv-3-O-glucoside) rispettivamente.

### **3.3 Materiali e metodi per lo studio dei trigliceridi**

#### **3.3.1 Campioni di uve ibride**

Le uve delle 32 varietà ibride riportate in Tabella 1.5 sono state raccolte nel 2010 nella collezione di varietà di vite del CRA-VIT situata a Susegana (TV) secondo il metodo di campionamento descritto nel paragrafo 3.2.1 ed immediatamente congelate.

#### **3.3.2 Estrazione dell'olio dai vinaccioli**

I semi di 20 acini sono stati manualmente separati dalle bucce e dalle polpe, asciugati su carta, pesati e trituriati in un mortaio con azoto liquido. La polvere di vinaccioli è stata posta in un tubo di vetro ed è stato aggiunto un volume di esano di 10:1 (v/p). Il tubo è stato posto sotto agitazione per una notte a temperatura ambiente. L'estratto è stato filtrato su un filtro di carta a pieghe e l'esano è stato rimosso sotto vuoto mediante evaporatore rotante. Il residuo di olio è stato recuperato in una vial da 2 ml e conservato sotto atmosfera di azoto a -20°C fino al momento dell'analisi.

Per valutare la resa dell'olio, per ogni campione i semi di 40 acini sono stati pesati lasciati seccare a temperatura ambiente per un giorno e ridotti in polvere con un macinino elettrico. L'olio è stato estratto nelle stesse condizioni riportate sopra; l'esano è stato rimosso sotto vuoto ed il residuo è stato pesato.

#### **3.3.3 Analisi ESI/MS e ESI/MS/MS**

Gli spettri di massa dei trigliceridi sono stati ottenuti mediante uno strumento LCQ a trappola ionica (Thermo-Finnigan, San José, CA, USA), equipaggiato con una sorgente ionica ESI operante in modalità positiva. Un milligrammo di olio è stato sciolto in 1 ml di una soluzione di THF/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 85:10:5 (v/v/v) e l'analisi della soluzione è stata effettuata mediante infusione diretta in sorgente con una siringa a pistone ad un flusso di 8 µl/min.

Condizioni strumentali: voltaggio spray 4kV; temperatura dell'entrata capillare 280°C; sheath gas 40 a.u.

#### **3.3.4 Analisi MALDI-TOF MS**

L'analisi MALDI/MS è stata effettuata utilizzando uno strumento MALDI-TOF-TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Germania) reflectron equipaggiato con laser 1 kHz smartbeam II ( $\lambda=355$  nm) operante in modalità positiva. Le condizioni strumentali impiegate per analizzare le specie molecolari nel range di massa 450-3500 *m/z* erano: sorgente ionica 1: 25.00 kV; sorgente ionica 2: 22.30 kV; lente: 7.70 kV; estrazione ionica pulsata: 80 ns; reflector 1: 26.45 kV; reflector 2: 13.45 kV. La soluzione della matrice è stata preparata sciogliendo 10 mg di cristalli di acido diidrossibenzoico (DHB) in 1 ml di metanolo. I campioni di olio sono stati sciolti in cloroformio alla concentrazione di 1 mg/ml. Un volume di 5 µl della soluzione di matrice è stato mescolato con lo stesso

volume della soluzione di olio, ed 1  $\mu\text{l}$  della miscela è stato depositato sulla piastra portacampione in acciaio inossidabile e lasciata asciugare prima di essere introdotta nello spettrometro. La calibrazione di massa esterna (Peptide Calibration Standard) si è basata sui valori monoisotopici dello ione  $[\text{M}+\text{H}]^+$  di Bradichinina, Angiotensina I, Angiotensina II, Sostanza P, Bombesina, clip ACTH (1-17), clip ACTH (18-39), Somatostatina 28 alle masse  $m/z$  757.39916, 1046.5420, 1296.6853, 1347.7361, 1619.8230, 2093.0868, 2465.1990 e 3147.4714.

### **3.3.5 Analisi statistica**

L'analisi fattoriale, l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) e dei cluster sono state effettuate utilizzando il software statistico MINITAB Inc. 2003 Release 14 per Windows (State College, Pennsylvania). Nell'analisi ANOVA è stato utilizzato il test di Tukey applicando un livello di significatività del 95%; confronti aventi  $p < 0.05$  sono stati considerati significativi. L'analisi dei cluster è stata applicata per raggruppare insieme casi simili per il contenuto di trigliceridi ed è stato utilizzato il metodo del legame medio (average linkage method) e della distanza Euclidea.

### 3.4 Materiali e metodi per lo studio delle proantocianidine dei vinaccioli

#### 3.4.1 Campioni

I campioni d'uva di 32 varietà di ibridi riportati in tabella 1.5 e di tre varietà di *V. vinifera* di riferimento (Aramon (*V. vinifera* × ?), Cabernet Sauvignon, Chardonnay) sono stati raccolti nel 2010 a maturità tecnologica nella Collezione ampelografica del CRA-VIT situata a Susegana (TV). Il campionamento è stato eseguito come descritto nel paragrafo 3.2.1.

#### 3.4.2 Estrazione delle proantocianidine

I vinaccioli di 20 acini sono stati manualmente separati da bucce e polpe, asciugati su carta, pesati e polverizzati in un mortaio con azoto liquido. La polvere di vinaccioli è stata lavata con esano (rapporto 1:10 p/v) sotto agitazione al buio per 18 ore per estrarre l'olio ed i lipidi. La polvere è stata separata mediante un filtro di carta e le proantocianidine sono state estratte con una soluzione CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) in rapporto 1:10 (p/v) sotto agitazione per 18 ore. I campioni sono stati centrifugati a 4000 giri/min per 10 minuti a 15 °C e la soluzione metanolica è stata filtrata su filtro di carta.

#### 3.4.3 Indice di polifenoli totali

Il contenuto di polifenoli totali degli estratti è stato determinato secondo il metodo di Folin-Ciocalteu (Di Stefano e Cravero, 1991). Un volume di 0.1 ml di estratto metanolico è stato diluito 4 volte con acqua e trasferito in un matraccio da 20 ml dove sono stati aggiunti 5 ml di acqua distillata, 1 ml del reagente di Folin-Ciocalteu e 4 ml di una soluzione acquosa di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% (p/v). Il matraccio è stato portato a volume e la soluzione è stata lasciata sotto reazione per 90 minuti. L'assorbanza della soluzione è stata misurata a 700 nm utilizzando lo spettrofotometro Cary 50 Scan UV-Vis (Varian, Milano).

L'indice di polifenoli totali è stato calcolato dalla formula:

$$(+)\text{-catechina (mg/kg)} = 186.5 \times A_{700} \times (n/V) \times (V_{\text{ex}}/g)$$

dove n è il numero di diluizioni del campione, V il volume dell'estratto utilizzato (0.1 ml), V<sub>ex</sub> il volume totale di estratto di semi, g il peso del campione d'uva.

#### 3.4.4 Analisi MALDI-TOF

Le misurazioni MALDI-TOF sono state effettuate utilizzando lo strumento MALDI-TOF-TOF UltrafleXtreme (Bruker Daltonics, Bremen, Germania), equipaggiato con laser da 1 kHz smartbeam II ( $\lambda=355$  nm) operante in modalità positiva. Le condizioni strumentali impiegate per analizzare le specie molecolari nel range di massa  $m/z$  450-3500 sono state: sorgente ionica 1: 25.00 kV; sorgente ionica 2: 22.30 kV; lenti: 7.70 kV; estrazione ionica pulsata: 80 ns; reflector 1: 26.45 kV; reflector 2: 13.45 kV. La soluzione della matrice è stata preparata sciogliendo 10 mg di acido 2,5-diidrossibenzoico (DHB) in 1 ml di una soluzione CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v). Gli estratti sono stati diluiti 1:10 v/v con

CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 70:30 (v/v) e 5 µl della soluzione sono stati mescolati con pari volume di matrice. Un volume di 1 µl della miscela è stato depositato sul porta-campioni di acciaio e lasciato asciugare prima di essere introdotto nello spettrometro di massa. La calibrazione di massa esterna (Standard di Calibrazione Peptidico) si è basata sui valori monoisotopici degli ioni [M+H]<sup>+</sup> di Bradichinina, Angiotensina II, Angiotensina I, Sostanza P, Bombesina, clip ACTH (1-17), clip ACTH (18-39), Somatostatina 28 rispettivamente a *m/z* 757.39916, 1046.5420, 1296.6853, 1347.7361, 1619.8230, 2093.0868 e 3147.4714.

### 3.4.5 Analisi statistica

Le intensità relative (rispetto al segnale più abbondante) dei segnali sono state sottoposte a trasformazione angolare per normalizzare la distribuzione dei dati mediante la formula:  $y = \arcsin(\sqrt{p})$  dove *y* è il valore della variabile trasformata, *arcsin* è la funzione arcoseno, *sqrt(p)* è la radice quadrata della proporzione percentuale. Per selezionare le variabili significative per la differenziazione tra *V. vinifera* e ibridi è stata eseguita l'ANOVA ad una via applicando il test di Fisher con un livello di significatività pari al 95% (Cabredo-Pinillos *et al.*, 2008). Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con il software statistico Minitab Inc. (2003), Release 14 per Windows (State College, Pensilvania).

### 3.5 Materiali e metodi per il nuovo approccio di metabolomica

#### 3.5.1 Preparazione dei campioni di uve di varietà ibride

Circa 100 acini delle varietà Clinton (*V. riparia* × *V. labrusca*), Seibel 19881 (numero VIVC, Vitis International Variety Catalogue: 11461) e Seyve Villard 12-347 (Seibel 6468 × Seibel 6905) sono stati raccolti a piena maturazione nel 2011 (il Clinton) e nel 2011 e 2012 (le altre due varietà) dalla Collezione del Germoplasma viticolo del CRA-VIT (Susegana, Treviso, Italia). Le bacche sono state prelevate casualmente da cinque diverse piante ed immediatamente congelate a -20 °C.

Per la preparazione del campione di uva Clinton, 20 acini sono stati pesati, omogeneizzati con azoto liquido e la polvere risultante è stata immediatamente estratta a freddo con metanolo puro in rapporto 2:1 (v/p) sotto agitazione per 20 min. Dopo l'aggiunta di 200 µl di una soluzione metanolica di 4',5,7-triidrossi flavanone a 500 mg/l come standard interno, il campione è stato centrifugato a 10 °C per 20 min. La soluzione è stata filtrata con filtro Acrodisc GHP 0,22 µm (Waters, Milford, USA) e raccolta in una vial per l'analisi LC/MS. Per ogni campione sono state ripetute due analisi.

Gli estratti delle varietà Seibel 19881 e Seyve Villard 12-347 sono stati ottenuti secondo il procedimento utilizzato per l'analisi dei polifenoli nelle bucce descritto nel paragrafo 3.1.2. Gli estratti delle bucce sono stati scongelati, sonicati e centrifugati a 4000 giri per 10 minuti. Sono stati prelevati 2 ml di estratto ed addizionati con 2 ml di una soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 N. Sono stati aggiunti 20 µl di soluzione di standard interno 4',5,7-triidrossiflavanone a concentrazione 304.64 mg/l. La soluzione è stata eluita in una cartuccia Sep-Pak<sup>®</sup> C<sub>18</sub> (Waters) da 360 mg precedentemente attivata con 3 ml di CH<sub>3</sub>OH e 5 ml di H<sub>2</sub>O. Dopo caricamento, la cartuccia è stata lavata con 2 ml di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.01 N, e la soluzione contenente l'estratto antocianico è stata eluita con 2 ml di CH<sub>3</sub>OH e filtrata su vials da 2 ml con filtro in polipropilene Acrodisc<sup>®</sup> GHP (Waters). Dopo l'estrazione il campione Seibel 19881 è stato diluito con altri 2 ml di metanolo.

#### 3.5.2 Spettrometria di massa LC/QTOF

Il sistema analitico utilizzato è costituito da un UHPLC Agilent 1290 Infinity equipaggiato con un autocampionatore Agilent 1290 Infinity e accoppiato allo spettrometro di massa accurata Agilent 6540 Q-TOF (risoluzione nominale 40000) con sorgente di ionizzazione Jet Stream (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Sono state eseguite due analisi ripetute di ogni campione con modalità di scansione completa sia in modalità di ionizzazione positiva che negativa. Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna a fase inversa Zorbax (RRHD SB-C18 3×150 mm, 1.8 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). La fase mobile era costituita da (A) H<sub>2</sub>O/0.1% HCOOH (v/v) e (B) CH<sub>3</sub>CN/0.1% HCOOH (v/v). Programma di eluizione a gradiente: 5% B isocratica per 8 min, da 5 a 45% B in 10 min, dal 45 al 65% B in 5 min, 65-90% B in 4 min, 90% B

isocratica per 10 min. Flusso 0.4 ml/min. Volume di campione iniettato 10  $\mu$ l. Temperatura della colonna 35 °C.

Condizioni Q-TOF: flusso di azoto 10 l/min a 400 °C; flusso di azoto per l'evaporazione del solvente 8 l/min a 350 °C; pressione nebulizzatore 60 psi, tensione ugello 1 kV, voltaggio del capillare 3.5 kV. I segnali sono stati registrati nell'intervallo  $m/z$  100-1700. La calibrazione di massa negativa è stata eseguita con una miscela standard G1969-85000 (Supelco Inc.) e con un errore residuo per le masse previste compreso tra  $\pm 0.2$  ppm. Composti utilizzati per la calibrazione: anioni TFA a  $m/z$  112.9856 e HP-0921 (+ formiato) a  $m/z$  966.0007 in modalità negativa, cationi purina a  $m/z$  121.0509 e HP-0921 a  $m/z$  922.0098 in modalità positiva. Condizioni MS/MS: campo elettrico di frammentazione compreso tra 20-60 eV.

### 3.5.3 Analisi dei dati

Il trattamento dei dati è stato effettuato con il software di analisi Agilent MassHunter Qualitative Analysis versione B.05.00. Il database di metaboliti putativi dell'uva e del vino (*GrapeMetabolomics*) è stato sviluppato raccogliendo le informazioni sulle formule molecolari trovate in letteratura e nelle banche dati elettroniche. L'identificazione target dei composti è stata eseguita con l'algoritmo "Find Compounds by Formula", mentre l'analisi untarget è stata eseguita con l'algoritmo "Find Compounds by Molecular Feature". La fiducia di identificazione dei composti basata sulla determinazione della massa accurata e del pattern isotopico è stata espressa con uno "score di identificazione globale", calcolato valutando lo scostamento in ppm tra la massa sperimentale e quella teorica, l'abbondanza relativa e la distanza  $m/z$  (spacing) nel pattern isotopico. Il peso relativo dei diversi parametri presi in considerazione per il calcolo dello "score" espresso in percentuale sono:  $W_{\text{mass}}=100$ ;  $W_{\text{abundance}}=60$ ;  $W_{\text{spacing}}=50$ , con tolleranze relative alla massa teorica di 2.0 mDa + 5.6 ppm, all'abbondanza isotopica del 7.5%, alla distanza tra le masse isotopiche di 0.00025  $m/z$  + 7.0 ppm.

## **4. RISULTATI E DISCUSSIONE**

## 4.1 Valutazione delle potenzialità enologiche delle varietà *V. vinifera*

### 4.1.1 Indici di antociani totali e di flavonoidi totali delle bucce

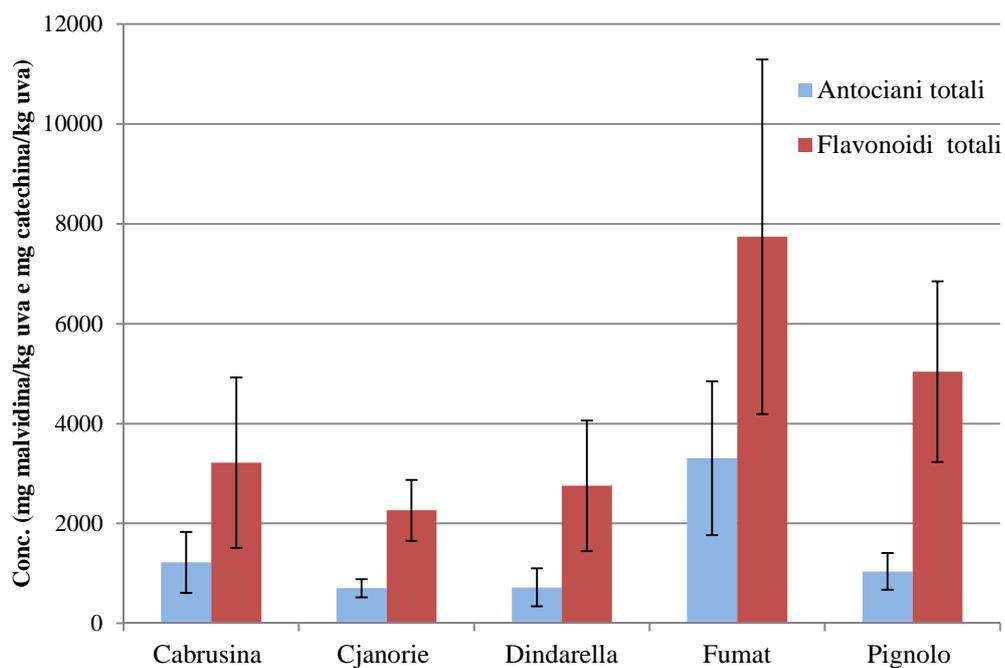
In **Tabella** e **Figura 4.1** sono riportati i valori medi degli indici di flavonoidi totali e di antociani totali determinati negli estratti delle bucce delle cinque varietà a bacca rossa nelle due annate di studio.

La varietà Fumat si distingue per i più alti indici di antociani e flavonoidi totali, seguita dal Pignolo per quanto riguarda l'indice di flavonoidi totali, mentre l'indice di antociani totali del Pignolo è di poco superiore a Cjanorie e Dindarella e di poco inferiore a Cabrusina.

Per tutte le varietà si può notare una notevole differenza tra i valori registrati nelle due annate indicata dalla semidispersione dalla media, probabilmente a causa del più elevato grado di maturazione fenolica al momento della raccolta nell'annata 2009.

<i>Varietà</i>	<i>Antociani totali mg malvidina/kg uva</i>	<i>Flavonoidi totali mg catechina/kg uva</i>
<b>Cabrusina</b>	1221 ± 611	3216 ± 1706
<b>Cjanorie</b>	703 ± 182	2262 ± 611
<b>Dindarella</b>	721 ± 379	2754 ± 1306
<b>Fumat</b>	3306 ± 1539	7739 ± 3550
<b>Pignolo</b>	1041 ± 366	5037 ± 1807

**Tabella 4.1:** Valori medi di due annate con relativa semidispersione dalla media degli indici di antociani totali (espressi in mg malvidina-3-O-glucoside/kg uva) e di flavonoidi totali (espressi in mg (+)-catechina/kg uva).

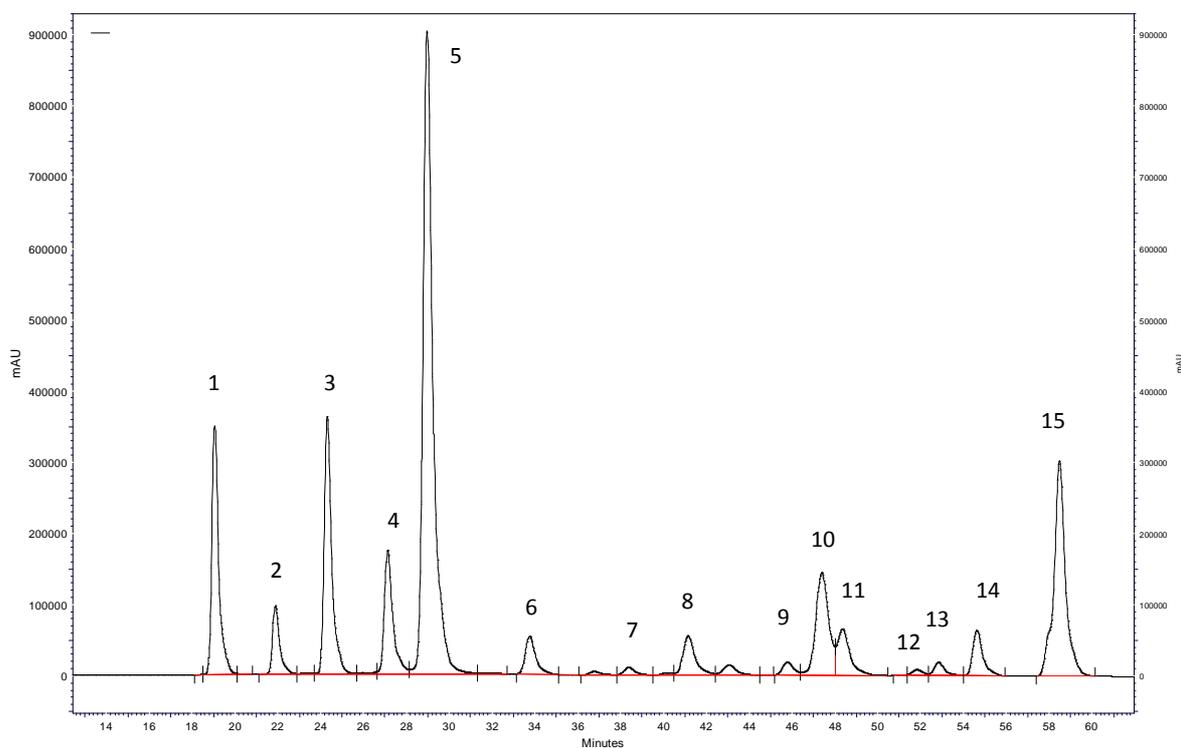


**Figura 4.1:** Indice di antociani totali (mg malvidina-3-O-glucoside/kg uva) e indice di flavonoidi totali (mg (+)-catechina/kg uva) nelle bucce delle varietà a bacca rossa. Sono rappresentati i valori medi delle due annate con la relativa semidispersione dalla media.

### 4.1.2 Studio del profilo degli antociani

Il profilo antocianico rappresenta un parametro tassonomico importante per la classificazione delle varietà dal momento che, sebbene cambino le concentrazioni assolute nei diversi anni di raccolta, la composizione degli antociani rimane relativamente stabile (Mattivi *et al.*, 2006).

La **Figura 4.2** rappresenta il profilo di antociani della varietà Fumat determinato mediante analisi HPLC/DAD. L'assegnazione dei picchi cromatografici è stata fatta sulla base della sequenza di eluizione della colonna a fase inversa e lo spettro di assorbimento dei composti, la composizione percentuale di antociani delle bucce delle varietà rosse è stata determinata dalla misura dell'area dei picchi cromatografici.



**Figura 4.2:** Cromatogramma HPLC del profilo degli antociani nella varietà Fumat. 1) delfinidina-3-O-glucoside; 2) cianidina-3-O-glucoside; 3) petunidina-3-O-glucoside; 4) peonidina-3-O-glucoside; 5) malvidina-3-O-glucoside; 6) delfinidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside; 7) delfinidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside; 8) petunidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside; 9) peonidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside; 10) malvidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside; 11) delfinidina-3-O-(6-O-*p*-cumaril)glucoside; 12) malvidina-3-O-(6-O-caffeoil)glucoside; 13) cianidina-3-O-(6-O-*p*-cumaril)glucoside; 14) petunidina-3-O-(6-O-*p*-cumaril)glucoside; 15) peonidina + malvidina-3-O-(6-O-*p*-cumaril)-glucoside.

Gli antociani determinati nelle cinque varietà sono la delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina presenti nella forma di monoglucosidi, acetil-monoglucosidi e *p*-cumaril-monoglucosidi, ed è stata inoltre trovata una significativa presenza di malvidina-3-O-(6-O-caffeoil)-glucoside (**Tabella 4.2**).

Osservando la composizione percentuale di antociani monoglucosidi si possono individuare le maggiori differenze tra le varietà: la malvidina-3-O-glucoside è l'antociano

dominante nelle varietà Cabrusina, Fumat e Pignolo, mentre nel Cjanorie è la peonidina-3-O-glucoside; nella varietà Dindarella sono state riscontrate elevate quantità di cianidina 3-O-glucoside e di peonidina-3-O-glucoside.

Lo stesso andamento si osserva per i corrispondenti antociani acetilati e *p*-cumarati: nella varietà Fumat, che presenta un'alta percentuale di petunidina-3-O-glucoside (10.2%), vi sono maggiori contenuti di petunidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside (2.2%) e petunidina-3-O-(6-O-*p*-cumaril)glucoside (2.6%). La malvidina-3-O-(6-O-caffeoil)-glucoside è presente in più alte percentuali nella Cabrusina.

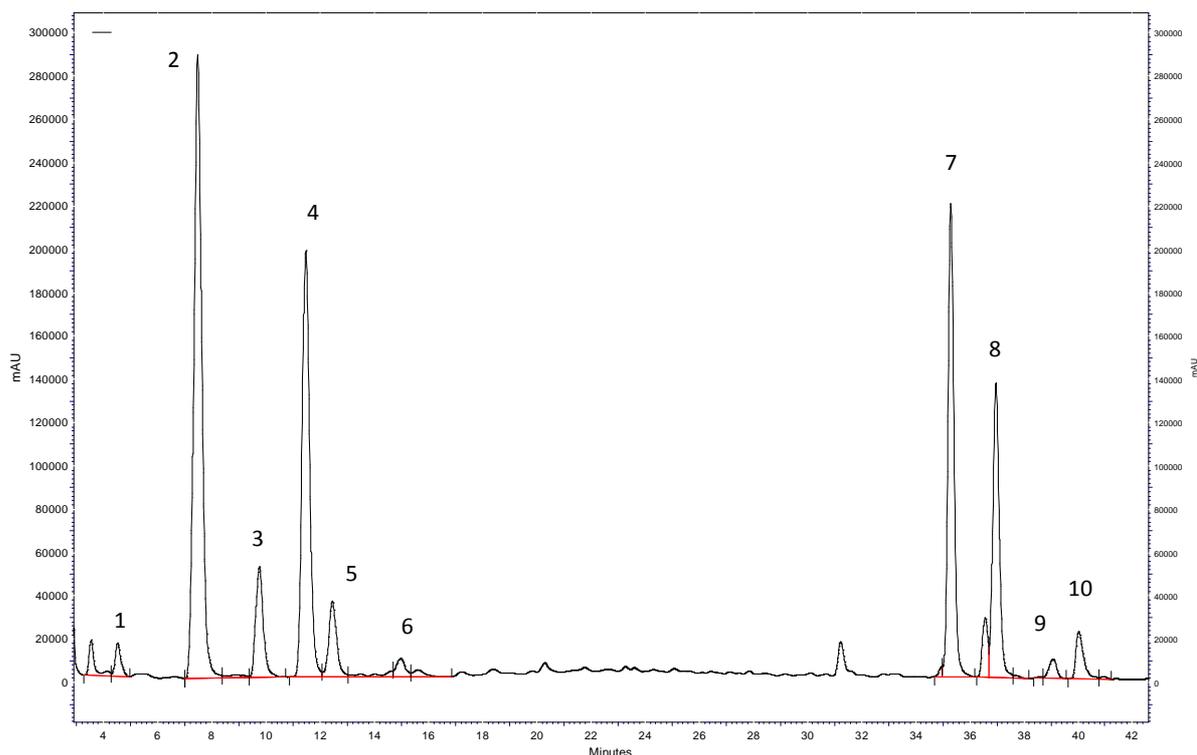
In tutte le varietà la somma delle percentuali di antociani *p*-cumarati è superiore agli acetati, come già riportato in letteratura (Mattivi *et al.*, 2006), e risulta più elevata per le varietà Cabrusina e Fumat. In generale gli antociani acilati sono i composti che contribuiscono maggiormente alla stabilità del colore durante la conservazione e l'invecchiamento dei vini rossi (Giusti e Wrolstad, 2003).

<i>Antociani</i>	Area %				
	<i>Cabrusina</i>	<i>Cjanorie</i>	<i>Dindarella</i>	<i>Fumat</i>	<i>Pignolo</i>
delfinidina-3-O-glucoside	4.1 ± 1.3	4.5 ± 0.5	13.6 ± 3.1	8.8 ± 2.0	7.3 ± 1.6
cianidina-3-O-glucoside	1.4 ± 0.4	7.9 ± 0.9	28.6 ± 9.0	2.5 ± 1.2	5.6 ± 1.4
petunidina-3-O-glucoside	5.0 ± 1.0	4.7 ± 0.4	7.3 ± 0.1	10.2 ± 1.5	6.6 ± 1.1
peonidina-3-O-glucoside	11.6 ± 1.6	42.9 ± 5.9	24.8 ± 5.7	5.9 ± 1.9	12.3 ± 3.2
malvidina-3-O-glucoside	41.6 ± 1.0	25.1 ± 3.7	14.3 ± 5.7	37.9 ± 1.3	38.8 ± 2.6
delfinidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.0	0.5 ± 0.2	1.7 ± 0.3	1.1 ± 0.3
cianidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	0.5 ± 0.4	0.4 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.7
petunidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	0.7 ± 0.0	1.0 ± 0.0	0.3 ± 0.1	2.2 ± 0.2	0.8 ± 0.0
peonidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	1.2 ± 0.2	1.8 ± 0.2	0.2 ± 0.0	0.8 ± 0.1	1.3 ± 0.3
malvidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	7.5 ± 0.5	1.9 ± 0.6	0.2 ± 0.0	8.2 ± 1.7	8.7 ± 1.8
delfinidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaroil)glucoside	1.9 ± 0.6	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.1	2.7 ± 0.0	1.0 ± 0.3
malvidina-3-O-(6-O-caffeoil)glucoside	1.3 ± 0.0	0.7 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.8 ± 0.3
cianidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)glucoside	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.0	3.6 ± 0.8	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.1
petunidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)glucoside	1.8 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.0	2.6 ± 0.5	0.9 ± 0.1
(peonidina+malvidina)-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)-glucoside	20.6 ± 1.9	7.3 ± 1.1	4.1 ± 2.0	15.0 ± 3.8	13.5 ± 4.1
<b><i>Somma antociani acetati</i></b>	10.4 ± 1.4	5.4 ± 0.8	1.9 ± 0.3	13.3 ± 2.5	12.7 ± 3.2
<b><i>Somma antociani p-cumarati</i></b>	24.5 ± 2.6	8.9 ± 1.3	9.0 ± 2.8	20.9 ± 4.4	15.8 ± 4.5

**Tabella 4.2:** Percentuali medie dei singoli antociani determinati mediante analisi HPLC/DAD nelle 5 varietà a bacca rossa con la relativa semidispersione dalla media per le due annate. Nella parte inferiore della tabella è riportata la somma delle percentuali di antociani acetilati e *p*-cumarati.

### 4.1.3 Studio del profilo di HCTA e flavonoli delle bucce

La **Figura 4.3** riporta il cromatogramma di flavonoli e HCTA della varietà a bacca bianca Cividin. Gli acidi *p*-cumarico, caffeico, ferulico sono i principali acidi fenolici dell'uva e del vino e si trovano spesso legati al residuo di zucchero degli antociani (in uve rosse), o come esteri dell'acido tartarico, formando in questo modo l'acido cutarico (*trans*-cumaril-tartarico), caftarico (*trans*-caffeil-tartarico) e fertarico (*trans*-ferulil-tartarico). Nel mosto l'acido caffeoil-tartarico è il più abbondante, mentre nelle bucce, a seconda della varietà, può essere anche il *p*-cumaril tartarico. Le percentuali relative dei tre esteri dovrebbero essere costanti per ogni cultivar (Cravero, 1991).



**Figura 4.3:** Profilo HPLC di flavonoli e HCTA nella varietà a bacca bianca Cividin. 1) acido *cis*-caffeoil-tartarico; 2) acido *trans*-caffeoil-tartarico; 3) acido *cis*-*p*-cumaril-tartarico; 4) acido *trans*-*p*-cumaril-tartarico; 5) acido 2-S-glutationil-caffeoil-tartarico; 6) acido *trans*-ferulil-tartarico; 7) quercetina glucuronide; 8) quercetina glucoside; 9) campferolo glucuronide; 10) campferolo glucoside.

In **Tabella 4.3** sono riportati i contenuti medi percentuali di HCTA determinati per le due annate di studio con relativa semidispersione dalla media. In tutte le varietà gli HCTA nella forma *trans* sono risultati più abbondanti rispetto alle corrispondenti forme *cis*. In tutte le varietà l'acido caffeoil tartrato è risultato il più abbondante. Solo nella Cabrusina l'acido *p*-cumaril tartrato totale (somma di *cis* e *trans*) è risultato presente in quantità superiore rispetto al caffeoil tartrato (48.7%); la stessa ha evidenziato elevati contenuti percentuali anche di acido *trans*-ferulil tartarico (3.5%), come nella Sagrestana (3.7%).

Dal confronto con dati di letteratura riportati per le bucce di altre varietà e ottenuti mediante metodiche analoghe, si evidenzia che la Boschera presenta un'elevata percentuale di acido *trans*-caffeoiltartarico (76%) rispetto alle altre varietà a bacca bianca,

similmente al Prosecco (66%). Per tutte le varietà a bacca rossa, ad eccezione della Cabrusina, si riscontrano percentuali elevate di acido *trans*-caffeoiltartarico, analogamente al Negroamaro (57.5%) (Panighel *et al.*, 2012).

Si è osservato un contenuto più basso di acido 2-S-glutationil-caffeoil-tartarico nella varietà Boschera (0.4%) e più alto in Dindarella (12.2%) e Cabrusina (10.9%). Questo composto, noto anche come GRP (Grape Reaction Product), si forma per addizione nucleofila del glutatione con l'acido caftarico e intrappolando in forme incolori gli orto-chinoni, responsabili dell'imbrunimento del mosto, mantiene un'alta concentrazione di polifenoli inalterati nel vino (Kritzinger *et al.*, 2013).

I flavonoli contribuiscono al sapore amaro dei vini e, in quelli rossi, incrementano il colore attraverso la copigmentazione con gli antociani (Malien-Aubert *et al.*, 2001; Castillo-Muñoz *et al.*, 2007). I principali flavonoli determinati nelle varietà bianche sono quercetina e campferolo, mentre nelle rosse è presente anche la miricetina, nelle forme di glucosidi e glucuronidi (**Tabella 4.3**).

Sia nelle varietà a bacca bianca che in quelle a bacca rossa la quercetina è risultato il flavonolo più abbondante, seguito dalla miricetina nelle varietà rosse, in accordo con quanto riportato in letteratura per altre varietà (Mattivi *et al.*, 2006). Il rapporto quercetina glucoside/quercetina glucuronide è risultato inferiore ad uno nelle varietà Cividin, Fumat e Grapariol, mentre era >1 nelle altre. Le varietà più ricche in campferolo glucoside e glucuronide sono Cabrusina e Dindarella, mentre quelle a contenuto minore sono Fumat e Cividin. Il rapporto campferolo glucoside/campferolo glucuronide è risultato maggiore di uno in tutte le varietà tranne che in Cjanorie e Fumat.

Il contenuto dei derivati della miricetina è risultato molto elevato nelle varietà Fumat, Pignolo e Cabrusina, molto basso per Dindarella e Cjanorie.

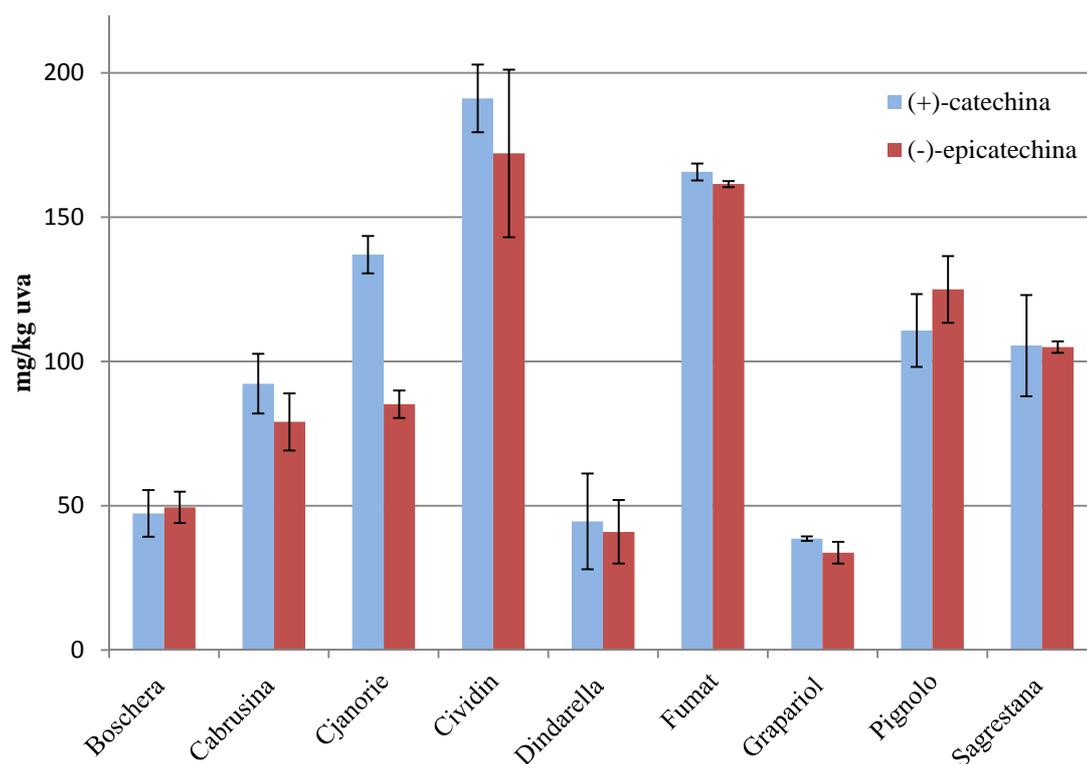
Dal confronto con i dati riportati in letteratura, comparabili in quanto ottenuti con metodiche analoghe, si può osservare che Sagrestana e Boschera presentano un contenuto di quercetina glucuronide inferiore alla glucoside, analogamente a quanto riportato nel Prosecco. Le varietà rosse Cabrusina e Pignolo mostrano una composizione di flavonoli simile al Negroamaro (Panighel *et al.*, 2012).

	<i>Boschera</i>	<i>Cabrusina</i>	<i>Cjanorie</i>	<i>Cividin</i>	<i>Dindarella</i>	<i>Fumat</i>	<i>Grapariol</i>	<i>Pignolo</i>	<i>Sagrestana</i>	<i>Prosecco</i>	<i>Negroamaro</i>
<b>Acidi idrossicinnamil-tartarici (HCTA)</b>	<b>Area %</b>										
<i>cis</i> -caffeoil tartarico	1.1±0.3	0.3±0.3	0.8±0.2	1.5±0.5	2.5±1.6	0.3±0.3	1.7±0.2	0.6±0.6	2.0±1.0	4.8	n.d.
<i>trans</i> -caffeoil tartarico	76.4±4.1	39.6±3.1	59.6±1.8	50.5±1.6	43.5±3.7	53.8±3.3	50.1±7.7	49.9±0.0	49.4±9.1	65.8	57.5
<i>cis-p</i> -cumaril tartarico	4.9±0.5	9.8±3.9	6.8±0.5	8.9±0.9	7.6±1.8	5.1±0.4	11.9±1.9	8.1±0.4	8.0±2.2	4.2	5.3
<i>trans-p</i> -cumaril tartarico	16.4±3.5	38.8±14.9	26.3±2.9	32.7±4.4	32.9±13.1	34.6±7.0	32.8±7.2	37.9±2.0	34.1±12.8	9.4	35.6
2-S-glutationil-caffeoil-tartarico	0.4±0.4	10.9±8.8	5.6±4.7	4.4±2.8	12.2±10.9	4.4±3.5	2.0±0.9	2.3±1.7	2.8±2.5	8.9	n.d.
<i>trans</i> -ferulil tartarico	0.8±0.0	3.5±2.2	0.9±0.3	2.0±0.3	1.3±1.3	1.9±0.9	1.5±0.3	1.3±0.4	3.7±2.5	6.9	1.6
<b>Flavonoli</b>											
Miricetina-glucuronide	0.0	2.6±2.6	0.1±0.1	0.0	0.1±0.1	0.0	0.0	1.7±1.7	0.0	n.d.	n.d.
Miricetina-glucoside	0.0	33.1±5.5	7.3±1.1	0.0	5.8±1.2	40.0±19.9	0.0	38.3±6.8	0.0	n.d.	35.6
Quercetina-glucuronide	39.0±7.7	13.2±1.2	31.3±2.1	47.9±6.8	24.2±1.4	31.5±16.6	54.5±0.2	16.3±3.3	35.0±2.1	39.1	17.7
Quercetina-glucoside	47.6±5.2	34.2±5.7	45.9±1.1	41.4±3.8	53.2±0.9	20.1±9.4	30.8±1.0	31.7±7.8	49.9±1.0	50.9	39.6
Campferolo-glucuronide	3.0±0.5	7.7±4.1	9.3±0.1	2.9±0.7	1.0±1.0	5.3±5.3	3.4±0.4	2.5±2.5	6.9±3.6	2.5	1.1
Campferolo-glucoside	10.5±2.0	9.2±0.0	6.1±0.2	7.8±2.3	15.6±2.8	3.1±0.9	11.3±1.1	9.6±3.4	8.2±2.6	7.4	5.9

**Tabella 4.3:** Contenuti medi percentuali di due annate di acidi idrossicinnamiltartarici e flavonoli nelle bucce determinati mediante analisi HPLC/DAD nelle nove varietà *V. vinifera* studiate e in due varietà note (Prosecco e Negroamaro) prese come riferimento (Panighel *et al.*, 2012).

#### 4.1.4 Flavanoli nei vinaccioli

Il contenuto di flavanoli monomeri negli estratti dei semi determinato mediante analisi HPLC ha rivelato in tutte le varietà un contenuto di (+)-catechina superiore a quello di (-)-epicatechina, ad eccezione del Pignolo per il quale il contenuto medio di (-)-epicatechina (125 mg/kg uva) è simile a quello di (+)-catechina (111 mg/kg) e per la Boschera (50 e 47 mg/kg uva, rispettivamente) (**Figura 4.4**). I livelli di (+)-catechina e (-)-epicatechina più elevati sono stati riscontrati nel Cividin e nel Fumat mentre i più bassi in Boschera, Grapariol e Dindarella.



**Figura 4.4:** Contenuti medi di flavanoli monomeri (mg/kg uva di (+)-catechina e (-)-epicatechina) nelle due annate determinati mediante analisi HPLC/DAD negli estratti di vinaccioli (le barre indicano la semidispersione dalla media).

#### **4.1.5 Studio dei composti volatili liberi e precursori di aromi glicosilati nelle varietà Boschera e Dindarella**

I composti volatili dell'uva giocano un ruolo fondamentale nelle proprietà organolettiche dei vini. I componenti aromatici sono presenti nell'uva sia in forma libera che glicosidata, cioè legati a molecole di zucchero, ed il loro contenuto dipende dalla varietà (Gunata *et al.*, 1985; Rocha *et al.*, 2006).

In base ai contenuti di aromi volatili, le varietà d'uva possono essere distinte in aromatiche e non-aromatiche: le varietà aromatiche possiedono terpeni liberi e forme glicosilate che, attraverso l'idrolisi, generano i composti aromatici che danno l'aroma tipico di vini quali ad esempio il Moscato; le varietà non-aromatiche possiedono composti volatili ma in concentrazioni inferiori rispetto alla soglia olfattiva che danno un contributo trascurabile all'aroma finale del vino (es. Riesling e Chardonnay) (Del Caro *et al.*, 2012).

Nelle uve di Boschera e Dindarella è stato condotto lo studio dei composti aromatici in quanto, tra le varietà in studio, risultavano quelle potenzialmente più interessanti dal punto di vista aromatico.

I composti liberi riscontrati sono alcoli alifatici, composti benzenoidi e terpenoli. Dai dati presentati in **Tabella 4.4** risulta evidente la scarsa presenza di composti terpenici, generalmente responsabili dei sentori floreali di uve molto aromatiche quali i Moscati (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1998), mentre risultano più abbondanti i benzenoidi, rappresentati in maggiore quantità da alcol benzilico e  $\beta$ -feniletanolo, benzeneacetaldide e vanillina. Tra i composti alifatici più abbondanti sono stati riscontrati acido esanoico, soprattutto nella varietà Dindarella (272  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), acido 2-esenoico e 3-penten-2-olo.

	<b>BOSCHERA</b>	<b>DINDARELLA</b>
	<b>µg/kg</b>	<b>µg/kg</b>
<b>Alcoli alifatici</b>		
esanale	14.23 ± 1.55	24.01 ± 12.00
3-penten-2-olo	12.13 ± 0.28	33.67 ± 0.09
3-cicloesen-1-olo	-	9.76 ± 9.76
2-esenale	18.54 ± 2.76	16.31 ± 2.54
1-esanolo	-	12.84 ± 6.02
2-esen-1-olo	2.62 ± 2.62	7.64 ± 7.64
3-esen-1-olo	1.88 ± 1.88	-
2-butossietanolo	7.79 ± 0.18	11.03 ± 0.97
2-etil-1-esanolo	5.82 ± 0.08	14.62 ± 0.50
acido esanoico	90.57 ± 6.07	272.57 ± 16.15
acido 2-esenoico	78.11 ± 9.18	135.28 ± 1.66
<b>Benzenoidi</b>		
benzaldeide	15.12 ± 1.24	54.93 ± 9.82
benzenacetaldeide	120.68 ± 34.90	63.48 ± 31.05
metil salicilato	3.66 ± 3.66	-
alcol benzilico	73.41 ± 0.47	635.70 ± 245.04
β-feniletanolo	36.82 ± 1.17	127.04 ± 26.77
2-fenossietanolo	16.18 ± 1.18	27.75 ± 27.75
2-etil fenolo	11.43 ± 0.46	43.55 ± 43.55
3,4-dietilfenolo	74.01 ± 4.50	94.70 ± 7.05
fenolo 2,4-bis-(1,1dimetiletil)	15.85 ± 3.44	54.32 ± 12.66
benzofenone	7.03 ± 0.79	13.74 ± 0.51
vanillina	41.25 ± 15.21	60.50 ± 10.06
<b>Terpenoli</b>		
diendiolo I	14.32 ± 2.77	20.31 ± 7.21
acido geranico	11.79 ± 11.79	55.44 ± 13.91

**Tabella 4.4:** Contenuti medi di composti liberi espressi in µg 1-eptanolo/kg uva con semidispersione dalla media di due ripetizioni.

I profili qualitativi dipendono strettamente dalla varietà, mentre i contenuti relativi di ciascun composto, e quindi le proprietà sensoriali delle uve, sono anche legate al terroir, inteso come insieme di parametri quali il suolo, il clima, le pratiche vitivinicole e agronomiche (González-Barreiro *et al.*, 2013).

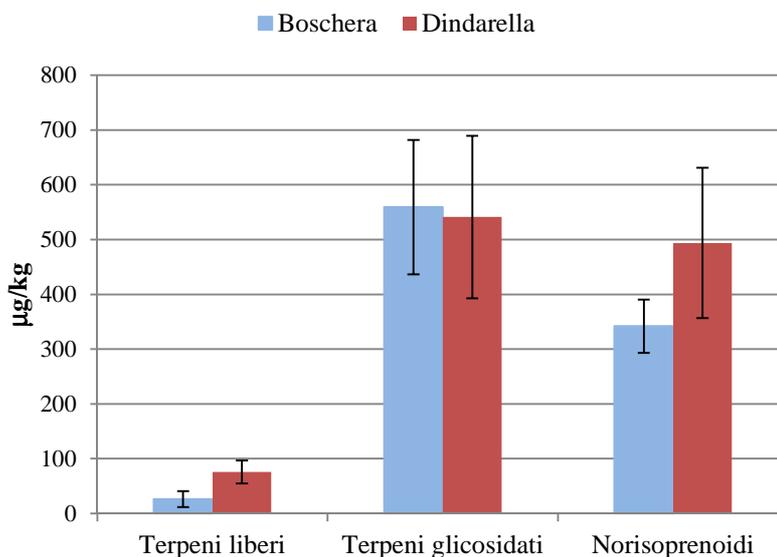
I composti aromatici glicosidati liberati per idrolisi enzimatica appartengono alle classi degli alcoli alifatici, composti benzenoidi, terpenoli e norisoprenoidi (**Tabella 4.5**). Anche in questo caso risultano quantitativamente molto presenti i benzenoidi, in particolare alcol benzilico, alcol omovanillico e β-feniletanolo, che nella varietà Dindarella raggiunge i 3298 µg/kg, sebbene con grande differenza tra le due ripetizioni.

I composti terpenici, quasi assenti nella forma libera, sono risultati invece presenti in quella glicosidata: linalolo, nerolo e geraniolo sono presenti in tutte le tre varietà; vi sono elevati tenori di ossidi del linalolo (*trans*-8-idrossilinalolo, *cis*-8-idrossilinalolo, 8-idrossidiidrolinalolo, furanlinalolo ossido, piranlinalolo ossido) ed acido geranico, già presente nella forma libera. Sono presenti anche composti norisoprenoidi, in particolare vomifoliolo e 3-oxo-α-ionolo.

Il rapporto tra terpeni glicosidati e liberi rappresenta un indicatore del potenziale aromatico dell'uva, utile anche per classificare uve di varietà diverse. Gunata *et al.* (1985)

riportano nelle uve Moscato un rapporto terpeni glicosidati/liberi superiore ai due terzi dei terpenoli totali, e proporzioni maggiori nelle uve non di Moscato, come il Gewürtztraminer in cui i terpeni glicosidati raggiungono il 94% dei terpeni totali.

Nelle varietà analizzate, la differenza significativa tra i contenuti di terpenoli nella forma libera e glicosidata permette di assegnare a queste varietà un carattere semi-aromatico (**Figura 4.5**).



**Figura 4.5:** Contenuti medi di terpenoli liberi (espressi in µg 1-eptanolo/kg uva), terpenoli glicosidati e norisoprenoidi (espressi in µg 1-decanolo/kg uva) nelle due varietà studiate (le barre indicano la semidispersione dalla media).

	BOSCHERA	DINDARELLA
	µg/kg	µg/kg
<b>Alcoli alifatici</b>		
1-butanolo	1.23 ± 1.23	8.67 ± 8.67
2-esenale	11.52 ± 5.27	20.82 ± 11.67
3-metil-3-buten-1-olo	12.95 ± 2.08	10.91 ± 0.32
3-metil-2-buten-1-olo	8.01 ± 3.60	13.18 ± 1.30
2-metil-2-buten-1-olo	8.98 ± 2.04	-
2-metil-1-propanolo	-	14.74 ± 14.74
3-metil-1-butanolo	-	37.25 ± 8.57
3-penten-4-metil-1-olo	0.33 ± 0.33	-
1-esanolo	4.14 ± 4.14	19.50 ± 2.05
4-esen-1-olo	3.38 ± 3.38	6.23 ± 6.23
<b>Benzenoidi</b>		
benzaldeide	-	16.85 ± 9.19
metil salicilato	1.67 ± 1.67	65.57 ± 60.14
2-metossi fenolo	8.83 ± 5.78	-
alcol benzilico	210.69 ± 1.41	3298.06 ± 2195.33
β-feniletanolo	406.34 ± 60.73	369.20 ± 37.87
alcol omovanillico	172.64 ± 52.99	225.26 ± 102.41
<b>Terpenoli</b>		
furan linalolo ossido	4.71 ± 4.71	-
piran linalolo ossido	32.06 ± 12.17	-
linalolo	13.96 ± 5.96	74.73 ± 39.98
nerolo	23.47 ± 8.59	12.95 ± 3.70
geraniolo	86.01 ± 15.63	48.66 ± 8.48
diendiolo I	30.82 ± 8.92	53.20 ± 36.28
eugenolo	-	5.45 ± 5.45
idrossi-citronellolo	-	18.09 ± 18.09
<i>trans</i> -8-idrossi-linalolo	31.13 ± 31.13	59.13 ± 12.09
idrossi-geraniolo	29.17 ± 16.39	2.05 ± 2.05
<i>cis</i> -8-idrossi-linalolo	25.09 ± 1.09	58.48 ± 53.42
8-idrossi-diidrolinalolo	-	23.63 ± 23.63
acido geranico	142.73 ± 36.74	50.79 ± 39.94
7-idrossi-α-terpineolo	56.38 ± 11.46	167.88 ± 51.57
<b>Norisoprenoidi</b>		
3-idrossi-β-damascone	48.54 ± 0.78	38.73 ± 2.34
3-oxo-α-ionolo	78.57 ± 3.03	118.20 ± 28.12
4-idrossi-3-metossi feniletanone	-	122.66 ± 8.02
3,9-diidrossi-megastigma-5-ene	12.21 ± 0.79	63.86 ± 41.25
vomifoliolo	202.47 ± 44.22	300.29 ± 48.55
3-idrossi-7,8-dideidro-β-ionolo	-	49.88 ± 49.88

**Tabella 4.5:** Contenuti di aromi glicosidati espressi in µg 1-decanolo/kg uva con relativa semidisersione dalla media per due ripetizioni.

#### 4.1.6 Analisi sensoriale dei vini

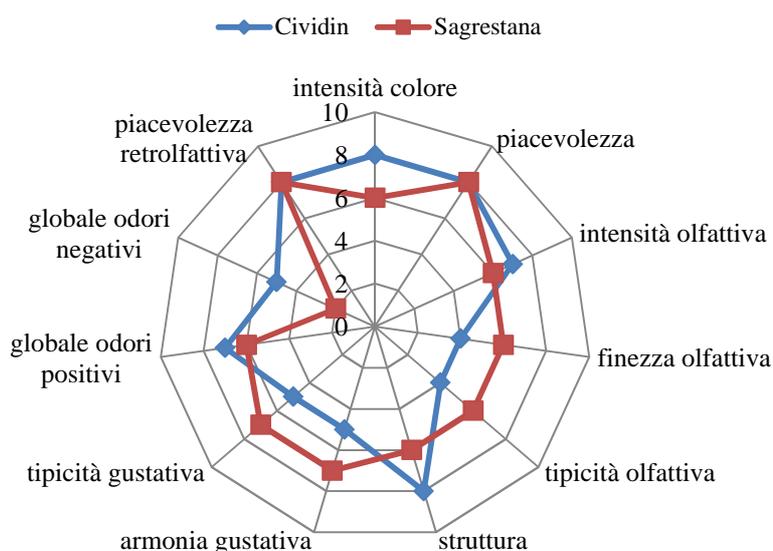
I vini ottenuti dalle microvinificazioni delle uve presentano una buona gradazione alcolica naturale per tutte le varietà, superiore al 12% nelle varietà friulane e al 10% in quelle venete (**Tabella 4.6**). Le varietà a bacca bianca presentano un'acidità importante, più alta nel caso del Cividin (8.75 g/l) e più bassa nel vino Boschera (6.90 g/l). Le varietà rosse hanno fornito vini ricchi in polifenoli totali (oltre 1500 mg/l) ad eccezione di Cjanorie (792 mg/l) e Dindarella (1182 mg/l).

Varietà	Alcol (% vol)	Estratto netto (g/l)	Acidità (g/l)		pH	Polifenoli totali (mg/l)
			volatile	totale		
<b>Cjanorie</b>	12.15	26.2	0.48	4.65	3.66	792
<b>Cividin</b>	12.88	22.1	0.27	8.75	2.91	223
<b>Fumat</b>	12.87	29.2	0.50	5.35	3.80	1581
<b>Sagrestana</b>	13.00	19.8	0.30	7.10	3.20	264
<b>Pignolo</b>	12.91	34.6	0.56	4.20	4.48	1985
<b>Boschera</b>	11.4	17.1	0.17	6.90	2.90	158
<b>Cabrusina</b>	10.4	24.4	0.58	5.7	3.28	1552
<b>Grapariol</b>	10.2	19.0	0.08	8.6	2.95	98
<b>Dindarella</b>	10.7	22.8	0.41	4.8	3.42	1182

**Tabella 4.6:** Principali parametri rilevati nei vini ottenuti dalle uve delle varietà *V. vinifera*.

Alla degustazione il vino di Sagrestana si è rivelato sapido e strutturato e dotato di una buona intensità, tipicità e finezza olfattiva, odori positivi con sentori di frutta matura e floreale.

Il Cividin ha presentato una buona intensità e tipicità olfattiva, odori positivi con sentori di frutta matura, con una buona acidità, sapido e strutturato, molto piacevole (**Figura 4.6**).

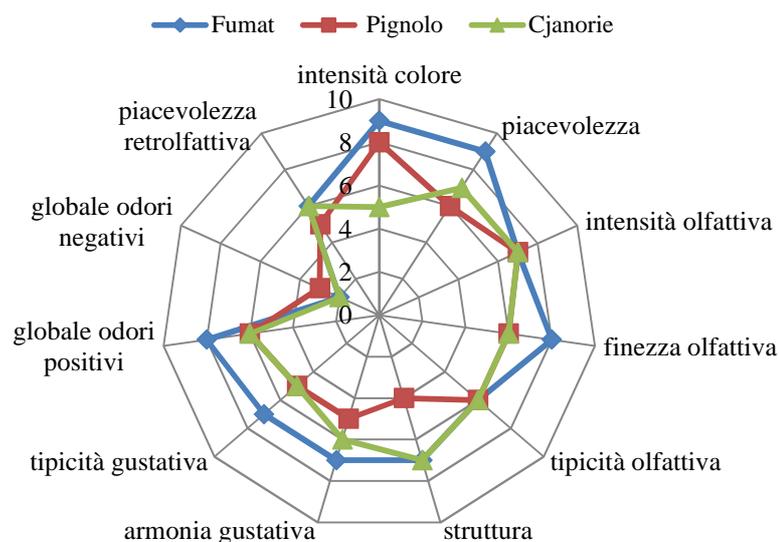


**Figura 4.6:** Analisi sensoriale dei vini ottenuti dalle varietà a bacca bianca provenienti dal Friuli Venezia Giulia, Cividin e Sagrestana.

Il vino ottenuto dalla varietà Pignolo ha presentato un'elevata intensità del colore, una buona intensità e tipicità olfattiva, ed odori positivi con sentori di frutta rossa e confettura, piuttosto astringente al gusto.

Il Fumat è caratterizzato da un'ottima intensità e piacevolezza nel colore, buona intensità, tipicità e finezza olfattiva, odori positivi con sentore di frutta rossa e confettura, buona struttura, con una rilevante acidità.

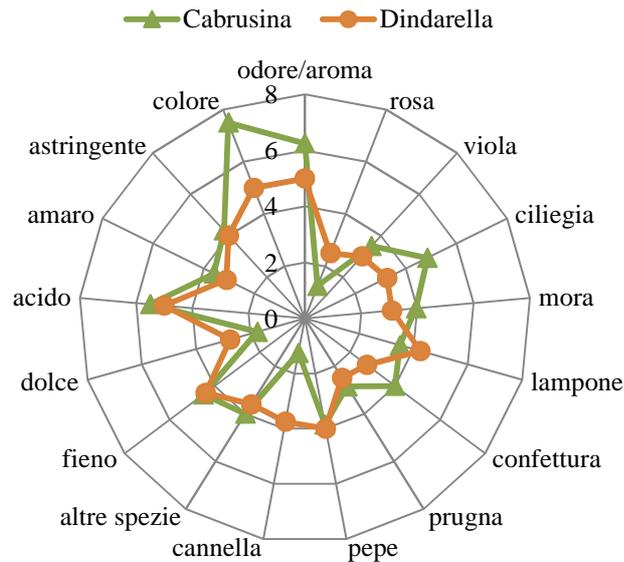
Il Cjanorie ha espresso un colore non molto intenso, ma buona intensità olfattiva ed odori positivi, sentore di confettura; buona struttura, con una buona acidità (**Figura 4.7**).



**Figura 4.7:** Analisi sensoriale dei vini ottenuti dalle varietà a bacca rossa provenienti dal Friuli Venezia Giulia: Fumat, Pignolo e Cjanorie.

Il vino ottenuto dalla varietà Cabrusina è caratterizzato da un'elevata intensità del colore, una buona intensità e tipicità olfattiva, ed odori positivi con sentori di frutta rossa, confettura e spezie, con una buona acidità, poco astringente al gusto.

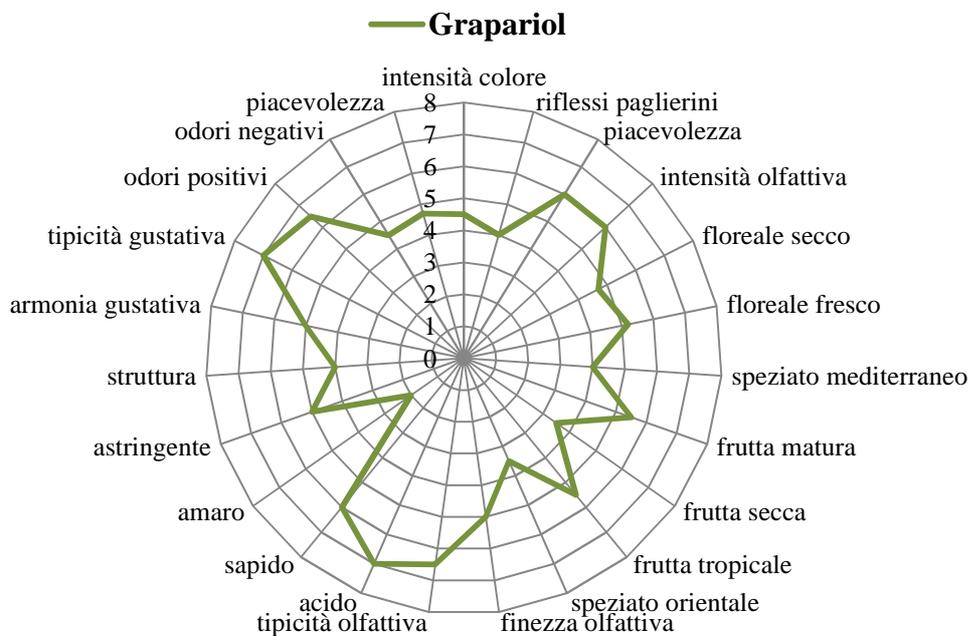
La Dindarella ha espresso un colore non molto intenso, ma buona intensità olfattiva ed odori positivi, sentore di frutti rossi e spezie; buona struttura e acidità (**Figura 4.8**).



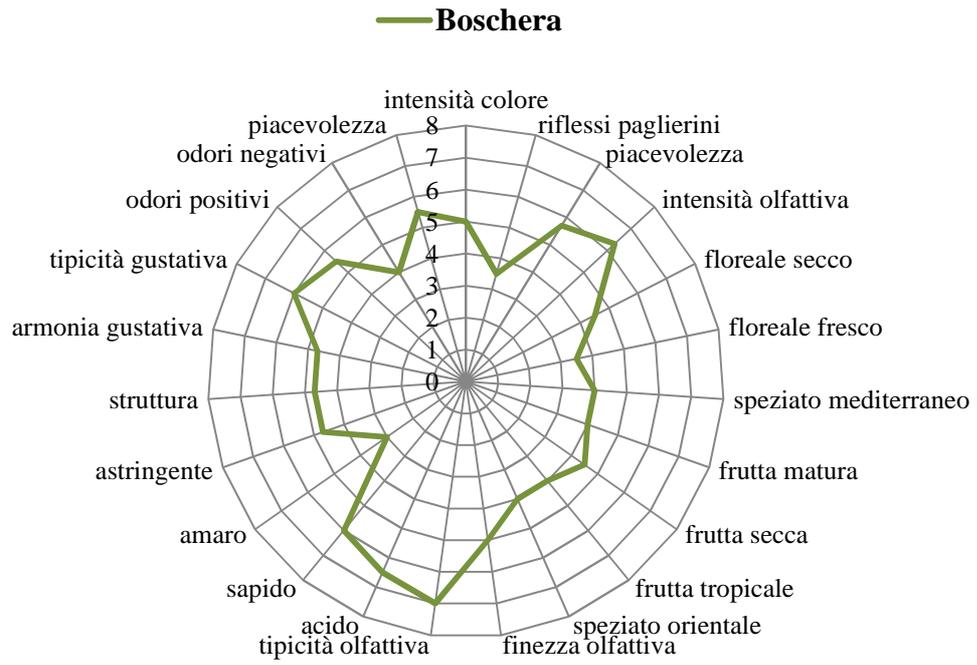
**Figura 4.8:** Analisi sensoriale dei vini ottenuti dalle varietà a bacca rossa provenienti dal Veneto, Cabrusina e Dindarella.

Il profilo organolettico del Grapariol è caratterizzato da una buona intensità e tipicità olfattiva, odori positivi con sentori floreali e di frutta matura e tropicale, una buona acidità, sapido e strutturato e con un'elevata tipicità gustativa (**Figura 4.9**).

La Boschera ha presentato una buona intensità e tipicità olfattiva, odori positivi con sentori di frutta secca, una buona acidità, sapido e con un'elevata tipicità olfattiva (**Figura 4.10**).



**Figura 4.9:** Analisi sensoriale del vino ottenuto dalle varietà a bacca bianca Grapariol.



**Figura 4.10:** Analisi sensoriale del vino ottenuto dalla varietà a bacca bianca coltivata in Veneto Boschera.

## 4.2 Valutazione delle potenzialità industriali delle varietà ibride: gli antociani

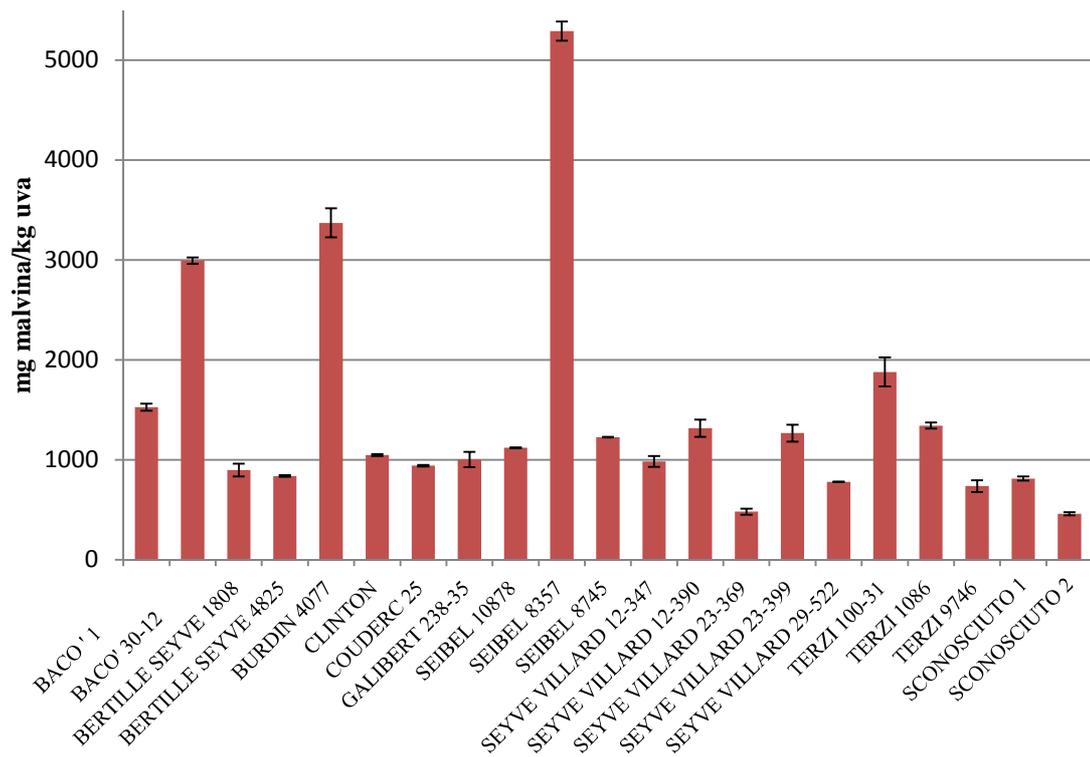
### 4.2.1 Determinazione dell'indice di antociani totali

In generale l'indice di antociani totali è risultato molto elevato rispetto ad altre varietà riportate in letteratura analizzate con lo stesso metodo analitico. Il contenuto di antociani totali delle varietà *V. vinifera* Raboso e Cabernet Sauvignon, ricche dal punto di vista polifenolico, è compreso tra 1300-2300 e 1800-1900 mg/kg uva rispettivamente (De Rosso *et al.*, 2010).

Tra le varietà ibride studiate, quelle con il più alto contenuto di antociani, espresso come mg di malvidina-3-O-glucoside per kg d'uva, sono risultate il Seibel 8357, il Burdin 4077, il Bacò 30-12 ed il Terzi 100-31 (**Tabella 4.7** e **Figura 4.11**).

Campioni	Malvidina (mg/kg d'uva)
Bacò 1	1527 ± 35
Bacò 30-12	2994 ± 33
Bertille Seyve 1808	897 ± 63
Bertille Seyve 4825	838 ± 9
Burdin 4077	3372 ± 146
Clinton	1047 ± 10
Couderc 25	941 ± 7
Galibert 238-35	1004 ± 77
Seibel 10878	1120 ± 5
Seibel 8357	5291 ± 95
Seibel 8745	1227 ± 4
Seyve Villard 12-347	984 ± 55
Seyve Villard 12-390	1316 ± 85
Seyve Villard 23-369	481 ± 31
Seyve Villard 23-399	1267 ± 84
Seyve Villard 29-522	780 ± 3
Terzi 100-31	1880 ± 145
Terzi 1086	1342 ± 30
Terzi 9746	737 ± 59
Sconosciuto 1	812 ± 21
Sconosciuto 2	458 ± 16

**Tabella 4.7:** Valori medi di due ripetizioni degli indici di antociani totali delle 21 varietà rosse ibride espressi come malvidina-3-O-glucoside/kg uva.



**Figura 4.11:** Indice di antociani totali delle 21 varietà ibride studiate espresso come mg di malvidina-3-O-glucoside/kg uva. Sono riportate le medie di due ripetizioni con le barre di semidispersione dalla media.

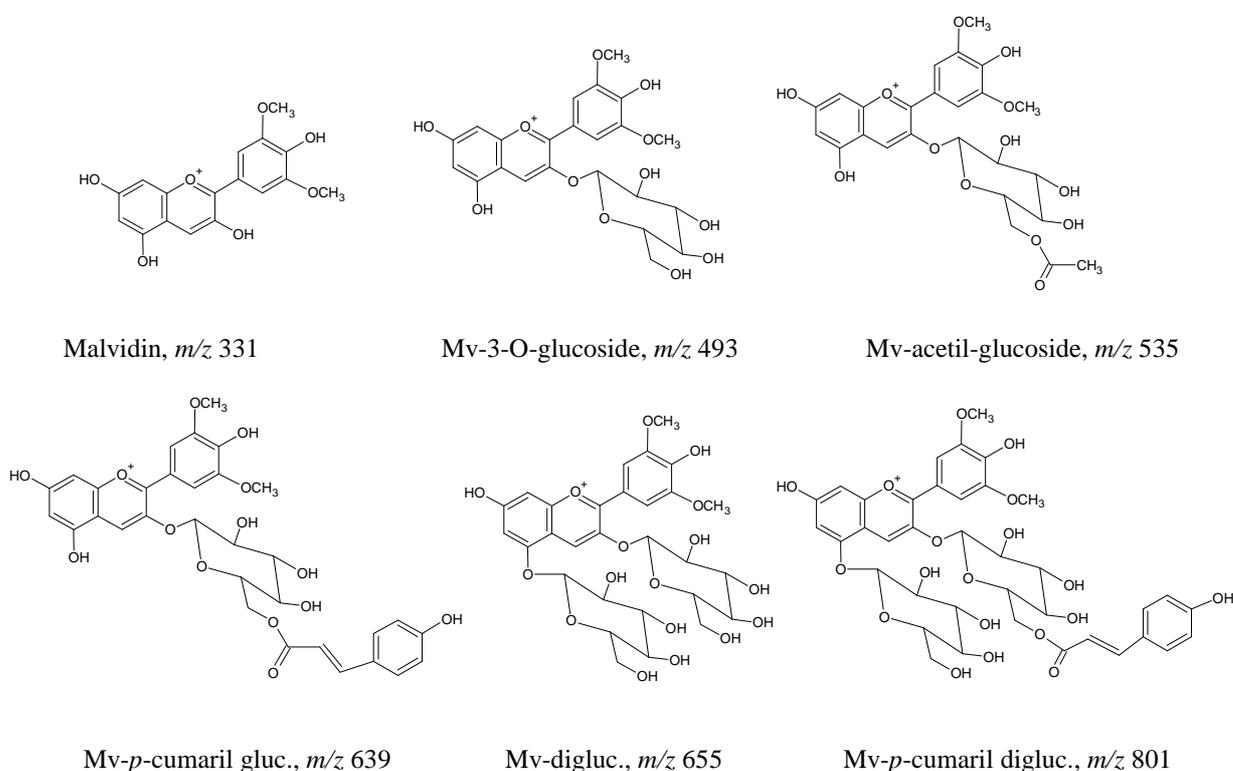
## 4.2.2 Identificazione degli antociani mediante LC/MS precursor ion analysis

L'identificazione e caratterizzazione dei singoli composti è stata eseguita mediante analisi LC/MS con scansione degli ioni precursori utilizzando le seguenti condizioni sperimentali:

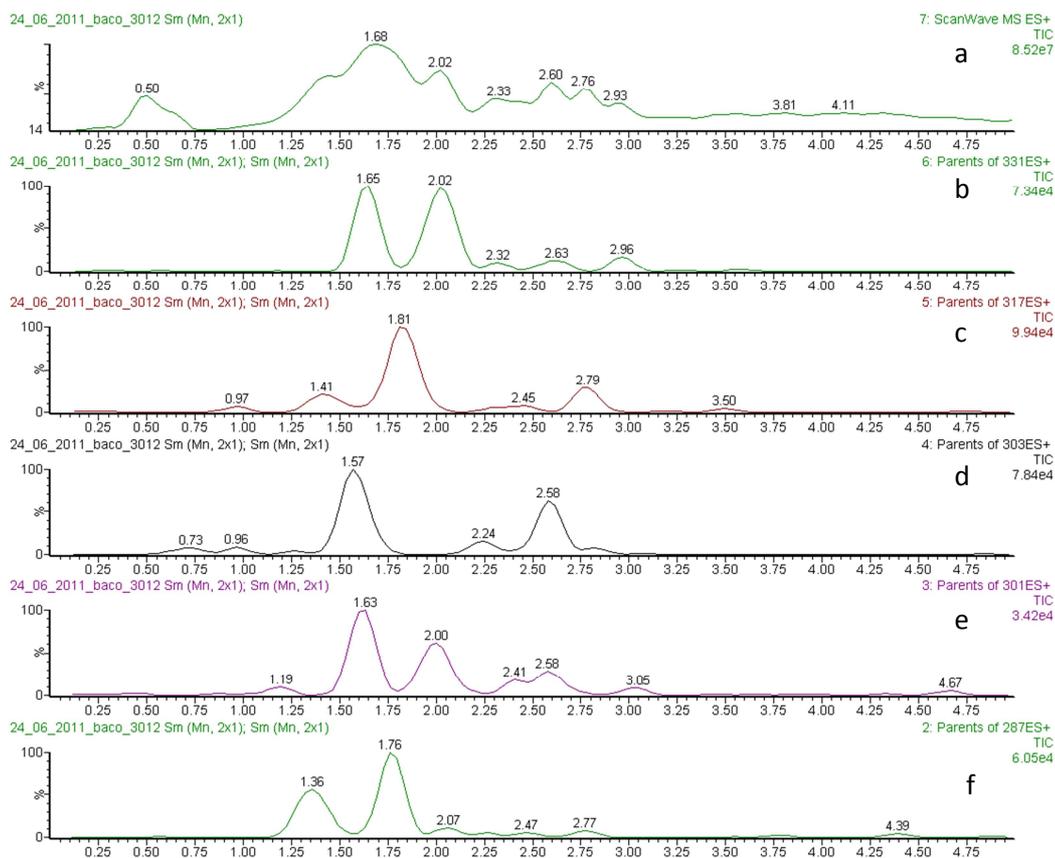
- scansione degli ioni precursori degli agliconi con energia di collisione di 4 eV,
- scansione dei precursori degli antociani monoglucosidi con energia di collisione di 25 eV.

L'utilizzo di diverse energie di collisione ha permesso di monitorare i precursori degli ioni agliconi e dei monoglucosidi.

Per esempio, monitorando lo ione a  $m/z$  331, corrispondente alla malvidina aglicone, vengono rivelati i segnali degli ioni precursori a  $m/z$  493, corrispondente al monoglucoside,  $m/z$  535 acetil-monoglucoside,  $m/z$  639 *p*-cumaril-monoglucoside,  $m/z$  655 diglucoside e  $m/z$  801 *p*-cumaril-diglucoside (**Figure 4.12 e 4.13**).



**Figura 4.12:** Strutture chimiche dei principali derivati della malvidina identificati nelle uve ibride.



**Figura 4.13:** (a) UPLC/MS Total Ion Chromatogram (TIC) della varietà Bacò 30-12 e cromatogrammi degli ioni precursori degli ioni a: (b)  $m/z$  331 corrispondente alla malvidina, (c)  $m/z$  317 (petunidina), (d)  $m/z$  303 (delfinidina), (e)  $m/z$  301 (peonidina), (f)  $m/z$  287 (cianidina).

Con questo metodo è stato possibile identificare 20 differenti antociani (7 diglucosidi e 13 monoglucosidi) e rispettivamente 5 ioni precursori per malvidina e petunidina, 3 per cianidina e delfinidina e 4 per la peonidina (**Tabella 4.8 e 4.9**).

Tra i composti determinati si può notare la presenza di coppie di composti isobari quali petunidina-3-O-(6-O-*p*-cumaril)glucoside e peonidina-3,5-diglucoside ( $m/z$  625) e delfinidina-3-O-(6-O-*p*-cumaril)glucoside e cianidina-3,5-diglucoside ( $m/z$  611). Anche se recentemente è stata rilevata nell'uva la presenza in tracce di pelargonidina-3-O-glucoside (Tian *et al.*, 2005; He *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2003; Sandhu e Gu, 2010; Zhu *et al.*, 2012), non è stata riscontrata una significativa presenza di questo composto in nessuna delle varietà studiate.

Aglicone	monoglucoside	<i>p</i> -cumaril-monogluc.	acetilmonogluc.	diglucoside	<i>p</i> -cumaril-digluc.
Malvidina	493	801	535	655	801
Petunidina	479	625	521	641	787
Delfinidina	465	611		627	
Peonidina	463	609	505	625	
Cianidina	449	595		611	

**Tabella 4.8:** Segnali  $m/z$  degli antociani identificati mediante LC/MS precursor-ion analysis.

Varietà	Ioni precursori di m/z 331 (Mv)			Ioni precursori di m/z 317 (Pt)			Ioni precursori di m/z 303 (Dp)			Ioni precursori di m/z 301 (Pn)			Ioni precursori di m/z 287 (Cy)		
	M <sup>+</sup>	RT	composto	M <sup>+</sup>	RT	composto	M <sup>+</sup>	RT	composto	M <sup>+</sup>	RT	composto	M <sup>+</sup>	RT	composto
Bacò 1	655	1.65	digluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	463	2	monogluc.	449	1.8	monogluc.
	493	2.06	monogluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.									
	801	2.60	(p-cum.)-digluc.												
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.												
Bacò 30-12	655	1.65	digluc.	641	1.4	digluc.	465	1.6	monogluc.	625	1.6	digluc.	611	1.4	digluc.
	493	2.06	monogluc.	479	1.8	monogluc.	773	2.2	(p-cum.)-digluc.	463	2	monogluc.	449	1.8	monogluc.
	801	2.63	(p-cum.)-digluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.	609	2.6	(p-cum.)-monogluc.	595	2.7	(p-cum.)-monogluc.
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.												
Bertille Seive 1808	493	2.06	monogluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.				449	1.8	monogluc.
							611	2.6	(p-cum.)-monogluc.						
Bertille Seive 4825	655	1.65	digluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	625	1.6	digluc.	611	1.4	digluc.
	493	2.06	monogluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.	463	2	monogluc.	449	1.8	monogluc.
										609	2.6	(p-cum.)-monogluc.	595	2.7	(p-cum.)-monogluc.
Burdin 4077	493	2.06	monogluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	463	2	monogluc.	449	1.8	monogluc.
							611	2.6	(p-cum.)-monogluc.						
Clinton	655	1.65	digluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	625	1.6	digluc.	449	1.8	monogluc.
	493	2.06	monogluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.	463	2	monogluc.	595	2.7	(p-cum.)-monogluc.
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.												
Couderc 25	655	1.61	digluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	625	1.6	digluc.	611	1.4	digluc.
	493	2.06	monogluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.	463	2	monogluc.	449	1.8	monogluc.
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.										595	2.7	(p-cum.)-monogluc.
Galibert 238-35	493	2.06	monogluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	463	2	monogluc.	449	1.8	monogluc.
	535	2.56	(acetil)-monogluc.	521	2.4	(acetil)-monogluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.						
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.									
Seibel 10878	493	2.06	monogluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	463	2	monogluc.	449	1.8	monogluc.
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.	521	2.4	(acetil)-monogluc.									
				625	2.8	(p-cum.)-monogluc.									
Seibel 8357	493	2.06	monogluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	625	1.6	digluc.	449	1.8	monogluc.
	801	2.60	(p-cum.)-digluc.	521	2.30	(acetil)-monogluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.	463	2	monogluc.			
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.	787	2.5	(p-cum.)-digluc.				505	2.5	(acetil)-monogluc.			
				625	2.8	(p-cum.)-monogluc.									
Seibel 8745	655	1.65	digluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	625	1.6	digluc.	449	1.8	monogluc.
	493	2.06	monogluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.						
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.												
Seyve Villard 12-347	655	1.65	digluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	625	1.6	digluc.	449	1.8	monogluc.
	493	2.06	monogluc.				611	2.6	(p-cum.)-monogluc.						
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.												
Seyve Villard 12-390	493	2.06	monogluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.				449	1.8	monogluc.
	535	2.56	(acetil)-monogluc.	521	2.4	(acetil)-monogluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.				595	2.7	(p-cum.)-monogluc.
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.									
Seyve Villard 23-369	655	1.65	digluc.	479	1.8	monogluc.	465	2.6	monogluc.						
	493	2.06	monogluc.												
Seyve Villard 23-399	655	1.65	digluc.	641	1.4	digluc.	465	1.6	monogluc.				611	1.40	digluc.
	493	2.06	monogluc.	479	1.8	monogluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.				449	1.8	monogluc.
	655	1.65	digluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.						
Seyve Villard 29-522	493	2.06	monogluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.						
	801	2.60	(p-cum.)-digluc.												
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.												
Terzi 100-31	655	1.65	digluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	625	1.6	digluc.	449	1.8	monogluc.
	493	2.06	monogluc.							463	2	monogluc.			
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.												
Terzi 108-6	493	2.06	monogluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	625	1.6	digluc.	449	1.8	monogluc.
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.				611	2.6	(p-cum.)-monogluc.	463	2	monogluc.			
Terzi 97-46	655	1.65	digluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	463	2	monogluc.	449	1.8	monogluc.
	493	2.06	monogluc.	787	2.5	(p-cum.)-digluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.						
	535	2.60	(acetil)-monogluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.									
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.												
Sconosciuto 1	493	2.06	monogluc.	479	1.8	monogluc.	465	1.6	monogluc.	463	2	monogluc.	449	1.8	monogluc.
	639	2.96	(p-cum.)-monogluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.	611	2.6	(p-cum.)-monogluc.	609	3	(p-cum.)-monogluc.	595	2.7	(p-cum.)-monogluc.
Sconosciuto 2	655	1.65	digluc.	625	2.8	(p-cum.)-monogluc.							595	2.7	(p-cum.)-monogluc.
	493	2.06	monogluc.												
	801	2.60	(p-cum.)-digluc.												

**Tabella 4.9:** Ioni precursori degli agliconi identificati mediante LC/MS precursor-ion analysis nelle 21 varietà ibride a bacca rossa studiate. Rt, tempo di ritenzione (min).

Varietà	Ioni precursori di $m/z$ 493 (Mv)			Ioni precursori di $m/z$ 479 (Pt)			Ioni precursori di $m/z$ 465 (Dp)			Ioni precursori di $m/z$ 463 (Pn)			Ioni precursori di $m/z$ 449 (Cy)		
	M <sup>+</sup>	RT	composto	M <sup>+</sup>	RT	composto	M <sup>+</sup>	RT	composto	M <sup>+</sup>	RT	composto	M <sup>+</sup>	RT	composto
Bacò 1	655	1.7	digluc.	641	1.40	digluc.	773	2.3	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	787	2.5	( <i>p</i> -cum.)-digluc.				770	2.7	( <i>p</i> -cum.)-digluc.			
Bacò 30-12	655	1.7	digluc.	641	1.40	digluc.	773	2.3	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.												
Bertille Seivè 1808	655	1.7	digluc.	641	1.40	digluc.	627	1.3	digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
Bertille Seivè 4825	655	1.7	digluc.	641	1.40	digluc.				625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.							770	2.7	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	757	2.4	( <i>p</i> -cum.)-digluc.
Burdin 4077	655	1.7	digluc.	641	1.47	digluc.									
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	787	2.5	( <i>p</i> -cum.)-digluc.									
Clinton	655	1.7	digluc.	641	1.47	digluc.	627	1.3	digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	787	2.5	( <i>p</i> -cum.)-digluc.									
Couderc 25	655	1.7	digluc.	641	1.40	digluc.	627	1.3	digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.60	( <i>p</i> -cum.)-digluc.												
Galibert 238-35	655	1.7	digluc.												
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.												
Seibel 10878	/			/			/			/			/		
Seibel 8357	655	1.7	digluc.	641	1.47	digluc.	773	2.3	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	787	2.5	( <i>p</i> -cum.)-digluc.				770	2.7	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	757	2.5	( <i>p</i> -cum.)-digluc.
Seibel 8745	655	1.7	digluc.	641	1.40	digluc.	627	1.3	digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.				773	2.3	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	770	2.7	( <i>p</i> -cum.)-digluc.			
Seyve Villard 12-347	655	1.7	digluc.	641	1.47	digluc.	627	1.3	digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	787	2.5	( <i>p</i> -cum.)-digluc.									
Seyve Villard 12-390	655	1.7	digluc.	641	1.40	digluc.				625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.							770	2.7	( <i>p</i> -cum.)-digluc.			
Seyve Villard 23-369	655	1.7	digluc.	641	1.40	digluc.				625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
Seyve Villard 23-399	655	1.7	digluc.	641	1.47	digluc.	627	1.3	digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	787	2.5	( <i>p</i> -cum.)-digluc.									
Seyve Villard 29-522	655	1.7	digluc.	641	1.47	digluc.	627	1.3	digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.												
Terzi 100-31	655	1.7	digluc.	641	1.40	digluc.				625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.							770	2.7	( <i>p</i> -cum.)-digluc.			
Terzi 108-6	655	1.7	digluc.	641	1.40	digluc.	627	1.3	digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	787	2.5	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	773	2.3	( <i>p</i> -cum.)-digluc.				757	2.4	( <i>p</i> -cum.)-digluc.
Terzi 97-46	655	1.7	digluc.	641	1.47	digluc.	627	1.3	digluc.	625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	787	2.5	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	773	2.3	( <i>p</i> -cum.)-digluc.						
Sconosciuto 1	655	1.7	digluc.	641	1.47	digluc.				625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.	787	2.5	( <i>p</i> -cum.)-digluc.				770	2.7	( <i>p</i> -cum.)-digluc.			
Sconosciuto2	655	1.7	digluc.	641	1.47	digluc.				625	1.7	digluc.	611	1.4	digluc.
	697	2.1	(acetil)-digluc.	787	2.5	( <i>p</i> -cum.)-digluc.				770	2.7	( <i>p</i> -cum.)-digluc.			
	801	2.61	( <i>p</i> -cum.)-digluc.												

**Tabella 4.10:** Ioni precursori degli antociani monoglucosidi identificati mediante LC/MS precursor-ion analysis nelle 21 varietà ibride a bacca rossa studiate. Rt, tempo di ritenzione (min).

Gli antociani diglucosidi sono stati identificati come i precursori dei composti monoglucosidi, il metodo è risultato molto selettivo poichè il legame tra il glucosio e i gruppi acilici (cioè *p*-cumaril, acetil, caffeoil) non viene frammentato (**Tabella 4.10**). Ad esempio, nel caso della malvidina, monitorando il segnale a  $m/z$  493 sono stati rivelati i precursori a  $m/z$  655, corrispondente alla Mv-3,5-diglucoside,  $m/z$  801, corrispondente alla Mv-3-O-(6-O-*p*-cumaril)-5-O-diglucoside, e  $m/z$  697, corrispondente alla Mv-3-O-(6-O-acetil)-5-O-diglucoside. Sono stati così identificati 11 composti diglucosidi e complessivamente i 24 antociani riportati in **Tabella 4.11**.

<i>Antociani</i>	<i>m/z</i>
Malvidina-3-O-glucoside	493
Petunidina-3-O-glucoside	479
Delfinidina-3-O-glucoside	465
Peonidina-3-O-glucoside	463
Cianidina-3-O-glucoside	449
Malvidina-3,5-O-diglucoside	655
Petunidina-3,5-O-diglucoside	641
Delfinidina-3,5-O-diglucoside	627
Peonidina-3,5-O-diglucoside	625
Cianidina-3,5-O-diglucoside	611
Malvidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)glucoside	801
Petunidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)glucoside	625
Delfinidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)glucoside	611
Peonidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)glucoside	609
Cianidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)glucoside	595
Malvidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	535
Petunidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	521
Peonidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	505
Malvidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)-5-O-diglucoside	801
Petunidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)-5-O-diglucoside	787
Delfinidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)-5-O-diglucoside	773
Peonidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)-5-O-diglucoside	771
Cianidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)-5-O-diglucoside	757
Malvidina-3-O-(6-O-acetil)-5-O-diglucoside	697

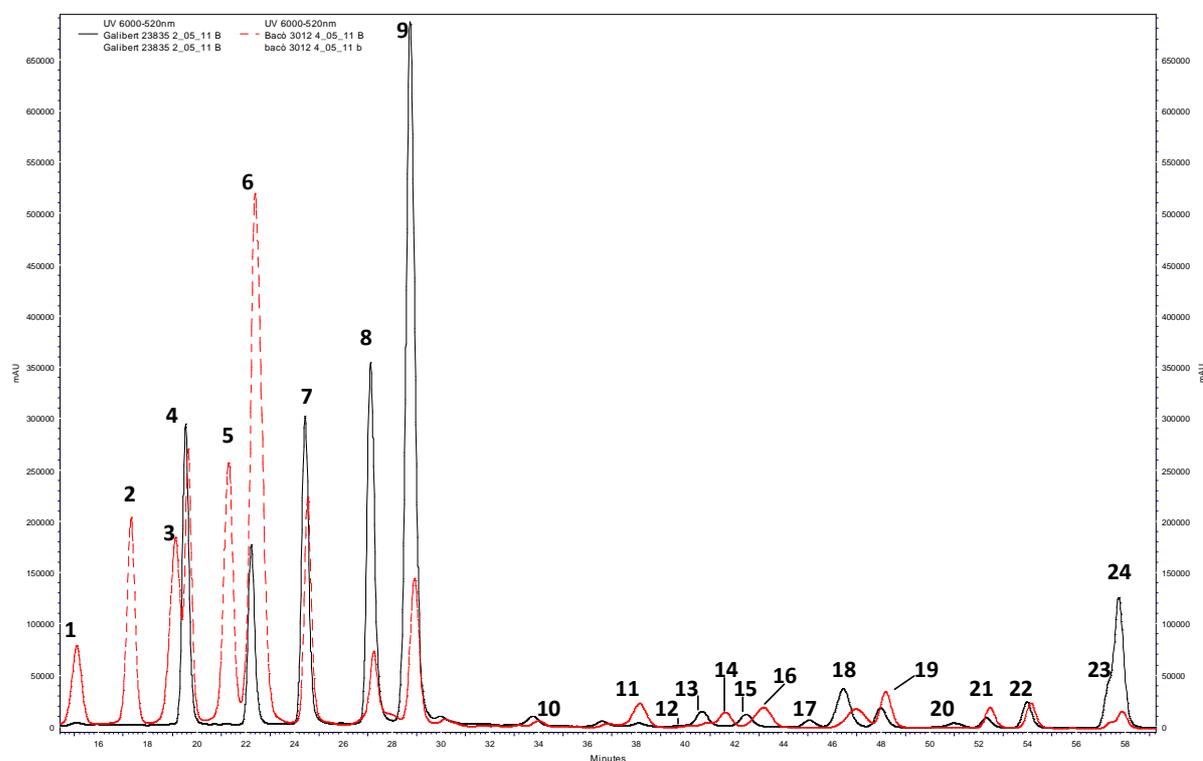
**Tabella 4.11:** Antociani determinati mediante LC/MS precursor-ion analysis.

Le condizioni sperimentali utilizzate con questo approccio (basso voltaggio del capillare, diversa energia di collisione per mono- e diglucosidi) hanno permesso di identificare gli antociani, specie già cariche positivamente, e di minimizzare la ionizzazione delle specie interferenti della matrice, aumentando in questo modo la sensibilità del metodo. L'analisi dello ione precursore si è quindi rivelato un metodo molto selettivo e, in condizioni analitiche ottimizzate, molto utile per lo studio e la caratterizzazione degli antociani.

### 4.2.3 Determinazione degli antociani mediante analisi HPLC/DAD

Per lo studio quantitativo degli antociani delle uve ibride è stata eseguita l'analisi LC/DAD. La **Figura 4.14** riporta il confronto tra i cromatogrammi di due varietà con profili antocianici molto diversi registrati a 520 nm: il Galibert 238-35, avente pochi antociani diglucosidi, e il Bacò 30-12, una delle varietà con il maggiore contenuto di diglucosidi.

Si può osservare la presenza dei 24 picchi cromatografici. Nel caso della coppia di composti malvidina-3-O-(6-O-caffeoil)glucoside e malvidina-3,5-diglucoside aventi la stessa massa nominale ( $m/z$  655), l'analisi MS/MS non permette di distinguerli avendo entrambi lo stesso aglicone (Favretto e Flamini, 2000). La differenziazione tra composti isobari è stata invece possibile nel caso di delphinidina-3-O-(6-O-*p*-cumaril)glucoside e cianidina-3,5-diglucoside, con massa nominale  $m/z$  611, e petunidina-3-O-(6-O-*p*-cumaril)glucoside e peonidina-3,5-diglucoside, con massa nominale  $m/z$  625.



**Figura 4.14:** Sovrapposizione dei cromatogrammi HPLC/DAD delle varietà Galibert 238-35 (linea continua) e Bacò 30-12 (linea tratteggiata). 1. delphinidina (Dp)-3,5-O-diglucoside, 2. cianidina (Cy) 3,5-O-digluc., 3. petunidina (Pt) 3,5-O-digluc., 4. Dp-3-O-glucoside, 5. peonidin (Pn) 3,5-O-digluc., 6. malvidin (Mv) 3,5-O-digluc.+Cy-3-O-gluc., 7. Pt-3-O-gluc., 8. Pn-3-O-gluc., 9. Mv-3-O-gluc., 10. Dp-3-O-(6-O-acetil)gluc., 11. Dp-3-(6-O-*p*-cumaril)-5-O-digluc., 12. Cy-3-(6-O-*p*-cumaril)-5-O-digluc., 13. Cy-3-O-(6-O-acetil)gluc., 14. Pt-3-(6-O-*p*-cumaril)-5-O-digluc., 15. Pt-3-O-(6-O-acetil)gluc., 16. Mv-3-(6-O-*p*-cumaril)-5-O-digluc., 17. Pn-3-O-(6-O-acetil)gluc., 18. Mv-3-O-(6-O-acet.)gluc., 19. Dp-3-O-(6-O-*p*-cumaril)gluc., 20. Mv-3-O-(6-O-caffeoil)gluc., 21. Cy-3-O-(6-O-*p*-cumaril)gluc., 22. Pt-3-O-(6-O-*p*-cumaril)gluc., 23. Pn-3-O-(6-O-*p*-cumaril)gluc., 24. Mv-3-O-(6-O-*p*-cumaril)glucoside.

A seconda della composizione di antociani diglucosidi è stato possibile suddividere le varietà in studio in due gruppi: uno caratterizzato da un'alta percentuale di antociani diglucosidi (superiore al 20%, in particolare Seyve Villard 23-399 e Seyve Villard 23-369 con 81.7% e 85.9% rispettivamente), e l'altro caratterizzato dalla scarsa presenza o addirittura dall'assenza di diglucosidi (in particolare Seibel 10878, Galibert 238-35, Sconosciuto 1 e Burdin 4077) (**Tabella 4.12**).

Varietà	% digluc.	% monogluc.	% (acetil)-digluc.	% (acetil)-monogluc.	% (p-cum.)-digluc.	% (p-cum.)-monogluc.	% Mv-(caffeoil)-monogluc.
	<20%						
Burdin 4077	5.5	80.4	/	5.2	tr	8.6	0.2
Couderc 25	15.5	79.2	0.5	1.1	0.7	2.9	tr
Galibert 238-35	3.0	78.4	/	6.4	tr	11.9	0.3
S.Villard 12-390	13.1	74.7	0.9	3.6	0.6	6.6	0.5
Seibel 10878	/	85.0	/	7.0	/	7.2	0.8
Seibel 8357	9.0	75.0	1.1	7.4	4.0	3.5	0.0
Terzi 100-31	14.9	75.6	0.7	3.0	0.3	5.3	0.2
Terzi 108-6	10.5	73.6	1.0	3.9	4.4	6.5	0.0
Sconosciuto 1	4.4	55.9	1.2	7.7	1.3	28.6	0.8
	>20%						
Bertille Seyve 1808	35.1	63.0	0.7	0.4	0.3	0.5	tr
Bacò 1	36.8	45.7	0.8	5.6	1.7	9.2	0.2
Bacò 30-12	49.2	39.1	0.2	3.0	3.4	5.1	tr
Bertille Seyve 4825	48.3	41.9	0.2	1.7	3.2	4.7	tr
Clinton	36.7	46.5	0.5	2.2	4.4	9.7	0.1
S.Villard 12-347	50.3	36.5	1.1	4.0	1.3	6.6	0.3
S.Villard 23-369	81.7	17.5	0.3	0.2	0.3	0.2	tr
S.Villard 23-399	85.9	11.6	0.1	0.6	1.2	0.8	tr
S.Villard 29-522	47.2	37.9	1.9	3.6	2.8	6.1	0.5
Sconosciuto 2	55.5	22.0	4.9	8.6	4.0	4.6	0.5
Seibel 8745	25.0	62.0	0.5	2.4	2.7	7.3	0.1
Terzi 97-46	29.9	44.5	1.1	4.2	7.7	12.4	0.2

**Tabella 4.12:** Composizione percentuale degli antociani. Le 21 varietà ibride bacca rossa sono state suddivise in due gruppi: uno con un contenuto totale di antociani diglucosidi inferiore al 20%, l'altro superiore al 20% (tr, tracce).

Dai dati riportati in **Tabella 4.12** si può osservare che la varietà Couderc 25 presenta un basso contenuto di antociani *p*-cumarati mono- e diglucosidi, mentre la varietà Sconosciuto 1 (così denominata in quanto non è stato possibile risalire al numero di incrocio) presenta alti contenuti di composti acilati (*p*-cumaril monoglucosidi totali 28.6%, acetil monoglucosidi totali 7.7%). La varietà Sconosciuto 2 è caratterizzata da un elevato contenuto di composti acetilati sia monoglucosidi che diglucosidi (in totale 13.5%), il Terzi 9746 presenta un contenuto totale di *p*-cumarati mono- e diglucosidi del 20.1%. Tutti i campioni presentavano contenuti di Mv-3-O-(6-O-caffeoil)glucoside inferiori <1%.

Per quanto riguarda la composizione dei singoli antociani (**Tabella 4.13**), un'alta percentuale di derivati della delphinidina è stata trovata nella varietà Bertille Seyve 1808 (Dp-3,5-O-diglucoside 11.3%, Dp-3-O-glucoside 35.6%) e nel Terzi 1086 (Dp-3-O-glucoside 32%). Le varietà caratterizzate da più alti contenuti di cianidina sono state il Bertille Seyve 4825 (Cy-3,5-O-diglucoside 11.9%, Cy-3-O-glucoside 22%) ed il Seyve Villard 12-390 (Cy-3-O-glucoside 27.2%). Alte percentuali di derivati della petunidina

sono state riscontrate nel Seyve Villard 23-369, Seyve Villard 23-399 (Pt-3,5-O-diglucoside 21.7% e 20.1% rispettivamente), Burdin 4077 (Pt-3-O-glucoside 23.7%) e nel Seibel 10878 (Pt-3-O-glucoside 20%). I derivati della peonidina erano più elevati in Bacò 30-12 (Pn-3,5-O-diglucoside 11.8%), Bertille Seyve 4825 (Pn-3,5-O-diglucoside 13.5%) e Galibert 238-35 (Pn-3-O-glucoside 15.5%). Infine, alte percentuali di derivati di malvidina sono state trovate nel Seyve Villard 12-347, Sconosciuto 2 e Seyve Villard 23-399 (Mv-3,5-O-diglucoside 40.3%, 44.5% e 47.9% rispettivamente), e nel Seibel 10878, Burdin 4077 e Terzi 100-31 (Mv-3-O-glucoside 44.8%, 34.6% e 30.7% rispettivamente).

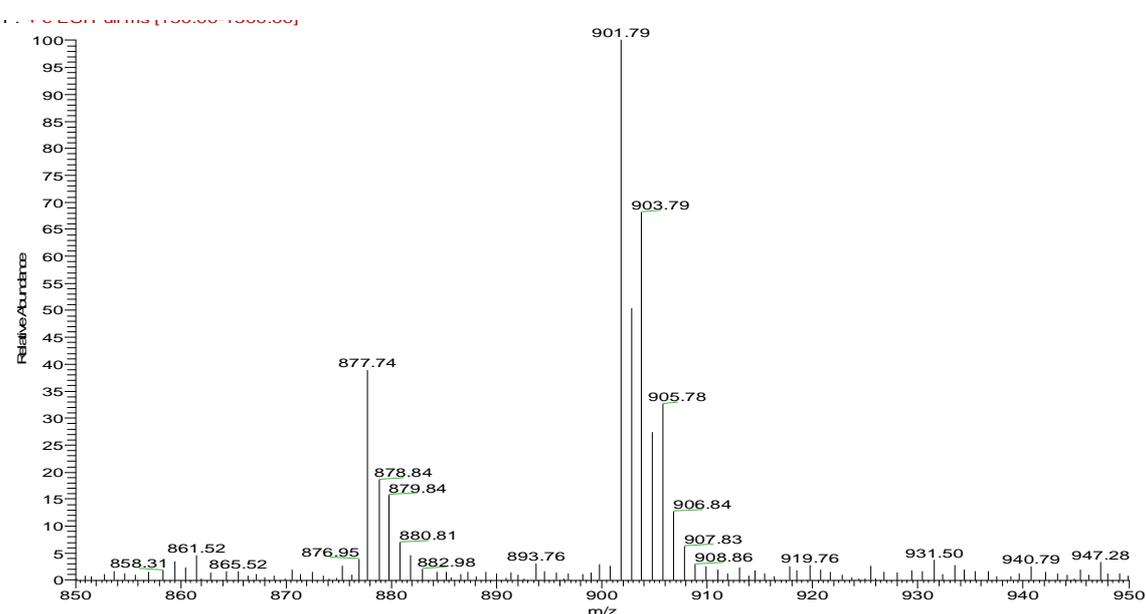
Varietà	<i>Mv-gluc.</i>	<i>Mv-digluc.</i>	<i>Pt-gluc.</i>	<i>Pt-digluc.</i>	<i>Dp-gluc.</i>	<i>Dp-digluc.</i>	<i>Pn-gluc.</i>	<i>Pn-digluc.</i>	<i>Cy-gluc.</i>	<i>Cy-digluc.</i>
Bacò 1	10.27	20.00	9.70	6.30	13.08	2.88	1.89	6.21	10.67	1.42
Bacò 3012	6.14	16.15	7.74	9.20	9.06	3.80	2.55	11.83	13.57	8.25
Bertille Seyve 1808	3.25	6.93	8.55	6.44	35.57	11.32	3.38	4.41	12.29	5.99
Bertille Seyve 4825	2.59	5.61	2.93	7.35	11.79	9.88	2.58	13.51	21.97	11.93
Burdin 4077	34.57	-	23.73	4.35	17.40	-	1.72	-	3.59	-
Clinton	7.90	13.80	12.71	10.87	19.50	6.54	0.36	2.21	6.01	3.25
Couderc 25	1.35	1.33	3.70	0.68	23.75	2.74	4.86	1.85	45.57	8.65
Galibert 238-35	35.54	-	12.21	-	11.02	-	15.54	-	6.56	-
Seibel 10878	44.78	-	20.07	-	13.86	-	2.49	-	3.28	-
Seibel 8357	23.68	1.60	15.63	2.41	21.98	0.99	3.16	2.98	10.40	0.98
Seibel 8745	10.63	8.35	9.21	7.41	23.82	6.29	0.98	2.06	17.28	0.86
Seyve Villard 12-347	11.20	40.35	8.57	4.31	10.46	2.09	1.14	2.98	4.09	0.53
Seyve Villard 12-390	23.66	4.67	10.73	2.11	9.92	0.95	2.98	5.00	27.25	0.41
Seyve Villard 23-369	0.68	29.73	4.36	21.75	9.37	15.56	0.67	4.65	0.67	9.98
Seyve Villard 23-399	1.66	47.85	2.34	20.10	4.93	15.65	0.17	1.29	2.27	0.97
Seyve Villard 29-522	12.45	33.21	8.54	6.63	14.88	5.00	0.58	1.53	0.58	0.83
Terzi 100-31	30.66	5.47	11.71	1.30	10.18	0.52	9.84	6.92	13.23	0.69
Terzi 108-6	6.14	3.70	14.50	1.15	31.99	0.78	1.50	1.51	19.50	3.37
Terzi 97-46	7.45	10.92	10.32	10.02	14.33	5.98	0.72	1.44	11.06	1.50
Sconosciuto 1	22.00	0.63	9.47	0.76	10.59	0.46	5.24	2.41	8.62	0.16
Sconosciuto 2	6.21	44.53	3.47	4.49	5.90	1.97	1.58	3.81	3.74	0.69

**Tabella 4.13:** Percentuali di antociani mono- e diglucosidi determinate nelle 21 varietà di uve ibride a bacca rossa studiate.

### 4.3 Valutazione delle potenzialità industriali delle varietà ibride: l'olio di vinaccioli

#### 4.3.1 Caratterizzazione dei trigliceridi mediante ESI-MS/MS

L'analisi ESI-MS/MS dei trigliceridi è stata realizzata effettuando l'iniezione diretta del campione diluito in THF/CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O (85:10:5 v/v/v). In queste condizioni non si osserva la formazione di molecole protonate ma solo di addotti con il sodio, che danno origine a segnali molto abbondanti (De Marchi *et al.*, 2012). Un tipico spettro ESI/MS di un campione di olio di vinaccioli è riportato in **Figura 4.15**, dove si osserva la presenza di due gruppi di segnali: il primo, nell'intervallo  $m/z$  877-881, corrispondente alla serie di trigliceridi C55 (aventi cioè un numero totale di atomi di carbonio pari a 55), e l'altro nell'intervallo  $m/z$  901-905, corrispondente alla serie di trigliceridi C57.



**Figura 4.15:** Spettro ESI-MS del campione di olio di vinaccioli della varietà Burdin 4077 in cui sono presenti due serie distinte di trigliceridi a  $m/z$  877-881 e  $m/z$  901-905.

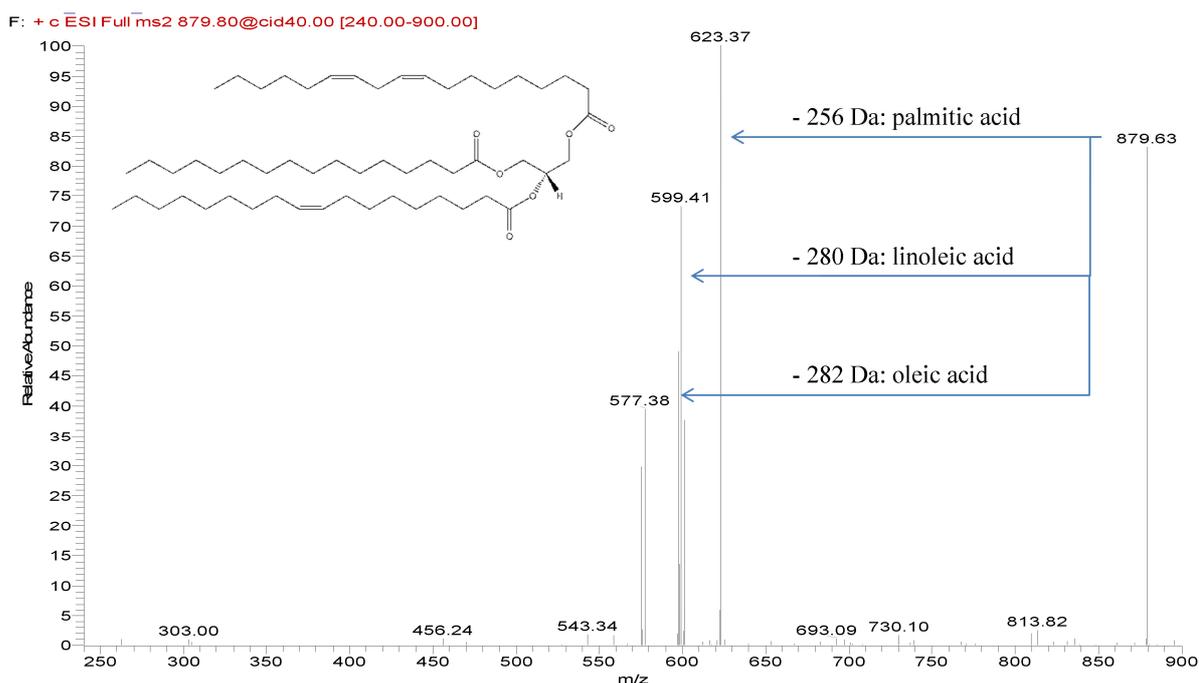
Negli spettri ESI/MS è possibile osservare gli ioni a  $m/z$  877, 879, 881, 901, 903 e 905 corrispondenti agli addotti sodiati di sei trigliceridi caratterizzati dalle perdite dei residui di acidi grassi presenti nella loro struttura.

I trigliceridi, che sono i prodotti dell'esterificazione del glicerolo con acidi grassi a catena lunga, sono denominati secondo numerazione stereospecifica *sn* (stereospecific numbering), poiché presentano asimmetria quando sono sostituiti da acidi grassi diversi tra loro. La tecnica ESI-MS/MS è efficace per eseguire la caratterizzazione strutturale dei trigliceridi in base ai frammenti degli acidi grassi che si formano, mentre è più incerta nella determinazione della posizione dei singoli acidi grassi esterificati al glicerolo.

La posizione, e la conseguente assegnazione dei nomi dei trigliceridi, può tuttavia essere attribuita tenendo in considerazione la maggiore probabilità di frammentazione delle catene di acidi grassi esterificate alle estremità della molecola di glicerolo, cioè in

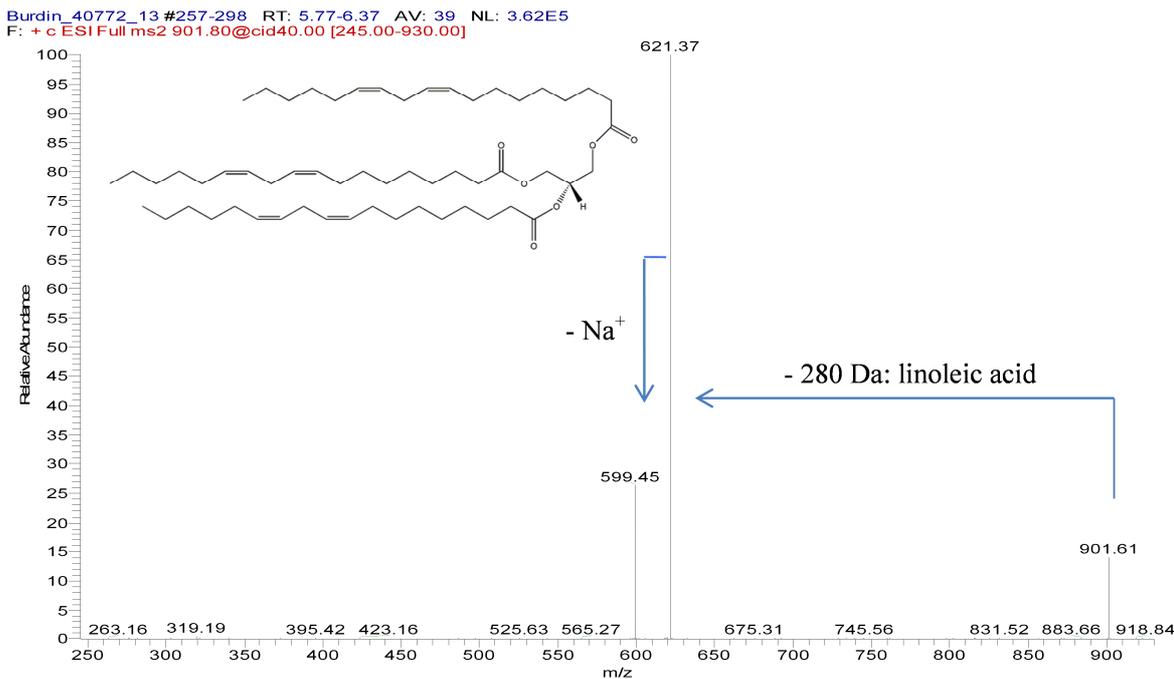
posizione *sn*-1 e *sn*-3, rispetto alla posizione centrale, *sn*-2. I segnali più intensi sono pertanto stati assegnati alla perdita di un residuo di acido grasso legato alle posizioni isomeriche *sn*-1 e *sn*-3 nello scheletro del glicerolo, mentre la perdita a più bassa intensità al residuo di acido grasso legato alla posizione *sn*-2.

In tal modo, il trigliceride 1-linoleoil-2-oleoil-3-palmitoil glicerolo, avente  $m/z$  879 (Figura 4.16), è stato denominato, per brevità, LOP. Gli ioni frammento a  $m/z$  623, 599 e 577 corrispondono alla perdita di acido palmitico (P, 256 Da), linoleico (L, 280 Da) e oleico (O, 282 Da) rispettivamente, mentre la perdita dei relativi sali sodici origina le specie ioniche a  $m/z$  601, 577 e 575.



**Figura 4.16:** Spettro ESI-MS/MS del trigliceride LOP: si osservano i segnali corrispondenti alla perdita dei frammenti di acidi grassi esterificati con il glicerolo.

Nello spettro ESI-MS/MS dello ione a  $m/z$  901 (Figura 4.17) si osservano due picchi: uno a  $m/z$  621, corrispondente alla perdita di acido linoleico (280 Da) e l'altro a  $m/z$  599, derivante dalla perdita di sodio linoleato. Di conseguenza lo ione a  $m/z$  901 corrisponde all'addotto con il sodio del trigliceride LLL, cioè  $[LLL+Na]^+$ .



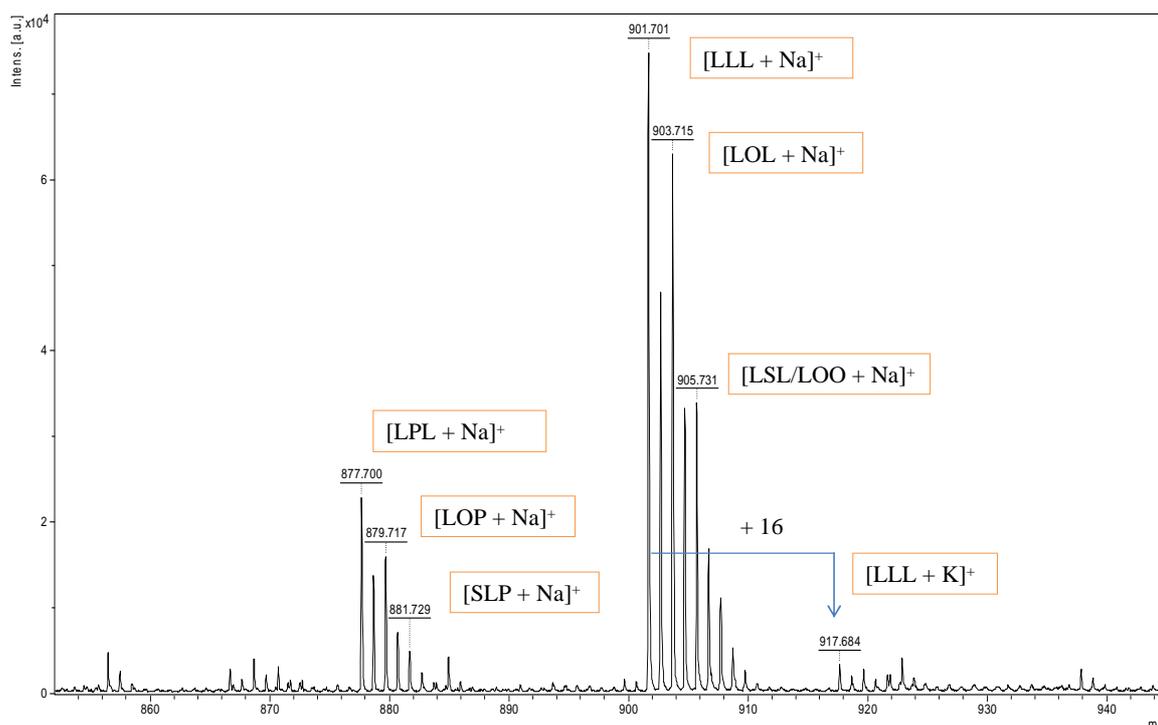
**Figura 4.17:** Spettro di frammentazione ESI-MS/MS relativo al trigliceride con  $m/z$  901, corrispondente a LLL.

Con questo metodo sono stati identificati gli altri picchi: lo ione a  $m/z$  877 (perdite di 280 e 256 Da) corrisponde all'addotto sodiato  $[LPL+Na]^+$ ; lo ione a  $m/z$  903 è  $[LOL+Na]^+$ ; lo ione a  $m/z$  905 (perdite di 282 e 284 corrispondenti rispettivamente ad acido oleico, O, e stearico, S) corrisponde ai trigliceridi sodiati  $[LSL+Na]^+$  e  $[LOO+Na]^+$ ; lo ione a  $m/z$  881 corrisponde a  $[LSP+Na]^+$  (vedere **Tabella 4.14** dove sono riportate nella parte superiore gli ioni frammento con le relative intensità).

Da questi dati si ricava che i trigliceridi dell'olio di vinaccioli sono costituiti principalmente da quattro acidi grassi legati allo scheletro del glicerolo a formare sei principali trigliceridi: acido linoleico (L, C18 : 2n-6.9, avente cioè 18 atomi di carbonio e due insaturazioni nelle posizioni 6 e 9), acido oleico (O, C18 : 1n-9, 18 atomi di carbonio, una sola insaturazione in posizione 9), acido stearico (S, C18:0, nessuna insaturazione) ed acido palmitico (P, 16:0).

### 4.3.2 Profilo MALDI-TOF dei trigliceridi nell'olio di vinaccioli

Gli spettri MALDI-TOF, come già gli spettri ESI/MS, mostrano la presenza delle serie di trigliceridi C55 e C57 (**Figura 4.18**). La serie di trigliceridi C57, costituita da addotti con il sodio, dà origine a segnali le cui intensità sono più alte della serie di trigliceridi C55. Gli ioni a  $m/z$  901, 903, 905 corrispondono ai trigliceridi LLL, LOL e LPL/LOO, rispettivamente, mentre le specie ioniche a  $m/z$  877, 879 e 881 ai trigliceridi LPL, LOP e LSP.

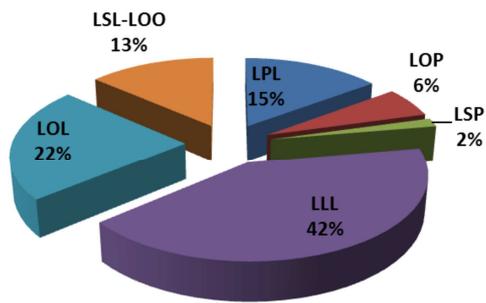


**Figura 4.18:** Spettro MALDI-TOF del un campione di olio della varietà Bacò 1. Sono riportati gli addotti con sodio e potassio dei principali trigliceridi.

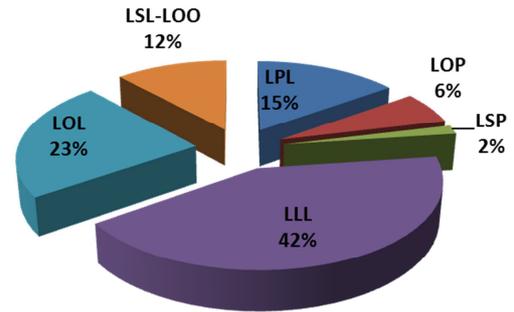
Nel calcolo delle intensità relative dei singoli segnali è stato tenuto in considerazione il contributo isotopico dei due picchi a  $m/z$  più alto (in questo caso 877, 879 e 901, 903) che aumentava l'intensità di ciascun segnale successivo del 20%. La correzione è stata effettuata sottraendo dall'intensità di questi segnali il 20% dell'intensità del picco precedente.

Come si può osservare dalla **Figura 4.19** non sono state trovate differenze significative tra varietà rosse e bianche.

### VARIETA' BIANCHE



### VARIETA' ROSSE



**Figura 4.19:** Confronto del contenuto percentuale medio di trigliceridi tra le varietà bianche e le varietà rosse.

Tuttavia, il confronto tra le diverse varietà ha messo in evidenza alcune differenze (**Tabella 4.14**). In particolare, la percentuale media di LLL (trigliceride con un alto contenuto di acidi grassi) è pari a circa 43% nei 32 ibridi, ma campioni quali Bacò 1 e Sconosciuto 2 (una varietà rossa) hanno un contenuto medio pari a 48% e 52% rispettivamente. Al contrario, l'altra varietà rossa Sconosciuto 1 presenta il più basso contenuto percentuale di LLL (33%). Nel caso del trigliceride LSP con più grassi saturi, la percentuale media è poco inferiore al 2%, ma i campioni Sconosciuto 1 e Sconosciuto 2 si discostano da tale valore con percentuali pari a 3.4 e 0.9% rispettivamente.

MALDI (%)	877.63 [LPL+Na] <sup>+</sup>	879.65 [LOP+Na] <sup>+</sup>	881.64 [LSP+Na] <sup>+</sup>	901.63 [LLL+Na] <sup>+</sup>	903.64 [LOL+Na] <sup>+</sup>	905.66 [LSL/LOO+Na] <sup>+</sup>
ESI-MS/MS <i>m/z</i> Masse e intensità relative	621.4 (67%); 597.4 (100%)	623.4(100%); 599.4(73%); 597.6(49%)	624.5(100%); 600.5(87%)	621.4 (100%)	623.4(100%) 621.4(42%)	625.4(100%); 623.4(75%); 621.4(43%)
Varietà rosse						
1 Bacò 1	13.1	4.3	1.5	48.2	24.7	8.2
2 Bacò 30-12	17.2	6.7	1.1	41.9	21.6	11.4
3 Bertille Seyve 1808	15.8	6.4	1.5	45.2	20.9	10.1
4 Bertille Seyve 4825	15.5	6.3	0.9	37.6	24.8	14.9
5 Burdin 4077	12.3	6.6	1.9	40.2	26.4	12.6
6 Clinton	15.2	5.9	1.4	44.2	22.4	10.9
7 Couderc 25	15.7	4.8	2.3	46.3	20.2	10.6
8 Galibert 238-35	16.6	6.8	1.6	37.2	22.8	15.0
9 Seibel 8357	11.6	7.1	1.9	38.1	25.4	15.9
10 Seibel 8745	13.0	5.9	1.8	43.6	25.4	10.3
11 Seibel 10878	14.5	5.9	1.2	46.1	22.2	10.1
12 Seyve Villard 12-347	15.9	6.4	1.3	42.3	23.2	10.9
13 Seyve Villard 12-390	13.5	5.7	1.2	42.8	23.7	13.1
14 Seyve Villard 23-369	14.1	5.4	1.4	44.2	25.1	9.7
15 Seyve Villard 23-399	16.8	7.5	1.3	39.2	24.1	11.2
16 Seyve Villard 29-522	15.5	6.7	1.4	38.9	25.0	12.5
17 Terzi 100-31	15.8	4.9	2.2	44.5	20.1	12.5
18 Terzi 108-6	13.1	6.0	2.2	45.1	21.5	12.0
19 Terzi 9746	16.6	5.6	1.7	41.5	23.1	11.6
20 Sconosciuto 1	15.1	9.1	3.4	33.5	25.5	13.4
21 Sconosciuto 2	16.3	4.6	0.9	51.6	19.0	7.7
Varietà bianche						
22 Bacò 2-16	12.8	6.3	1.6	39.8	26.3	13.1
23 Burdin 7419	15.3	6.5	1.5	41.7	23.9	11.2
24 GA 48-12	17.9	6.3	1.9	44.2	20.5	9.2
25 Galibert 152-26	14.7	5.5	0.9	45.7	24.5	8.8
26 Galibert 255-43	16.0	5.6	1.3	44.8	22.5	9.8
27 Galibert Treblanc	17.5	7.2	1.7	39.6	25.6	8.4
28 GF 84-21-9	15.6	5.8	1.0	44.2	22.0	11.4
29 Inc. Bruni 624	17.1	5.2	1.0	45.9	21.0	9.7
30 Seibel 9110	14.0	6.4	4.0	43.0	23.9	8.7
31 Seibel 10173	14.4	5.5	1.1	45.7	22.8	10.5
32 Seyve Villard 12-357	14.9	5.8	0.9	43.6	25.4	9.3
Media	15.1	6.1	1.6	42.8	23.3	11.1
S.D.	1.6	0.9	0.7	3.6	2.0	2.0

**Tabella 4.14:** Composizione percentuale dei sei principali trigliceridi identificati negli spettri MALDI delle 32 varietà di ibridi studiati. Nella parte superiore della tabella sono riportate le masse e le intensità relative delle frammentazioni ESI-MS/MS.

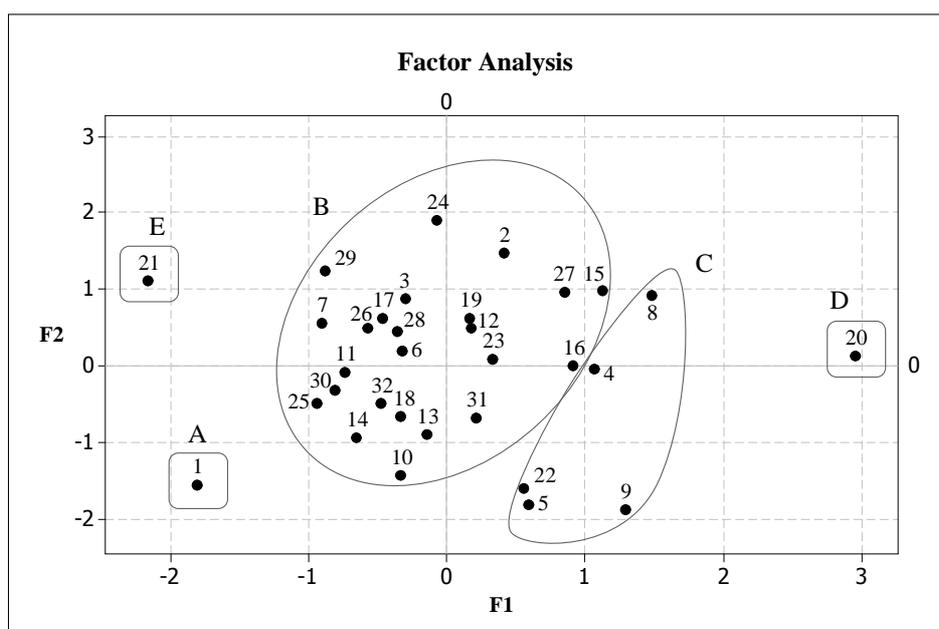
La presenza di acidi grassi insaturi nei trigliceridi oltre a fornire un'indicazione della tendenza dell'olio all'ossidazione, è anche un parametro nutrizionale importante in quanto gli acidi grassi essenziali - come l'acido linoleico - sono fondamentali per la crescita, la riproduzione e la salute degli organismi viventi. E' stata quindi calcolata la percentuale di trigliceridi contenenti più acidi grassi insaturi, intesa come somma delle percentuali di

LLL, LOL, LSL/LOO, la cui media è risultata pari a 77% per le 32 varietà studiate, con un valore di 72% per la varietà Sconosciuto 1 e di 81% per il Bacò 1 (**Tabella 4.15**).

Trigliceride	Media (%) $\pm$ S.D.	Bacò 1	Sconosciuto 1	Sconosciuto 2
LPL	15 $\pm$ 2	13.0	15.1	16.3
LOP	6 $\pm$ 1	4.3	9.1	4.6
LSP	2 $\pm$ 0.5	1.4	3.4	0.9
LLL	43 $\pm$ 3	48.0	33.5	51.6
LOL	23 $\pm$ 2	24.6	25.5	19.0
LSL/LOO	11 $\pm$ 2	8.5	13.4	7.7
LLL+LOL+LSL/LOO	77 $\pm$ 2	81.2	72.4	78.2

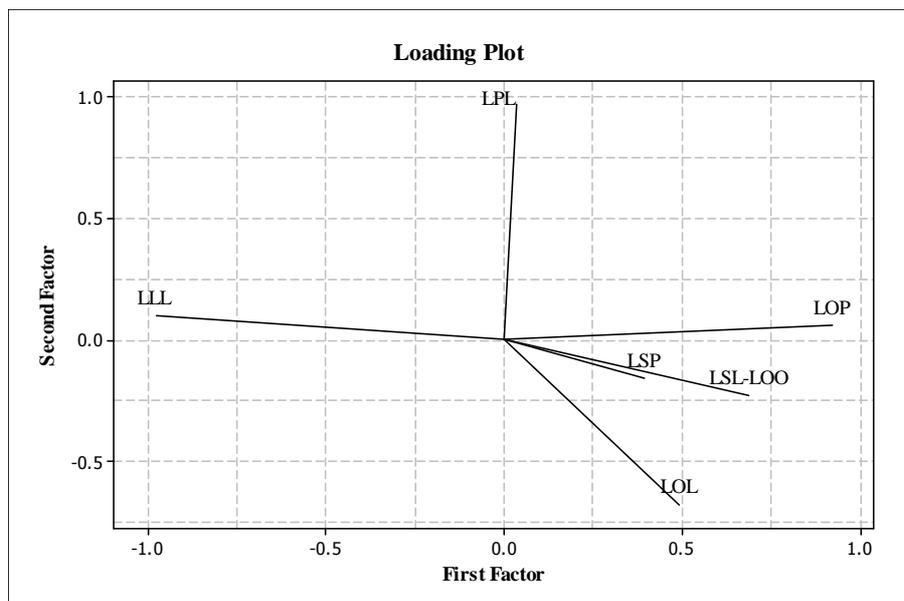
**Tabella 4.15:** Composizione media percentuale dei principali trigliceridi e somma dei trigliceridi più insaturi con le relative deviazioni standard. Sono evidenziati i casi di tre varietà che presentano maggiori differenze rispetto ai valori medi determinati per le 32 varietà di ibridi studiati.

Le differenze nella composizione di trigliceridi sono risultate ben evidenziate dall'analisi statistica, in particolare dall'analisi fattoriale (**Figura 4.20**): i campioni Bacò 1 (campione 1 in **Tabella 4.14**), Sconosciuto 1 (20) e Sconosciuto 2 (21) sono separati dagli altri campioni dal Fattore 1 (F1) che risulta correlato alle variabili LLL, LSP, LOP e LSL/LOO, mentre GA-4812 (24), Burdin 4077 (5) e Seibel 8357 (9) sono separati dal fattore F2, che è principalmente associato alle variabili LPL e LOL (**Figura 4.21**). L'analisi dei cluster (**Figura 4.22**) mette in evidenza questi risultati, ponendo i campioni 1, 20 e 21 in diversi gruppi, mentre le rimanenti 29 varietà sono riunite in due gruppi, B e C, il secondo racchiude i campioni 5 e 9.

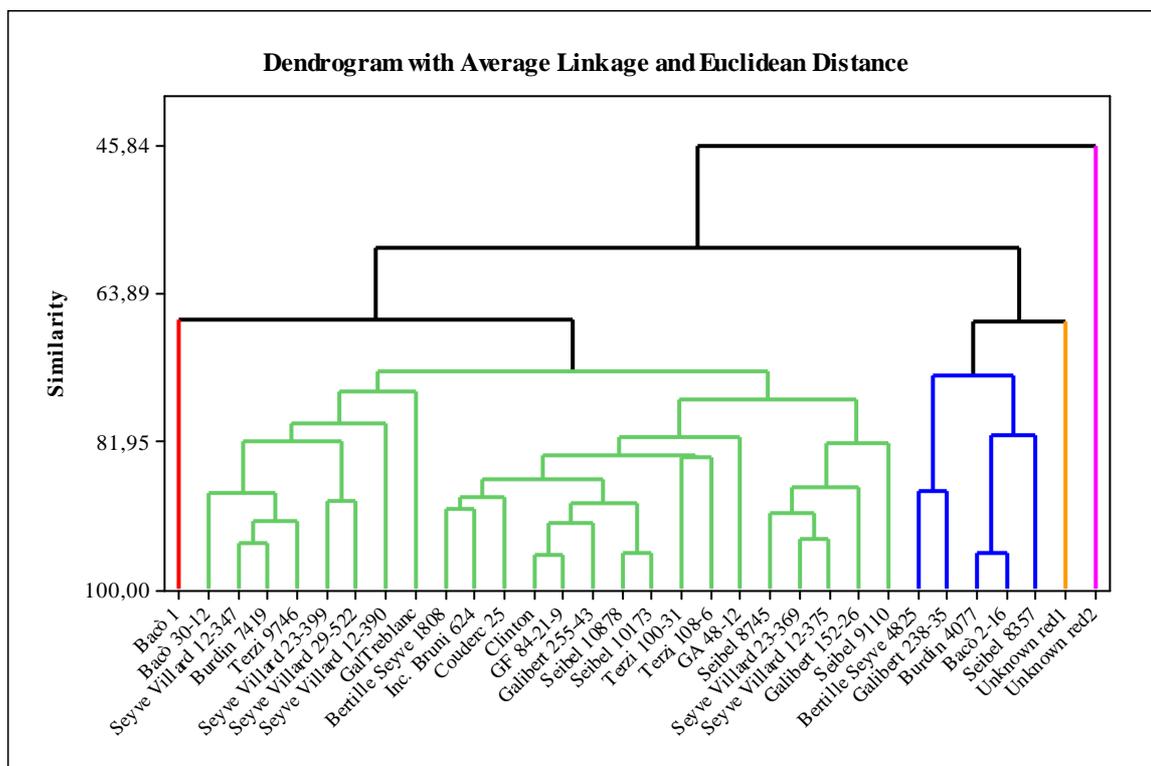


**Figura 4.20:** Analisi fattoriale delle 32 varietà ibride calcolata sulla base della composizione dei sei trigliceridi determinati nei campioni di olio di vinaccioli. La percentuale di varianza spiegata dai primi due

fattori, F1 e F2, è pari al 70% (45% e 25% rispettivamente). Le varietà sono raggruppate in cinque insiemi (indicati dalle lettere A, B, C, D, E) in accordo all'analisi dei clusters.



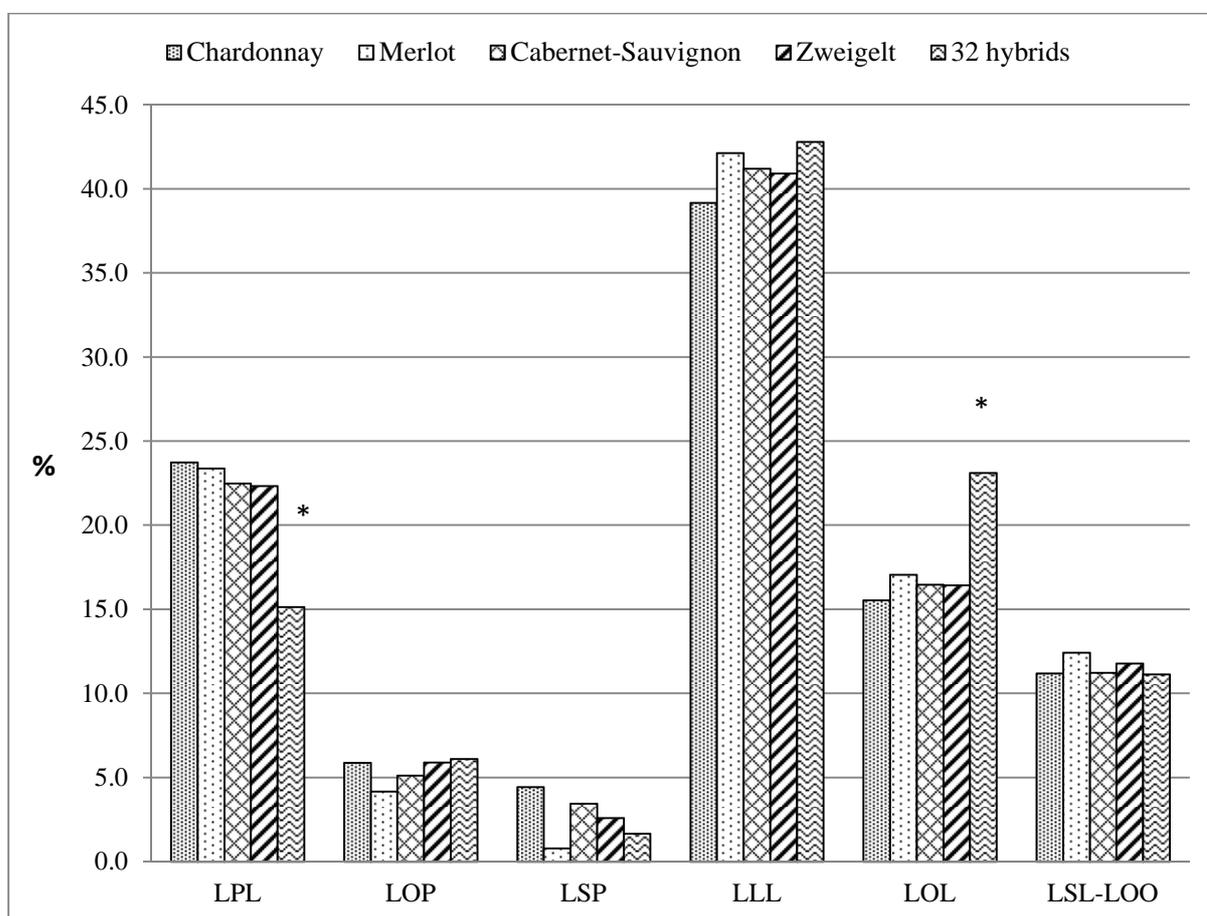
**Figura 4.21:** Loading plot delle variabili utilizzate nell'analisi fattoriale: F1 risulta positivamente correlato con LSP, LOP e LSL-LOO e negativamente con LLL; F2 è positivamente correlato con LPL e negativamente con LOL.



**Figura 4.22:** Dendrogramma relativo all'analisi dei clusters effettuata con il metodo del legame medio e della distanza euclidea; il raggruppamento è stato effettuato con un indice di similarità pari al 68%.

Un recente studio di Bail *et al.* (2008) riporta la composizione dei trigliceridi di campioni di olio di vinaccioli spremuti a freddo di quattro varietà *V. vinifera*, Chardonnay, Merlot, Cabernet Sauvignon, Zweigelt, analizzati mediante MALDI-TOF.

Le percentuali relative normalizzate ai 6 trigliceridi determinati da Bail *et al.* (2008) sono comprese tra 39% e 42% per LLL, 15-17% per LOL, 11-12% per LSL/LOO, 22-24% per LPL, 4-6% per LOP e tra 1-4% per LSP (Figura 4.23). L'analisi statistica dell'ANOVA a una via ha evidenziato differenze significative tra le quattro varietà di *V. vinifera* e i 32 ibridi, con un livello di confidenza del 95%. I contenuti percentuali di trigliceridi sono risultati simili per alcuni composti, mentre si è riscontrato una percentuale più alta di LOL (23%, un trigliceride con un elevato contenuto di acidi grassi insaturi) e una più bassa di LPL (15%), con un livello di significatività minore di 0.05. Anche la percentuale di LSP è risultata inferiore nei campioni di olio di varietà ibride, ad eccezione della varietà Merlot.



**Figura 4.23:** Confronto tra le percentuali di trigliceridi nelle 32 varietà di ibridi e le quattro varietà *V. vinifera* riportate in letteratura da Bail *et al.* (2008) (\* =  $p$ -value < 0.05).

### **4.3.3 Produzione e resa di olio dei vinaccioli**

La produzione media dell'olio di vinaccioli di ciascuna varietà è stata stimata sui campioni raccolti nelle annate 2010 e 2011 (**Tabella 4.16**).

In generale è stato riscontrato un contenuto di olio compreso tra 1.0 e 6.0 g/kg di uva. I campioni maggiormente produttivi sono stati Bacò 30-12, Clinton, Seibel 10878, Terzi 9746, Incrocio Bruni 624 e Seibel 10173, con contenuti di olio superiori a 4.5 g/kg d'uva. Seibel 10878 e Terzi 9746 hanno anche evidenziato un elevato contenuto percentuale di olio nei semi (>10%). La più bassa resa è stata trovata per Bertille Seyve 4825 e Seibel 9110 (circa 1 g/kg uva).

E' interessante notare che la varietà Seibel 10878 ha anche un'alta produttività in termini di kg di uva per pianta, rendendo questa varietà particolarmente adatta a colture finalizzate ad un'alta produzione di olio di vinaccioli.

	<i>Resa (%)</i>		<i>Media (%)</i>	<i>Produttività</i>		<i>Media (g olio/kg uva)</i>
	<i>2010</i>	<i>2011</i>		<i>2010</i>	<i>2011</i>	
<b><i>Varietà rosse</i></b>						
Bacò 1	12.76	14.26	13.51 ± 0.75	3.53	4.43	3.98 ± 0.45
Bacò 30-12	8.70	9.25	8.98 ± 0.28	4.54	4.76	4.65 ± 0.11
Bertille Seyve 1808	8.01	8.28	8.15 ± 0.14	3.42	3.31	3.37 ± 0.06
Bertille Seyve 4825	9.36	10.55	9.96 ± 0.60	1.38	1.01	1.20 ± 0.19
Burdin 4077	9.20	9.61	9.41 ± 0.21	2.95	4.06	3.51 ± 0.56
Clinton	9.64	10.09	9.87 ± 0.23	4.01	6.13	5.07 ± 1.06
Couderc 25	13.50	10.87	12.19 ± 1.32	4.94	3.32	4.13 ± 0.81
Galibert 238-35	12.31	13.20	12.76 ± 0.45	2.01	1.96	1.99 ± 0.02
Seibel 8357	8.26	10.53	9.40 ± 1.14	2.97	4.23	3.60 ± 0.63
Seibel 8745	7.86	9.83	8.85 ± 0.98	2.74	2.29	2.52 ± 0.23
Seibel 10878	10.44	11.49	10.97 ± 0.53	4.97	4.82	4.90 ± 0.07
Seyve Villard 12-347	9.28	12.56	10.92 ± 1.64	1.72	3.39	2.56 ± 0.84
Seyve Villard 12-390	12.43	13.46	12.95 ± 0.52	2.51	2.81	2.66 ± 0.15
Seyve Villard 23-369	7.88	11.19	9.54 ± 1.66	2.04	3.27	2.66 ± 0.62
Seyve Villard 23-399	8.79	9.23	9.01 ± 0.22	2.10	2.41	2.26 ± 0.16
Seyve Villard 29-522	11.00	14.83	12.92 ± 1.92	3.19	4.99	4.09 ± 0.90
Terzi 100-31	13.32	12.00	12.66 ± 0.66	2.94	2.55	2.75 ± 0.20
Terzi 108-6	9.37	11.03	10.20 ± 0.83	3.53	4.39	3.96 ± 0.43
Terzi 9746	10.04	10.08	10.06 ± 0.02	4.70	4.78	4.74 ± 0.04
Sconosciuto 1	7.42	8.88	8.15 ± 0.73	2.92	2.25	2.59 ± 0.34
Sconosciuto 2	5.23	n.d.	-	1.31	n.d.	-
<b><i>Varietà bianche</i></b>						
Bacò 2-16	10.49	12.35	11.42 ± 0.93	2.93	4.80	3.87 ± 0.94
Burdin 7419	10.81	11.97	11.39 ± 0.58	3.98	4.16	4.07 ± 0.09
GA 48-12	7.76	12.01	9.89 ± 2.13	1.92	2.93	2.43 ± 0.51
Galibert 152-26	9.21	13.60	11.41 ± 2.20	2.14	3.19	2.67 ± 0.53
Galibert 255-43	10.39	11.49	10.94 ± 0.55	1.60	1.69	1.65 ± 0.04
Galibert Treblanc	11.32	11.17	11.25 ± 0.08	1.92	2.10	2.01 ± 0.09
GF 84-21-9	9.21	10.74	9.98 ± 0.76	2.52	2.87	2.70 ± 0.18
Incrocio Bruni 624	10.36	9.03	9.70 ± 0.67	5.75	5.59	5.67 ± 0.08
Seibel 9110	6.65	6.17	6.41 ± 0.24	1.08	1.08	1.08 ± 0.00
Seibel 10173	10.56	9.10	9.83 ± 0.73	5.87	3.72	4.80 ± 1.08
Seyve Villard 12-357	9.32	9.49	9.41 ± 0.08	1.83	2.98	2.41 ± 0.58

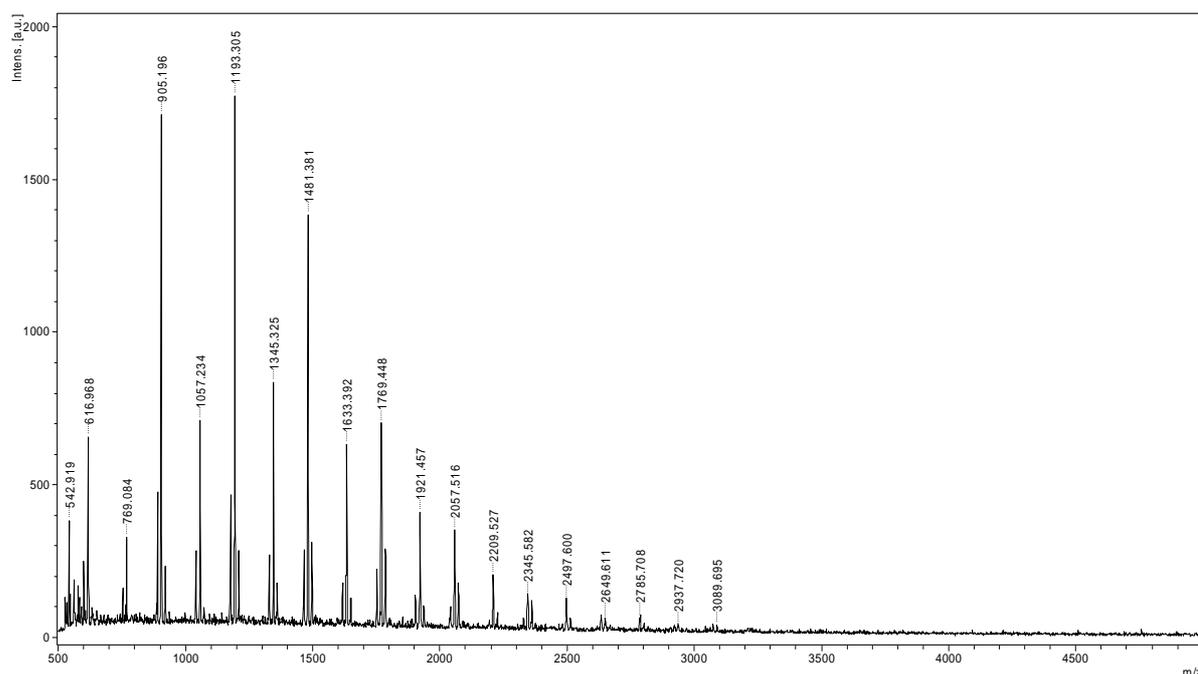
**Tabella 4.16:** Rese percentuali (calcolate come grammi di olio x 100/grammi di polvere di vinaccioli) e produttività (espressa come g olio/kg uva) delle 32 varietà di uve ibride studiate nelle annate 2010 e 2011. Sono riportate anche le medie con semidispersione dalla media delle due misure.

## 4.4 Valutazione delle proprietà nutraceutiche delle varietà ibride

### 4.4.1 Identificazione dei segnali degli spettri MALDI-TOF

Il primo passo nell'investigazione delle proantocianidine è stato la ricerca delle migliori condizioni MALDI per ottenere la migliore riproducibilità ed il più alto rapporto segnale/rumore. Sono state testate diverse matrici (acido sinapico,  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico, acido 2,5-diidrossibenzoico o DHB, ditranolo) ed i migliori risultati sono stati ottenuti utilizzando il DHB che ha permesso di ottenere spettri caratterizzati da un'abbondante formazione di specie molecolari protonate ( $H^+$ ) e cationiche ( $Na^+$ ,  $K^+$ ). Le misurazioni sono state effettuate in modalità reflectron e lineare, ed è stata scelta la modalità positiva reflectron perché ha permesso di ottenere dati più abbondanti e riproducibili.

Gli spettri MALDI-TOF degli estratti di vinaccioli registrati in modalità positiva mostrano intensità dei picchi che decrescono all'aumentare dei valori di massa, seguendo un tipico andamento a campana (**Figura 4.24**). La minore sensibilità per gli ioni più pesanti è attribuibile alla frammentazione di questi ioni, causata dal più lungo cammino di volo e dal processo di post-accelerazione (Jerez *et al.*, 2009).



**Figura 4.24:** Spettro MALDI-MS dell'estratto di vinaccioli della varietà Burdin 74-19.

I numerosi segnali registrati negli spettri MALDI sono dovuti alla presenza delle forme cationiche  $[M+Na]^+$  ed  $[M+K]^+$  delle proantocianidine di tipo A e B, ed in alcuni casi anche delle molecole protonate  $[M+H]^+$  (**Tabella 4.17**). I picchi sono separati da differenze di massa pari a 288 Da, corrispondenti alla presenza di unità monomeriche aggiuntive di catechina/epicatechina nella struttura molecolare del tannino; le differenze di

massa pari a 152 Da sono invece attribuite alla presenza di più residui di acido gallico esterificati all'ossidrile C3 dell'anello eterociclico delle unità di epicatechina.

Per predire le masse molecolari delle proantocianidine è stata riportata in letteratura la formula  $290 + 288c + 152g + k - 2x$ , dove 290 è la massa molecolare dell'unità terminale di catechina/epicatechina,  $c$  il numero delle unità di catechina/epicatechina non terminali,  $g$  il numero di gallati esterificati alle unità di epicatechina,  $k$  il peso molecolare del catione e  $x$  il numero di legami A-type (Krueger *et al.*, 2000).

Alcune serie di proantocianidine oligomere con valori di massa inferiori di 2, 4, 6 Da rispetto alle proantocianidine di tipo B presenti negli spettri, sono state identificate come proantocianidine di tipo A. Per esempio, nel caso del trimero protonato  $[M+H]^+$  è stato osservato un cluster di segnali distanti tra loro di 2 Da che sono stati spiegati dalla presenza di un trimero con due legami B-type ( $m/z$  867), un legame B-type ed uno A-type ( $m/z$  865) e con due legami A-type ( $m/z$  863). Il segnale con massa  $m/z$  1149 potrebbe pertanto corrispondere ad un tetramero con tre legami A-type, anche se teoricamente ostacolato da un ingombro sterico.

Sono stati individuati inoltre altri due segnali a  $m/z$  561 e  $m/z$  559, identificati rispettivamente come le specie protonate dimere B-type e A-type disidratate in accordo con quanto riportato da Mouls e Fulcrand (2012).

E' da notare che la massa di due molecole di acido gallico è equivalente a quella di un'unità gallocatechina/galloepicatechina (304 Da).

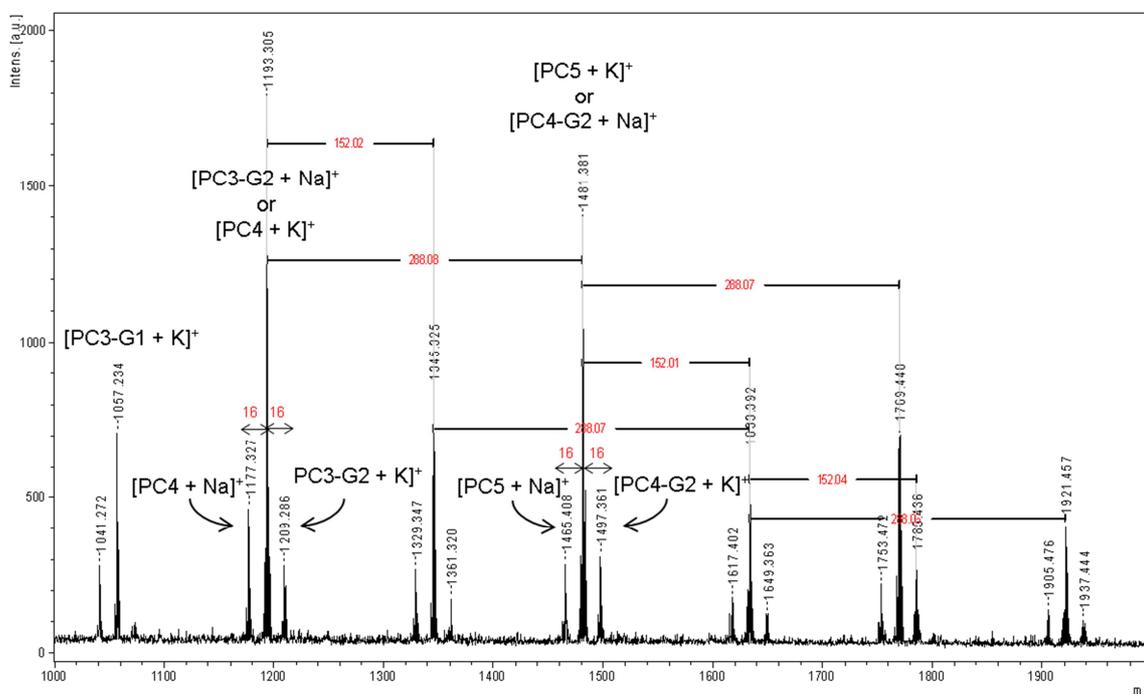
Con questo approccio di studio sono state complessivamente identificate nei vinaccioli dei campioni studiati i segnali di 148 proantocianidine putative (rispettivamente 55 di tipo B e 93 di tipo A), con grado di polimerizzazione da 2 a 11 e grado di galloilazione compreso tra 0 e 7. Questi risultati sono simili a quelli riportati in letteratura per estratti di vinaccioli analizzati mediante MALDI-MS (Krueger *et al.*, 2000).

E' da sottolineare la presenza di 29 coppie di specie isobariche, corrispondenti a proantocianidine sia B-type che A-type, separate da differenze di massa di 16 Da. Tale differenza può corrispondere sia alla differenza delle masse dei cationi sodio e potassio ( $\Delta=15.9739$  amu) che alla presenza di un gruppo ossidrile in più sull'anello B ( $\Delta=15.9949$  amu) e quindi alla presenza di prodelfinidine. Poiché lo strumento utilizzato possiede una risoluzione non sufficiente a distinguere le specie molecolari in base alla sola massa, per determinare le strutture sono stati effettuati ulteriori esperimenti di scambio cationico e di MS/MS.

Tannin ID	B-type			A-type		
	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	[M+K] <sup>+</sup>
dimer	579	601	617	577	599	615
dimer 1G		753	769		751	767
dimer 2G		905	921		903	919
trimer	867	889	905	863, 865	887	903
trimer 1G		1041	1057		1039	1053, 1055
trimer 2G		1193	1209		1189, 1191	1205, 1207
trimer 3G		1345	1361		1341, 1343	1357, 1359
tetramer	1155	1177	1193	1149, 1151, 1153	1173, 1175	1189, 1191
tetramer 1G	1305	1329	1345	1303	1325, 1327	1341, 1343
tetramer 2G		1481	1497		1475, 1477, 1479	1491, 1493, 1495
tetramer 3G		1633	1649		1629, 1631	1645, 1647
tetramer 4G		1785	1801		1781, 1783	1795, 1797, 1799
pentamer		1465	1481		1461, 1463	1475, 1477, 1479
pentamer 1G		1617	1633		1613, 1615	1629, 1631
pentamer 2G		1769	1785		1763, 1765, 1767	1781, 1783
pentamer 3G		1921	1937		1917, 1919	1933, 1935
pentamer 4G		2073	2089		2069, 2071	2087, 2085
pentamer 5G		2225			2221, 2223	
hexamer		1753	1769		1747, 1749, 1751	1763, 1765, 1767
hexamer 1G		1905	1921		1901, 1903	1917, 1919
hexamer 2G		2057	2073		2053, 2055	2069, 2071
hexamer 3G		2209	2225		2205, 2207	2221, 2223
hexamer 4G		2361	2377		2357, 2359	2371, 2373, 2375
hexamer 5G		2513	2529		2509, 2511	2523, 2525, 2527
hexamer 6G		2665			2661, 2663	
heptamer		2041	2057		2037, 2039	2053, 2055
heptamer 1G		2193	2209		2189, 2191	2205, 2207
heptamer 2G		2345	2361		2339, 2341, 2343	2357, 2359
heptamer 3G		2497	2513		2493, 2495	2509, 2511
heptamer 4G		2649	2665		2645, 2647	2661, 2663
heptamer 5G		2801	2817		2797, 2799	
heptamer 6G		2953			2949, 2951	
octamer		2329	2345		2325, 2327	2339, 2341, 2343
octamer 1G		2481	2497		2477, 2479	2493, 2495
octamer 2G		2633	2649		2629, 2631	2645, 2647
octamer 3G		2785	2801		2781, 2783	2797, 2799
octamer 4G		2937	2953		2933, 2935	2949, 2951
octamer 5G		3089	3105		3087	
octamer 6G		3241	3257		3239	
octamer 7G		3393				
nonamer 1G		2769	2785		2765, 2767	2781, 2783
nonamer 2G		2921	2937		2919	2933, 2935
nonamer 3G		3073	3089		3071	3087
nonamer 4G		3225	3241		3223	3239
nonamer 5G		3377	3393		3375	
nonamer 6G		3529				
decamer 1G		3057	3073			
decamer 2G		3209	3225		3207	3223
decamer 3G		3361	3377		3357, 3359	3375
decamer 4G		3513	3529		3511	
decamer 5G		3665				
decamer 6G		3817				
undecamer 1G		3345	3361			
undecamer 2G		3497	3513			
undecamer 3G		3649	3665			

**Tabella 4.17:** Segnali registrati negli spettri MALDI-TOF degli estratti di vinaccioli ed assegnati alle proantocianidine A-type e B-type. G: gallato.

Nella porzione dello spettro MALDI del Burdin 74-19 riportato in **Figura 4.25** si può vedere chiaramente la presenza delle specie isobariche: ad esempio il segnale a  $m/z$  1481 è separato dai segnali precedente e seguente da differenze di massa di 16 Da, e può corrispondere all'addotto di sodio del tetramero digallato, al pentamero potassiato o alla somma di entrambi.



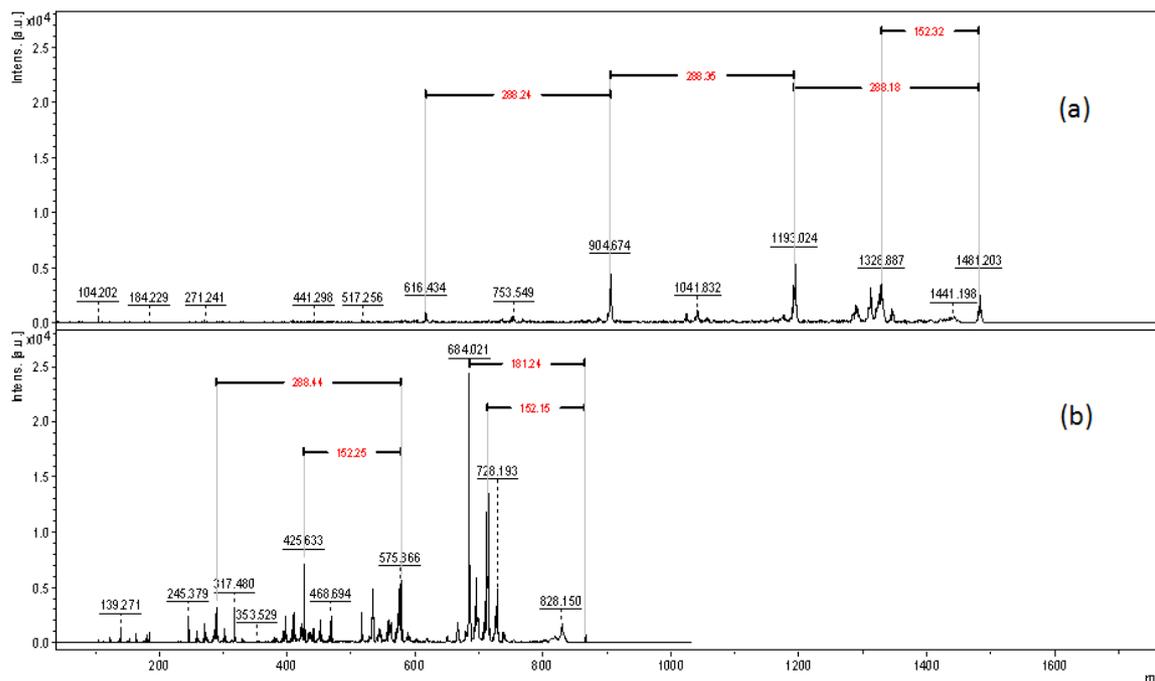
**Figura 4.25:** Porzione dello spettro di massa dell'estratto di vinaccioli della varietà Burdin 74-19 in cui sono evidenziate alcune specie isobariche.

Per eseguire esperimenti di scambio cationico i campioni sono stati deionizzati passando gli estratti su cartuccia per estrazione in fase solida C<sub>18</sub> Sep-Pak<sup>®</sup> da 10 g e sono stati addizionati in successione con sali di sodio, potassio e litio.

Dopo l'aggiunta dei sali di potassio non è stato osservato alcun spostamento evidente dei segnali, i più alti dei quali erano a  $m/z$  1481 e 1497. Invece la successiva addizione di sodio ha provocato uno spostamento della distribuzione a masse più basse di 16 u.m.a., con un aumento dei segnali a  $m/z$  1465 e il 1481, corrispondenti all'addotto sodiato del pentamero e del tetramero digallato, rispettivamente. La presenza di entrambi i composti è stata confermata dall'aggiunta di litio, che ha dato origine ai segnali a  $m/z$  1449 e 1465 corrispondenti all'addotto di litio del pentamero e del tetramero digallato.

Quindi si può concludere che quando entrambi i cationi Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> sono presenti nella matrice il segnale viene diviso e rilevato come addotto sia del sodio che del potassio.

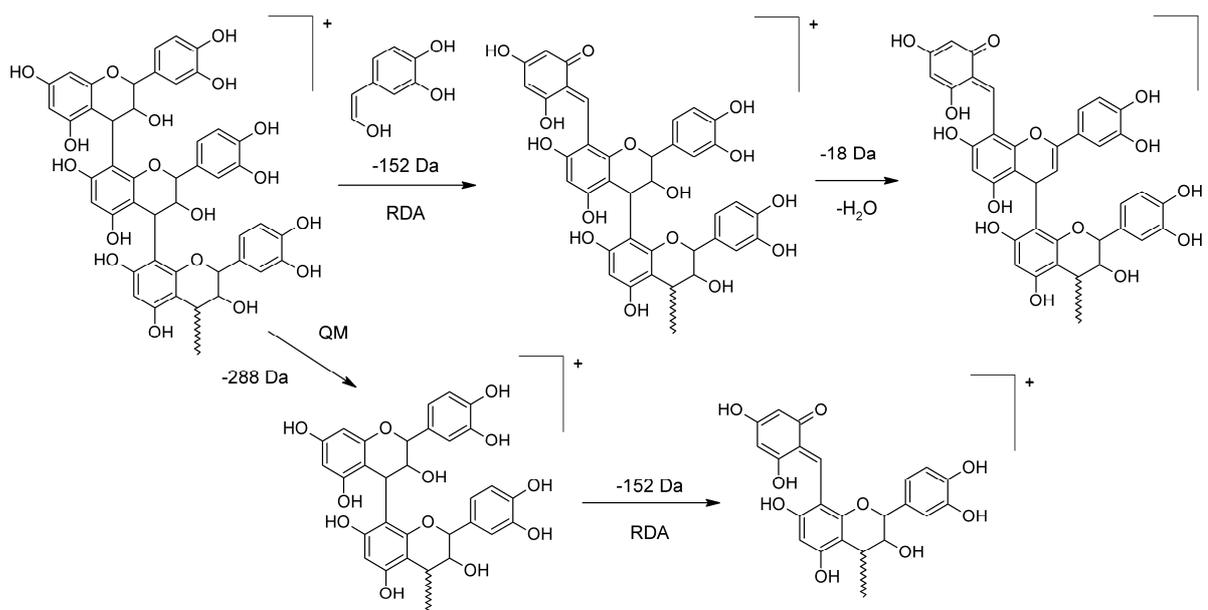
Per chiarire e caratterizzare la struttura molecolare delle proantocianidine sono stati eseguiti esperimenti TOF/TOF sui segnali più intensi corrispondenti a oligomeri A- e B-type. In **Figura 4.26** sono riportati come esempio gli spettri di massa TOF/TOF degli ioni a  $m/z$  1481 (tetramero B-type) e  $m/z$  865 (trimerico con un legame A-type ed uno B-type).



**Figura 4.26:** Spettri di massa MALDI-TOF/TOF (a) dello ione a  $m/z$  1481 putativamente assegnato all'addotto sodiato del tetramero digallato B-type o del pentamero potassiato B-type; (b) dello ione a  $m/z$  865 putativamente assegnato al trimero protonato A-type.

Nel caso dello ione  $m/z$  1481 è possibile distinguere chiaramente i frammenti formati in seguito alla perdita delle subunità di catechina/epicatechina (-288 Da) dovuta alla rottura chinone metino che frammenta gli oligomeri in unità monomeriche. Secondo quanto riportato in letteratura, i segnali più bassi di 170 Da e 152 Da potrebbero corrispondere alla perdita di una molecola neutra di acido gallico e del residuo gallato (Vidal *et al.*, 2010), ma possono essere anche spiegate dal tipico meccanismo di frammentazione delle proantocianidine che coinvolge una retro Diels-Alder sull'anello C dell'unità flavanolica seguita da una perdita di acqua con una perdita complessiva di 170 Da (**Figura 4.27**). Queste frammentazioni hanno permesso di escludere la presenza di prodelfinidine (perché sarebbero stati visibili perdite di -304 Da) mentre non sono diagnostici per discriminare tra proantocianidine galloilate e non galloilate.

Nel caso dello ione a  $m/z$  865, oltre alle perdite di 288 Da e 152 Da, sono presenti nuovi frammenti, come quello a  $m/z$  684, derivante dalla perdita di una specie radicalica avente formula molecolare  $C_9H_9O_4\cdot$  (181 Da) che potrebbe essere spiegata da riarrangiamenti della specie protonata indotti dal legame A-type che migliorano l'impedimento sterico della molecola. Aumentando il grado di polimerizzazione, gli spettri TOF/TOF delle proantocianidine A-type diventano via via più complicati: sono ancora visibili le perdite di 152 Da e 288 Da, ma i frammenti ionici derivanti dai riarrangiamenti sono troppo abbondanti e diventa difficile assegnarne una struttura.



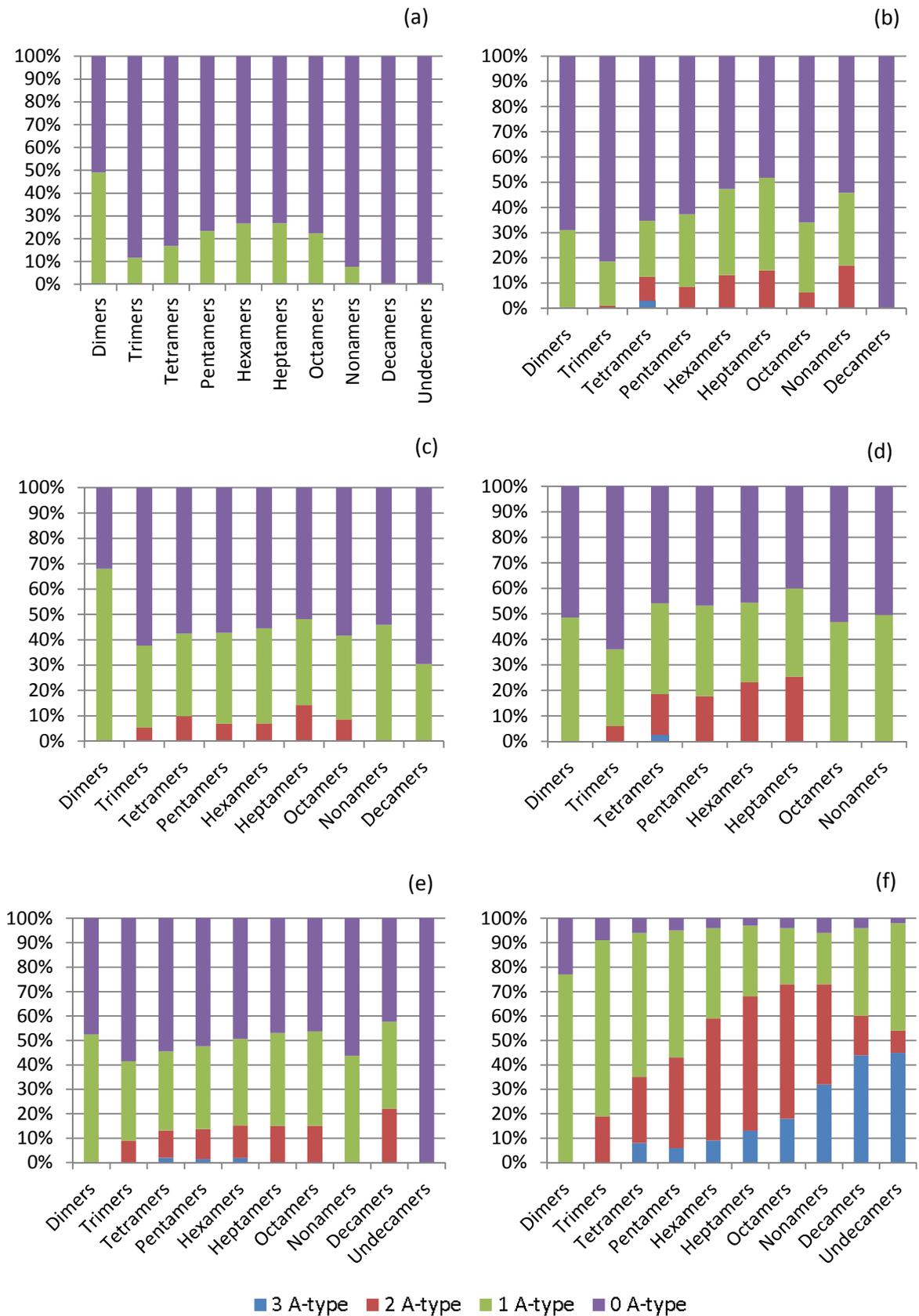
**Figura 4.27:** Schema di frammentazione delle proantocianidine; RDA: reazione Retro Diels-Alder; QM: rottura chinone-metino (Quinone Methide cleavage).

Particolarmente interessante è la presenza di proantocianidine A-type perché si trovano in poche piante e frutti, quali mirtilli rossi, cachi, semi di litchi, prugne e cannella (Gu *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2010). Nei mirtilli rossi questo tipo di proantocianidine è ritenuto il componente attivo che inibisce l'adesione dei batteri di *Escherichia coli* alla superficie delle cellule uro-epiteliali, prevenendo la colonizzazione batterica e la conseguente infezione (Foo *et al.*, 2000).

La presenza di proantocianidine A-type nei vinaccioli, anche in forma galloilata, è stata recentemente dimostrata (Passos *et al.*, 2007), ed i nostri risultati suggeriscono la presenza di proantocianidine con più di un legame di questo tipo. Finora proantocianidine con almeno due legami A-type sono state identificate nella corteccia della pianta *Pavetta owariensis* (Balde *et al.*, 1995).

Alcune varietà ibride studiate quali Bacò 1, Bertille Seyve 4825, Couderc 25, Seibel 10878, Seyve Villard 12-390, 23-369, 23-399, Galibert 255-43, GF 84-21-9, Incrocio Bruni, Seibel 9110, Seyve Villard 12-375, hanno presentato un contenuto di proantocianidine A-type superiore alle varietà di *V. vinifera*. In **Figura 4.28** è riportato il confronto delle percentuali di proantocianidine B-type e A-type tra le varietà di *V. vinifera* studiate, gli estratti di mirtilli rossi (Feliciano *et al.*, 2012), ed alcuni degli ibridi in cui sono stati riscontrati i più alti contenuti di proantocianidine A-type (Bacò 1, Seyve Villard 23-399, Seibel 10878, Bertille Seyve 48-25). Le proantocianidine A-type rappresentano la maggioranza negli estratti di mirtilli, ma possono raggiungere quantitativi importanti (fino al 70% per i dimeri e fino al 50% per gli eptameri) anche nei vinaccioli.

In virtù delle loro proprietà antibatteriche, l'elevato contenuto di queste proantocianidine potrebbe ulteriormente accrescere il potenziale nutraceutico degli estratti di vinaccioli di queste varietà ibride.

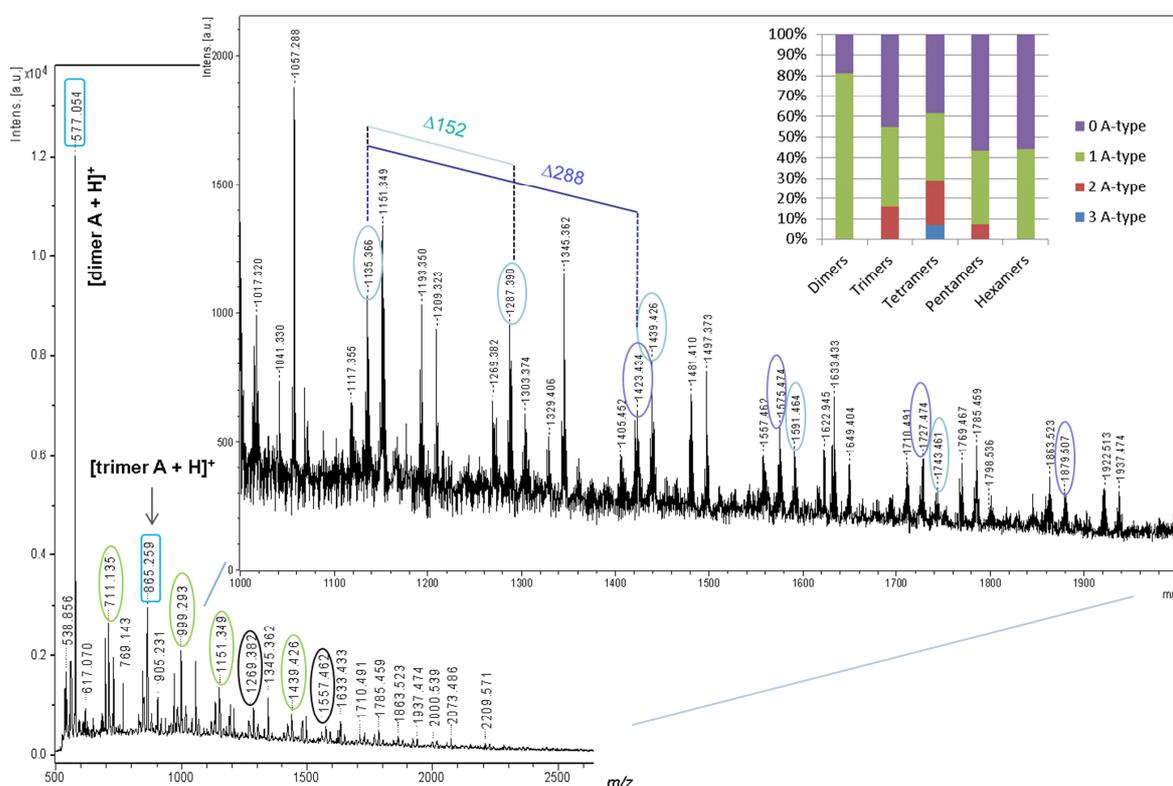


**Figura 4.28:** Confronto tra le percentuali di proantocianidine A-type e B-type nelle varietà *V. vinifera* (valori medi di Aramon, Chardonnay e Cabernet Sauvignon) (a); Bacò 1 (b); Seyve Villard 23399 (c); Seibel 10878 (d); Bertille Seyve 48-25 (e), e negli estratti di mirtilli rossi (f) (Feliciano *et al.*, 2012).

#### 4.4.2 Caratterizzazione delle varietà

In alcune varietà studiate è stato osservato che il profilo dello spettro MALDI viene interrotto dai segnali ad alta intensità a  $m/z$  559 (Aramon, Terzi 100-31, Incrocio Bruni 624, Cabernet Sauvignon) e  $m/z$  577 (Clinton, Couderc 25, Seibel 10878, Seyve Villard 23-369 e 23-399, Terzi 1086 e Terzi 9746). Nella maggior parte dei campioni studiati i segnali più abbondanti corrispondono al trimero digallato sodiato a  $m/z$  1193, mentre nei campioni Seibel 8357 e Seyve Villard 12-357 al dimero digallato sodiato a  $m/z$  905.

Lo spettro MALDI del Clinton mostra, oltre ad un elevato rumore di fondo, una notevole complessità rispetto agli altri campioni, con i segnali delle proantocianidine di tipo A spesso più alti di quelli di tipo B. Inoltre sono state osservate due serie di segnali separate da differenze di 288 Da che partono dagli ioni  $m/z$  559 e 711 ( $559+152$ ) e che includono i segnali rispettivamente a  $m/z$  847, 1135, 1423, 1711, 1999, 2287 e  $m/z$  999, 1287, 1863, 2151, 2439, 2727 (**Figura 4.29**).



**Figura 4.29:** Spettro MALDI-TOF della varietà Clinton con una sezione espansa. Sono evidenziate le serie di segnali sconosciuti separati da differenze di massa di 288 e 152 Da. La tabella in alto a destra riporta le percentuali di proantocianidine di tipo A relative ai vari oligomeri.

E' stato determinato anche l'indice di polifenoli totali degli estratti mediante il metodo di Folin-Ciocalteu (**Tabella 4.18**). Il contenuto di polifenoli totali varia da un minimo di 200 mg/kg uva per il Clinton ad un massimo di 2600 mg/kg uva per il Terzi 108-6, mentre nei campioni di *V. vinifera* varia tra i 1050 ed i 1670 mg/kg uva.

Varietà	M <sub>n</sub>	Indice di polifenoli totali mg (+)-catechina/kg uva
Bacò 1	1430	871
Bacò 30-12	1436	1999
Bertille Seyve 1808	1370	566
Bertille Seyve 4825	1443	326
Burdin 4077	1365	857
Clinton	1042	207
Couderc 25	1385	500
Galibert 238-35	1367	450
Seibel 8357	1236	571
Seibel 8745	1350	1642
Seibel 10878	1372	997
Seyve Villard 12-347	1367	563
Seyve Villard 12-390	1518	1101
Seyve Villard 23-369	1392	1522
Seyve Villard 23-399	1331	1104
Seyve Villard 29-522	1323	1066
Terzi 100-31	1277	1182
Terzi 1086	1138	2597
Terzi 9746	1329	738
Sconosciuto 1	1340	849
Sconosciuto 2	1482	566
Bacò 216	1405	881
Burdin 7419	1388	1386
GA 4812	1373	1149
Galibert 152-26	1441	1277
Galibert 255-43	1571	704
Galibert Treblanc	1444	644
GF 84219	1441	1569
Incrocio Bruni 624	1369	1099
Seibel 9110	1542	366
Seicel 10173	1357	1411
Seyve Villard 12-357	1377	614
Aramon	1356	1055
Chardonnay	1400	1311
Cabernet Sauvignon	1372	1667

**Tabella 4.18:** Indice di polifenoli totali e valori di M<sub>n</sub> determinati per le 32 varietà di ibridi e le tre di *V. vinifera* studiate.

Il peso molecolare medio numerico (M<sub>n</sub>) rappresenta la somma dei singoli pesi molecolari diviso il loro numero e per i segnali degli spettri MALDI è stato calcolato mediante la seguente formula:

$$M_n = \frac{\sum[(m/z)_i \times I_i]}{\sum I_i}$$

dove I<sub>i</sub> è l'intensità assoluta di ciascun tannino identificato.

Il valore medio di M<sub>n</sub> dei campioni studiati (**Tabella 4.18**) è risultato pari a 1375 ± 97, e per le tre varietà *V. vinifera* di 1376 ± 18. Questi risultati sono simili a quelli riportati in letteratura per le frazioni di tannini commerciali di uva e mele e mettono in evidenza che gli oligomeri sono responsabili per i principali picchi presenti negli spettri MALDI (Mané *et al.*, 2007a).

La varietà Clinton ha mostrato di avere il più basso valore  $M_n$  (1042) mentre Seyve Villard 12-390, Galibert 255-43 e Seibel 9110 avevano un valore  $M_n$  è più elevato rispetto ai campioni di *V. vinifera* (1518, 1571 e 1541 rispettivamente). Questi valori di  $M_n$  hanno dimostrato che le tre varietà presentano un più alto contenuto di tannini a più alto peso molecolare, perciò i loro estratti sono particolarmente interessanti per uso enologico. Molti studi hanno dimostrato una correlazione positiva tra la lunghezza di catena del tannino e le caratteristiche organolettiche: ad un più alto peso molecolare corrisponde una minore sensazione di amaro ed una maggiore astringenza (Vidal *et al.*, 2003). Nel campione Seyve Villard 12-390 è stato trovato anche un considerevole contenuto di polifenoli (1.1 g/kg uva).

E' stata inoltre eseguita l'analisi statistica per studiare le differenze tra i campioni ibridi e quelli di *V. vinifera*. Per motivi legati al rigore statistico, l'elevato numero di segnali riportato nella **Tabella 4.17** è stato ridotto a 109 sommando le intensità delle specie  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$  e  $[M+K]^+$  corrispondenti ad un singolo tannino e le intensità dei tannini con almeno un legame di tipo A. Il numero delle variabili è stato ulteriormente ridotto a 15 (**Tabella 4.19**) effettuando ANOVA ad una via ed il Test di Fisher.

Le variabili con un elevato valore di F ed un  $p$ -value  $<0.05$  sono state considerate significative per differenziare tra varietà ibride e *V. vinifera*. Come si può vedere dai risultati riportati in **Tabella 4.19** le variabili più significative nel distinguere i due tipi di campioni sono gli A-type dimero digallato  $[M+Na]^+$  o trimero  $[M+K]^+$  e dimero disidratato e il B- type decamero tetragallato  $[M+Na]^+$ .

<i>Variabile</i>	<i>m/z</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
[M+Na] <sup>+</sup> dimero A 2G o [M+K] <sup>+</sup> trimero A	903, 919	13.1	0.001
[M+Na] <sup>+</sup> decamero B 4G	3513	12.99	0.001
[M+Na] <sup>+</sup> dimero A - H <sub>2</sub> O	559	12.25	0.001
[M+Na] <sup>+</sup> trimero A 1G	1039, 1053, 1055	9.27	0.005
[M+Na] <sup>+</sup> esamero B 3G o [M+K] <sup>+</sup> eptamero B 1G	2209	9.01	0.005
[M+Na] <sup>+</sup> nonamero B 4G o [M+K] <sup>+</sup> decamero B 2G	3225	8.97	0.005
[M+Na] <sup>+</sup> undecamero B 2G	3497	7.34	0.011
[M+Na] <sup>+</sup> tetramero A	1149, 1151, 1153, 1173, 1175	7.16	0.012
[M+Na] <sup>+</sup> trimero A	863, 865, 887	6.33	0.017
[M+Na] <sup>+</sup> tetramero B 3G o [M+K] <sup>+</sup> pentamero B 1G	1633, 1649	5.93	0.02
[M+Na] <sup>+</sup> trimero A 2G o [M+K] <sup>+</sup> tetramero A	1189, 1191, 1205, 1207	5.48	0.025
[M+Na] <sup>+</sup> pentamero B 3G o [M+K] <sup>+</sup> esamero B 1G	1921, 1937	5.01	0.032
[M+Na] <sup>+</sup> pentamero B 4G o [M+K] <sup>+</sup> esamero B 2G	2073	4.81	0.035
[M+K] <sup>+</sup> tetramero B 4G	1801	4.26	0.047
[M+Na] <sup>+</sup> tetramero A 4G o [M+K] <sup>+</sup> pentamero 2G	1781, 1783	4.19	0.049

**Tabella 4.19:** Variabili più significative per la differenziazione tra campioni di uve ibride e *V. vinifera* selezionate dall'analisi dell'ANOVA. *m/z*, masse delle specie attribuite a ciascun tannino. *F*, *F* statistico di Fisher; *P*, *p*-value; *G*: gallato.

#### 4.5 L'approccio di “suspect screening analysis” per lo studio del metaboloma dell'uva

L'approccio utilizzato in questo lavoro per lo studio del metaboloma dell'uva, definito di ‘*suspect screening analysis*’, è a metà strada tra la metabolomica target ed untarget. Si basa sull'utilizzo di informazioni specifiche sui composti disponibili in letteratura, come la formula molecolare e la struttura, per l'identificazione dei composti determinati dagli spettri di massa acquisiti ad alta risoluzione (Krauss *et al.*, 2010; Flamini *et al.*, 2013).

La spettrometria di massa ad alta risoluzione permette di determinare la formula molecolare dei composti dai dati spettrali mediante l'utilizzo di specifici algoritmi di processamento. La maggior parte di questi algoritmi identificano i composti sulla base del valore della massa monoisotopica, calcolano il numero totale di possibili formule molecolari per un particolare ione ed escludono le formule che violano particolari regole chimiche (ad es. rapporto atomi di carbonio/idrogeno, regola dell'azoto, ecc.). I software sviluppati dagli stessi costruttori dello strumento possono applicare ulteriori vincoli per ridurre ulteriormente la lista dei possibili composti candidati, incorporando nei calcoli informazioni spettrali come le abbondanze del pattern isotopico.

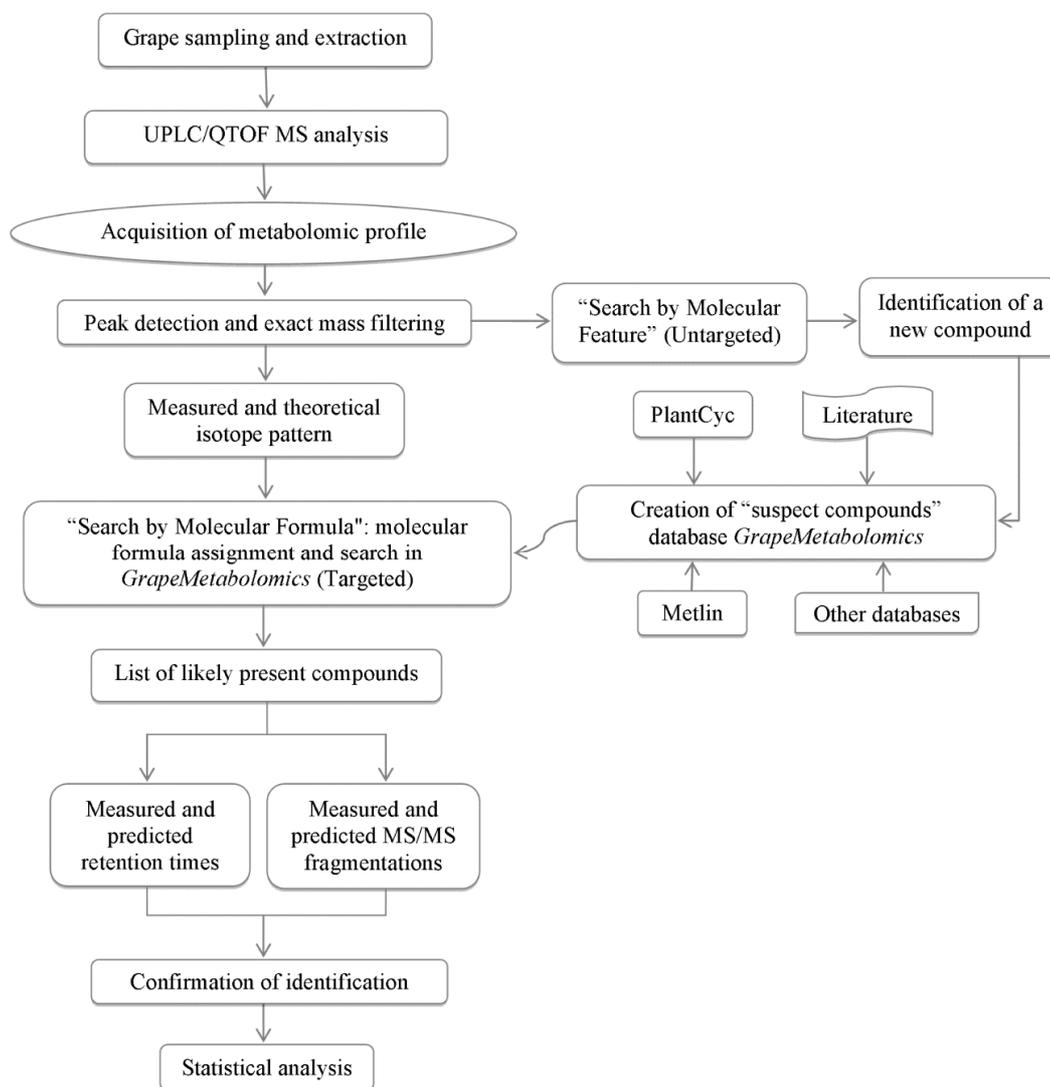
A ciascun composto è assegnato un punteggio di qualità, o “probability score”, che rappresenta quanto i rapporti delle abbondanze isotopiche della formula molecolare candidata si avvicinano a quelli ottenuti sperimentalmente: più alto sarà lo score (score massimo 100%) maggiore sarà la probabilità che la formula sia corretta. La lista risultante delle masse cationiche e anioniche sperimentali viene quindi cercata nei database contenenti le masse esatte teoriche dei composti ed utilizzando nella ricerca parametri fisici ortogonali e complementari alla massa, come ad esempio il tempo di ritenzione (Sana *et al.*, 2008).

I database in cui è effettuata la ricerca possono essere commerciali o pubblici e disponibili sul web, più o meno specifici per classi di composti o tipologia di matrice (animali, piante). Alcuni database contenenti metaboliti delle piante sono PlantCyc, Flavonoid Viewer, Lipid Maps, PubChem, NIST Chem WebBook, METLIN. Purtroppo nessuno dei database disponibili è specifico per i metaboliti dell'uva, perciò è stata necessaria la costruzione di un database denominato *GrapeMetabolomics* contenente le formule molecolari di composti d'interesse enologico presenti negli estratti naturali trovati in letteratura e in altre banche dati elettroniche. Attualmente *GrapeMetabolomics* contiene circa un migliaio di metaboliti putativi di uva e del vino, ed è in continua espansione poiché aumentando il numero dei campioni studiati il database può essere ulteriormente incrementato.

Nel workflow in **Figura 4.30** è riportato il procedimento di *suspect screening analysis* utilizzato per lo studio degli estratti d'uva.

Dopo la preparazione degli estratti e l'acquisizione dello spettro di massa, vengono utilizzati due diversi algoritmi per assegnare ai segnali dello spettro di massa la formula molecolare putativa.

Il primo algoritmo (Find Compounds by Formula) effettua la ricerca target dei composti nel database *GrapeMetabolomics*, e dalla lista dei composti ottenuti si può procedere alla conferma delle identità dei metaboliti sulla base dei tempi di ritenzione in colonna e degli spettri di frammentazione MS/MS.

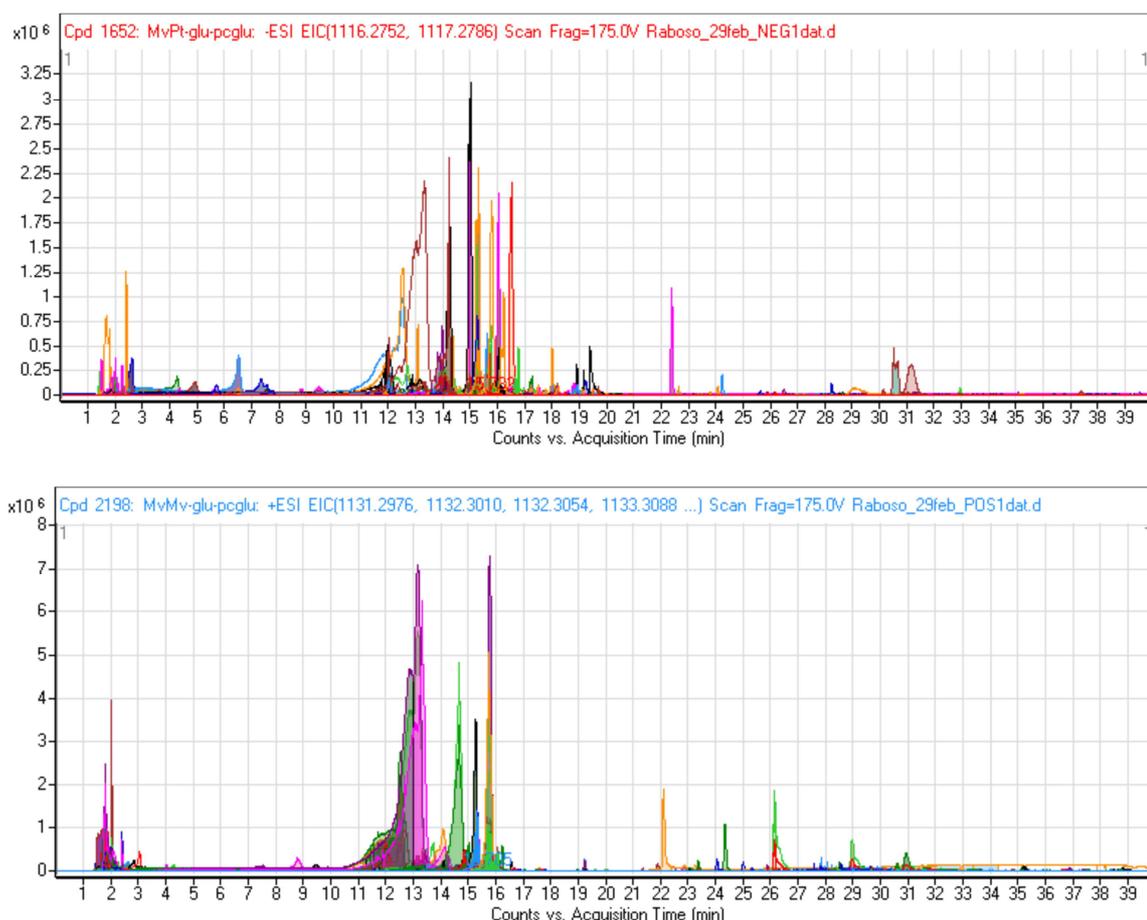


**Figura 4.30:** Schema del workflow utilizzato nell'analisi metabolomica mediante screening dei composti sospetti (Flamini *et al.*, 2013).

Il secondo algoritmo (Find Compounds by Molecular Feature), che a sua volta contiene i due algoritmi Molecular Feature Extraction (MFE) e Molecular Formula Generator (MFG), fornisce un elenco di formule molecolari che non sono presenti in *GrapeMetabolomics* (ricerca untarget) e che possono essere ricercate in altri database. Dopo la rimozione del rumore di fondo dal cromatogramma causato dalle impurità nella matrice del campione, l'algoritmo MFE raggruppa ioni aventi valori di  $m/z$  correlati (es. picchi con la stessa distribuzione isotopica o differenti addotti o stati di carica della stessa molecola neutra) in uno o più composti (features). Quindi l'algoritmo MFG sfrutta sia la

precisione di massa che l'informazione spettrale di massa per applicare vincoli aggiuntivi alla lista delle formule molecolari candidate. Questo risultato è ottenuto incorporando nei calcoli la massa monoisotopica, le abbondanze isotopiche e la distanza tra i picchi isotopici. Se la ricerca della formula molecolare risultante effettuata in altri database permette l'identificazione di un nuovo composto, compatibile con la matrice e con uno score sufficientemente alto (maggiore del 99%), questo viene inserito in *GrapeMetabolomics* insieme al suo tempo di ritenzione in colonna cromatografica.

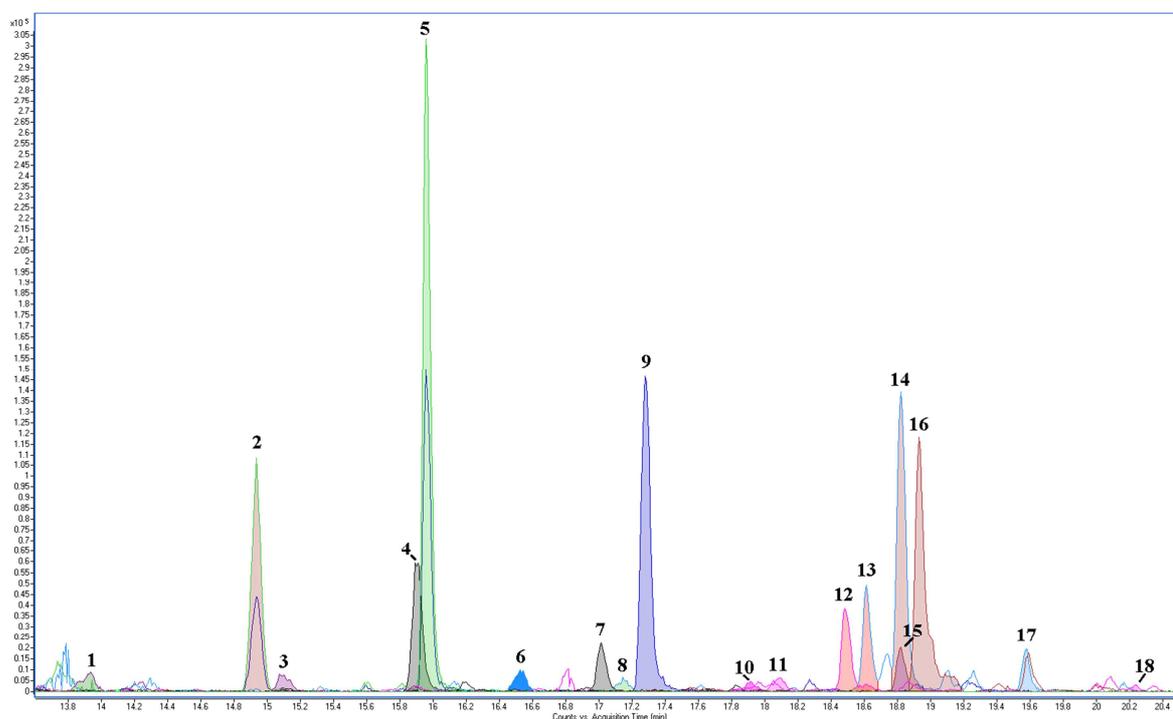
Effettuando due analisi in modalità positiva e negativa, ed utilizzando l'algoritmo "Find Compounds by Formula" e la ricerca in *GrapeMetabolomics*, a seconda della varietà è possibile identificare negli estratti d'uva le formule molecolari di 320-450 composti con uno score superiore al 60% (calcolato sulla massa accurata ed il pattern isotopico). I composti identificati comprendono soprattutto polifenoli, come antociani, flavoni e flavanoni, flavanoli e proantocianidine, stilbeni, acidi fenolici, precursori aromatici glicosidati, ed altri composti (**Figura 4.31**).



**Figura 4.31:** Extract-Ion Chromatogram (EIC) dei 460 composti determinati nell'estratto di Raboso Piave in modalità di ionizzazione negativa (sopra) e positiva (sotto).

Questo approccio può essere tuttavia efficacemente applicato allo studio delle singole classi di metaboliti. Infatti i composti chimici di interesse, una volta confermati dall'analisi MS/MS e aggiunto il tempo di ritenzione al database *GrapeMetabolomics*,

presentano uno score identificativo elevato e possono essere quantificati mediante l'utilizzo di uno standard. In **Figura 4.32** è rappresentato un esempio di questo metodo per la determinazione degli stilbeni in un estratto di Raboso Piave (Flamini *et al.*, 2013).



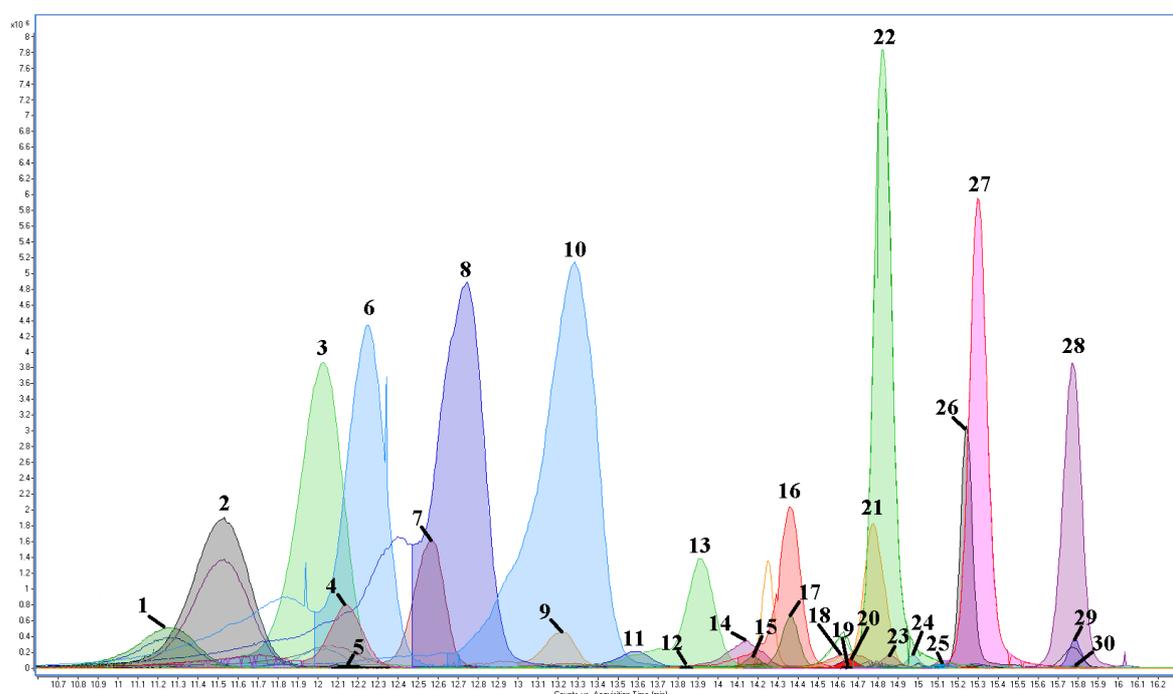
**Figura 4.32:** Extract-Ion Chromatogram (EC) dei derivati stilbenici nell'estratto di Raboso Piave (Flamini *et al.*, 2013).

Utilizzando l'approccio di *suspect screening analysis* sono stati studiati gli antociani negli estratti della varietà Clinton, e i flavonoli nelle varietà Seibel 19881 e Seyve Villard 12-347, raccolte in due annate consecutive.

#### 4.5.1 Metabolomica del Clinton: studio degli antociani

La ricerca target in *GrapeMetabolomics* utilizzando l'approccio di *suspect screening analysis* ha permesso di identificare negli estratti della varietà Clinton circa 470 composti, di cui 30 antociani. Questi ultimi, rilevati in modalità ionica positiva, presentano in generale score elevati, superiori all'80% (**Figura 4.33** e **Tabella 4.20**). Gli score più bassi sono stati determinati per composti meno abbondanti, in particolare per i derivati della pelargonidina e per i ferulati.

Gli antociani identificati sono mono- e di-glucosidi acilati delle 6 forme antocianiche principali (delfinidina, cianidina, petunidina, malvidina, peonidina e pelargonidina), similmente ai risultati ottenuti in LC/MS precursor-ion analysis utilizzando il triplo quadrupolo. Le identificazioni sono state confermate dall'analisi MS/MS e dalla misura delle masse accurate dei frammenti formati.



**Figura 4.33:** EIC degli antociani determinati nel Clinton. I numeri dei picchi corrispondono a quelli riportati nella seguente Tabella 4.20.

	<i>Antociani</i>	<i>R.T.</i>	<i>Score %</i>	<i>Massa [M]<sup>+</sup></i>	<i>Formula</i>	<i>ppm</i>
1	Cianidina-3-5-O-diglucoside	11.24	97.57	611.1607	C27 H31 O16	1.1
2	Petunidina-3-5-O-diglucoside	11.52	99.04	641.1712	C28 H33 O17	1.0
3	Delfinidina-3-O-glucoside	12.03	92.68	465.1028	C21 H21 O12	4.0
4	Peonidina-3-5-O-diglucoside	12.14	97.49	625.1763	C28 H33 O16	1.1
5	Delfinidina-3-O-(6-O-acetil)-5-O-digluc.	12.16	79.43	669.1661	C29 H33 O18	-0.1
6	Malvidina-3-5-O-diglucoside	12.24	98.27	655.1869	C29 H35 O17	1.2
7	Cianidina-3-O-glucoside	12.57	87.47	449.1078	C21 H21 O11	1.2
8	Petunidina-3-O-glucoside	12.74	93.80	479.1184	C22 H23 O12	1.7
9	Peonidina-3-O-glucoside	13.12	98.05	463.124	C22 H23 O11	-2.05
10	Malvidina-3-O-glucoside	13.27	97.05	493.1341	C23 H25 O12	1.6
11	Delfinidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	13.59	98.86	507.1133	C23 H23 O13	0.8
12	Petunidina-3-O-(6-O-caffeoil)-5-O-digluc.	13.87	78.49	803.2029	C37 H39 O20	-2.2
13	Delfinidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)-5-O-digluc.	13.91	98.50	773.1924	C36 H37 O19	1.1
14	Petunidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	14.14	91.30	521.1290	C24 H25 O13	1.1
15	Delfinidina-3-O-(6-O-caffeoil)glucoside	14.18	98.32	627.1344	C30 H27 O15	1.3
16	Petunidina -3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)-5-O-digluc.	14.36	98.73	787.2080	C37 H39 O19	1.1
17	Cianidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)-5-O-digluc.	14.36	97.90	757.1974	C36 H37 O18	1.0
18	Malvidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)-5-O-digluc.	14.60	97.74	801.2237	C38 H41 O19	-0.8
19	Malvidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	14.64	87.87	535.1446	C25 H27 O13	1.8
20	Peonidina-3-O-(6-O-acetil)glucoside	14.65	86.47	505.1341	C24 H25 O12	-1.6
21	Petunidina-3-O-(6-O-caffeoil)glucoside	14.65	96.46	641.1501	C31 H29 O15	1.8
22	Delfinidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -coumaril)glucoside	14.82	94.63	611.1395	C30 H27 O14	2.0
23	Peonidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)-5-O-digluc.	14.85	86.75	771.2131	C37 H39 O18	-0.8
24	Delfinidina	14.97	99.04	303.0499	C15 H11 O7	1.32
25	Malvidina-3-O-(6-O-caffeoil)glucoside	15.14	91.41	655.1663	C32 H31 O15	-3.21
26	Cianidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)glucoside	15.24	95.34	595.1446	C30 H27 O13	1.0
27	Petunidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)glucoside	15.30	99.29	625.1552	C31 H29 O14	1.1
28	Malvidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)glucoside	15.77	88.45	639.1708	C32 H31 O14	1.3
29	Peonidina-3-O-(6-O- <i>p</i> -cumaril)glucoside	15.78	91.52	609.1603	C31 H29 O13	0.2
30	Malvidina-3-O-(6-O-ferulil)glucoside	15.85	79.72	669.1814	C33 H33 O15	2.4

**Tabella 4.20:** Antociani identificati nelle bucce della varietà ibrida Clinton. Sono riportati: il tempo di ritenzione espresso in minuti (RT), il punteggio identificativo percentuale (score), le masse teoriche [M]<sup>+</sup>, la formula molecolare e lo scostamento tra la massa teorica calcolata e la massa misurata sperimentalmente (ppm).

## 4.5.2 Metabolomica del Seibel 19881 e del Seyve Villard 12-347: studio dei flavonoli

### 4.5.2.1 Identificazione dei flavonoli

Le formule molecolari dei flavonoli sono state determinate per mezzo di una ricerca target nel database *GrapeMetabolomics* sulla base dei valori di massa accurata e del pattern isotopico estrapolati dal picco cromatografico. Operando in modalità di ionizzazione negativa, sono stati identificati gli ioni  $[M-H]^-$  di 27 flavonoli con uno score identificativo superiore al 95% (**Tabella 4.21**).

Nel caso di due diidroflavonoli (diidromiricetina e diidroquercetina) il residuo glicosidico è stato genericamente indicato come esoside, poichè la spettrometria di massa non differenzia composti isomeri. Inoltre tutte le strutture identificate sono state confermate dall'analisi MS/MS.

Flavonoli	RT (min)	$[M-H]^-$ teorico	$[M-H]^-$ sperimentale	Score %	ppm
Miricetina-3-O-rutinoside	13.89	625.1410	625.1409	99.1	-0.2
Siringetina-O-di-esoside	13.96	669.1672	669.1673	99.0	0.2
Miricetina-O-di-esoside	14.11	641.1359	641.1359	99.7	-0.1
Miricetina-3-O-glucuronide	14.22	493.0624	493.0626	98.8	0.4
Miricetina-3-O-glucoside	14.27	479.0831	479.0831	95.5	-0.1
Diidromiricetina-3-O-esoside	14.35	481.0988	481.0988	99.5	-0.1
Diidroquercetina-3-O-esoside	14.59	465.1038	465.1039	98.4	0.1
Rutina	14.65	609.1461	609.1463	98.7	0.3
Quercetina-3-O-glucuronide	14.97	477.0675	477.0682	95.2	1.5
Laricitrina-3-O-glucoside	15.04	493.0988	493.0989	99.0	0.2
Quercetina-3-O-glucoside	15.02	463.0882	463.0886	97.7	0.8
Diidroquercetina-3-O-ramnoside	15.29	449.1089	449.1091	97.8	0.5
Campferolo-3-O-rutinoside	15.22	593.1512	593.1506	98.1	-1.1
Quercetina-O-pentoside	15.34	433.0776	433.0779	99.2	0.7
Campferolo-3-O-galattoside	15.43	447.0933	447.0936	96.1	0.7
Campferolo-3-O-glucoside	15.62	447.0933	447.0939	97.0	1.3
Siringetina-3-O-glucoside	15.70	507.1144	507.1144	98.4	0.0
Isoramnetina-3-O-glucoside	15.74	477.1038	477.1042	99.2	0.8
Diidrocampferolo-3-O-ramnoside	15.91	433.1140	433.1141	99.4	0.2
Isoramnetina-3-O-glucuronide	15.92	491.0831	491.0833	98.4	0.4
Miricetina-3-O-ramnoside	16.23	463.0882	463.0883	99.1	0.1
Miricetina	16.52	317.0303	317.0303	99.1	0.0
Quercetina	18.01	301.0354	301.0354	99.9	0.1
Campferolo	19.45	285.0405	285.0405	99.8	0.0
Siringetina	19.51	345.0616	345.0616	99.3	0.1
Isoramnetina	19.69	315.0510	315.0510	99.7	0.1
Metil naringenina	22.38	285.0768	285.0768	99.3	-0.2

**Tabella 4.21:** Flavonoli identificati nelle bucce delle varietà ibride Seibel 19881 e Seyve Villard 12-347. Sono riportati: il tempo di ritenzione espresso in minuti (RT), le masse teoriche e sperimentali  $[M-H]^-$ , il

punteggio identificativo percentuale e lo scostamento tra la massa teorica calcolata e la massa misurata sperimentalmente (ppm).

La conferma identificativa dei composti flavonolici è stata eseguita tramite esperimenti di frammentazione delle molecole (MS/MS) condotti sul campione di estratto del Seibel 19881 vendemmiato nel 2011. I risultati sono stati suddivisi per classi di composti: glucosidi e galattosidi (**Tabella 4.22**), glucuronidi (**Tabella 4.23**), diidroflavonoli (**Tabella 4.24**) e diglucosidi (**Tabella 4.25**). Nelle tabelle sono indicati gli scostamenti (espressi in ppm) tra massa teorica e massa sperimentale dello ione.

In generale si è riscontrato che:

- nell'isoramnetina-3-O-glucoside e nella siringetina-3-O-glucoside è assente il frammento  $m/z$  151.0037, presente invece nel caso del campferolo-3-O-glucoside, della quercetina-3-O-glucoside e della miricetina-3-O-glucoside;
- nei glucuronidi si formano solo ioni aglicone, in generale questi si frammentano meno rispetto ai glucosidi;
- la frammentazione del campferolo-3-O-galattoside è minore rispetto al glucoside;
- nella frammentazione dei diglucosidi si riscontra la perdita di entrambe le molecole di zucchero legate al flavonolo.

**Miricetina-3-O-glucoside**, RT: 14.27 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C21 H20 O13	479.0831	479.0837	1.3	Ione precursore
C21 H18 O12	461.0725	461.0741	3.5	Flavonolo - H <sub>2</sub> O
C17 H12 O9	359.0409	359.0398	-3.1	Aglicone + frammento zucchero
C15 H9 O8	316.0225	316.0228	0.9	Radicale aglicone
C7 H4 O4	151.0037	151.0032	-3.3	Frammento flavonolo

**Quercetina-3-O-glucoside**, RT: 15.02 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C21 H20 O12	463.0882	463.0881	-0.2	Ione precursore
C17 H12 O8	343.0459	343.0455	-1.2	Aglicone + frammento zucchero
C15 H10 O7	301.0354	301.0348	-2.0	Aglicone
C15 H19 O7	300.0276	300.0278	0.7	Radicale aglicone
C14 H8 O6	271.0248	271.0245	-1.1	Aglicone - H <sub>2</sub> CO
C14 H8 O5	255.0299	255.0295	-1.6	Aglicone - CO - H <sub>2</sub> O
C7 H4 O4	151.0037	151.0033	-2.6	Frammento flavonolo

**Laricetina-3-O-glucoside**, RT: 15.04 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C22 H22 O13	493.0988	493.0993	1.0	Ione precursore
C16 H12 O8	331.0459	331.045	-2.7	Aglicone
C16 H11 O8	330.0381	330.0376	-1.5	Radicale aglicone
C15 H8 O8	315.0146	315.0146	0.0	Radicale aglicone - CH <sub>3</sub>

**Campferolo-3-O-glucoside**, RT: 15.62 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C21 H20 O11	447.0933	447.0937	0.9	Ione precursore
C18 H14 O8	357.0616	357.0621	1.4	Aglicone + frammento zucchero
C17 H12 O7	327.051	327.0497	-4.0	Aglicone + frammento zucchero
C16 H11 O7	284.0326	284.0333	2.5	Radicale aglicone
C14 H8 O5	255.0299	255.0298	-0.4	Aglicone - 2H - CO
C13 H8 O4	227.035	227.0351	0.4	Aglicone - 2H - 2CO
C7 H4 O4	151.0037	151.0041	2.6	Frammento flavonolo

**Siringetina-3-O-glucoside**, RT: 15.70 min

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C23 H24 O13	507.1144	507.1153	1.8	Ione precursore
C19 H16 O9	387.0722	387.0723	0.3	Aglicone + frammento zucchero
C17 H13 O8	344.0538	344.0543	1.5	Radicale aglicone
C16 H10 O8	329.0303	329.03	-0.9	Radicale aglicone - CH <sub>3</sub>
C15 H10 O7	301.0354	301.036	2.0	Frammento aglicone - CO - CH <sub>3</sub>
C7 H4 O4	151.0037	151.0033	-2.6	Frammento flavonolo

**Isoramnetina-3-O-glucoside**, RT: 15.74 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C22 H22 O12	477.1038	477.1048	2.1	Ione precursore
C19 H16 O9	387.0722	387.0717	1.3	Aglicone + frammento zucchero
C18 H14 O8	357.0616	357.0608	2.2	Aglicone + frammento zucchero
C16 H11 O7	314.0432	314.0438	1.9	Radicale aglicone
C15 H8 O7	299.0197	299.0192	-1.7	Radicale aglicone - CH <sub>3</sub>
C14 H8 O6	271.0248	271.025	-0.7	Radicale aglicone - CH <sub>3</sub> - CO
C13 H8 O5	243.0299	243.0296	1.2	Radicale aglicone - CH <sub>3</sub> - 2CO

**Campferolo-3-O-galattoside**, RT: 15.43 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C21 H20 O11	447.0933	447.0927	-1.3	Ione precursore
C17 H12 O7	327.051	327.0509	-0.3	Aglicone + frammento zucchero
C15 H9 O6	284.0326	284.0319	-2.5	Radicale aglicone
C14 H8 O5	255.0299	255.0293	-2.4	Aglicone - 2H - CO

**Tabella 4.22:** Frammentazioni dei flavonoli glucosidi e galattosidi.

**Miricetina-3-O-glucuronide**, RT: 14.22 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C21 H18 O14	493.0624	493.062	-0.8	Ione precursore
C16 H12 O8	331.0459	331.0453	-1.8	Aglicone + frammento zucchero
C15 H10 O8	317.0303	317.03	-0.9	Aglicone

**Quercetina-3-O-glucuronide**, RT: 14.97 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C21 H18 O13	477.0675	477.068	1.0	Ione precursore
C15 H10 O7	301.0354	301.0358	1.3	Aglicone
C15 H8 O6	283.0248	283.0242	-2.1	Aglicone - H <sub>2</sub> O
C14 H8 O5	255.0299	255.0306	2.7	Aglicone - CO - H <sub>2</sub> O
C7 H4 O4	151.0037	151.0034	-2.0	Frammentazione flavonolo

**Isoramnetina-3-O-glucuronide**, RT: 15.92 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C22 H20 O13	491.0831	491.0837	1.2	Ione precursore
C16 H12 O7	315.051	315.0506	-1.3	Aglicone
C15 H9 O7	300.0276	300.0277	0.3	Aglicone - CH <sub>3</sub>

**Tabella 4.23:** Frammentazioni dei flavonoli glucuronidi.

**Diidroquercetina-3-O-esoside, RT: 14.59 min.**

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C21 H22 O12	465.1038	465.1038	0.0	Ione precursore
C14 H18 O8	313.0929	313.0937	2.6	Aglicone + frammento zucchero
C15 H12 O7	303.051	303.0516	2.0	Aglicone
C15 H10 O7	301.0354	301.0354	0.0	Aglicone - 2H
C7 H4 O4	151.0037	151.0039	1.3	Frammento aglicone

**Diidroquercetina-3-O-ramnoside, RT: 15.29 min.**

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C21 H22 O11	449.1089	449.108	-2.0	Ione precursore
C15 H11 O7	303.0519	303.0519	0.0	Aglicone
C15 H10 O7	302.0433	302.0433	0.0	Radicale aglicone
C15 H12 O6	285.0405	285.0404	-0.4	Aglicone - OH
C7 H4 O4	151.0037	151.0034	-2.0	Frammentazione flavonolo

**Diidrocampferolo-3-O-ramnoside, RT: 15.91 min.**

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C21 H22 O10	433.114	433.1138	-0.5	Ione precursore
C15 H12 O6	287.0561	287.0558	-1.0	Aglicone
C15 H11 O6	286.0483	286.0489	2.1	Radicale aglicone
C15 H10 O5	269.0455	269.0456	0.4	Frammento aglicone
C14 H12 O5	259.0612	259.0614	0.8	Aglicone - CO
C8 H5 O5	180.0064	180.006	-2.2	Frammento radicale aglicone
C7 H5 O4	152.0115	152.0118	2.0	Frammento radicale aglicone - CO

**Tabella 4.24:** Frammentazioni dei diidroflavonoli.

**Siringetina-O-di-esoside**, RT: 13.96 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C29 H34 O18	669.1672	669.1669	-0.4	Ione precursore
C23 H24 O13	507.1144	507.1141	-0.6	Monoglucoside
C17 H14 O8	345.0616	345.0615	-0.3	Aglicone

**Miricetina-O-di-esoside**, RT: 14.11 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C27 H30 O18	641.1359	641.1351	-1.2	Ione precursore
C21 H20 O13	479.0831	479.0828	-0.6	Monoglucoside
C15 H10 O8	317.0303	317.0294	-2.8	Aglicone

**Rutina**, RT: 14.65 min.

Formula bruta (M)	[M-H] <sup>-</sup> teorica	[M-H] <sup>-</sup> sperimentale	ppm	Frammenti
C27 H30 O16	609.1461	609.1465	0.7	Ione precursore
C15 H10 O7	301.0354	301.0348	-2.0	Aglicone
C15 H9 O7	300.0276	300.0274	-0.7	Radicale aglicone
C17 H12 O8	343.0459	343.0454	-1.5	Aglicone + frammento zucchero

**Tabella 4.25:** Frammentazioni dei flavonoli diglucosidi.

#### 4.5.2.2 I flavonoli del Seibel 19881

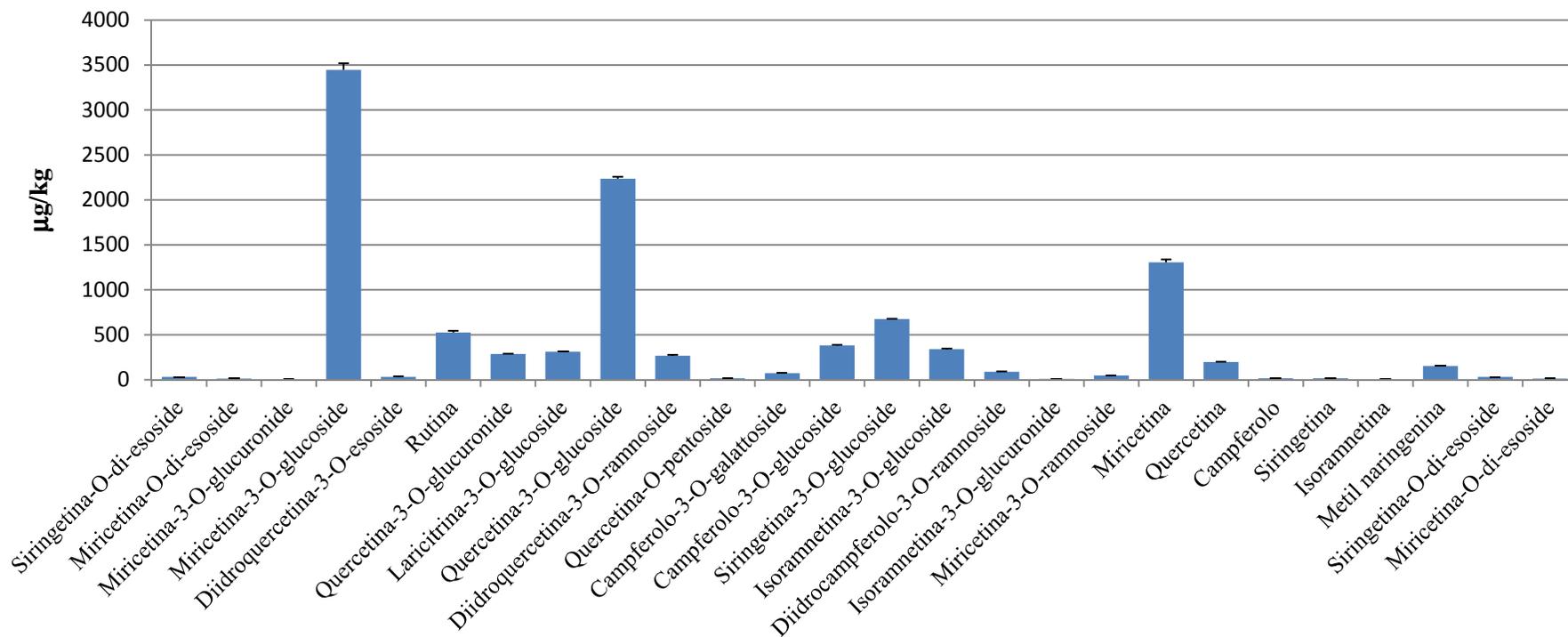
I flavonoli determinati nelle uve di Seibel 19881 nelle annate 2011 e 2012 sono riportati in **Tabella 4.26**. Le concentrazioni sono state espresse in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  uva di standard interno 4',5,7-triidrossiflavanone.

Flavonoli	Annata 2011	Annata 2012	Media
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ uva	$\mu\text{g}/\text{kg}$ uva	$\mu\text{g}/\text{kg}$ uva
Siringetina-O-di-esoside	20.1 $\pm$ 0.4	42.2 $\pm$ 1.6	31.1 $\pm$ 1.2
Miricetina-O-di-esoside	14.4 $\pm$ 0.3	10.3 $\pm$ 0.4	12.4 $\pm$ 0.5
Miricetina-3-O-glucuronide	4.1 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.2
Miricetina-3-O-glucoside	3810.8 $\pm$ 59.9	3076.4 $\pm$ 26.9	3443.6 $\pm$ 73.4
Diidroquercetina-3-O-esoside	35.1 $\pm$ 5.7	30.7 $\pm$ 1.9	32.9 $\pm$ 6.7
Rutina	614.7 $\pm$ 19.5	433.7 $\pm$ 1.5	524.2 $\pm$ 20.3
Quercetina-3-O-glucuronide	292.9 $\pm$ 0.7	280.0 $\pm$ 3.5	286.5 $\pm$ 2.5
Laricitrina-3-O-glucoside	252.2 $\pm$ 0.4	374.0 $\pm$ 1.2	313.1 $\pm$ 1.0
Quercetina-3-O-glucoside	2335.7 $\pm$ 9.9	2132.0 $\pm$ 27.5	2233.9 $\pm$ 23.7
Diidroquercetina-3-O-ramnoside	335.1 $\pm$ 9.6	199.5 $\pm$ 0.1	267.3 $\pm$ 9.7
Quercetina-O-pentoside	16.1 $\pm$ 0.9	14.2 $\pm$ 0.0	15.2 $\pm$ 0.9
Campferolo-3-O-galattoside	82.4 $\pm$ 0.1	66.5 $\pm$ 0.4	74.4 $\pm$ 0.3
Campferolo-3-O-glucoside	444.1 $\pm$ 3.1	323.2 $\pm$ 3.8	383.7 $\pm$ 5.0
Siringetina-3-O-glucoside	517.3 $\pm$ 2.7	835.6 $\pm$ 1.9	676.4 $\pm$ 3.7
Isoramnetina-3-O-glucoside	252.3 $\pm$ 7.7	427.0 $\pm$ 2.3	339.7 $\pm$ 8.9
Diidrocampferolo-3-O-ramnoside	19.6 $\pm$ 0.9	158.8 $\pm$ 3.1	89.2 $\pm$ 2.5
Isoramnetina-3-O-glucuronide	11.0 $\pm$ 0.9	8.4 $\pm$ 1.0	9.7 $\pm$ 1.4
Miricetina-3-O-ramnoside	53.6 $\pm$ 0.2	44.1 $\pm$ 1.2	48.8 $\pm$ 0.8
Miricetina	1632.3 $\pm$ 29.1	981.6 $\pm$ 1.3	1306.9 $\pm$ 29.8
Quercetina	212.8 $\pm$ 1.5	184.6 $\pm$ 2.8	198.7 $\pm$ 2.9
Campferolo	19.8 $\pm$ 0.3	10.6 $\pm$ 0.4	15.2 $\pm$ 0.5
Siringetina	25.3 $\pm$ 0.1	10.0 $\pm$ 0.1	17.7 $\pm$ 0.2
Isoramnetina	4.2 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.2
Metil naringenina	157.7 $\pm$ 0.4	147.8 $\pm$ 2.0	152.8 $\pm$ 1.4
Siringetina-O-di-esoside	20.1 $\pm$ 0.4	42.2 $\pm$ 1.6	31.1 $\pm$ 1.2
Miricetina-O-di-esoside	14.4 $\pm$ 0.3	10.3 $\pm$ 0.4	12.4 $\pm$ 0.5
<b>FLAVONOLI TOTALI</b>	<b>11163.6 <math>\pm</math> 6.4</b>	<b>9800.0 <math>\pm</math> 3.5</b>	<b>10481.8 <math>\pm</math> 8.2</b>

**Tabella 4.26:** Concentrazione dei flavonoli nel Seibel 19881. Sono riportati i valori medi delle due repliche nelle due annate, espressi in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  uva di standard interno con la semidispersione dalla media.

In generale nel Seibel 19881 è stata riscontrata un'elevata concentrazione di flavonoli totali. I composti più caratteristici di questo vitigno sono la miricetina-3-O-glucoside, maggiormente presente in entrambe le annate, la quercetina-3-O-glucoside e la miricetina. Anche siringetina-3-O-glucoside e rutina sono state riscontrate a livelli significativi.

In **Figura 4.34** sono riportate le medie delle due annate con relativa semidispersione dalla media, espressi in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  uva di standard interno.



**Figura 4.34:** Valori medi delle due annate per la varietà Seibel 19881. Le concentrazioni medie, riportate con la relativa semidispersione dalla media, sono espresse in µg/kg uva di 4',5,7-triidrossiflavanone.

#### 4.5.2.3 I flavonoli del Seyve Villard 12-347

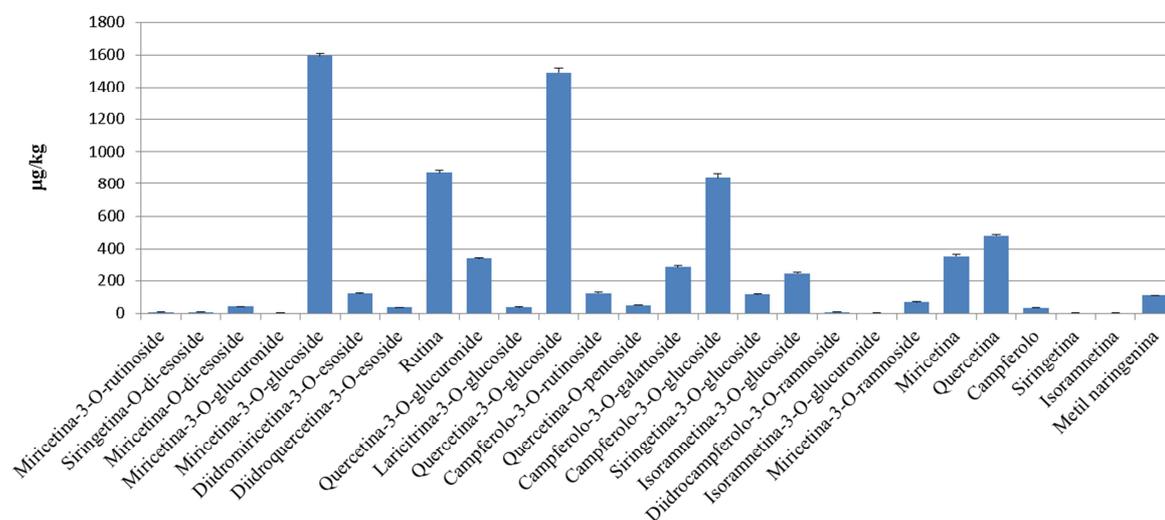
I flavonoli determinati nelle uve di Seyve Villard 12-347 nelle annate 2011 e 2012 sono riportati in **Tabella 4.27**. Le concentrazioni sono state espresse in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  uva di standard interno 4',5,7-triidrossiflavanone.

Flavonoli	Annata 2011	Annata 2012	Media
	$\mu\text{g}/\text{kg}$ uva	$\mu\text{g}/\text{kg}$ uva	$\mu\text{g}/\text{kg}$ uva
Miricetina-3-O-rutinoside	8.0 $\pm$ 0.1	10.2 $\pm$ 0.2	9.1 $\pm$ 0.2
Siringetina-O-di-esoside	8.3 $\pm$ 0.1	9.1 $\pm$ 0.2	8.7 $\pm$ 0.2
Miricetina-O-di-esoside	26.1 $\pm$ 0.6	59.2 $\pm$ 1.2	42.7 $\pm$ 1.2
Miricetina-3-O-glucuronide	2.6 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.2	3.0 $\pm$ 0.2
Miricetina-3-O-glucoside	1138.1 $\pm$ 8.1	2050.1 $\pm$ 12.5	1594.1 $\pm$ 14.4
Diidromiricetina-3-O-esoside	40.2 $\pm$ 0.1	205.5 $\pm$ 3.8	122.8 $\pm$ 2
Diidroquercetina-3-O-esoside	20.1 $\pm$ 0.1	55.9 $\pm$ 0.3	38.0 $\pm$ 0.3
Rutina	619.8 $\pm$ 3.3	1124.2 $\pm$ 20.5	872.0 $\pm$ 13.6
Quercetina-3-O-glucuronide	201.9 $\pm$ 1.2	483.2 $\pm$ 3.7	342.6 $\pm$ 3.1
Laricitrina-3-O-glucoside	35.6 $\pm$ 0.2	43.8 $\pm$ 0.3	39.7 $\pm$ 0.4
Quercetina-3-O-glucoside	1254.5 $\pm$ 3.8	1732.4 $\pm$ 50.5	1493.5 $\pm$ 29.1
Campferolo-3-O-rutinoside	96.6 $\pm$ 1.0	154.1 $\pm$ 5.7	125.4 $\pm$ 3.9
Quercetina-O-pentoside	31.3 $\pm$ 1.0	74.2 $\pm$ 2.4	52.8 $\pm$ 2.2
Campferolo-3-O-galattoside	230.0 $\pm$ 0.8	351.6 $\pm$ 16.5	290.8 $\pm$ 9.1
Campferolo-3-O-glucoside	678.4 $\pm$ 5.4	1000.1 $\pm$ 43.7	839.2 $\pm$ 27.3
Siringetina-3-O-glucoside	101.3 $\pm$ 1.5	132.8 $\pm$ 4.2	117.0 $\pm$ 3.6
Isoramnetina-3-O-glucoside	160.4 $\pm$ 2.6	333.0 $\pm$ 5.0	246.7 $\pm$ 5.1
Diidrocampferolo-3-O-ramnoside	7.7 $\pm$ 1.8	11.3 $\pm$ 0.7	9.5 $\pm$ 2.2
Isoramnetina-3-O-glucuronide	3.3 $\pm$ 0.4	6.0 $\pm$ 0.7	4.6 $\pm$ 0.8
Miricetina-3-O-ramnoside	36.8 $\pm$ 1.0	103.4 $\pm$ 2.7	70.1 $\pm$ 2.4
Miricetina	245.4 $\pm$ 2.9	466.7 $\pm$ 11.5	356.1 $\pm$ 8.7
Quercetina	359.2 $\pm$ 5.6	601.7 $\pm$ 5.1	480.5 $\pm$ 8.2
Campferolo	24.2 $\pm$ 1.1	45.8 $\pm$ 1.4	35.0 $\pm$ 1.8
Siringetina	3.9 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2
Isoramnetina	3.3 $\pm$ 0.1	6.4 $\pm$ 0.4	4.9 $\pm$ 0.3
Metil naringenina	106.9 $\pm$ 0.2	115.5 $\pm$ 1.9	111.2 $\pm$ 1.2
<b>FLAVONOLI TOTALI</b>	<b>5443.9 <math>\pm</math> 1.7</b>	<b>9182.7 <math>\pm</math> 7.5</b>	<b>7313.3 <math>\pm</math> 4.6</b>

**Tabella 4.27:** Concentrazione dei flavonoli nel Seyve Villard 12-347. Sono riportati i valori medi delle due repliche nelle due annate espressi in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  uva di standard interno con la semidispersione dalla media.

Nel caso della varietà Seyve Villard 12-347 il contenuto di flavonoli totali è risultato inferiore rispetto al Seibel 19881 e con un maggiore scarto tra le due annate. Il profilo dei flavonoli è dominato da miricetina, quercetina e campferolo glucosidi, e dalla rutina. Sono presenti inoltre le forme agliconiche di miricetina e quercetina, quercetina glucuronide, campferolo galattoside e isoramnetina glucoside.

In **Figura 4.35** sono rappresentate le medie tra le due annate con relativa semidispersione dalla media. Le concentrazioni sono espresse in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  di uva di standard interno 4',5,7-triidrossiflavanone.



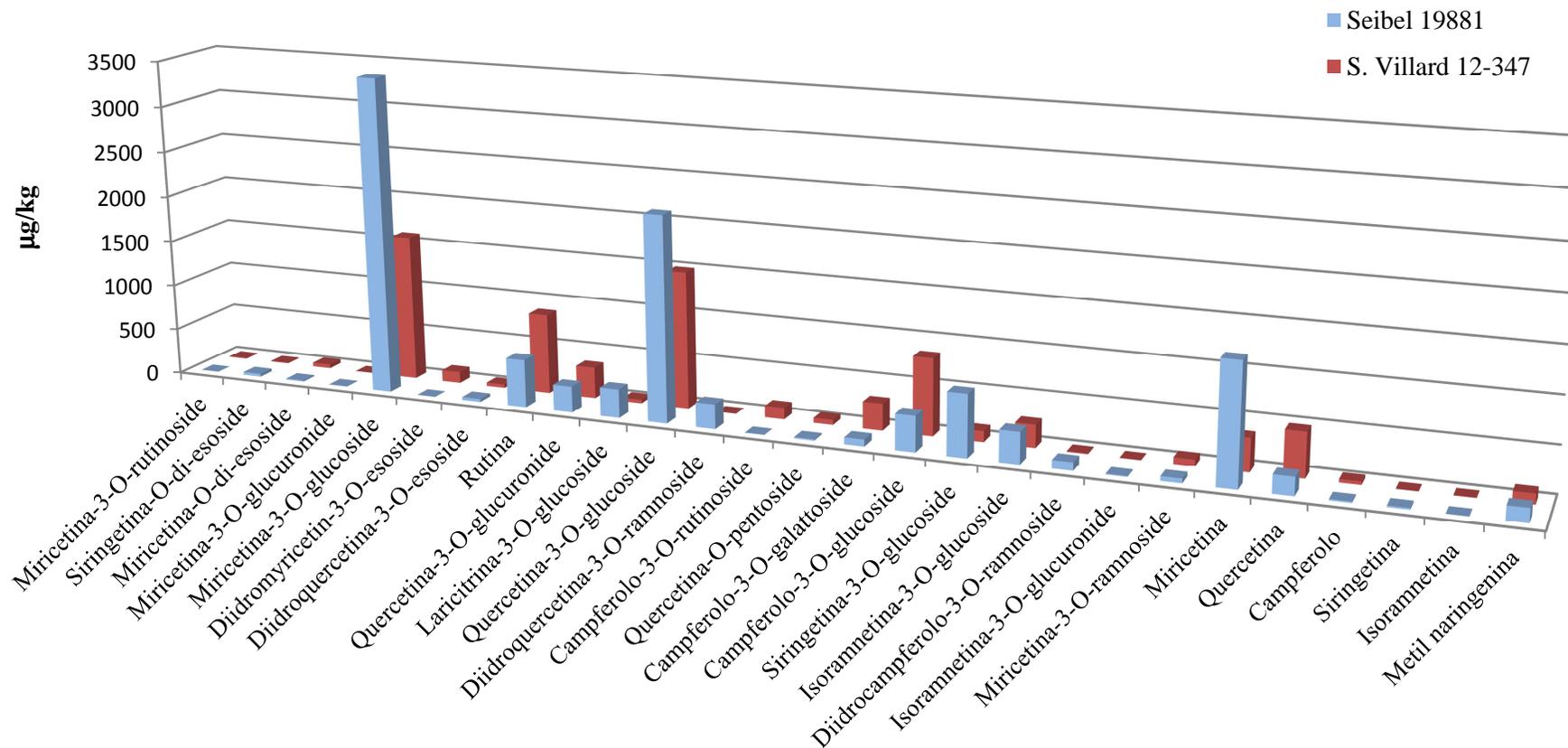
**Figura 4.35:** Valori medi delle due annate per la varietà Seyve Villard 12-347. Le concentrazioni medie, riportate con relativa semidispersione dalla media, sono espresse in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  uva di 4',5,7-triidrossiflavanone.

#### 4.5.2.4 Confronto tra le due varietà

Come già osservato, la varietà Seibel 19881 presenta concentrazioni di flavonoli superiori rispetto alla varietà Seyve Villard 12-347. In particolare la miricetina-3-O-glucoside, un flavonolo abbondante in entrambe le varietà, è presente nel Seibel 19881 più del doppio ( $3443.6 \mu\text{g}/\text{kg}$  d'uva) rispetto al S. Villard 12-347 ( $1594.1 \mu\text{g}/\text{kg}$  d'uva). Anche quercetina e siringetina glucosidi e la miricetina sono molto più abbondanti nel Seibel 19881 ( $2233.9$ ,  $676.4$  e  $1306.9 \mu\text{g}/\text{kg}$  uva, rispettivamente). Sono invece risultate più abbondanti nella varietà Seyve Villard 12-347 la rutina ( $872 \mu\text{g}/\text{kg}$  d'uva), il campferolo galattoside ( $290.8 \mu\text{g}/\text{kg}$  d'uva) e glucoside ( $839.2 \mu\text{g}/\text{kg}$  d'uva), e la quercetina ( $480.5 \mu\text{g}/\text{kg}$  d'uva) (**Tabella 4.28** e **Figura 4.36**).

Flavonoli	Seibel 19881	S. Villard 12-347
	µg/kg uva	µg/kg uva
Miricetina-3-O-rutinoside	/	9.1
Siringetina-di-esoside	31.1	8.7
Miricetina-di-esoside	12.4	42.7
Miricetina-3-O-glucuronide	4.3	3.0
Miricetina-3-O-glucoside	3443.6	1594.1
Diidromyricetin-3-O-esoside	/	122.8
Diidroquercetina-3-O-esoside	32.9	38.0
Rutina	524.2	872.0
Quercetina-3-O-glucuronide	286.5	342.6
Laricitrina-3-O-glucoside	313.1	39.7
Quercetina-3-O-glucoside	2233.9	1493.5
Diidroquercetina-3-O-ramnoside	267.3	/
Campferolo-3-O-rutinoside	/	125.4
Quercetina pentoside	15.2	52.8
Campferolo-3-O-galattoside	74.4	290.8
Campferolo-3-O-glucoside	383.7	839.2
Siringetina-3-O-glucoside	676.4	117.0
Isoramnetina-3-O-glucoside	339.7	246.7
Diidrocampferolo-3-O-ramnoside	89.2	9.5
Isoramnetina-glucuronide	9.7	4.6
Miricetina-3-O-ramnoside	48.8	70.1
Miricetina	1306.9	356.1
Quercetina	198.7	480.5
Campferolo	15.2	35.0
Siringetina	17.7	3.4
Isoramnetina	4.3	4.9
Metil naringenina	152.8	111.2
<b>FLAVONOLI TOTALI</b>	<b>10481.8</b>	<b>7313.3</b>

**Tabella 4.28:** Medie delle concentrazioni di flavonoli determinate nelle due varietà (dati espressi in µg/kg uva di standard interno 4',5,7-triidrossiflavanone).



**Figura 4.36:** Confronto tra i contenuti medi di flavonoli delle due varietà (concentrazioni espresse in µg/kg di uva di standard interno 4',5,7-triidrossiflavanone).

## **5. CONCLUSIONI**

## 5.1 Potenzialità enologiche delle varietà *V. vinifera*

Nelle bucce dell'uva **Boschera**, è stato riscontrato un più elevato contenuto percentuale di acido *trans*-caffeiltartarico (76%) rispetto alle varietà bianche studiate, un composto caratterizzato da importanti proprietà antiossidanti. Sotto il profilo aromatico, questa varietà è caratterizzata da una rilevante presenza di terpenoli glicosidati, caratteristici delle varietà aromatiche e semi-aromatiche. Il vino ottenuto ha presentato una buona tipicità olfattiva, con sentori di frutta secca, e bassa acidità.

La **Cabrusina** si è distinta dalle altre varietà rosse studiate per l'elevato livello di miricetina totale (36%, paragonabile al Negroamaro). Inoltre ha evidenziato maggiori contenuti percentuali di acido 2-S-glutationil-caftarico. Il pigmento principale è la malvidina-3-O-glucoside. Il vino è caratterizzato da un'elevata intensità di colore e buona tipicità olfattiva con sentore di frutti rossi.

Nelle bucce di **Cjanorie** sono state riscontrate alte percentuali di quercetina totale (77%) e peonidina-3-O-glucoside come pigmento principale. Negli estratti di vinaccioli sono stati riscontrati alti contenuti di (+)-catechina. Il vino è poco colorato ma con buona intensità olfattiva e struttura.

L'uva della varietà **Cividin** è caratterizzata dalla quercetina quale principale flavonolo delle bucce e da elevati contenuti di flavanoli monomeri nei vinaccioli. Il vino presenta elevata acidità e struttura.

Le bucce della **Dindarella** presentano una netta prevalenza della quercetina come flavonolo (77%), ed un rilevante contenuto di acido 2-S-glutationil-caftarico. Il profilo degli antociani è caratterizzato da importanti percentuali di cianidina-3-O-glucoside (28%) e peonidina-3-O-glucoside (25%). Come la Boschera, questa varietà ha evidenziato significativi contenuti di terpenoli glicosidati. Il vino ottenuto è risultato poco colorato, ma con elevata acidità e sentori positivi di frutti rossi e spezie.

Il **Fumat** si distingue per la preponderanza della miricetina nelle bucce (40%), da elevati contenuti di antociani e flavonoidi totali, e di antociani acilati, che sono importanti per la stabilità del colore durante il periodo di conservazione ed invecchiamento del vino. Il vino è risultato intensamente colorato, con buona intensità e tipicità olfattiva e rilevante acidità.

Il **Grapariol** è caratterizzato da alte percentuali di acido *cis-p*-cumariltartarico e quercetina glucuronide nelle bucce, e bassi contenuti di flavanoli monomeri nei vinaccioli. Il vino si è distinto per l'elevata tipicità olfattiva e gustativa, elevata acidità, sapidità e struttura, odori positivi con sentori floreali, di frutta matura e tropicale.

Come il Fumat, anche il **Pignolo** ha evidenziato un'alta percentuale di miricetina ed elevati contenuti di flavonoidi ed antociani totali nelle bucce, la malvidina-3-O-glucoside è il pigmento principale. Il vino ha elevati contenuti di polifenoli totali, elevato grado alcolico ed astringenza.

La **Sagrestana** non si è particolarmente distinta dalle altre varietà a bacca bianca sotto il profilo polifenolico.

Sulla base delle caratteristiche riscontrate il Fumat ed il Grapariol possono essere proposti per la produzione di vini monovarietali con una personalità in grado di svincolarsi dagli standard del mercato. Le uve degli altri vitigni studiati avrebbero un più opportuno utilizzo in mescolanza con altre varietà per migliorarne colore, acidità e struttura. I considerevoli contenuti polifenolici evidenziano le varietà Fumat e Pignolo per la produzione di vini caratterizzati da rilevanti contenuti di composti antiossidanti.

## **5.2 Potenzialità industriali delle varietà ibride**

Nelle uve delle varietà studiate sono stati identificati 24 differenti composti antocianici (11 diglucosidi e 13 monoglucosidi) comprendenti cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina nelle forme di acetil-monoglucosidi, *p*-cumaril-monoglucosidi, caffeoil-monoglucosidi, diglucosidi, acetil-diglucosidi e *p*-cumaril-diglucosidi. In nessuna varietà è stata trovata una significativa presenza di pelargonidina monoglucoside e suoi derivati.

Le varietà con maggiore presenza di antociani diglucosidi sono il Seyve Villard 23-399 (85.9%) e il Seyve Villard 23-369 (81.7%), mentre quelle con i contenuti minori il Seibel 10878 (in cui sono assenti), Galibert 238-35 (3.0%) e Sconosciuto 1 (4.4%). Le varietà con il maggior contenuto di antociani acilati, quindi interessanti per una maggiore stabilità del colore, sono lo Sconosciuto 1 e il Terzi 97-46.

Confrontando i contenuti di antociani totali con quelli del Raboso e del Cabernet Sauvignon determinati con le stesse metodiche (De Rosso *et al.*, 2010), Seibel 8357, Burdin 4077, Bacò 30-12 e Terzi 100-31 si sono distinti per l'elevato contenuto di pigmenti. Queste varietà risulterebbero quindi potenzialmente più adatte ad essere utilizzate nell'industria dei coloranti naturali. Le varietà Seibel 8357 e Terzi 100-31 presentano inoltre un'elevata produzione di uva per ceppo.

Lo studio dei profili dei trigliceridi nei vinaccioli delle 32 varietà ibride ha evidenziato che in tutti i campioni, il trigliceride LLL (trilinoleina) è il più abbondante (42%), seguito da LOL (23%), LPL (15%), LSL-LOO (12%), LOP (6%), LSP (2%), ed ha confermato che l'olio di vinaccioli è caratterizzato da una composizione ricca di acidi grassi insaturi. Non sono state trovate differenze significative tra le varietà rosse e le varietà bianche. Tuttavia, campioni quali Bacò 1 e Sconosciuto 2 hanno evidenziato contenuti percentuali di trilinoleina ancora più elevati, pari al 48% e 52% rispettivamente.

Anche la stima del contenuto percentuale di olio nei vinaccioli (calcolato come rapporto tra il peso di olio estratto e il peso di vinaccioli) e della produttività (intesa come olio estratto per peso d'uva) ha evidenziato alcune varietà: Bacò 30-12, Clinton, Seibel 10878, Terzi 9746,

Incrocio Bruni 624 e Seibel 10173 avevano contenuti di olio superiori a 4.5 g/kg d'uva, tra questi Seibel 10878 e Terzi 9746 hanno anche evidenziato un elevato contenuto percentuale di olio nei semi (>10%).

E' stata evidenziata la maggiore presenza nei vinaccioli di tannini a più alto peso molecolare nelle varietà Seyve Villard 12-390, Galibert 255-43 e Seibel 9110. I loro estratti sono pertanto potenzialmente interessanti per l'uso enologico. Nel campione Seyve Villard 12-390 è stato anche riscontrato un considerevole contenuto di polifenoli totali (1.1 g (+)-catechina/kg uva).

I tannini enologici sono comunemente utilizzati per la chiarifica dei mosti e dei vini e dovrebbero mantenere inalterate le proprietà organolettiche, olfattive ed il colore del prodotto. I tannini commerciali estratti dai vinaccioli devono inoltre aderire a specifiche chimiche quali un livello minimo di flavanoli totali (>10 mg (+)-catechina/g di tannino) (OIV, 2013). La varietà più rispondente a questi requisiti potrebbe essere il Seyve Villard 12-390.

### **5.3 Potenzialità nutraceutiche delle varietà ibride**

Negli spettri MALDI degli estratti di vinaccioli sono stati identificati i segnali corrispondenti a 148 differenti proantocianidine con un grado di polimerizzazione da 2 a 11 e grado di galloilazione da 0 a 7.

Particolarmente interessante è risultata la presenza di proantocianidine di tipo A, più rilevante nelle varietà Bacò 1, Seyve Villard 23-399, Seibel 10878 e Bertille Seyve 48-25. Queste proantocianidine sono caratterizzate da peculiari proprietà antimicrobiche, interessanti per l'impiego degli estratti di vinaccioli nell'industria nutraceutica.

Il contenuto di polifenoli totali è risultato molto variabile a seconda della varietà, con un minimo di 200 mg (+)-catechina/kg uva nel Clinton fino ad un massimo di 2600 mg (+)-catechina/kg uva nel Terzi 108-6. Altre varietà con contenuti di polifenoli superiori a 1500 mg (+)-catechina/kg uva sono il Bacò 30-12 ed il Seibel 8745. Il maggiore quantitativo di polifenoli negli estratti, rende queste varietà interessanti per applicazioni nell'industria della nutraceutica e parafarmaceutica per il loro potenziale antiossidante.

### **5.4 Nuovo approccio di “suspect screening analysis” per lo studio della metabolomica dell'uva**

L'analisi LC/QTOF mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione con un approccio di suspect screening analysis e la costruzione del database di metaboliti putativi dell'uva e del vino *GrapeMetabolomics*, ha fornito un metodo che permette l'identificazione di centinaia di composti nell'estratto dell'uva con due sole analisi. Lo studio è stato focalizzato su alcune delle principali classi di metaboliti permettendo di estrapolare profili dettagliati dei composti che sono stati identificati con alti gradi di confidenza.

Nel Clinton sono stati determinati 30 differenti antociani (mono- e diglucosidi e derivati acilati), comprendenti i derivati di cianidina, petunidina, delphinidina, malvidina, peonidina e pelargonidina.

Questo approccio di metabolomica focalizzato sullo studio dei flavonoli delle uve di Seibel 19881 e Seyve Villard 12-347 ha fornito la caratterizzazione qualitativa e quantitativa dei profili delle varietà: sono stati identificati sei flavonoli (campferolo, quercetina, miricetina, isoramnetina, laricetina e siringetina) in tre forme glicosilate (3-O-glucoside, 3-O-galattoside e 3-O-glucuronide), e la presenza di composti diossidi (siringetina e miricetina), ramnosidi (miricetina, diidroquercetina e diidrocampferolo) e rutinosidi (miricetina e campferolo).

Gli studi mettono in evidenza l'elevato potenziale di questo strumento analitico in particolare per la caratterizzazione varietale basata sull'analisi dei metaboliti secondari dell'uva.

## **6. Bibliografia**

- Adámez J. D., Samino E. G., Sánchez E. V., González-Gómez D. (2012) *In vitro* estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control*, **24**: 136-141.
- Angelini U., Costacurta A., Cancellier S. (1980) Dindarella. *Riv. Vit. Enol.*, suppl. ottobre.
- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S. J., Das D. K., Ray S. D., Kuszynski C. A., Joshi S. S., Pruess H. G. (2000) Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, **148**: 187-197.
- Bagchi D., Sen C. K., Ray S. D., Das D. K., Bagchi M., Preuss H.G., Vinson J.A. (2003) Molecular mechanisms of cardioprotection by a novel grape seed proanthocyanidin extract. *Mutat. Res.*, **523–524**: 87-97.
- Bail S., Stuebiger G., Krist S., Unterweger H., Buchbauer G. (2008) Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chem.*, **108**: 1122-1132.
- Balde A., De Bruyne T., Pieters L., Kolodziej H., Vanden Berghe D., Claeys M., Vlietinck A. (1995) Tetrameric proanthocyanidins containing a double interflavanoid (A-type) linkage from *Pavetta owariensis*. *Phytochemistry*, **40**: 933.
- Balu M., Sangeetha P., Murali G., Panneerselvam C. (2006) Modulatory role of grape seed extract on age-related oxidative DNA damage in central nervous system of rats. *Brain Res. Bull.*, **68**: 469-473.
- Bautista-Ortín A. B., Martínez-Cutillas A., Ros-García J. M., López-Roca J. M., Gómez-Plaza, E. (2005) Improving colour extraction and stability in red wines: the use of maceration enzymes and enological tannins. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **40**: 867-878.
- Bavaresco L., Mattivi F., De Rosso M., Flamini R. (2012) Effects of Elicitors, Viticultural Factors, and Enological Practices on Resveratrol and Stilbenes in Grapevine and Wine. *Mini-Rev. Med. Chem.*, **12** (13): 1366-1381.
- Baydar N. G., Özkan G., Sağdıç O. (2004) Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, **15**: 335-339.
- Baydar N. G., Özkan G. (2006) Tocopherol contents of some Turkish wine by-products. *Eur. Food Res. Technol.*, **223**: 290-293.

- Bavaresco L., Petegolli D., Cantu E., Fregoni M., Chiusa G., Trevisan M. (1997) Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, **36**: 77-83.
- Beveridge T. H. J., Girard B., Kopp T., Drover J. C. G. (2005) Yield and Composition of Grape Seed Oils Extracted by Supercritical Carbon Dioxide and Petroleum Ether: Varietal Effects. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 1799-1804.
- Braga, F. G., Lencart e Silva, F. A., Alves, A. (2002) Recovery of winery by-products in the douro demarcated region: Production of calcium tartrate and grape pigments. *Am. J. Enol. Vitic.*, **53** (1): 41-45.
- Brenton A. G., Godfrey A. R. (2010) Accurate Mass Measurement: Terminology and Treatment of Data. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **21**: 1821-1835.
- Cabredo-Pinillos S., Cedrón-Fernández T., Sáenz-Barrio C. (2008) Differentiation of “Claret”, Rosè, Red and Blend wines based on the content of volatile compounds by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Eur. Food Res. Technol.*, **226**: 1317-1323.
- Cancellier S., Costacurta A., Angelini U., Segattini G. (1980) Cabrusina. *Riv. Vit. Enol.*, suppl. ottobre.
- Cancellier S. (1992) Un vecchio vitigno dei colli trevigiani: la “Boschera”. *L'Informatore Agrario*, n. 14.
- Cancellier S., Giacobbi P. (2004) Antichi vitigni veneti a bacca nera. In: Recupero, conservazione e valorizzazione del germoplasma viticolo veneto. Eds. Veneto Agricoltura, 33-91.
- Cancellier S., Michelet E. (2006) Il vitigno Grapariol. *L'informatore Agrario*, n. 35.
- Castillo-Muñoz N., Gómez-Alonso S., García-Romero E., Hermosín-Gutiérrez I. (2007) Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 992-1002.
- Castillo-Muñoz N., Gómez-Alonso S., García-Romero E., Hermosín-Gutiérrez I. (2010) Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *J. Food Compos. Anal.*, **23**: 699-705.
- Chen Z.Y., Ma K.Y., Liang Y., Peng C., Zuo Y. (2011) Role and classification of cholesterol-lowering functional foods. *J. Funct. Foods*, **3**: 61-69.

- Cos P., De Bruyne T., Hermans N., Apers S., Vanden Berghe D., Vietlinck A. J. (2003) Proanthocyanidins in Health Care: Current and New Trends. *Curr. Med. Chem.*, **10**: 1345-1359.
- Cravero M. C. (1991) Gli acidi idrossicinnamiltartarici dell'uva e del vino. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia di Asti*, (XXII): 275-294.
- Crews C., Hough P., Godward J., Brereton P., Lees M., Guiet S., W. Winkelmann (2006) Quantitation of the Main Constituents of Some Authentic Grape-Seed Oils of Different Origin. *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 6261-6265.
- Dalmasso G., Eynard I. (1979) *Manuale di viticoltura moderna*, Ed. Hoepli.
- Davies A. J., Mazza G. (1993) Copigmentation of simple and acylated anthocyanins with colorless phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **41**: 716-720.
- De Beer D., Joubert E., Gelderblom W. C. A., Manley M. (2002) Phenolic compounds: a review of their possible role as *in vivo* antioxidants of wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **23** (2): 48-61.
- De Campos M. A. S. L., Leimann F. V., Pedrosa R. C., Ferreira S. R. S. (2008) Free radical scavenging of grape pomace extracts from Cabernet sauvignon (*Vitis vinifera*). *Bioresour. Technol.*, **99**: 8314-8420.
- Del Caro A., Fanara C., Genovese A., Moio L., Piga A., Piombino P. (2012) Free and enzymatically hydrolysed volatile compounds of sweet wines from Malvasia and Muscat grapes (*Vitis vinifera* L.) grown in Sardinia. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **33** (1): 115-121.
- De Marchi F., Seraglia R., Molin L., Traldi P., De Rosso M., Panighel A., Dalla Vedova A., Gardiman M., Giust M., Flamini R., (2012) Seed oil triglyceride profiling of thirty-two hybrid grape varieties. *J. Mass Spectrom.*, **47** (9): 1113-1119.
- Demirtas I., Pelvan E., Özdemir I. S., Alasalvar C., Ertas E. (2013) Lipid characteristics and phenolics of native grape seed oils grown in Turkey. *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **115**: 641-647.
- De Pascual-Teresa S., Sanchez-Ballesta M. T. (2008) Anthocyanins: from plants to health. *Phytochem. Rev.*, **7**: 281-299.
- De Rosso M., Panighel A., Carraro R., Padoan E., Favaro A., Dalla Vedova A., Flamini R., (2010) Chemical characterization and enological potential of Raboso varieties by study of secondary grape metabolites. *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 11364-11371.

- De Rosso M., Tonidandel L., Larcher R., Nicolini G., Ruggeri V., Dalla Vedova A., De Marchi F., Gardiman M., Flamini R. (2012) Study of anthocyanic profiles of twenty-one hybrid grape varieties by liquid chromatography and precursor-ion mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, **732**: 120-129.
- Di Majo D., La Guardia M., Giammanco S., La Neve L., Giammanco M. (2008) The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. *Food Chem.*, **111**: 45-49.
- Di Stefano R., Cravero M. C. (1991) Metodi per lo studio dei polifenoli dell'uva. *Riv. Vitic. Enol.*, **49** (2): 37-45.
- Di Stefano R., Borsa D., Maggiorotto G., Corino L. (1995) Terpeni e polifenoli di uve aromatiche a frutto colorato prodotte in Piemonte. *L'Enotecnico*, XXXI (4), 75-85.
- Downey M. O., Harvey J. S., Robinson S. P. (2003) Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.*, **9**: 110-121.
- Downey M. O., Dokoozlian N. K., Krstic M. P. (2006) Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grape and wine: a review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.*, **57** (3): 257-268.
- Dunn W. B., Erban A., Weber R. J. M., Creek D. J., Brown M., Breitling R., Hankemeier T., Goodacre R., Neumann S., Kopka J., Viant M. R. (2013) Mass appeal: metabolite identification in mass spectrometry-focused untargeted metabolomics. *Metabolomics*, **9**: 44-66.
- Espín J. C., García-Conesa M. T., Tomás-Barberán F. A. (2007) Nutraceuticals: facts and fiction. *Phytochemistry*, **68**: 2986-3008.
- FAOSTAT, FAO Statistical Database (2011). Food and Agriculture Organization of the United Nations. [www.faostat.fao.org](http://www.faostat.fao.org), consultato il 29/10/2013.
- 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.
- Feliciano R. P., Krueger C. G., Shanmuganayagam D., Vestling M. M., Reed J. D. (2012) Deconvolution of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry isotope patterns to determine ratios of A-type to B-type interflavan bonds in cranberry proanthocyanidins. *Food Chem.*, **135**: 1485-1493.

Fernandes L., Casal S., Cruz R., Pereira J. A., Ramalhosa, E. (2013) Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Res. Int.*, **50** (1): 161-166.

Figueiredo-González M., Martínez-Carballo E., Cancho-Grande B., Santiago J. L., Martínez M. C., Simal-Gándara J. (2012) Pattern recognition of three *Vitis vinifera* L. red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways. *Food Chem.*, **130**: 9-19.

Flamini R., Dalla Vedova A., Calò A. (2001) Studio sui contenuti monoterpenici di 23 accessioni di uve Moscato: correlazione tra profilo aromatico e varietà. *Riv. Vitic. Enol.*, N. 2/3.

Flamini R. (2008) Hyphenated techniques in Grape and Wine Chemistry, John Wiley & Sons Ltd. Eds., ISBN 978-0-470-06187-9.

Flamini R., Traldi P. (2010) Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry, John Wiley & Sons Ltd. Eds., ISBN 978-0-470-39247-8.

Flamini R., De Rosso M., De Marchi F., Dalla Vedova A., Panighel A., Gardiman M., Maoz I., Bavaresco L. (2013) An innovative approach to grape metabolomics: stilbene profiling by suspect screening analysis. *Metabolomics*, **9** (6): 1243-1253.

Foo L. Y., Lu Y., Howell A. B., Vorsa N. (2000) A-Type proanthocyanidin trimers from cranberry that inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli*. *J. Nat. Prod.*, **63**: 1225-1228.

Frankel E. N., German J. B., Kinsella J. E., Parks E., Kanner J., (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet*, **341** (8843): 454-457.

Frazier R. A., Deaville E. R., Green R. J., Stringano E., Willoughby I., Plant J., Mueller-Harvey, I. (2010) Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **51**: 490-495.

Frémont L. (2000) Biological effects of resveratrol. *Life Sci.*, **66** (8): 663-673.

Fulcrand H., Remy S., Souquet J. M., Cheynier V., Moutounet M. (1999) Study of Wine Tannin Oligomers by On-Line Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agr. Food Chem.*, **47**: 1023-1028.

- Gil-Chávez G. J., Villa J. A., Ayala-Zavala J. F., Heredia J. B., Sepulveda D., Yahia E. M., González-Aguilar G. A. (2013) Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **12**: 5-23.
- Giusti M., Rodriguez-Saona L., Griffin D., Wrolstad R. (1999) Electrospray and Tandem Mass Spectrometry as Tools for Anthocyanin Characterization. *J. Agr. Food Chem.*, **47**: 4657-4664.
- Giusti M. M., Wrolstad R. E. (2003) Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochem. Eng. J.*, **14** (3): 217-225.
- González-Barreiro C., Rial-Otero R., Cancho-Grande B., Simal-Gándara J. (2013) Wine aroma compounds in grape: a critical review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, DOI: 10.1080/10408398.2011.650336.
- González-Centeno M. R., Jourdes M., Femenia A., Simal S., Rosselló C., Teissedre P. L. (2012) Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *J. Agric. Food Chem.*, **60**: 11850-11858.
- Griffiths W. J., Koal T., Wang Y., Kohl M., Enot D. P., Deigner H. P. (2010) Targeted metabolomics for biomarker discovery. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**: 5426-5445.
- Gu L., Kelm M. A., Hammerstone J. F., Zhang Z., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Prior R. L. (2003) Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. *J. Mass Spectrom.*, **38**: 1272-1280.
- Gu L., Kelm M. A., Hammerstone J. F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Prior R. L. (2003a) Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 7513-7521.
- Gunata Y. Z., Bayonove C. L., Baumes R. L., Cordonnier R. E. (1985) The aroma of grapes. Extraction and determination of free and glycosidically bound fractions of some grape aroma components. *J. Chrom. A*, **331**: 85-90.
- Han X., Shen T., Lou H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *Int. J. Mol. Sci.*, **8** (9): 950-988.
- Hanton S. D. (2001) Mass Spectrometry of Polymers and Polymer Surfaces. *Chem. Rev.*, **101**: 527-569.

- Haselgrove L., Botting D., van Heeswijck R., Høj P. B., Dry P. R., Ford C., Iland P. G. (2000) Canopy microclimate and berry composition: the effect of bunch sun exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **6**: 141-149.
- He J., Giusti M. M. (2010) Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, **1**: 163-87.
- He F., He J.-J., Pan Q.-H., Duan C.-Q. (2010) Mass-spectrometry evidence confirming the presence of pelargonidin-3-O-glucoside in the berry skins of Cabernet Sauvignon and Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Res.*, **16**: 464-468.
- Hermosín-Gutiérrez I., Castillo-Muñoz N., Gómez-Alonso S., García-Romero E. (2011) Flavonol profiles for grape and wine authentication. In: *ACS symposium series*. American Chemical Society, Washington, DC.
- Hofmann T., Glabasnia A., Schwarz B., Wisman K. N., Gangwer K. A., Hagerman, A. E. (2006) Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl- $\alpha$ -D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *J. Agric. Food Chem.*, **54**: 9503-9509.
- Huang D., Ou B., Prior R. L. (2005) The chemistry behind antioxidant capacity essays. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 1841-1856.
- Huang Z., Wang B., Williams P., Pace R. D. (2009) Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. *Food Sci. Technol.*, **42**: 819-824.
- Jerez M., Sineiro J., Guitián E., Núñez M. J. (2009) Identification of polymeric procyanidins from pine bark by mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **23**: 4013-4018.
- Jordão A. M., Ricardo-da-Silva J. M., Laureano O. (2005) Extraction of some ellagic tannins and ellagic acid from oak wood chips (*Quercus pyrenaica* L.) in model wine solutions: effect of time, pH, temperature and alcoholic content. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **26**: 83-89.
- Kammerer D., Claus A., Schieber A., Carle R. (2004) Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.*, **52**: 4360-4367.
- Kondo K., Kurihara M., Fukuhara K., Tanaka T., Suzuki T., Miyata N., Toyoda M. (2000) Conversion of procyanidin B-type (catechin dimer) to A-type: evidence for abstraction of C-2 hydrogen in catechin during radical oxidation. *Tetrahedron Lett.*, **41**: 485-488.
- Krauss M., Singer H., Hollender J. (2010) LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns. *Anal. Bioanal. Chem.*, **397**: 943-951.

- Kritzinger E. C., Bauer F. F., du Toit W. J. (2013) Role of glutathione in winemaking: a review. *J. Agric. Food Chem.*, **61**: 269-277.
- Krueger C. G., Dopke N. C., Treichel P. M., Folts J., Reed J. D. (2000) Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Polygalloyl Polyflavan-3-ols in Grape Seed Extract. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 1663-1667.
- Kueger S., Steinhauser D., Willmitzer L., Giavalisco P. (2012) High-resolution plant metabolomics: from mass spectral features to metabolites and from whole-cell analysis to subcellular metabolite distributions. *The Plant Journal*, **70**: 39-50.
- Labarbe B., Cheynier V., Brossaud F., Souquet J. M., Moutounet M. (1999) Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 2719-2723.
- Lachman J., Hejtmánková A., Hejtmánková K., Horníčková S., Pivec V., Skala O., Dédina M., Příbyl J. (2013) Towards complex utilisation of winemaking residues: Characterisation of grape seeds by total phenols, tocopherols and essential elements content as a by-product of winemaking. *Ind. Crops Prod.*, **49**: 445-453.
- Langcake P., Pryce R. J. (1977) A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, **33**: 151-152.
- Liang Z., Yang Y., Cheng L., Zhong G. (2012) Polyphenolic composition and content in the ripe berries of wild *Vitis* species. *Food Chem.*, **132**: 730-738.
- Lísa M., Holčapek M. (2008) Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chrom. A.*, **1198-1199**: 115-130.
- Lizarraga D., Lozano C., Briedé J. J., van Delft J. H., Touriño S., Centelles J. J., Torres J. L., Cascante M. (2007) The importance of polymerization and galloylation for the antiproliferative properties of procyanidin-rich natural extracts. *FEBS Journal*, **274** (18): 4802-4811.
- Llobera A., Cañellas J. (2007) Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chem.*, **101**: 659-666.
- Llobera A., Cañellas J. (2008) Antioxidant activity and dietary fibre of Prenal Blanc white grape (*Vitis vinifera*) by-products. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **43**: 1953-1959.

- Lutterodt H., Slavin M., Whent M., Turner E., Yu L. (2011) Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chem.*, **128** (2): 391-399.
- Maier T., Schieber A., Kammerer D. R., Carle R. (2009). Residues of grape (*Vitis vinifera* L.) seed oil production as a valuable source of phenolic antioxidants. *Food Chem.*, **112**: 551-559.
- Makris D. P., Kallithraka S., Kefalas P. (2006) Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters. *J. Food Compos. Anal.*, **19**: 396-404.
- Malien-Aubert C., Dangles O., Amiot M. J. (2001) Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra and intermolecular copigmentation. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 170-176.
- Malien-Aubert C., Dangles O., Amiot M. J. (2002) Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. *J. Agric. Food Chem.*, **50**: 3299-3305.
- Manach C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.*, **79**: 727-747.
- Mané C., Souquet J. M., Ollé D., Véran F., Mazerolles G., Cheynier V., Fulcrand H. (2007) Optimisation of simultaneous flavanol, phenolic acid, and anthocyanin extraction from grapes using an experimental design: application to the characterization of Champagne grape varieties. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 7224-7233.
- Mané C., Sommerer N., Yalcin T., Cheynier V., Cole R.B., Fulcrand H. (2007a) Assessment of the Molecular Weight Distribution of Tannin Fractions through MALDI-TOF MS Analysis of Protein–Tannin Complexes. *Anal. Chem.*, **79**: 2239.
- Markus M. A., Morris B. J. (2008). Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin. Interventions Aging*, **3** (2): 331-339.
- Martin K. R., Appel C. L. (2010) Polyphenols as dietary supplements: a double-edged sword. *Nutr. Diet. Suppl.*, **2**: 1-12.
- Mateo J. J., Gentilini N., Huerta T., Jiménez M., Di Stefano R. (1997) Fractionation of glucoside precursors of aroma in grapes and wine. *J. Chrom. A*, **778**: 219-224.
- Mattivi F., Guzzon R., Vrhovsek U., Stefanini M., Velasco R. (2006) Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *J. Agr. Food Chem.*, **54**: 7692-7702.

- Mattoli L., Cangi F., Maidecchi A., Ghiara C., Ragazzi E., Tubaro M., Stella L., Tisato F., Traldi P. (2006) Metabolomic fingerprinting of plant extracts. *J. Mass Spectrom.*, **41**: 1534-1545.
- McRae J. M., Kennedy J. A. (2011) Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: a review of current research. *Molecules*, **16**: 2348-2364.
- Monagas M., Gomez-Cordovés C., Bartolomé B., Laureano O., Ricardo da Silva J. M. (2003) Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 6475-6481.
- Mouls L., Fulcrand H. (2012) UPLC-ESI-MS study of the oxidation markers released from tannin depolymerization: toward a better characterization of the tannin evolution over food and beverage processing. *J. Mass Spectrom.*, **47**: 1450-1457.
- Naczki M., Shahidi F., (2000) Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **41**: 1523-1542.
- Nakamura Y., Tsuji S., Tonogai Y. (2003) Analysis of proanthocyanidins in grape seed extracts, health foods and grape seed oils. *J. Health Sci.*, **49** (1): 45-54.
- Nassiri-Asl M., Hosseinzadeh H. (2009) Review of the pharmacological effects of *Vitis vinifera* (grape) and its bioactive compounds. *Phytother. Res.*, **23**: 1197-1204.
- Neves A. C., Spranger M. I., Zhao Y., Leandro M. C., Sun B. (2010) Effect of Addition of Commercial Grape Seed Tannins on Phenolic Composition, Chromatic Characteristics, and Antioxidant Activity of Red Wine. *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 11775-11782.
- Nerantzis E. T., Tataridis P. (2006). Integrated enology - utilization of winery wastes for the production of high added value products. *e-J. Sci. Technol.*, **1** (3): 79-89.
- Nixdorf S. L., Hermosín-Gutiérrez I. (2010) Brazilian red wines made from the hybrid grape cultivar Isabel: Phenolic composition and antioxidant capacity. *Anal. Chim. Acta*, **659**: 208-215.
- OIV, Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2012) International code of oenological practices, part II. 3.2-1, 3. Wines, 3.2 clarification of wine (OIV: Paris, France).
- OIV, Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (2013) International oenological codex oenological tannins COEI-1-tannins: 2009, INS N°: 181, 1-25 (OIV: Paris, France).

- Ortega-Regules A., Romero-Cascales I., López-Roca J. M., Ros-García J. M., Gómez-Plaza E. (2006) Anthocyanin fingerprint of grapes: environmental and genetic variations. *J. Sci. Food Agric.*, **86**: 1460-1467.
- Özvural E. B., Vural H. (2011) Grape seed flour is a viable ingredient to improve the nutritional profile and reduce lipid oxidation of frankfurters. *Meat Sci.*, **88**: 179-183.
- Pandey K. B., Rizvi S. I., (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxid. Med. Cell. Longevity*, **2** (5): 270-278.
- Panighel A., Gardiman M., De Marchi F., De Rosso M., Dalla Vedova A., Flamini R. (2012) Studio dei profili polifenolici ed aromatici di alcuni vitigni autoctoni del Veneto e Friuli Venezia Giulia. *Riv. Vitic. Enol.*, **2**: 41-60.
- Pardo J. E., Fernández E., Rubio M., Alvarruiz A., Alonso G. L. (2009) Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *Eur. J. Lipid Sci. Tech.*, **111** (2): 188-193.
- Passos C. P., Cardoso S. M., Domingues M. R. M., Domingues P., Silva C. M., Coimbra M. A. (2007) Evidence for galloylated type-A procyanidins in grape seeds. *Food Chem.*, **105**: 1457-1467.
- Pastrana-Bonilla E., Akoh C. C., Sellappan S., Krewer G. (2003) Phenolic content and antioxidant capacity of Muscadine grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 5497-5503.
- Peng X., Ma J., Cheng K. W., Jiang Y., Cheng F., Wang M. (2010) The effects of grape seed extract fortification on the antioxidant activity and quality attributes of bread. *Food Chem.*, **119**: 49-53.
- Peralbo-Molina A., de Castro M. D. L. (2013) Potential of residues from the Mediterranean agriculture and agrifood industry. *Trends Food Sci. Technol.*, **32**: 16-24.
- Plumb G. W., De Pascual-Teresa S., Santos-Buelga C., Cheynier V., Williamson G. (1998) Antioxidant Properties of Catechins and Proanthocyanidins: Effect of Polymerisation, Galloylation and Glycosylation. *Free Rad. Res.*, **29**: 351-358.
- Poggi G. (1939) Atlante ampelografico. Consorzio provinciale tra i produttori dell'Agricoltura, Sezione viticoltura (Udine).
- Prieur C., Rigaud J., Cheynier V., Moutounet M. (1994) Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, **36** (3): 781-784.

- Prodanov M. P., Domínguez J. A., Blázquez I., Salinas M. R., Alonso G. L. (2005) Some aspects of the quantitative/qualitative assessment of commercial anthocyanin-rich extracts. *Food Chem.*, **90**: 585-596.
- Quideau S., Deffieux D., Douat-Casassus C., Poységu L. (2011) Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**: 586-621.
- Reed J. D., Krueger C. G., Vestling M. M. (2005) MALDI-TOF mass spectrometry of oligomeric food polyphenols. *Phytochemistry*, **66**: 2248-2263.
- Reemtsma T. (2009) Determination of molecular formulas of natural organic matter molecules by (ultra-) high-resolution mass spectrometry. Status and needs. *J. Chrom. A*, **1216**: 3687-3701.
- Registro Nazionale delle Varietà di Vite, <http://catalogoviti.politicheagricole.it/home.php>, consultato il 12/11/2013.
- Regolamento (CE) 479/2008 del Consiglio del 29 aprile 2008, sulla OCM del settore vitivinicolo.
- Renaud S., De Lorgeril M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, **339**: 1523-1526.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A., Dubourdieu D. (1998) Trattato di enologia II, Chimica del vino, Stabilizzazione, Trattamenti, EdAgricole.
- Ricardo da Silva J. M., Rigaud J., Cheynier V., Cheminat A., Moutounet M. (1991) Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, **30** (4): 1259-1264.
- Ricardo da Silva J. M., Cheynier V., Souquet J. M., Moutounet M. (1991a) Interaction of Grape Seed Procyanidins with Various Proteins in Relation to Wine Fining. *J. Sci. Food Agric.*, **57**: 111-125.
- Rocha S. M., Coutinho P., Barros A., Delgadillo I., Coimbra M. (2006) Rapid tool for distinction of wines based on the global volatile signature. *J. Chrom. A*, **1114**: 188-197.
- Rockenbach I. I., Rodrigues E., Gonzaga L. V., Caliarí V., Genovese M. I., Gonçalves A. E. S. S., Fett R. (2011) Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brasil. *Food Chem.*, **127**: 174-179.

- Rojas-Chertó M., Kasper P. T., Willighagen E. L., Vreeken R. J., Hankemeier T., Reijmers T. H. (2011) Elemental composition determination based on MS<sup>n</sup>. *Bioinformatics*, **27** (17): 2376-2383.
- Ross C. F., Hoye C., Fernandez-Plotka V. C. (2011) Influence of heating on the polyphenolic content and antioxidant activity of grape seed flour. *J. Food Sci.*, **76** (6): 884-890.
- Rubio M., Alvarez-Ortí M., Alvarruiz A., Fernández E., Pardo J. E. (2009) Characterization of Oil Obtained from Grape Seeds Collected during Berry Development. *J. Agric. Food Chem.*, **57**: 2812-2815.
- Sana T. R., Roark J. C., Li X., Waddell K., Fischer S. M. (2008) Molecular formula and METLIN personal metabolite database matching applied to the identification of compounds generated by LC/TOF-MS. *J. Biomol. Tech.*, **19**: 258-266.
- Sandhu A. K., Gu L. (2010) Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Profiling of Phenolic Compounds in the Seeds, Skin, and Pulp of *Vitis rotundifolia* (Muscadine Grapes) As Determined by HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>. *J. Agric. Food Chem.*, **58** (8): 4681-4692.
- Santos-Buelga C., Scalbert, A. (2000) Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, **80**: 1094-1117.
- Sanz M. L., Martínez-Castro I., Moreno-Arribas M. V. (2008) Identification of the origin of commercial enological tannins by the analysis of monosaccharides and polyalcohols. *Food Chem.*, **111**: 778-783.
- Sarni-Manchado P., Cheynier V., Moutounet M. (1999). Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.*, **47**: 42-47.
- Scalbert A., Brennan L., Fiehn O., Hankemeier T., Kristal B. S., van Ommen B., Pujos-Guillot E., Verheji E., Wishart D., Wopereis S. (2009) Mass-spectrometry-based metabolomics: limitations and recommendations for future progress with particular focus on nutrition research. *Metabolomics*, **5**: 435-458.
- Schiller J., Süß R., Arnhold J., Fuchs B., Leßig J., Müller M., Petkovic M., Spalteholz H., Zschörnig O., Arnold K. (2004) Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. *Prog. Lipid Res.*, **43**: 449-488.
- Schneider A. (2006) Aspetti genetici nello studio dei vitigni del territorio. *Quad. Vitic. Enol. Univ. Torino*, **28**, 2005-2006.

- Schwarz M., Picazo-Bacete J. J., Winterhalter P., Hermosín-Gutiérrez I. (2005) Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 8372-8381.
- Shahidi F. (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Food / Nahrung*, **44** (3): 158-163.
- Shahidi F., Naczk M. (2003). Phenolics in Food and Nutraceuticals. New York: CRC Press, 2004, ISBN 0-203-59485-1.
- Shahidi F. (2004) Functional Foods: Their Role in Health Promotion and Disease Prevention. *J. Food Sci.*, **69** (5): R146-149.
- Shahidi F., Chandrasekara A. (2010) Hydroxycinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. *Phytochem. Rev.*, **9**: 147-170.
- Shahidi F., Zhong Y., (2010a) Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **112**: 930–940.
- Siró I., Kápolna E., Kápolna B., Lugasi, A. (2008) Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, **51** (3): 456-467.
- Sleno L., Volmer D. A. (2006) Assessing the properties of internal standards for quantitative matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of small molecules. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**: 1517-1524.
- Soares S., Mateus N., de Freitas F. (2007) Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary  $\alpha$ -amylase (HSA) by fluorescence quenching. *J. Agric. Food Chem.*, **55**: 6727-6735.
- Somers T. C. (1971) The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, **10** (9): 2175-2186.
- Souquet J-M., Cheynier V., Brossaud F., Moutounet M. (1996) Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, **43**: 509-512.
- Souquet J-M., Labarbe B., Le Guernevé C., Cheynier V., Moutounet M. (2000). Phenolic composition of grape stems. *J. Agric. Food Chem.*, **48**: 1076-1080.
- Stoll N., Schmidt E., Thurow K. (2006) Isotope pattern evaluation for the reduction of elemental compositions assigned to high-resolution mass spectral data from Electrospray

Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **17**: 1692-1699.

Sumner L. W., Amberg A., Barrett D., Beale M. H., Beger R., Daykin C. A., Fan T. W.-M., Fiehn O., Goodacre R., Griffin J. L., Hankemeier T., Hardy N., Harnly J., Higashi R., Kopka J., Lane A. N., Lindon J. C., Marriott P., Nicholls A.W., Reily M. D., Thaden J. J., Viant M. R. (2007) Proposed minimum reporting standards for chemical analysis. *Metabolomics*, **3**: 211-221.

Sun B., Spranger I., Roque-do-Vale F., Leandro C., Belchior P. (2001) Effect of Different Winemaking Technologies on Phenolic Composition in Tinta Miúda Red Wines. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 5809-5816.

Tangolar S. G., Ozogul Y., Tangolar S., Torun A. (2009) Evaluation of fatty acid profiles and mineral content of grape seed oil of some grape genotypes. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, **60** (1): 32-39.

Teissedre P. L., Frankel E. N., Waterhouse A. L., Peleg H., German J. B. (1996) Inhibition of *In Vitro* Human LDL Oxidation by Phenolic Antioxidants from Grapes and Wines. *J. Sci. Food Agric.*, **70**: 55-61.

Tian Q., Giusti M. M., Stoner G. D., Schwartz S. J. (2005) Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring. *J. Chrom. A*, **1091**: 72-82.

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.

Wang L., Stoner G. D. (2008) Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Lett.*, **269** (2): 281-290.

Wijendran V., Hayes K. C. (2004) Dietary n-6 and n-3 fatty acid balance and cardiovascular health. *Ann. Rev. Nutr.*, **24**: 597-615.

Xia E., Deng G., Guo Y., Li H. (2010) Biological activities of polyphenols from grapes. *Int. J. Mol. Sci.*, **11** (2): 622-646.

Xu X., Xie H., Wang Y., Wei X. (2010) A-type proanthocyanidins from lychee seeds and their antioxidant and antiviral activities. *J. Agric. Food Chem.*, **58**: 11667-11672.

- Yilmaz Y., Toledo R. T. (2004) Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends Food Sci. Technol.*, **15**: 422-433.
- Yu J., Ahmedna M. (2013) Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *Int. J. Food Sci. Technol.*, **48** (2): 221-237.
- Vauzour D., Rodriguez-Mateo A., Corona G., Oruna-Concha M. J., Spencer J. P. E. (2010) Polyphenols and human health: prevention of disease and mechanisms of action. *Nutrients*, **2**: 1106-1131.
- Versari A., du Toit W., Parpinello G. P. (2012) Oenological tannins: a review. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **19**: 1-10.
- Vidal S., Francis L., Guyot S., Marnet N., Kwiatkowski M., Gawel R., Cheynier V., Waters E. J. (2003) The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.*, **83**: 564.
- VIVC, Vitis International Variety Catalogue, [www.vivc.de](http://www.vivc.de)
- Zhang F., Liu J., Shi J. S. (2010) Anti-inflammatory activities of resveratrol in the brain: Role of resveratrol in microglial activation. *Eur. J. Pharm.*, **636**: 1-7.
- Zhu L., Zhang Y., Lu, J. (2012) Phenolic Contents and Compositions in Skins of Red Wine Grape Cultivars among Various Genetic Backgrounds and Originations. *Int. J. Mol. Sci.*, **13** (3): 3492-3510.