



# **SFR (Stable Free Radicals), composizione e attività antiossidante nel vino rosso e ossigenazione**

**linea di ricerca**

**Fulvio Mattivi, Panagiotis Arapitsas, Daniele  
Perenzoni, Urska Vrhovsek**

Fondazione Edmund Mach, Centro Ricerca ed Innovazione Iasma,  
Area Alimentazione, via E. Mach 1, 38010 San Michele all'Adige

---

FONDAZIONE EDMUND MACH



ISTITUTO AGRARIO  
DI SAN MICHELE ALL'ADIGE

**18 gennaio 2010**

## ***Indige generale***

1 <i>Introduzione</i> .....	3
1.1 <i>Descrizione della linea di ricerca</i> .....	3
2. <i>Materiali e Metodi</i> .....	5
2.1. <i>Analisi metabolomica dei vini</i> .....	5
3. <i>Risultati e Discussione</i> .....	6
3.1 <i>Numero di features</i> .....	6
3.2 <i>Annotazione dei picchi</i> .....	9
3.3 <i>Effetto Ossigeno-Metallo</i> .....	16
4. <i>Conclusioni</i> .....	28
5. <i>Bibliografia</i> .....	29

# 1. Introduzione

## 1.1 Descrizione della linea di ricerca

L'attività di questo progetto, svolto in collaborazione tra la Fondazione Edmund Mach, l'Università di Padova ed il Consorzio Toscana, si è focalizzata sulla micro-ossigenazione del Sangiovese. In base alla valutazione analitica delle partite disponibili, effettuata nel 2009, è stato scelto per la prova un vino Sangiovese della vendemmia 2009, ottenuto presso la cantina sperimentale Toscana. La prima fase di micro-ossigenazione è iniziata poco dopo il completamento della fermentazione alcolica e si è completata subito prima della fermentazione malo-lattica. Il vino (240 hl) è stato diviso in 24 vasche in acciaio da 10 hl e sottoposto a 7 settimane di micro-ossigenazione controllata in 8 diverse condizioni, ciascuna condotta in triplicato. Le variabili investigate sono state la quantità di ossigeno (quattro livelli, 0-5-10-15 mg per litro per mese) e la concentrazione di ferro (due livelli, 1.5 and 2.0 mg/l). Tutte le altre condizioni sono state strettamente standardizzate e monitorate. Sia durante che dopo le prove di micro-ossigenazione, sono state misurate sia la composizione del vino che le caratteristiche sensoriali (per queste ultime, che sono strettamente correlate, vedi relazione Alessandra Biondi Bartolini). Tra i parametri più strettamente monitorati come parametro di processo, oltre alle sopra citate periodiche valutazioni sensoriali, la concentrazione di ossigeno sia disciolto che nello spazio di testa di ciascun serbatoio, attraverso misura diretta per oxo-luminescenza effettuata a cura del Consorzio Toscana con lo strumento PreSens (Nomacor) e la concentrazione della acetaldeide nei vini, seguita in FEM per via gascromatografica. La seconda fase di micro-ossigenazione è iniziata poco dopo il completamento della fermentazione malo-lattica e, come la precedente, è stata attuata su 24 vasche permettendo di testare, in triplicato, l'effetto di 4 differenti dosaggi di ossigeno (0-1-2-3 mg per litro per mese) in presenza di due livelli di ferro (1.7 contro 2.6 mg/L), durante tre mesi di trattamento.

Gli aspetti salienti di questa prova si possono così sintetizzare: i) scala di vinificazione, durata della prova ed intervallo di concentrazioni dei fattori studiati rappresentativi delle condizioni reali di cantina; ii) stretto monitoraggio chimico e sensoriale di tutte le fasi della lavorazione, iii) disegno sperimentale con adeguato numero di repliche e iv) misura degli effetti attraverso esperimenti di “metabolomica” basati sulla spettrometria di massa. Questo ultimo fattore rappresenta in assoluto una novità, in quanto propone un approccio esplorativo in precedenza mai applicato allo studio del processo di micro-ossigenazione.

## 2. Materiali e Metodi

### 2.1. Analisi metabolomica dei vini

Si è provveduto ad analizzare i campioni di vino provenienti dalle varie fasi del processo di micro - ossigenazione, utilizzando una metodica che registra il profilo metabolomico dei campioni, appositamente messa a punto presso i laboratori della Fondazione Mach. Ogni campione, dei 24 serbatoi, è stato analizzato sia tale quale che concentrato cinque volte, dopo una estrazione in fase solida (SPE) con cartuccia ENV+. Le analisi sono state effettuate con un sistema cromatografico Waters Acquity UPLC accoppiato con un spettrometro di massa Synapt HDMS Q-TOF, controllato dal MassLynx 4.1 software. Le modalità di lavoro sono quelle tipiche degli esperimenti data-driven. Il campione viene separato in cromatografia UPLC in fase inversa e l'eluato viene analizzato nello spettrometro di massa operante ad alta risoluzione ed accuratezza, generando dei raw files che contengono l'informazione chimica generata dalla frammentazione di tutti i composti organici ionizzabili presenti nella matrice. L'elaborazione dei dati permette di estrarre un elevato numero di features, ossia di coppie univoche di tempo di ritenzione e massa accurata, che sono riconducibili in linea di principio al composto che ha generato il segnale.

La separazione cromatografica è stata ottimizzata su una colonna Waters Acquity UPLC HSS T3 (1.8  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 150 mm), durava 62 minuti, a flusso 0.3 mL/min ed il volume iniettato era 10  $\mu\text{L}$ .

Gli spettri di massa sono stati registrati utilizzando la tecnica di ionizzazione ESI (electrospray ionization) sia in modalità positiva che negativa (ottenuta con corse cromatografiche separate), ed a due livelli di energia (bassa ed alta) per ciascuna delle due modalità, operando in un intervallo di massa ( $m/z$ ) da 50 fino a 3000 amu. Tutte le analisi sono state realizzate in duplicato.

I cromatogrammi sono stati processati ed analizzati in un primo livello dal software XCMS ed esportati per la successiva elaborazione verso R-package, CAMERA e Matlab<sup>TM</sup>.

### 3. Risultati e Discussione

Negli ultimi anni la metabolomica è diventata una “tecnologia abilitante” in diversi settori scientifici, dalla diagnosi delle malattie fino alla tecnologia degli alimenti. Si tratta di un approccio scientifico innovativo, che punta ad analizzare tutti i metaboliti, o ampi gruppi di metaboliti, come un insieme. Il vino è una matrice che contiene un elevato numero di metaboliti primari e secondari, le concentrazioni ed i rapporti tra i quali determinano la qualità ed il carattere del vino. In letteratura fino ora ci sono pochi studi metabolomici ancora pioneristici applicati al settore enologico, focalizzati alla valutazione della origine geografica del vino, della cultivar del vitigno e dell’annata (Cuadros-Inostroza et al 2010; Vaclavik et al 2011). Uno studio particolarmente interessante ha permesso di descrivere i composti caratteristici della spuma degli Champagne (Liger-Balair et al 2009). Ad oggi non ci risulta siano mai stati tentati studi metabolomici sulla influenza della pratica enologica della micro-ossigenazione.

#### 3.1 Numero di features

Si ricorda che per “feature” si intende una coppia univoca di valori di massa accurata e di tempo di ritenzione. Viene usata negli esperimenti di metabolomica perché in questo modo si acquisiscono e conservano le informazioni rispetto a tutti i composti rilevabili, ossia che possano lasciare una traccia nelle condizioni della analisi, inclusi quelli, e sono la maggior parte, ad oggi non ancora identificati. Questo genera dei dati estremamente completi e complessi da analizzare, che contengono una quantità di informazione incomparabilmente superiore di quella proveniente dai consueti esperimenti su composti target. In questi ultimi infatti, l’informazione che riguarda i composti non specificamente cercati viene preventivamente rimossa, o dove acquisita va comunque persa durante il processo di processamento del dato.

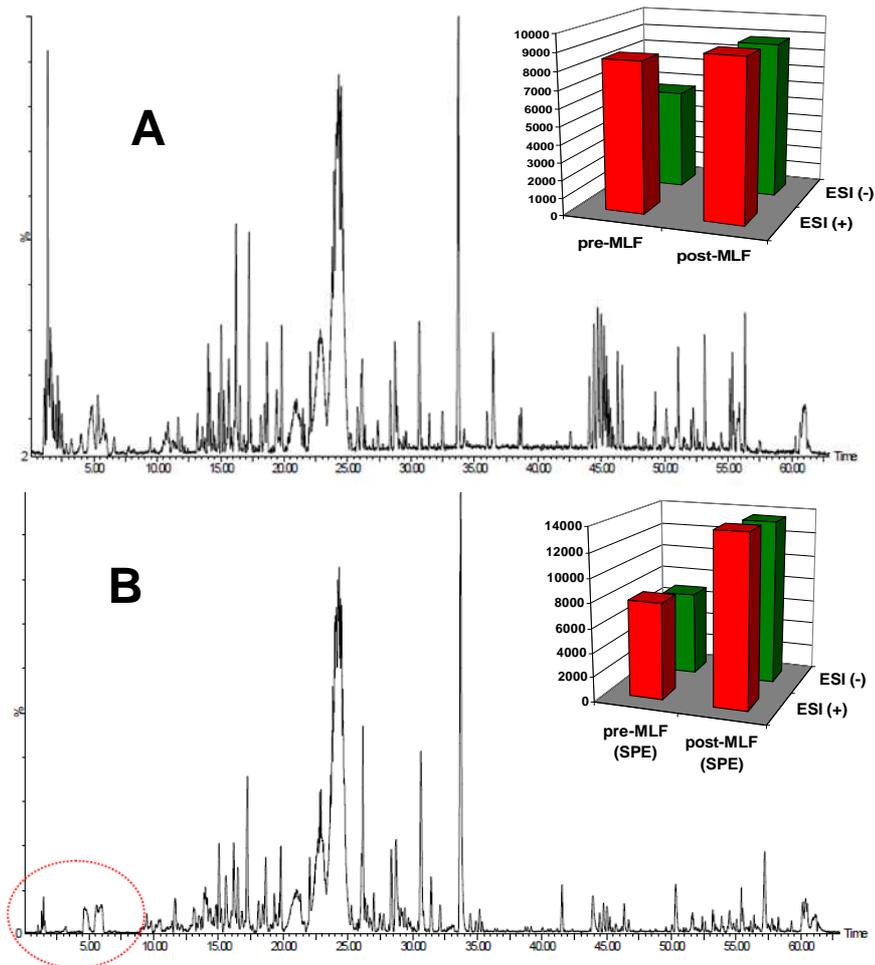
Analizzando i dati sperimentali delle analisi UPLC-MS, dopo il loro processamento con XCMS sono stati rilevati per i campioni di vini dell'esperimento di micro-ossigenazione in fase I (prima della fermentazione malo-lattica o **pre-MLF**), analizzati tal quali, per l'analisi in modalità di ionizzazione ESI positiva 8526 features (raggruppate in 3188 insiemi), e 5620 features (raggruppate in 2151 insiemi) per quella ESI negativa.

Per gli stessi campioni ma concentrati cinque volte (via SPE) prima della iniezione, in ESI positiva sono stati rilevati 7972 features (3180 insiemi) e 6904 features (2758 insiemi) in ESI negativa.

Per quanto riguarda i campioni di vini relativi all'esperimento di micro-ossigenazione in fase II (dopo la fermentazione malo-lattica o post-**MLF**) le features sono state, per i campioni tal quali, in modalità positiva 9134 (3121 insiemi), e in negativa 8843 (2864 insiemi); e per i campioni concentrati cinque volte, in modalità positiva 13991 (5607 insiemi) e in negativa 13589 (5400 insiemi) (Figura 1). Un insieme è un gruppo di features che appartengono nello stesso picco cromatografico. Questi possono essere ascritti ad isotopi, addotti e frammenti.

Come si può vedere dalla **Figura 1**, il numero di features è stato maggiore nei vini dopo concentrazione via SPE. Anche se va sottolineato che con questa procedura una gran parte dei composti che eluiscono nei primi minuti della corsa cromatografica sono stati eliminati. Si tratta di metaboliti solubili in acqua come zuccheri, amine, amino acidi ed acidi organici, non trattenuti dalla cartuccia di fase inversa utilizzata per concentrare il campione. Il trend ed uno degli obiettivi principali delle analisi metabolomiche è di concentrarsi verso procedure che richiedono la minima manipolazione del campione, perchè possono modificare la composizione del campione compromettendo in tal modo una analisi olistica. I campioni di vino tal quale, preparato in atmosfera inerte per prevenire contatti con l'ossigeno, rispettano in pieno questo principio. Invece la procedura di concentrazione utilizzata per concentrare 5 volte i vini prima della iniezione porta ad eliminare nelle fasi di caricamento e lavaggio una quota elevata dei composti, prevalentemente metaboliti primari, mentre consente di concentrare

ed accedere ad una quantità superiore di informazioni sui metaboliti secondari presenti in tracce (Theodoridis et al, 2011).



**Figura 1.** Tipici cromatogrammi LC-MS dello stesso campione analizzato tal quale (A) e dopo concentrazione via SPE (B). In alto destra, in istogramma, il numero di features rilevate in modalità positiva ESI (+) e negativa ESI (-), prima (pre-MLF) o dopo (post-MLF) della fermentazione malolattica.

### 3.2 Annotazione dei picchi

In base a queste features sperimentali sono stati tentativamente identificati nei vini più di 200 composti, tramite il doppio confronto della loro frammentazione e tempo di ritenzione con quelli di appositi standard (**Tabella 1**). Dalla modalità ESI positiva sono stati identificati (o tentativamente identificati) più di 150 composti, e dalla modalità ESI negativa più di 140 composti (diversi composti erano identificati in entrambe le modalità). Per l'identificazione dei composti, le analisi dei campioni dopo SPE sono state di grande utilità dato che gli spettri registrati erano di migliore qualità se ottenuti dopo la concentrazione e con la eliminazione degli interferenti. Del resto questa è una delle ragioni principali del vasto impiego di tecniche SPE per la preparazione dei campioni per le analisi target. I composti identificati nei vini fanno parte di numerose categorie di metaboliti primari o secondari come polifenoli (pigmenti, flavonoidi, tannini, stilbeni, acidi fenolici, acidi cinnamici etc.), carboidrati, bioammine, acidi organici, amino acidi, acidi grassi, esteri, etc.

**Tabella 1. Elenco dei composti di cui è stata completata l'annotazione**

compound	rt (min)	m/z ESI (-)	m/z ESI (+)
<u>pigments</u>			
malvidin 3-glucoside gallo catechin	15.70	-	797.1923
malvidin 3-glucoside catechin	18.40	-	781.1974
delphinidin 3-glucoside*	21.03	463.0872	465.1028
cyanidin 3-glucoside*	22.30	447.0921	449.1073
petunidin 3-glucoside*	22.50	477.1029	479.1180
pyrano delphinidin 3-glucoside	23.07	-	489.1023
carboxypyran delphinidin 3-glucoside	23.82	-	533.0927
peonidin 3-glucoside*	24.02	461.1079	463.1232
malvidin 3-glucoside*	24.25	491.1176	493.1336
carboxypyran cyanidin 3-glucoside	25.47	-	517.0945
pyrano petunidin 3-glucoside	25.62	-	503.1184
carboxypyran petunidin 3-glucoside	26.43	-	547.1086
myricetin 3-glycoside	26.78	479.8312	-
pyrano peonidin 3-glucoside	26.82	-	487.1229
petunidin 3-glucoside ethyl-catechin	26.99	-	795.2131

## Risultati e Discussione

## linea di ricerca

pyrano malvidin 3-glucoside	27.48	-	517.1341
petunidin 3-glucoside ethyl-epicatechin	27.97	-	795.2131
carboxypyranol malvidin 3-glucoside	28.42	-	561.1227
peonidin 3-(6'-acetyl)-glucoside ethyl-catechin	28.68	-	779.2242
malvidin 3-(6'-acetyl)-glucoside*	28.90	-	535.1443
malvidin 3-glucoside ethyl-catechin	28.94	-	809.2286
malvidin 3-glucoside ethyl-gallocatechin	29.02	-	825.2155
peonidin 3-(6'-acetyl)-glucoside*	29.20	503.1195	505.1340
malvidin 3-glucoside ethyl-gallocatechin	29.26	-	825.2221
peonidin 3-(6'-acetyl)-glucoside ethyl-catechin	29.69	-	779.2141
malvidin 3-glucoside ethyl-catechin	29.71	-	809.2316
malvidin 3-glucoside ethyl-catechin	30.14	-	809.2368
peonidin 3-(6'-acetyl)-glucoside ethyl-catechin	30.40	-	779.2192
carboxypyranol malvidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	31.66	-	707.1607
cyanidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	31.70	-	595.1446
petunidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside	31.76	-	625.1552
malvidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside 4-vinylsyringol	31.90	-	787.1868
malvidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside*	32.40	637.1559	639.1708
peonidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside*	32.97	607.1459	609.1603
petunidin 3-glucoside 4-vinylcatechol	33.82	-	611.1395
petunidin 3-glucoside-4-vinylphenol	34.76	-	595.1446
malvidin 3-glucoside 4-vinylcatechol	35.23	-	625.1552
malvidin 3-glucoside 4-vinylphenol	36.11	-	609.1603
malvidin 3-glucoside 4-vinylguaiacol	36.39	-	639.1708
malvidin 3-(6'- <i>p</i> -coumaroyl)-glucoside 4-vinylphenol	37.90	-	755.1954
<u>tannins</u>			
prodelphinidin	11.46		611.1395
procyanidin C type	12.99	865.2121	867.2136
prodelphinidin	13.86		611.1395
prodelphinidin	14.09	593.1294	595.1435
gallocatechin*	14.51	305.0663	307.0801
prodelphinidin	14.90	593.1296	595.1435
prodelphinidin	15.22	593.1263	595.1435
procyanidin	16.30	1169.2650	-
prodelphinidin	16.44	593.1334	595.1435
procyanidin	16.60	1169.2650	-
procyanidin B3*	16.86	577.1346	579.1500
prodelphinidin	17.03	-	611.1395
procyanidin B1*	17.29	577.1343	579.1500
procyanidin tetramer	17.45	1153.2643	-
procyanidin C type	17.55	865.1995	867.2136
prodelphinidin	17.74	593.1327	595.1435

## Risultati e Discussione

## linea di ricerca

procyanidin C type	18.36	865.1995	867.2136
epigallocatechin*	18.50	305.0666	139.0386
procianidin B4*	18.50	577.1354	579.1495
catechin*	18.70	289.0703	291.0865
prodelphinidin	18.87	593.1327	595.1435
prodelphinidin	19.48	593.1235	595.1435
procianidin B2*	19.92	577.1356	579.1506
procyanidin C	21.47	865.2004	867.2136
procyanidin B type	21.70	577.1356	-
epicatechin*	22.23	289.0722	313.0678
<u>flavonoids</u>			
dihydromyricetin compound	20.34	319.0443	-
taxifolin*	25.27	303.0502	-
quercetin diglucoside	26.08	625.1410	-
isorhamnetin/rhamnetin diglucoside	26.10	625.1415	-
myricetin 3-glucuronide	26.44	493.0624	-
miricitrin*	28.30	463.0874	465.1028
quercetin 3-arabinoside*	28.30	-	303.0497
myricitin 3-rhamnoside*	28.30	-	319.0453
quercetin-3-glucuronide*	28.67	477.0667	303.0501
quercetin 3-glucoside*	29.10	463.0867	303.0513
quercetin 3-rutinoside*	29.10	-	303.0513
phloridzin*	29.60	435.1286	-
kaempferol 3-glucuronide*	30.86	461.0703	-
myricetin*	30.89	317.0289	319.0455
eriodictyol*	31.03	287.0555	-
quercitrin*	31.10	447.0917	-
isorhamnetin 3-glucoside*	31.53	477.1035	317.0656
laricitrin 3-glycoside	31.53	493.0988	-
syringetin 3-glycoside*	31.57	507.1142	347.0758
naringenin*	33.75	271.0601	273.0757
quercetin*	33.96	301.0344	303.0501
laricitrin*	34.67	331.0450	333.0605
kaempferol*	36.61	285.0397	-
isorhamnetin*	37.07	-	317.0656
syringetin*	37.40	345.0611	-
<u>stilbenoids</u>			
piceatanol*	26.54	243.0660	245.0806
astringin*	22.70	405.1178	-
trans-piceid*	25.30	389.1222	413.1207
trans-resveratrol*	29.10	227.0679	229.0845

## Risultati e Discussione

## linea di ricerca

<i>cis</i> -piceid*	29.20	389.1241	413.1201
<i>cis</i> -resveratrol*	31.60	227.0665	229.0845
<u>phenolic acids</u>			
gallic acid*	9.00	169.0139	-
protocatechuic acid*	13.90	153.0166	155.0346
2,6 dihydroxybenzoic*	16.90	153.0185	-
vanillic acid*	20.30	167.0321	-
caffeic acid*	20.70	179.0326	163.0389
syringic acid*	21.90	197.0419	-
benzoic acid*	26.20	-	123.0456
ellagic acid*	30.39	300.9977	303.0135
ethyl gallate*	23.04	197.0437	199.0601
ethyl caffate*	32.10	207.0635	209.0808
<u>cinnamics</u>			
<i>cis</i> -caftaric acid	14.37	311.0409	335.0378
<i>trans</i> -caftaric acid*	15.50	311.0395	335.0378
<i>cis</i> -coutaric acid	17.46	295.0495	-
<i>trans</i> -coutaric acid	18.23	295.0495	-
<i>cis</i> -fertaric acid	19.46	325.0561	-
<i>trans</i> -fertaric acid	19.76	325.0561	-
<i>p</i> -cumaric acid*	24.30	163.0383	147.0446
ethyl <i>p</i> -coumarate	35.21	-	193.0859
ethyl <i>p</i> -coumarate	35.27	191.0714	-
<u>fatty acids &amp; fatty acid esters</u>			
hexanoic acid*	30.90	-	155.0375
octanoic acid*	40.09	143.1086	-
decanoic acid*	45.71	171.1391	173.1536
dodecanoic acid	49.59	199.1704	-
tetradecanoic acid	52.37	227.2017	229.2162
9- <i>cis</i> -hexadecenoic acid*	53.18	253.2173	-
<i>cis</i> , <i>cis</i> -9,12-octadecadienoic acid*	53.60	279.2305	-
hexadecanoic acid*	54.40	255.2330	257.2486
<i>cis</i> -9-octadecenoic acid*	54.80	281.2476	-
octadecanoic acid	56.12	283.2643	-
eicosenoic acid*	56.36	309.2799	-
docosanoic acid*	58.70	339.3269	-
methyl jasmonate*	38.45	223.1340	225.1477
methyl tetradecanoate*	54.50	241.2173	243.2313
methyl <i>cis</i> -9-hexenoate*	54.90	-	269.2469
methyl <i>cis</i> , <i>cis</i> -9,12-octadecadienoate*	55.50	-	295.2622

## Risultati e Discussione

## linea di ricerca

methyl hexadecanoate*	56.43	269.2459	271.2673
methyl octadec-9-enoate*	56.63	-	297.2765
ethyl tetradecanoate	54.47	-	257.2487
ethyl pentadecanoate	55.08	269.2316	271.2630
ethyl tetradecanoate*	55.11	255.2334	257.2506
ethyl hexadecanoate	56.12	283.2643	-
ethyl octadecanoate	57.44	311.2986	-
<u>organic acids</u>			
glucuronic acid*	1.27	193.0343	-
mucic acid*	1.30	209.0279	-
glutamic acid*	1.30	-	148.0594
L-saccharopine*	1.35	275.1235	277.1369
L-threonic acid*	1.40	135.0296	-
2-keto-d-gluconic acid*	1.40	193.0341	-
D-gluconic acid*	1.40	195.0478	-
galacturonic acid*	1.40	193.0336	217.0325
5-keto-D-gluconic acid*	1.44	193.0340	-
tartaric acid*	1.52	149.0051	-
glycolic acid*	1.60	75.0086	-
glyceric acid*	1.60	105.0187	-
dehydroascorbic acid*	1.74	173.0093	-
pyruvic acid*	1.78	87.0078	-
malic acid*	2.01	133.0119	322.9698
ascorbic acid*	2.37	175.0224	-
2-ketoglutaric acid*	2.40	145.0139	-
lactic acid*	2.50	89.0236	-
maleic acid*	2.90	115.0025	-
ribonic acid or hydroxy-glutaric acid	3.16	147.0359	-
citric acid*	3.92	191.0166	-
succinic acid*	4.95	117.0177	-
citramalic acid*	5.17	147.0278	-
pantothenic acid*	14.30	218.1029	220.1176
adipic acid*	15.50	145.0502	169.0457
<i>m</i> -hydroxybenzoic acid*	17.50	-	139.0391
isopropyl malic acid*	18.13	175.0604	199.0584
abscisic acid*	31.30	263.1292	247.1335
<u>amino acids</u>			
histidine*	1.20		156.0765
arginine*	1.20		175.1197
glycine*	1.20		203.0529
alanine*	1.30		90.0559

## Risultati e Discussione

## linea di ricerca

homoserine*	1.30	-	120.0655
threonine*	1.30	-	120.0660
L-glutamine*	1.30	-	130.0461
proline*	1.59	114.0548	116.0695
valine*	2.20	-	72.0809
norvaline*	2.20	-	72.0809
leucine*	4.96	130.0871	86.0964
phenylalanine*	11.50	164.0683	120.0753
tryptophan*	16.00	203.0818	188.0710
<u>amines</u>			
uridine*	7.01	243.0603	-
spermidine*	1.02	-	146.1661
L-cystathionine*	1.22	221.0600	-
propylamine*	1.35	-	60.0822
gaba*	1.40	-	104.0713
3 indolelactic acid*	24.60	204.0661	-
tryptophol*	26.20	-	162.0875
<u>carbohydrates</u>			
hexol*	1.24	179.0546	-
hexol*	1.40	-	183.0877
pentose*	1.40	149.0448	-
hexose*	1.40	179.0550	203.0554
hexose*	1.45	-	203.0554
trehalose*	1.50	341.1068	325.1114
quinic acid*	1.61	191.0560	-
raffinose*	2.61	503.1609	-
<u>miscellaneous</u>			
choline*	1.40	-	104.1053
betaine*	1.50	-	118.0868
xanthine*	6.03	151.0244	-
glutathione ox*	9.65	611.1447	-
p-hydroxybenzaldehyde*	20.30	-	123.0443
riboflavin*	23.90	375.1301	377.1452
ursolic acid*	53.53	455.3511	-
lanosterol*	58.32	425.3639	-

\*annotation via standard

### 3.3 Effetto Ossigeno-Metallo

Tutti i composti identificati sono stati integrati separatamente e la loro tendenza nei vari esperimenti è stata valutata considerando i vari livelli di ossigeno e metallo. Da questa procedura sono stati individuati alcuni composti markers la cui concentrazione è risultata, negli esperimenti condotti, influenzata dall'ossigeno o/e dal metallo.

In letteratura i composti che principalmente sono indicati essere fortemente influenzati dalla micro-ossigenazione sono i pigmenti (**Figura 2**). Infatti questa tecnica viene utilizzata principalmente per favorire la stabilizzazione del colore dei vini rossi. Gli antociani, che sono i pigmenti responsabili del colore dei vini rossi, quando sono in forma libera (e.g. *cyanidin 3-glucoside* - **Figura 2**) hanno una bassa stabilità e tendono con il tempo a degradarsi, con risultati negativi sulla tenuta del colore del vino (Atanasova et al., 2002; Gómez-Plaza et al 2011; Cano-Lopez et al., 2006; Ribèreau-Gayon et al 2000).

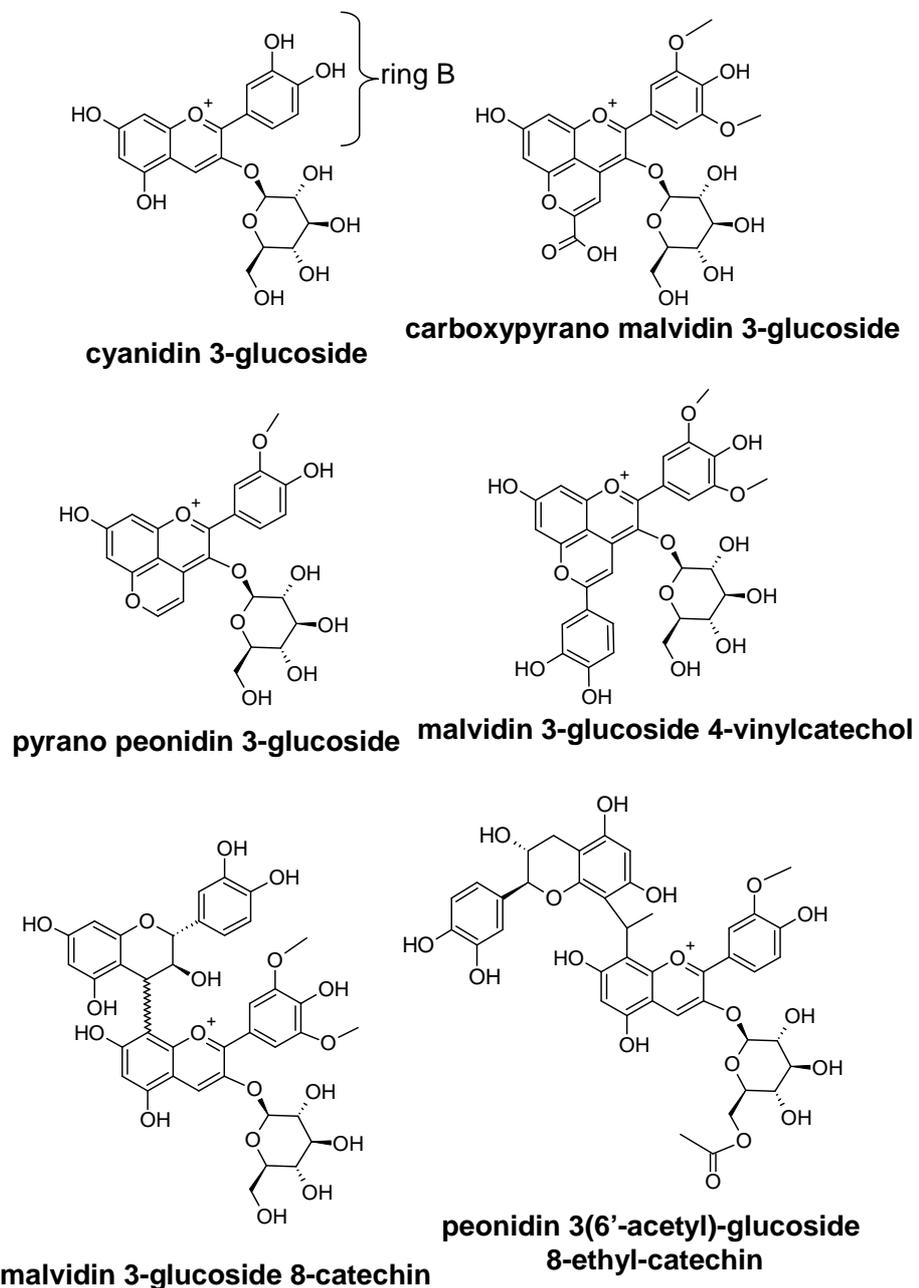
Durante la micro-ossigenazione, ed in generale l'invecchiamento dei vini, gli antociani partecipano in diverse reazioni chimiche e biochimiche che formano dei prodotti pigmenti più stabili, come:

a) reazioni fra antociani ed acidi organici (i.e. acido piruvico), o aldeidi (e.g. acetaldeide) o acidi cinnamici (e.g. acido caffeico) per dare pigmenti della serie delle vitisine (e.g. *carboxypyranol malvidin 3-glucoside* - **Figura 2**) e pinotine (e.g. *malvidin 3-glucoside 4-vinylcatechol* - **Figura 2**).

b) reazioni fra antociani e flavanoli mediante aldeidi (e.g. acetaldeide) che generano pigmenti del tipo della *peonidin 3-(6'-acetyl)-glucoside 8-ethyl-catechin* (**Figura 2**).

c) reazioni dirette fra antociani e flavanoli (monomeri, dimeri, trimeri etc di catechina e/o epicatechina), che generano pigmenti come la *malvidin 3-glucoside 8-catechin* (**Figura 2**).

Infatti, anche in questo esperimento di metabolomica non-target è stato possibile ricostruire con precisione come le varie dosi di ossigeno e metallo influiscano in modo positivo o negativo sulla concentrazione dei diversi tipi di pigmenti. Nella **Figura 3** vengono riportati alcuni esempi (I grafici completi si trovano nel materiale supplementare).



**Figura 2.** Strutture di pigmenti

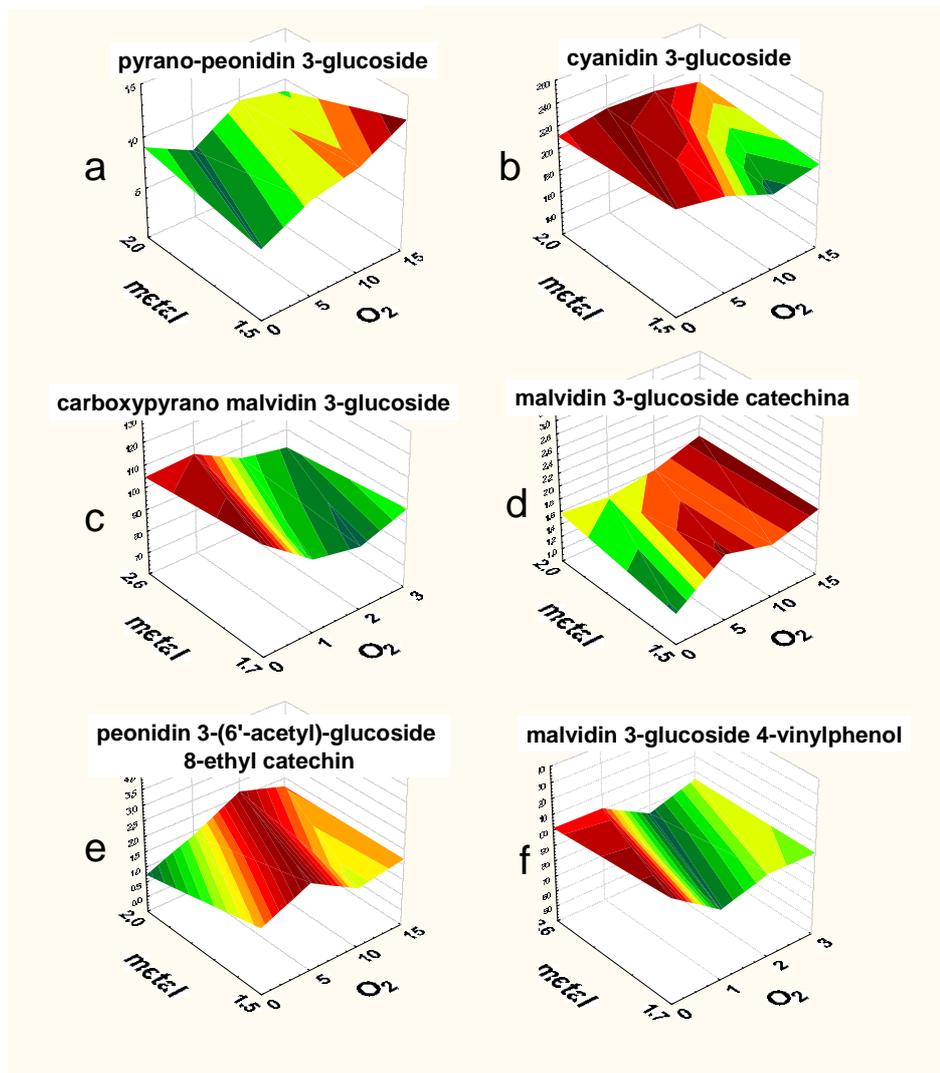
La maggior parte delle variazioni dei pigmenti dovuti alla micro-ossigenazione dei vini, sono stati molto più significativi per l'esperimento realizzato prima della fermentazione malo-lattica (pre-MLF). Anche questa osservazione è in accordo con l'esperienza pratica, e con i dati bibliografici, essendo stata dimostrata una variazione più significativa se la micro-ossidazione avviene dopo la fermentazione alcolica e subito prima di quella malo-lattica (Gómez-Plaza et al 2011).

I semplici glucosidi degli antociani, come la cianidina (**Figura 3a**), presentano una tendenza a diminuire nel tempo in presenza di maggiori dosi di ossigeno. Un altro effetto tipico della cianidina che si nota nella **Figura 3b** è che il derivato della cianidina è più stabile nei vini con concentrazione superiore di metallo. Questa caratteristica è verosimilmente dovuta alla struttura della cianidina, dove all'anello B si trovano due ossidrili in posizione orto, un parametro chimico-fisico che favorisce la formazione dei complessi con i metalli più stabili rispetto a quelli che si formano con gli antociani senza ossidrili in posizione orto nell'anello B. (Amic et al 2007; Castañeda-Ovando et al 2009).

I pigmenti della classe delle vitisine (che ricomprende pirano e carbossipirano antociani) in pre-MLF hanno la tendenza ad aumentare (e.g. *pyrano-peonidin 3 glucoside* - **Figura 2** e **Figura 3a**), mentre in micro-ossigenazione post-MLF hanno la tendenza a diminuire (e.g. *carboxypyran malvidin 3-glucoside* - **Figura 2** e **Figura 3c**). Questo andamento è tipico per le vitisine, cioè di essere tra i primi pigmenti a formarsi in condizioni di micro-ossigenazione, mentre in seguito la loro concentrazione inizia a diminuire con il proseguire del trattamento (Cejudo-Bastante et al 2011; Alcalde-Eon et al. 2006).

Fra i pigmenti favoriti dall'azione del ossigeno, sia in pre-MLF che post-MLF, vi sono i prodotti delle reazioni fra antociani e flavonoli (e.g. *malvidin 3-glucoside catechin* **Figura 2** e **Figura 3d**) e i pigmenti del tipo pinotina. Soprattutto le pinotine, ma anche i flavano-antociani, sono dei pigmenti che si formano in concentrazioni significative dopo il primo anno in vini che non hanno

subito micro-ossidazione ma sono stati conservati in bottiglia (Alcalde-Eon et al. 2006; Castañeda-Ovando et al 2009 ).



**Figura 3.** Alcuni esempi di variazione delle concentrazioni di pigmenti del vino in funzione delle dosi di ossigeno e ferro.

Va osservato che, nel nostro esperimento, alcune delle pinotine (e.g. *malvidin 3-(6'-p-coumaroyl)-glucoside 4-vinylphenol* e *malvidin 3-glucoside 4-vinylcatechol*), insieme con la maggioranza dei pigmenti tipo antociano-etil-flavonolo (e.g. *peonidin 3-(6'-acetyl)-glucoside 8-ethyl-catechin* **Figura 2** e **Figura 3e**) hanno presentato dei massimi alle medie dosi di ossigeno. E' un aspetto questo particolarmente interessante considerando che ci attendiamo, almeno per alcune delle reazioni osservate, un effetto bifasico (quindi non lineare) dell'ossigeno apportato. Quelle classi di composti che seguono questo andamento sono dei possibili marcatori di processo che potrebbero aiutarci a capire quando la dose somministrata è ottimale.

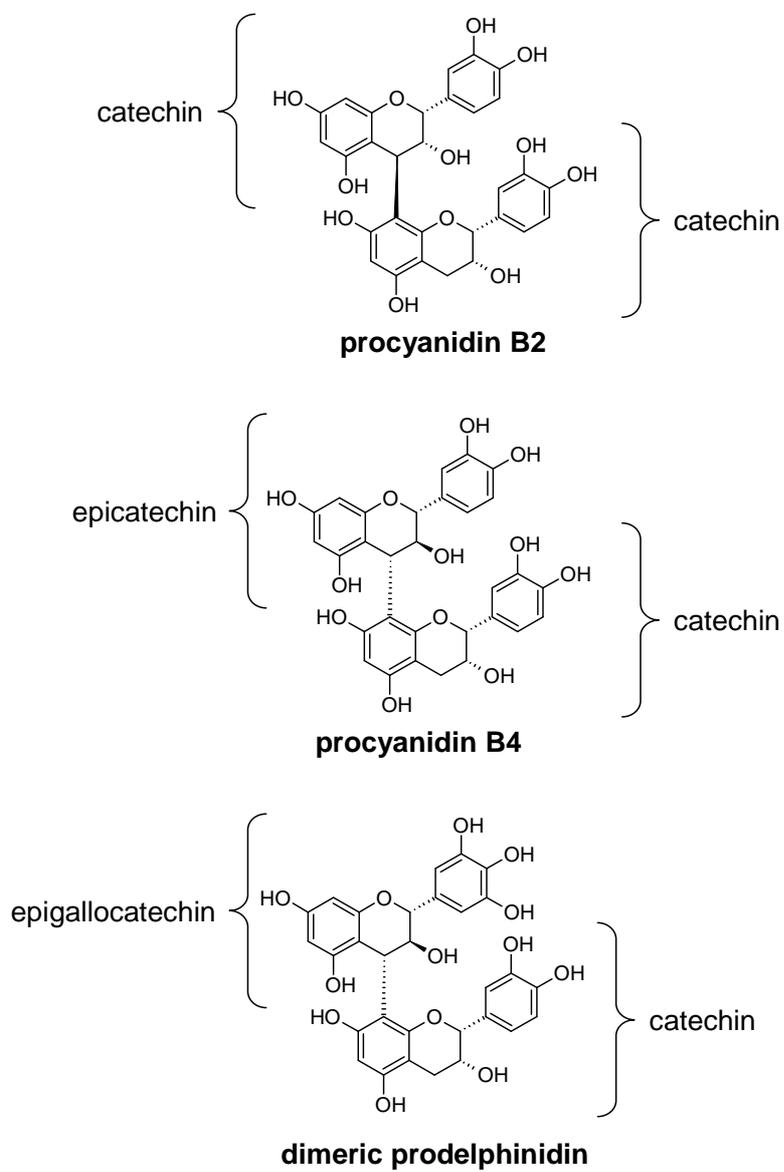
Alcuni altri pigmenti come la *malvidin 3-glucoside 4-vinylphenol* (**Figura 3f**), in post-MLF, hanno presentato dei minimi nelle medie dosi di ossigeno. Nonostante le dosi di ossigeno testate in questi due esperimenti (pre-MLF e post-MLF) fossero in un ristretto range di concentrazioni, tipici della vinificazione reale di vini Sangiovese e senza aggiungere per scopi sperimentali nessun valore estremo (di forzatura), sono stati diversi i composti che hanno presentato un effetto bifasico, cioè con delle concentrazioni massime o minime alle medie dosi di ossigeno. Questo fenomeno era stato da noi ipotizzato in fase di impostazione dell'esperimento. La pratica invalsa negli studi di laboratorio, di espandere lo studio a valori estremi e superiori – talora anche 1 o 2 ordini di grandezza - a quelli normalmente considerati ottimali, facilita la evidenziazione delle relazioni ma sposta il campo di osservazione verso valori superiori, dove frequentemente il comportamento è lineare. Questo non è specifico del vino ma è comune a diversi settori di ricerca dove l'ormesi è stata non sufficientemente investigata, quali ad esempio la tossicologia e la nutrizione (Calabrese, 2008-2009; Hayes, 2010).

Studi fatti in soluzioni modello simulanti la composizione del vino hanno proposto che il meccanismo della formazione delle pinotine avviene tramite una reazione fra l'antociano monomero ed un acido cinnamico, cioè ad esempio fra la *malvidin 3-glucoside* e l'acido caffeico nel caso della formazione della *malvidin 3-glucoside 4-vinylcatechol* (Schwarz et al 2003). Alla luce della similarità della

struttura delle vitisine e le pinotine, e in più dal fatto che le pinotine si formano durante la diminuzione delle vitisine, si può ipotizzare anche un altro meccanismo alternativo per la formazione delle pinotine che abbia come intermedio le vitisine. Una ipotesi da approfondire perché se confermata evidenzia la capacità degli esperimenti di metabolomica di fornire un quadro particolarmente completo delle complesse ed interconnesse reazioni.

Un gruppo di pigmenti per i quali vale la pena tentare di correlare il loro andamento con la concentrazione di acetaldeide fra i due esperimenti, pre-MLF and post-MLF (vedi anche materiale supplementare) sono quelli del tipo antociano-etil-flavonolo (e.g. *malvidin 3-glucoside 8-ethyl-catechin* e *peonidin 3-(6'-acetyl)-glucoside 8-ethyl-catechin*). Il loro profilo pre-MLF presenta dei massimi alle dosi intermedie di ossigeno, cioè ha un effetto bifasico entro le tesi studiate. All'esperimento post-MLF questi pigmenti hanno ancora un leggero aumento correlato con le dosi di ossigeno fino alla massima dose di ossigeno testata (3 mg/L/mese). D'altra parte, la concentrazione dell'acetaldeide pre-MLF cresce fino ai valori medi di ossigeno e poi si stabilizza, mentre in post-MLF ha una relazione proporzionale in tutto l'intervallo dei valori di ossigeno provati (vedi anche materiale supplementare). Siccome per la formazione di questi pigmenti, l'acetaldeide è uno dei tre elementi che reagiscono insieme per formare l'antociano-etil-flavonolo (Drinkine et al 2007), la differenza dell'andamento di questi pigmenti tra pre- e post-MLF potrebbe essere spiegata anche dal turnover della acetaldeide, la quale si forma a seguito della ossidazione e partecipa in diverse reazioni. Altre reazioni dirette possono in ipotesi essere più favorite rispetto a quella degli antociano-etil-flavonoli che richiede un meccanismo multistadio in cui partecipano tre separate molecole.

Peraltro, fra i composti sperimentalmente trovati correlati con il livello di ossigeno, oltre ai pigmenti, rientrano anche ammine, amminoacidi, tannini, acidi grassi, acidi fenolici, acidi organici, acidi cinnamici e i loro esteri.



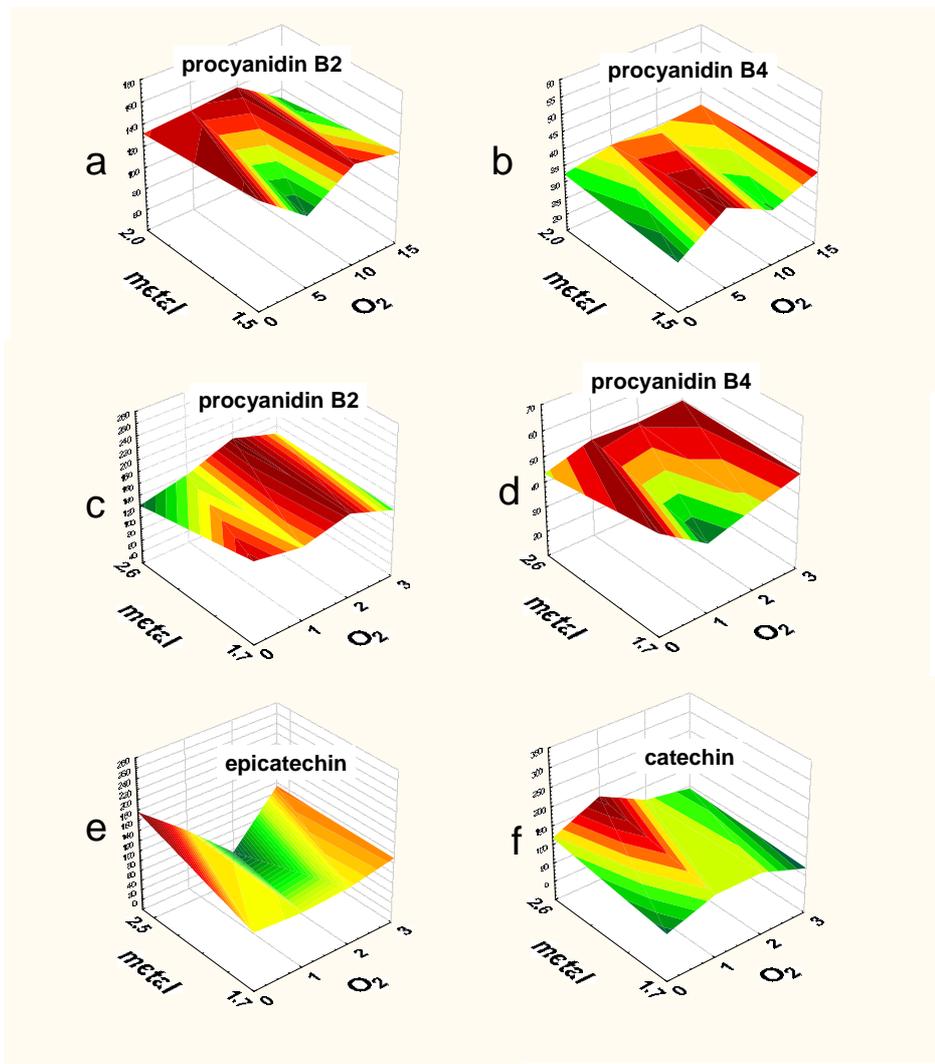
**Figura 4.** Strutture di procianidine e prodelphinidine

I tannini da una parte reagiscono con gli antociani e aiutano così la stabilità del colore dei vini rossi; e dall'altra parte reagiscono anche fra di loro e/o con altri composti, creando dei polimeri i quali migliorano il gusto e la struttura dei vini (Mattivi et al. 2009). È stato riportato che tra le catechine, la (-)-epicatechina reagisce più fortemente in presenza di ossigeno, rispetto alla (+)-catechina. In più, nel caso dei dimeri tipo B, quelli dove la parte superiore della struttura è (+)-catechina reagiscono più velocemente rispetto a quelli con (-)-epicatechina (Ribèreau-Gayon et al 2000).

La correlazione del profilo di questi composti con l'ossigeno è stata riscontrata anche nel nostro esperimento. In particolare, le procianidine del tipo B (quelle più comuni, con il legame interflavanico 4 → 8), nell'esperimento condotto prima della fermentazione malolattica, potrebbero essere divise in due gruppi in base al tipo di struttura presente come unità superiore del dimerico (**Figura 4**). Le *procyanidin B3* e *B4*, dove il flavonolo superiore è la *catechin*, dimostrano dei massimi alle medie dosi di ossigeno. L'effetto diverso si nota per le *procyanidin B1* e *B2*, dove il flavonolo superiore è la *epicatechin* (**Figura 5a-5b**).

Gli stessi composti, durante l'esperimento post-MLF, possono di nuovo essere divisi con lo stesso modo, anche se questa volta presentano dei effetti diversi. Le *procyanidin B1* e *B2* aumentano con l'aumento della dosi di ossigeno, invece le *B3* e *B4* presentano dei minimi alle dosi medie (**Figura 5c-5d**).

Anche i building block di questi composti, ossia i due flavanoli monomeri *catechin* ed *epicatechin*, presentano un andamento influenzato non solo dalla dosi di ossigeno ma anche dalla dosi di metallo (**Figura 5e-5f**). Questa potrebbe essere una informazione importante, non necessariamente per i vini Sangiovese, dove nel nostro caso in base alla analisi target LC-MS (Mattivi et al, 2009) avevamo livelli di partenza di flavanoli monomeri di circa 52 mg/L di cui 28 e 13 mg/L rispettivamente per catechina ed epicatechina, 9 di gallo catechina e 2 di epigallo catechina, ma soprattutto per altre varietà di vino che generano vini giovani con contenuti di diverse centinaia di mg/l in questi composti, quali ad esempio Pinot Nero, Nebbiolo, Sagrantino di Montefalco.



**Figura 5.** Alcuni esempi di variazione delle concentrazione di diversi derivati della catechina del vino in funzione delle dosi di ossigeno e ferro.

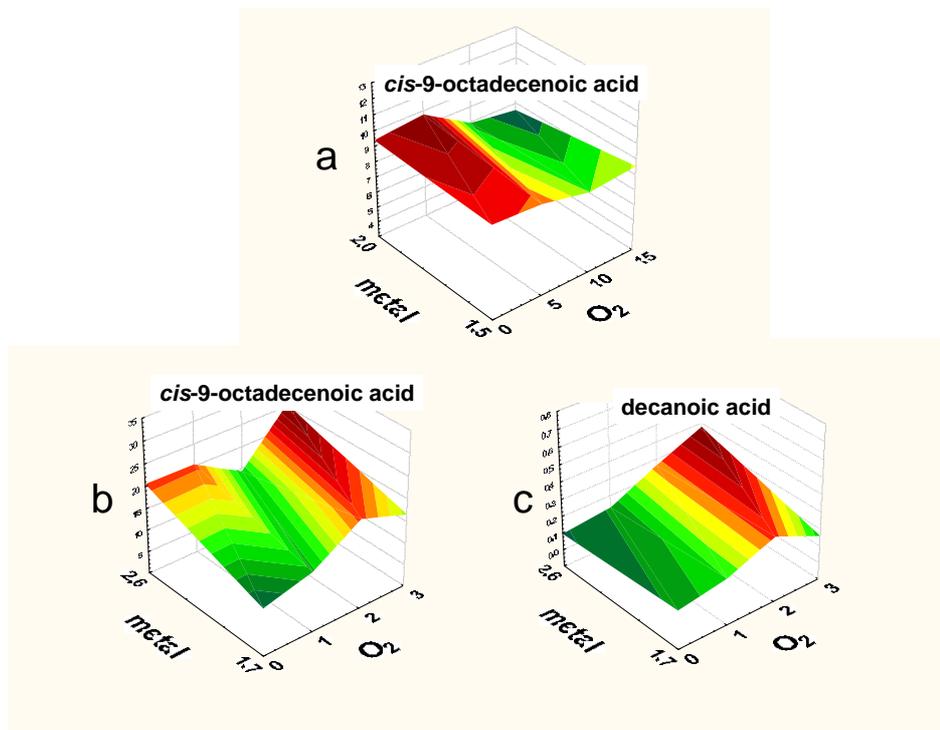
Pure le prodelfinidine dimeriche (**Figura 4**), del tipo gallocatechina-catechina, e le procianidine del tipo C identificate in questo studio hanno presentato dei profili molto interessanti. In pochi casi avevano una correlazione lineare positiva con la dose di ossigeno, ma la regola era un effetto bifasico, facendo questa classe di composti un altro importante generatore di marcatori per ottimizzare la tecnica di micro-ossigenazione, con analisi non target.

Questo è particolarmente interessante se consideriamo la composizione dei tannini, caratterizzati subito prima dell'inizio delle prove tramite analisi LC-MS dopo depolimerizzazione con floroglucinolo (Gris et al., 2011). Le procianidine nel Sangiovese risultavano piuttosto complesse, con un elevato grado medio di polimerizzazione (9.5), quindi con un peso medio intorno ai 3000 Dalton. La presenza di proantocianidine era dell'ordine di 950 mg/L, di cui 94 mg/L circa come unità terminali ed il restante 90% come unità superiori. Le unità terminali erano costituite per circa 53 mg/L da catechina, seguita da epicatechina (23 mg/L), gallocatechina (13 mg/L) ed epigallocatechina (5 mg/L). Invece le unità superiori avevano una composizione marcatamente differente, essendo costituite essenzialmente da unità di epigallocatechina (476 mg/L) ed epicatechina (347 mg/L) con copresenza solo in tracce di catechina (11 mg/L) ed epicatechina gallata (25 mg/L).

Un altro gruppo di metaboliti secondari che hanno mostrato di essere influenzati dalle dosi di ossigeno sono gli acidi grassi. Nel caso del *cis-9-octadecenoic acid* (acido oleico) la correlazione era negativa per l'esperimento pre-MLF (**Figura 6a**), ma positiva per l'esperimento post-MLF (**Figura 6b-6c**).

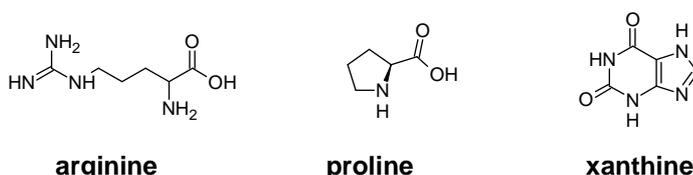
In generale la maggior parte degli acidi grassi ed i loro metil ed etil esteri hanno un effetto simile a quello dell'acido oleico per l'esperimento post-MLF (**Figura 6b-6c**). Schmarr et al hanno dimostrato usando un sistema di gascromatografia bidimensionale accoppiata con uno spettrometro a triplo quadrupolo una elevata correlazione positiva fra la quantità di ossigeno usato in condizioni di micro-ossigenazione dei vini e gli esteri etilici di acidi grassi a media catena (etil octanoato e etil decanoato) in fase pre-MLF, e gli esteri etilici di lunga catena (etil decaesanoato) in fase post-MLF (Schmarr et al 2010). Quale sia il meccanismo di questa variazione

ancora non è noto. Potrebbe essere sia il risultato di una reazione chimica ma è decisamente più probabile sia un conseguenza di reazioni enzimatiche. Ad esempio i *Brettanomyces*, che sono microorganismi che appartengono molto spesso alla microflora dei vini invecchiati in botti di legno in post-MLF, anche in vini sottoposti a micro-ossigenazione, possono aumentare la concentrazione nei vini degli acidi grassi e dei loro metil esteri, soprattutto degli acidi tetradecanoico e 9-*cis* esadecanoico (Malfeito-Ferreira et al 1997; Gomez-Plaza et al 2011).



**Figura 6.** Alcuni esempi di variazione delle concentrazioni di acidi grassi del vino in funzione delle dosi di ossigeno e ferro, pre-MLF (a) e post-MLF (b and c).

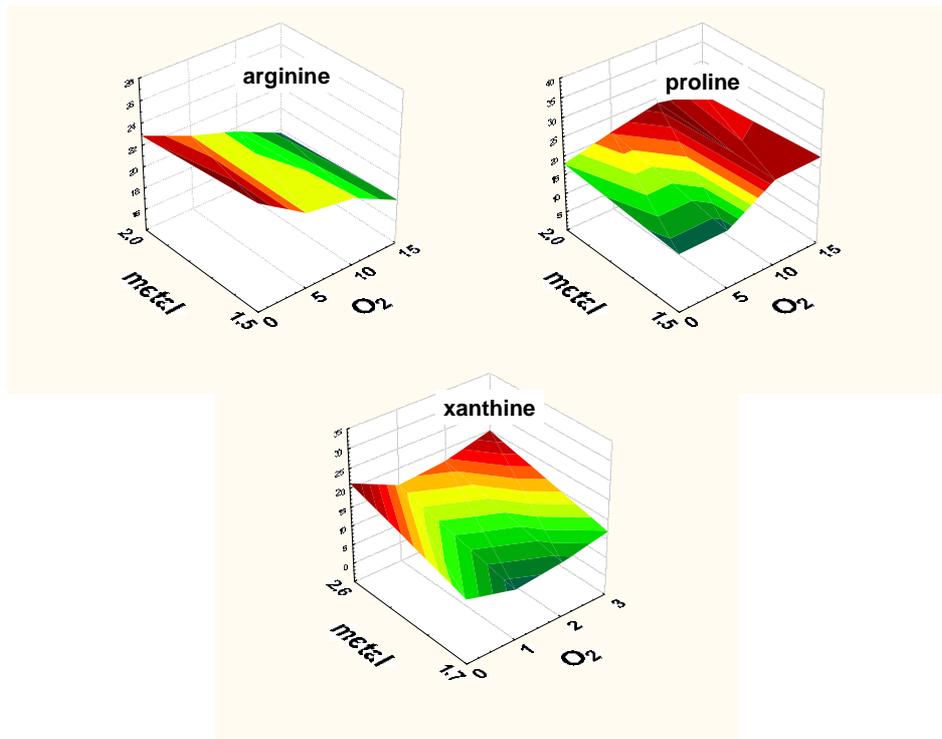
*Arginine* e *proline*, due dei più importanti amino acidi del vino hanno delle correlazioni diverse con le dosi di ossigeno (pre-MLF), ossia negativa (in diminuzione) per *l'arginine* e positiva (in aumento) per la *prolina* (**Figure 7 e 8**). Vale la pena di dire che finora nessuno studio ha mai riportato che questi composti siano influenzati dalla micro-ossigenazione.



**Figura 7.** Strutture di tre composti amminici studiati in questo lavoro

*L'arginine* è un amminoacido basico, cioè in un ambiente acido, come il vino, ha una carica positiva al suo gruppo guanidinico, che può essere facilmente delocalizzata causa il doppio legame, generare dei doppi legami, reagire con specie attive e formare nuovi composti (**Figura 7**). Per via enzimatica *l'arginine* partecipa a diverse reazioni che producono ammine biogene (per decarbossilazione, può produrre agmatina da cui si formano putrescina, spermina e spermidina; per deaminazione citrullina e ornitina), responsabili di alcuni difetti dei vini.

Un altro composto che in letteratura non è stato riportato finora essere influenzato dalla micro-ossigenazione è la *xanthine* (**Figura 7**), un alcaloide e base purinica. Il metabolismo di questo alcaloide è dall'enzima xantina ossidasi, che genera *xanthine* dalla ipoxantina e poi acido urico dalla *xanthine*, e viene catalizzato dal ferro in condizioni ossidative. La *xanthine* nel nostro esperimento (**Figura 8**) in post-MLF è stato uno dei pochi composti che hanno presentato una correlazione così chiara con le dosi del metallo (Luo et al 2001).



**Figura 8.** Alcuni esempi di variazione delle concentrazione di derivati amminici del vino in funzione delle dosi di ossigeno e ferro.

## 4. Conclusioni

In conclusione, questa sperimentazione ha dimostrato che una analisi senza nessun tipo di preparazione dei campioni e veloce, basata sulle applicazioni della metabolomica ci ha permesso di valutare l'effetto combinato di ossigeno e metallo durante la micro-ossigenazione, prima e dopo la fermentazione malo-lattica, di un vino Sangiovese. È stato possibile indentificare e descrivere con precisione gli andamenti di diversi metaboliti primari (e.g. carboidrati, ammino acidi) e secondari (polifenoli, acidi grassi, etc), già noti per la loro importanza in questa tecnica e allo stesso tempo di generare nuove ipotesi, avendo portato alla luce elementi sperimentali nuovi, non emersi da esperimenti precedenti condotti con tecniche convenzionali. E' in preparazione una discussione più approfondita ed articolata di questi risultati, che ricomprende anche gli aspetti biochimici e sensoriali, che sarà oggetto di una pubblicazione scientifica, e di presentazione a congressi nazionali ed internazionali nei prossimi mesi.

## 5. Bibliografia

Alcalde Eon, C., Escribano-Bailon, M. T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing. A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, 563, 283-254.

Amic, D., Davidovic-Amic, D., Beslo, D., Rastija, V., Lucic, B., & Trinajstic, N. (2007). SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids. *Current Medicinal Chemistry*, 827-845.

Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenols changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta*, 458, 15-27.

Cano-Lopez, M., Pardo-Minguez, F., Lopez-Roca, J. M., & Gomez-Plaza. (2006) Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57 (3), 325-331.

Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernandez, M. L., Paez-Hernandez, M. E., Rodriguez, J. A., & Galan-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.

Calabrese, E.J. (2008). Hormesis: Why it is important to Toxicology and Toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1451–1474.

Calabrese, E.J. (2009). Getting the dose–response wrong: why hormesis became marginalized and the threshold model accepted. *Archives of Toxicology*, 83, 227–247.

Cejudo-Bastante, M. J., Hermosillo-Gutierrez, I., & Pérez-Coello, M. S. (2011). Micro-oxygenation and oak chips treatment of red wine: Effects on colour-related phenolics, volatile composition and sensory characteristics. Part I: Petit Verdot wines. *Food Chemistry*, 124, 727-737.

Cuadros-Inostroza, A., Giavalisco, P., Kummel, J., Eckardt, A., Willmitzer, L., & Pena-Cortes, H. (2010) Discrimination of wine

attributes by metabolome analysis. *Analytical Chemistry*, 82, 3573-3580.

Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54 (2), 73-85.

Drinkine, J., Lopes, P., Kennedy, J. A., Teissedre, P., & Saucier, C. (2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6292-6299.

Gomez-Plaza, E., & Cano-Lopez, M. (2011). A review on micro-oxygenation of red wine: Claims, benefits and underlying chemistry. *Food Chemistry*, 125, 1131-1140.

Hayes, D.P. (2010). Nutritional Hormesis and Aging NUTRITIONAL HORMESIS AND AGING. *Dose-Response*, 8, 10-15.

Liger-Belair, G, Cilindre, C., Gougeon, R. D., Lucio, M., Jeandet, M., Gebefugi, I., & Schmitt-Kopplin, P. (2009). Unraveling different chemical fingerprints between a champagne wine and its aerosols. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 106, 16545-16549.

Luo, G., Qi, D., Zheng, Y., Mu, Y., Yan, G., Yang, T., & Shen, J. (2001). ESR studies on reaction of saccharide with the free radicals generated from the xanthine oxidase/hypoxanthine system containing iron. *FEBS Letters*, 492, 29-32.

Malfeito-Ferreira, M., Tareco, M., & Loureico, V. (1997). Fatty acid profiling: a feasible typing system to trace yeast contamination in wine bottling plants. *International Journal of Food Microbiology*, 38, 143-155.

Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D., & Trainotti, D. (2009). Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 27-35.

Parish, M., Wollan, D., & Micro-oxygenation. A review. *The Australian Grapegrower and Winemaker*, 438a, 47-50.

Ribèreau-Gayon, Glories, Y., Mayjean, A., & Dubourdieu, D. (2000). *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine stabilization and Treatments*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypothesis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57 (23), 306-312.

Schmarr, H., Bernhardt, J., Fischer, U., Stefan, A., Muller, P., & Durner, D. (2010) Two dimensional gas chromatography profiling as a tool for a rapid screening of the changes in volatile composition occurring due to microoxygenation of red wine. *Analytica Chimica Acta*, 672, 114-123.

Schwarz, M., Wabnitz, T. C., & Winterhalter, P. (2003). Pathway leading the formation of anthocyanins-vinylphenol adducts and related pigments in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3682-3687.

Theodoridis, G., Gika, H., Franceschi, P., Caputi, L., Arapitsas, P., Scholz, M., Masuero, D., Wehrens, R., Vrhovsek, U., & Mattivi, F. (submitted). LC-MS based global metabolite profiling of grapes: solvent extraction protocol optimization. *Analytical Chemistry*.

Vaclavik, L., Lacina, O., Hajslova, J., & Zweigenbaum, J. (2011). The use of high performance liquid chromatography quadruple time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for the discrimination and the classification of red wines according to their variety. *Analytica Chimica Acta*, 645, 56-63.