



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

DIPARTIMENTO DI SCIENZE E INNOVAZIONE TECNOLOGICA

TESI DI DOTTORATO IN SCIENZE CHIMICHE – XXVI° CICLO

**POTERE ANTIOSSIDANTE E
TRACCIABILITA' DI ALCUNI VINI ROSSI
ITALIANI**

Candidata: Dr. Federica Bonello

Tutor: Prof. Domenico Osella

Coordinatore: Prof. Domenico Osella

Desidero ricordare tutti coloro che mi hanno aiutato nella stesura della tesi con suggerimenti, critiche ed osservazioni: a loro va la mia gratitudine.

Prima di tutto vorrei ringraziare il prof. Domenico Osella, in qualità di relatore della mia tesi, per avermi saputo guidare e indirizzare in questa attività di ricerca e per avermi proposto questo progetto che si è rivelato molto interessante.

Ringrazio, inoltre, il professor Maurizio Aceto e la professoressa Valentina Gianotti per la grande disponibilità e cortesia dimostratemi, e per tutto l'aiuto fornito durante la stesura della tesi.

Proseguo con il dottor Claudio Cassino: senza il suo supporto e la sua guida sapiente questa tesi non esisterebbe.

Un ringraziamento infine al dottor Davide Musso che mi ha supportato durante le analisi di laboratorio.

Dedico questo lavoro ai miei genitori, a mio marito e ai miei figli Gabriele e Andrea.

SOMMARIO

PREFAZIONE.....	5
<i>SCOPO DEL LAVORO</i>	7
CONSIDERAZIONI INTRODUTTIVE.....	9
IL POTERE ANTIOSSIDANTE DEL VINO.....	10
<i>CENNI SULLA COMPOSIZIONE CHIMICA DEL VINO</i>	11
<i>I COMPOSTI FENOLICI DALL'UVA AL VINO</i>	12
UVA.....	12
<i>DALL'UVA AL MOSTO</i>	14
<i>DAL MOSTO AL VINO</i>	14
VINO	15
<i>RUOLO DEI POLIFENOLI NEL VINO</i>	16
<i>STRUTTURA CHIMICA DEI POLIFENOLI</i>	16
Acidi fenolici.....	17
Eterocicli ossigenati.....	19
Antociani	19
Flavani	20
Flavonoli	21
Idrossistilbeni	22
CENNI FARMACOLOGICI	23
<i>ASPETTI POSITIVI DEL CONSUMO DI VINO</i>	24
INFLUENZA DELLE TECNICHE DI VINIFICAZIONE.....	29
<i>PREMESSA</i>	30
<i>DIFFUSIONE DEI COMPOSTI FENOLICI</i>	30
TERRE RARE	32
<i>DEFINIZIONE</i>	34
<i>CONCENTRAZIONE E DISTRIBUZIONE NELLE PIANTE</i>	36
<i>RELAZIONE SUOLO-PIANTA</i>	36
PARTE SPERIMENTALE.....	38
<i>STRUMENTAZIONE UTILIZZATA PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE DEL VINO</i>	39
Spettrofotometria Uv-Visibile	39
Analisi cromatografiche	41
Analisi EPR.....	42
<i>STRUMENTAZIONE UTILIZZATA PER LA DETERMINAZIONE DELLE TERRE RARE</i>	52
Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry.....	52
<i>METODOLOGIE DI ANALISI</i>	54
Determinazione del pH	54
Determinazione del grado alcolico	54
Determinazione dell'anidride solforosa libera (per distillazione).....	55
Indice di polifenoli totali	56
Indice di antociani totali e flavonoidi totali	57
Indice di proantocianidine	59
Profilo HPLC degli esteri tartarici degli acidi idrossicinnamici (HCTA) e dei flavonoli.....	59
Determinazione del potere antiossidante tramite EPR	62
<i>SELEZIONE DEI CAMPIONI PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE</i>	65
<i>TECNICHE DI VINIFICAZIONE UTILIZZATE PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE</i>	66
Vinificazione tradizionale	66

Vinificazione con criomacerazione.....	67
Vinificazione con macerazione post-fermentativa	67
Vinificazione senza semi con affinamento in acciaio e in barrique	67
Affinamento in barrique.....	68
<i>METODI DI CAMPIONAMENTO.....</i>	<i>69</i>
Campionamento e preparazione dei terreni per la determinazione delle terre rare.....	69
Campionamento e preparazione dei campioni di uva per la determinazione delle terre rare	70
Metodi di campionamento e preparazione dei campioni di mosto e vino per la determinazione delle terre rare	71
<i>TECNICHE DI VINIFICAZIONE UTILIZZATE PER LA DETERMINAZIONE DELLE TERRE RARE.....</i>	<i>72</i>
Vinificazione in rosso.....	72
Vinificazione in rosato.....	72
<i>DETERMINAZIONE DELLE TERRE RARE MEDIANTE ICP-MS.....</i>	<i>74</i>
RISULTATI:	75
Il potere antiossidante dei polifenoli	75
<i>DISCUSSIONE</i>	<i>81</i>
RISULTATI:	91
Terre rare.....	91
<i>DISTRIBUZIONE DI REE NELLE DIVERSE PARTI DELL'ACINO.....</i>	<i>95</i>
<i>CONFRONTO TRA SUOLO E MOSTO</i>	<i>97</i>
<i>EFFETTI DEI PROCESSI DI VINIFICAZIONE</i>	<i>99</i>
Filiera a	100
Filiera b.....	102
L'analisi multivariata	105
CONCLUSIONI.....	107
<i>POTERE ANTIOSSIDANTE DEL VINO.....</i>	<i>108</i>
<i>CONTENUTO IN TERRE RARE</i>	<i>109</i>
BIBLIOGRAFIA.....	110

PREFAZIONE

In un mercato vitivinicolo sempre più omologato a livello internazionale, le produzioni tipiche rappresentano un elemento fondamentale per contrastare la costante pressione dei prodotti a basso costo e bassa qualità. Per questi e altri motivi la Comunità Europea ha emanato dei regolamenti comunitari che tutelano in ambito europeo le produzioni tipiche legate all'origine geografica, al territorio e alla specificità del processo produttivo.

Finora la tutela dei prodotti tipici è stata legata, essenzialmente, ad una tracciabilità di tipo cartaceo ma, per individuare imitazioni o frodi legate a prodotti ottenuti in zone diverse da quelle di tutela, sta nascendo la necessità di una tracciabilità "oggettiva" basata, cioè, su criteri che fanno riferimento a misure scientifiche.

La comunità scientifica ha quindi sviluppato negli ultimi anni diversi metodi per **determinare l'origine degli alimenti (tra cui il vino)**, basati su parametri misurati lungo tutta la filiera produttiva che va dal terreno al prodotto finale e per **caratterizzarli dal punto di vista salutistico**.

Proprio il vino infatti (oltre ad acqua, alcol ed altre sostanze) contiene anche i polifenoli che negli ultimi anni hanno assunto notevole rilevanza anche in campo farmacologico: è stato, infatti, osservato che esercitano importanti azioni soprattutto a livello cardiaco e dei vasi sanguigni grazie all'elevato potere antiossidante. Quest'ultimo parametro è stato determinato, all'interno di questo lavoro, utilizzando **la spettroscopia di risonanza paramagnetica elettronica (EPR)** dopo la reazione del vino con una soluzione di un radicale libero organico stabile: con questa tecnica si misura direttamente la quantità di radicale presente, che decresce in funzione della quantità di antiossidanti contenuti nel vino.

La seconda parte della ricerca oggetto della presente tesi ha preso in considerazione alcuni elementi chimici naturali definiti **terre rare o lantanidi** allo scopo di trovare traccianti che possano correlare il vino con la propria area di produzione specifica (a partire dal terreno, uve, mosto fino a giungere al vino stesso). Diversi studi scientifici hanno fornito la prova che questi elementi, presenti a livello di $\mu\text{g/L}$ o meno nel vino, possono fungere da marcatori geochimici. La scelta è dettata dal fatto che questi elementi hanno ancora un limitatissimo uso antropico e tendono a rimanere maggiormente costanti rispetto a numerosi composti organici che possono essere analogamente utilizzati per lo sviluppo di metodi di tracciabilità. Tale tecnica può quindi essere utilizzata con successo per l'individuazione dell'origine geografica di un alimento, in quanto questi dati potrebbero rivestire il ruolo di 'markers' ideali.

SCOPO DEL LAVORO

Negli ultimi anni i consumatori hanno mostrato un grande interesse per i cibi fortemente legati al luogo di origine, in particolare la Food Standards Agency ha rivelato che l'etichettatura dei prodotti alimentari riportante il loro paese di origine è in cima alla lista delle richieste per i consumatori.

Le ragioni per questo rinnovato interesse è scaturito da varie ragioni:

- 1) specifiche qualità culinarie e organolettiche tipiche dei prodotti regionali;
- 2) salute;
- 3) attenzione dei media;
- 4) sfiducia nei confronti della qualità e nella sicurezza dei prodotti provenienti al di fuori della propria regione, nazione o al di fuori dell'UE;
- 5) preoccupazione per la salvaguardia dell'ambiente con metodi di produzione più rispettosi adottati produttori regionali.

L'Italia è una delle Nazioni che dispone del più elevato numero di vini D.O.C. e D.O.C.G.

Grazie a queste denominazioni il consumatore si è sentito più tutelato e il produttore ha trovato uno stimolo a migliorare la produzione. Si è trattato del primo vero strumento di tutela del consumatore sulla qualità del vino tanto da diventare, nel linguaggio comune, sinonimo di qualità, che nasce dalla caratteristica del territorio, dalla tradizione produttiva e dal rispetto da parte del produttore di procedure produttive stabilite per legge dal disciplinare della DOC che garantiscono il consumatore sulla serietà e sul rigore di pratiche produttive tese a esaltare le particolarità di quel vino e la sua assoluta naturalità e genuinità.

Il contenuto delle sostanze polifenoliche, unitamente all'origine garantita del prodotto, fornisce elementi di giudizio di grande utilità nel determinare la qualità di un vino.

Per questo motivo, la tesi si propone i seguenti scopi:

1. studio della composizione polifenolica di un elevato numero di campioni di vino provenienti da diverse zone d'Italia e valutazione del contenuto di sostanze con effetti positivi sulla salute
2. determinazione di elementi in tracce quali possibili marker geochimici presenti nel suolo ed ereditati dal prodotto per la discriminazione dei suoli di provenienza dei vini.

CONSIDERAZIONI INTRODUTTIVE

IL POTERE ANTIOSSIDANTE DEL VINO

CENNI SULLA COMPOSIZIONE CHIMICA DEL VINO

Secondo il DPR del 12 febbraio 1965, N° 162: “Il nome di vino è riservato al prodotto ottenuto dalla fermentazione alcolica totale o parziale dell’uva fresca, dell’uva ammostata o del mosto d’uva, con gradazione alcolica non inferiore ai 3/5 della gradazione complessiva”.

Il vino è una bevanda caratterizzata da una complessa composizione chimica: oltre ai macrocomponenti (acqua ed alcol etilico), contiene moltissime sostanze, come zuccheri, acidi organici, esteri, alcoli, aminoacidi, altri composti azotati, polifenoli e sostanze minerali, vitamine del complesso B in tracce, enzimi e diversi pigmenti.

Le sostanze volatili, vale a dire le molecole responsabili dell’aroma, sono rappresentate da esteri, alcoli, aldeidi, chetoni, composti terpenici e aromatici.

Responsabili del colore e dei caratteri sensoriali di astringenza e di amaro sono invece i polifenoli, composti di notevole importanza non solo per le loro caratteristiche organolettiche ma anche per il ruolo che svolgono nelle reazioni di trasformazione che avvengono durante la conservazione e l’invecchiamento del vino.

Le sostanze fenoliche, in particolare gli antociani e gli acidi fenolici, possono essere utilizzati come fattore discriminante negli studi di caratterizzazione varietale in quanto la loro biosintesi, a livello sia d’organi sia di tessuti, è strettamente correlata alla varietà (Di Stefano *et al.*, 1995), pur essendo influenzata da altri fattori quali le condizioni ambientali, agronomiche e colturali.

Alcuni studi (Finkel, 1998; Teissedre *et al.*, 1996) hanno inoltre evidenziato che i polifenoli presentano proprietà farmacologiche in quanto i flavani e gli idrossistilbeni sarebbero efficaci come vaso e cardio-protettori.

I COMPOSTI FENOLICI DALL'UVA AL VINO

I polifenoli essendo substrati di un gran numero di reazioni chimiche, subiscono diverse variazioni di struttura nel corso dell'affinamento e dell'invecchiamento del vino modificandone le caratteristiche organolettiche. Pertanto, la stima della quantità e della qualità dei polifenoli dell'uva che possono essere estratti durante la vinificazione, e anche la conoscenza della ripartizione di questi composti tra bucce e vinaccioli possono aiutare l'enologo a impostare in maniera ottimale la vinificazione in rosso (Genovese et al., 2007) così da ottenere prodotti con un tenore in polifenoli maggiore.

UVA

I composti fenolici comprendono tutta una serie di molecole aventi in comune una struttura base caratterizzata dalla presenza di un anello fenolico più o meno sostituito.

Appartengono a quella categoria di composti definiti metaboliti secondari in quanto, a differenza di zuccheri, acidi e proteine, non intervengono nelle funzioni metaboliche primarie della cellula vegetale. Comprendono acidi fenolici (acidi benzoici e idrossicinnamici), flavonoidi (antociani, flavani, flavonoli) e idrossistilbeni.

I polifenoli sono localizzati nella polpa, nei semi e nella buccia dell'uva: gli antociani sono contenuti nei vacuoli della buccia (Amrani et al., 1994) (Figura 1 e 2); i flavani sono prevalentemente legati ai polisaccaridi nei fasci fibrovascolari nella polpa, ai polisaccaridi delle pareti cellulari e alle proteine delle membrane vacuolari della buccia e a livello del tegumento esterno dei semi (Thorngate e Singleton, 1994); i flavonoli sono presenti esclusivamente nella cellula della buccia; gli acidi idrossicinnamici nella polpa e nella buccia; gli acidi benzoici nella polpa prevalentemente in forma legata.

Gli antociani e i flavonoli nell'uva si trovano solo in forma glicosilata; i flavani sono presenti sotto forma di monomeri e di polimeri, non glicosilati, ma parzialmente esterificati con acido gallico; gli acidi benzoici sono esterificati con i polisaccaridi delle membrane cellulari; gli acidi idrossicinnamici sono completamente esterificati dall'acido tartarico.

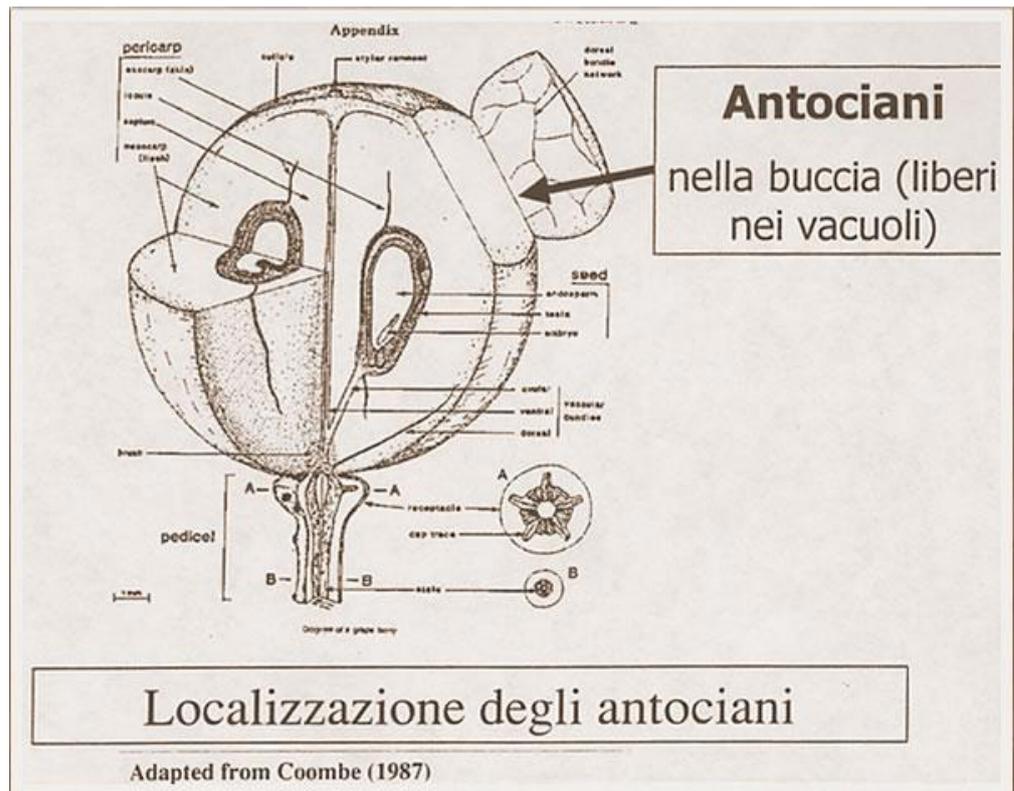


Figura 1 - Localizzazione degli antociani nell'acino

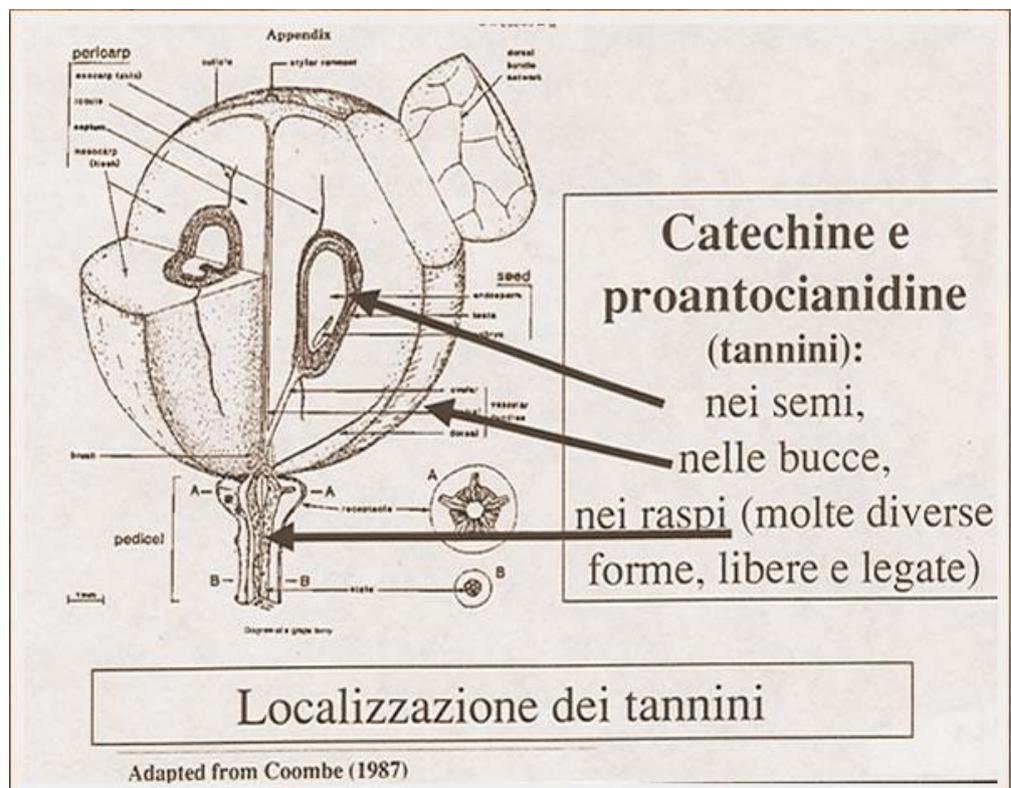


Figura 2 - Localizzazione dei tannini nell'acino

La sintesi dei polifenoli è strettamente legata alla cultivar (Di Stefano et al., 1995), infatti tali composti, in particolare gli antociani e gli acidi fenolici, vengono usati come criterio discriminante negli studi di caratterizzazione varietale (Guidoni et al., 1993; Cravero et al., 1994; Di Stefano et al., 1995; Di Stefano, 1996a e b; Mattivi et al., 1989). Anche se fattori ambientali e colturali influiscono sulla biosintesi e sul metabolismo di queste sostanze e quindi sul loro tenore nell'acino a maturità, numerosi Autori hanno constatato che il rapporto tra alcune di esse varia solo in dipendenza del vitigno di origine.

DALL'UVA AL MOSTO

Con l'ammostamento cioè con la rottura dell'acino, i composti fenolici, in particolare gli acidi idrossicinnamiltartarici della polpa e in parte gli acidi idrossicinnamiltartarici, gli antociani e i flavani della buccia passano nel mosto. In questa fase iniziano reazioni per lo più enzimatiche, ma anche chimiche, che comprendono reazioni di polimerizzazione e di ossidazione (Singleton et al., 1985; Salgues et al., 1986; Cheynier et al., 1988; Cheynier et al., 1989; Sarni et al., 1995).

Si tratta essenzialmente di reazioni a catena in cui il composto chiave è l'acido caffeiltartarico che in presenza di ossigeno viene ossidato dalle polifenolossidasi dell'uva all'o-chinone corrispondente, il quale a sua volta può essere ridotto ad acido caffeiltartarico da un altro o-difenolo (antocianine, flavonoli, catechine, proantocianidine) o da peptidi contenenti gruppi SH liberi (glutazione). Nel primo caso si formano gli o-chinoni corrispondenti agli o-difenoli su citati che possono polimerizzare, nel secondo caso composti somma quali l'acido 2-S-glutationil caffeiltartarico.

DAL MOSTO AL VINO

Se la vinificazione viene condotta in rosso, cioè in presenza delle parti solide dell'acino le sostanze contenute nella buccia e nei semi diffondono nel mosto-vino, in misura maggiore o minore a seconda del grado alcolico, della temperatura del mezzo, del tempo di

macerazione, dell'anidride solforosa aggiunta e delle operazioni meccaniche effettuate (rimontaggi e follature).

In questa fase si verificano reazioni di polimerizzazione enzimatiche, reazioni di polimerizzazione indotte dall'acetaldeide (che si forma come prodotto intermedio della fermentazione alcolica) che danno origine a pigmenti aventi lunghezza d'onda di assorbimento maggiore di quella degli antociani (Timberlake e Bridle, 1976), reazioni di ossidazione e fenomeni di coprecipitazione in cui sono coinvolti principalmente gli antociani che precipitano insieme al bitartrato di potassio.

VINO

Il vino, come tutti i sistemi biologici, è un mezzo in continua evoluzione, per cui dalla svinatura all'imbottigliamento, subisce diverse trasformazioni che variano con la tecnica di vinificazione adottata e con le modalità di conservazione e affinamento.

Le trasformazioni principali a carico dei polifenoli possono essere così riassunte:

- ◆ Idrolisi degli esteri degli acidi idrossicinnamiltartarici, dei gallati delle catechine e delle procianidine
- ◆ Idrolisi dei glicosidi delle antocianine e dei flavonoli con formazione dei rispettivi agliconi poco solubili
 - ◆ Degradazione degli antociani
 - ◆ Idrolisi dei legami C-C dei flavani con formazione di carbocationi.
 - ◆ Reazioni antociani- flavani
 - ◆ Reazioni antociani- acetaldeide
 - ◆ Reazioni flavani- acetaldeide
 - ◆ Reazioni flavani- acetaldeide-antociani
 - ◆ Reazioni iniziate dai chinoni

RUOLO DEI POLIFENOLI NEL VINO

I polifenoli sono tra le sostanze che rivestono maggior importanza nel determinare la qualità di un vino: infatti gli antociani e i pigmenti ad essi correlati (polimeri antociani-flavani) sono responsabili del colore, mentre i flavani monomeri e polimeri determinano i caratteri sensoriali di astringenza e di amaro, che contribuiscono al complesso equilibrio organolettico del prodotto.

Questi composti svolgono un ruolo importante anche in fenomeni chimico-fisici che avvengono durante l'affinamento del vino: è, infatti, ormai comunemente ritenuto che intervengono come fattori di protezione nei confronti delle precipitazioni tartariche.

Infine, in questi ultimi anni, i polifenoli hanno assunto maggior rilevanza anche in campo farmacologico. E' stato infatti osservato, come verrà più ampiamente descritto di seguito, che i composti fenolici, in particolare proantocianidine e idrossistilbeni, esercitano importanti azioni farmacologiche soprattutto a livello del cuore e dei vasi sanguigni grazie alla loro attività antiossidativa.

STRUTTURA CHIMICA DEI POLIFENOLI

Dal punto di vista chimico queste sostanze sono riconducibili alla struttura del fenolo (Figura 3), sono quindi composti che contengono uno o più gruppi idrossilici legati ad un anello aromatico che conferisce loro caratteristiche diverse rispetto ai composti con catene alifatiche, in special modo per quanto riguarda l'acidità.

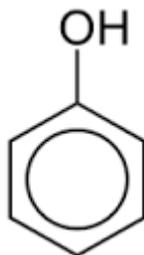


Figura 3 – Struttura chimica del fenolo

La presenza del gruppo ossidrilico attiva l'anello benzenico per le reazioni elettrofile, preferibilmente in orto o in para (Figura 4).

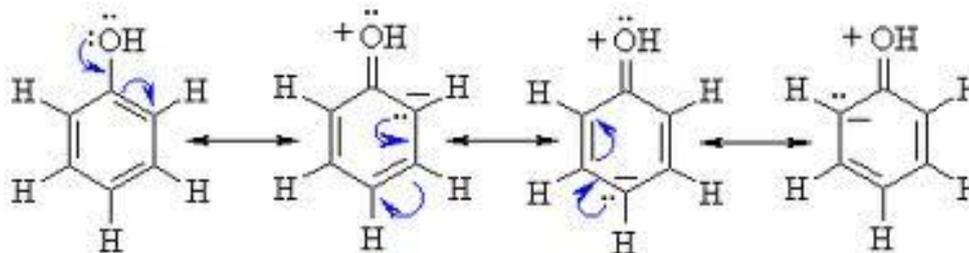


Figura 4 – Struttura di risonanza del fenolo

I composti fenolici presenti nell'uva e nel vino sono innumerevoli e dal termine più semplice, il fenolo, si arriva a composti con struttura più complessa che in relazione alle loro proprietà si possono suddividere in diverse famiglie:

1. Acidi fenolici
2. Eterocicli ossigenati
3. Idrossistilbeni

Acidi fenolici

Gli acidi fenolici sono rappresentati dai derivati dell'acido cinnamico e dell'acido benzoico.

Gli acidi della serie cinnamica, p-cumarico, caffeico e ferulico (Figura 5), nell'uva non sono liberi ma esterificati con l'acido tartarico (acidi idrossicinnamiltartarici: HCTA), e sono contenuti nel succo vacuolare delle cellule della polpa e della buccia. Nella polpa quantitativamente è più importante l'acido caffeiltartarico, mentre nelle bucce può prevalere il caffeiltartarico o il p-cumariltartarico in funzione della cultivar; l'acido feruliltartarico è presente generalmente in piccole quantità (Di Stefano e Cravero, 1989).

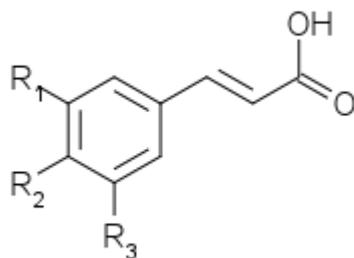


Figura 5 – acidi fenolici della serie cinnamica

Gli acidi della serie benzoica, vanillico, gallico, siringico, p-idrossibenzoico, protocatechico, salicilico ed acido gentisico (Figura 6) sono contenuti prevalentemente nella polpa ed esterificati con i polisaccaridi dei fasci fibrovascolari; nei vinaccioli si trova soprattutto acido gallico in forma libera.

Gli acidi fenolici hanno interesse chemiotassonomico in quanto è stata evidenziata la possibilità di distinguere le diverse varietà in funzione del valore, inferiore o superiore all'unità, del rapporto tra acido vanillico e acido siringico. (Di Stefano e Cravero 1989.)

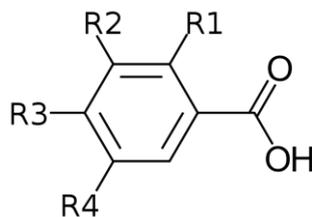


Figura 6 Acidi fenolici della serie benzoica

Nel vino ai derivati degli acidi fenolici dell'uva vengono ad affiancarsi le forme libere degli HCTA e degli acidi benzoici; di quest'ultime, allo stato attuale, non si conosce la via di formazione nel corso della vinificazione (Di Stefano et al., 1990)

Inoltre si possono riscontrare fenoli volatili collegati al metabolismo del lievito (tirosolo, 4-vinilfenolo, 4-vinilguaiacolo, 4-etilfenolo, 4-etilguaiacolo).

Eterocicli ossigenati

Gli eterocicli ossigenati sono costituiti da un gruppo di sostanze che hanno in comune, come struttura base, lo scheletro del 2-fenilbenzopirano (Figura 7).

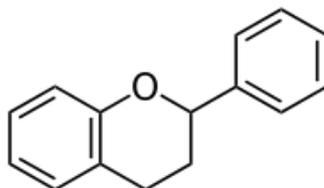


Figura 7 – Scheletro eterociclico dei flavonoidi

Nei frutti sono presenti in quantità considerevoli tre classi di eterocicli ossigenati: antociani, flavonoli e flavani.

Questi composti presentano le posizioni 3,5,7,4' sempre ossidrilate mentre si differenziano per il diverso grado di ossidazione dell'anello C e per il numero di sostituenti sull'anello B. I gruppi fenolici possono anche essere metilati (Glories, 1978).

Antociani

Gli antociani sono pigmenti che conferiscono ai frutti i loro caratteristici colori rosso, violetto e blu.

Queste sostanze sono generalmente localizzate nei vacuoli della buccia delle cultivar a bacca rossa. Il profilo antocianico delle bucce è una caratteristica varietale (Cravero e Di Stefano, 1992), mentre il tenore di antociani è collegato, oltre che alla cultivar, ai fattori climatici, alle tecniche colturali (Di Stefano et al., 1994) e allo stato sanitario della pianta (Mannini et al, 1995).

In base ai sostituenti sull'anello si distinguono cinque antocianine (glicosidi delle antocianidine): delphinidina-3-O-glucoside, cianidina-3-O-glucoside, petunina-3-O-glucoside, peonidina-3-O-glucoside e malvidina-3-O-glucoside (Figura 8).

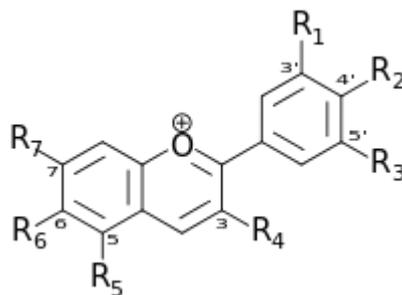


Figura 8 - Struttura del catione flavilio

Gli antociani possono quindi essere classificati, in base al numero di sostituenti all'anello B, in disostituiti (cianina, peonina) e trisostituiti (delfinina, petunina, malvina).

Il profilo delle varietà a prevalenza di antociani trisostituiti varia poco durante la maturazione dell'uva, quello delle varietà in cui sono maggiormente rappresentati i disostituiti può subire variazioni più importanti durante la maturazione o a causa di influenze ambientali.

Flavani

I flavani nell'uva sono localizzati principalmente nella bucce e nei vinaccioli. Sono rappresentati dai flavan-3-oli monomeri, o da catene oligomere e polimere. Nei semi sono presenti significative percentuali di forme monomere o a basso grado di polimerizzazione, nella buccia prevalgono invece le forme ad elevata massa molecolare.

Dalla struttura si può notare che i flavan-3-oli sono molecole chirali con centri di simmetria sul C-2 e C-3 (Figura 9a). I monomeri sono rappresentati dalla (+) catechina (Figura 9) e dalla (-) epicatechina (Figura 9b) che sono tra loro epimeri in C-3. Gli oligomeri sono molecole costituite da poche unità di catechina ed epicatechina, i polimeri da un numero di monomeri fino a 10 e sono solubili in acqua. Questi flavani polimeri sono definiti proantocianidine, poiché in ambiente acido e per riscaldamento generano antocianidine.

La struttura dei polimeri è caratterizzata da un legame interflavanico C-C tra la posizione 4 di un'unità con la posizione 8 dell'unità successiva; è possibile inoltre un legame 4-6.

I polimeri flavanici delle bucce possono essere costituiti anche da gallocatechina ed epigallocatechina. Le proantocianidine (che sono procianidine e prodelfinidine), si trovano nelle bucce, mentre nei semi sono riscontrabili solamente le procianidine.

Tali sostanze che vengono anche chiamate tannini sono quelle che conferiscono al vino la sensazione di astringenza e di amaro.

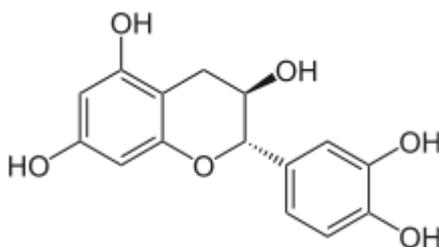


Figura 9a - Struttura della catechina

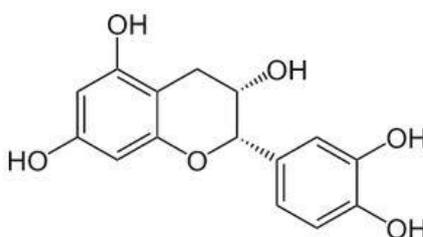


Figura 9b - Struttura della epicatechina

Dal punto di vista organolettico si può affermare che la sensazione di astringenza tende a decrescere con l'aumentare del grado di polimerizzazione (almeno fino ad $n = 3 \div 4$), per poi restare stabile, viceversa la sensazione di amaro cresce col grado di polimerizzazione e analogamente cresce il rapporto tra amaro e astringenza (Castino, 1991).

Flavonoli

Sono localizzati nelle bucce delle uve a bacca bianca e rossa; sono costituiti da una struttura centrale e da una laterale, presente in tutte le molecole. Questi composti si trovano sotto forma di glucosidi (se esterificati con glucosio) o glucuronidi (se esterificati con acido glucuronico).

Nelle cultivar a bacca rossa sono stati isolati i seguenti composti (Figura 10):
kempferolo, quercetina, miricetina, iso-ramnetina

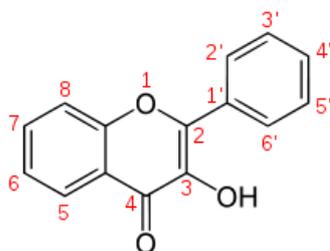


Figura 10 - Struttura dei flavonoli

Idrossistilbeni

Sono sostanze polifenoliche oggetto di numerosi studi negli ultimi anni a causa degli effetti cardioprotettivi che una di esse, presente anche nell'uva, il resveratrolo, eserciterebbe a livello del nostro organismo svolgendo un'azione cardiotonica (Cravero e Dell'Oro, 1995).

Questo composto (Figura 11), la cui produzione da parte della pianta è stimolata da attacchi di funghi, quali la *Botrytis cinerea*, è stato riscontrato quasi esclusivamente nella buccia in quantità via via decrescenti con il procedere della maturazione.

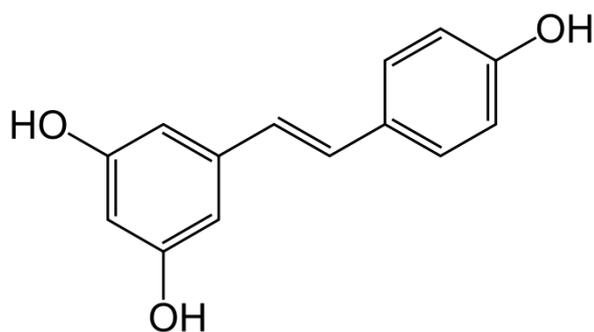


Figura 11 – Trans-3,5,4'-triidrossistilbene (trans-resveratrolo)

CENNI FARMACOLOGICI

ASPETTI POSITIVI DEL CONSUMO DI VINO

Il principale componente del vino non è l'alcol, ma l'acqua che costituisce circa l'80÷90% del totale. Sull'alcol però sono concentrate un gran numero di ricerche in campo farmacologico.

E' ormai scientificamente accettato che l'alcool ha influenza sui lipidi del sangue e comporta un innalzamento delle HDL. C'è quindi una correlazione positiva fra consumo di alcool e livello plasmatico di "colesterolo buono".

Studi epidemiologici sulla longevità hanno messo in evidenza il fatto che chi beve alcolici con misura ha meno probabilità di morire, per cause non accidentali, rispetto sia ai grandi bevitori che agli astemi (Figura 12).

Che gli alcolisti cronici fossero soggetti a morbilità e mortalità maggiore era assodato, ma la scoperta è rappresentata dal fatto che anche l'astensione può essere considerata fonte di rischio.

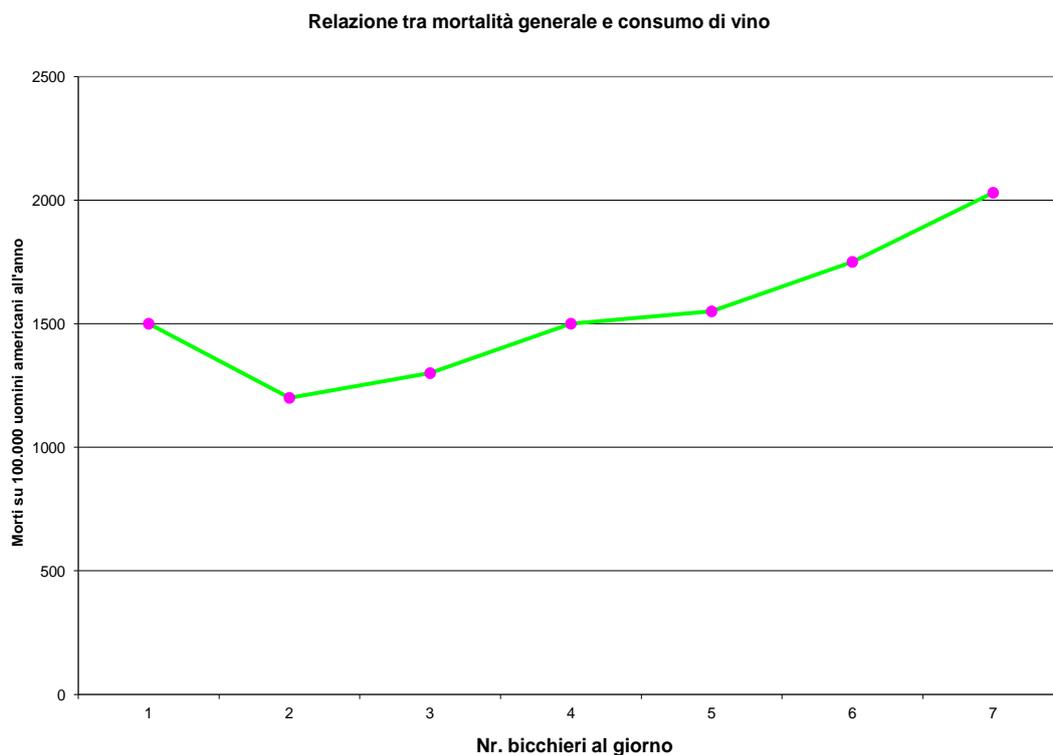


Figura 12 - Relazione tra mortalità e consumo di vino

Nel vino, infatti, sono presenti anche altre sostanze, i polifenoli, a cui è riconosciuta una notevole capacità di contrastare i radicali liberi, talvolta superiore a quella degli antiossidanti classici (vitamina C ed E). I radicali liberi hanno un ruolo primario nella genesi di molte patologie anche croniche a carattere degenerativo, come disturbi cardiovascolari e alcuni tipi di tumore, cause primarie della mortalità nei paesi industrializzati. I polifenoli agiscono da molecole antiossidanti, proteggendo l'organismo dall'insorgenza di malattie cardiovascolari (Vinson et al., 1998; Rice-Evans et al., 1997; Morton et al., 2000); prevengono le LDL dall'ossidazione, agendo da "scavengers" dei radicali liberi, soprattutto perossilici, rompendone la catena di formazione e legandosi ad essi per neutralizzarli. Inoltre agiscono da "quencher" nei confronti dei ROS e dei RNS e da chelatori di metalli.

Gli antiossidanti sono sostanze chimiche che rallentano o prevengono l'ossidazione di altre sostanze. L'ossidazione è una reazione chimica che trasferisce elettroni da una sostanza ad un ossidante. Le reazioni di ossidazione possono produrre radicali liberi, molecole con uno o più elettroni spaiati negli orbitali più esterni dei loro atomi costitutivi. La configurazione che li caratterizza rende ragione della loro elevata reattività.

I radicali liberi hanno vita brevissima, misurabile in millisecondi. Appena formati tendono a ricombinarsi con altri composti per conseguire uno stato energetico più stabile. Si innesca così una reazione a catena in grado di amplificarsi, perché l'altra molecola, a cui sono sottratti o ceduti elettroni, può a sua volta diventare un radicale libero.

Gli antiossidanti terminano queste reazioni a catena intervenendo sui radicali intermedi ed inibendo altre reazioni di ossidazione facendo ossidare se stessi. Come risultato, gli antiossidanti sono definiti chimicamente agenti riducenti - come tioli o polifenoli - in quanto le reazioni chimiche coinvolte sono di ossido-riduzione.

Anche se le reazioni di ossidazione sono fondamentali per la vita, possono essere altrettanto dannose; perciò, piante ed animali mantengono complessi sistemi di molteplici tipi di antiossidanti, come glutazione, vitamina C e vitamina E, così come enzimi quali catalasi, superossido dismutasi e vari perossidasi. Livelli troppo bassi di antiossidanti o di inibizione degli enzimi antiossidanti causano stress ossidativo e possono danneggiare o uccidere le cellule. Nel nostro organismo esistono sistemi di bioregolazione in grado di neutralizzare i radicali liberi prima che esprimano la loro nocività. Il controllo endogeno è affidato ad un gruppo di enzimi antiossidanti: superossidodismutasi (SOD), glutationperossidasi e catalasi.

Numerose cause possono turbare questo equilibrio. L'alterazione è indotta dall'aumento delle sostanze pro-ossidanti (fumo, inquinanti, radiazioni ionizzanti, fotoreazioni cutanee, ecc).

In questo caso il sistema di regolazione viene sovraccaricato e non riesce più a neutralizzare tutti i radicali che si formano.

I radicali esplicano il loro effetto dannoso anche quando si abbia una diminuzione delle sostanze antiossidanti. Stress forte e prolungato e attività fisica intensa comportano l'abbassamento delle capacità di difesa dell'organismo. La protezione diminuisce naturalmente con l'invecchiamento ed il calo è tanto più pesante e precoce quanto più il sistema è stato sottoposto ad uso intensivo.

La produzione incontrollata di radicali liberi è stata messa in relazione con un gran numero di malattie neurodegenerative con danno ai tessuti di molti organi diversi: lesioni infiammatorie (nefriti, malattie autoimmuni, ecc.), aterosclerosi e processi morbosi che ne conseguono (ictus, coronaropatie, infarto, ecc.), alterazioni del sistema nervoso e neuromuscolare (morbo di Parkinson, distrofia muscolare, sclerosi multipla, ecc.) alcune neoplasie, ecc.

I meccanismi che portano alla malattia sono molteplici e complessi, spesso ancora da chiarire.

La maggior parte delle patologie gravi a carico del cuore o della circolazione sono di natura ossidativa. Si tratta di malattie ad eziologia complessa, ma con l'aterosclerosi come denominatore comune. Sono infatti sempre precedute dall'indurimento delle arterie.

L'epidemiologia ha individuato l'eccesso di grassi nel sangue come fattore predisponente per la malattia cardiovascolare. L'iperlipidemia consegue ad una dieta troppo ricca, in cui abbondano i grassi saturi (di origine animale) e gli zuccheri. I suoi effetti sono esaltati dalla limitata assunzione di alimenti contenenti fattori di protezione (frutta e verdura soprattutto) e dalla presenza invece di fattori proossidanti (come il fumo).

Negli alimenti di origine animale è anche presente il colesterolo, necessario per la vita in certe quantità, ma che provoca danni gravissimi ai vasi, depositandovisi se in eccesso.

Il colesterolo è trasportato dalle lipoproteine LDL e HDL. Le HDL sono quelle che trasportano il colesterolo al fegato e ne facilitano lo smaltimento, mentre le LDL tendono a permetterne il deposito sulle pareti arteriose. Un aumentato valore del rapporto HDL/LDL è considerato positivo, più ancora di un basso valore di colesterolo circolante. Generalmente l'attività fisica favorisce le HDL, mentre un aumento di peso le LDL. I polifenoli sono molto importanti in quanto nel nostro organismo possono svolgere un ruolo protettivo nei confronti dell'ossidazione delle LDL (lipoproteine a bassa densità), inoltre possono costituire una salvaguardia contro eventuali alterazioni a carico del DNA ed eliminare i radicali ossidrilici (Capasso F. et al., 1995).

Per ovviare a ciò l'organismo cerca di controllare la produzione di radicali liberi con un sistema enzimatico interno. Le difese antiossidanti dell'organismo sono supportate da agenti non enzimatici di origine esogena: polifenoli, vitamina C, tocoferoli, carotenoidi, ecc.

Sono molecole captatrici di radicali chiamate anche "scavenger".

Un aumentato uso di queste sostanze porta benefici dimostrati statisticamente con una minor frequenza di patologie di tipo ossidativo.

I polifenoli sono sostanze che hanno una affinità per il radicale libero maggiore di quella del radicale libero per il suo bersaglio.

Non hanno tutti la medesima forza biologica ed il potere riducente dei diversi composti è soggetto ad ampia variabilità. Sono molto stabili, non tossici e solubili in acqua, caratteristiche difficili da trovare riunite in altri composti antiossidanti.

Le proprietà antiossidanti del vino, in particolare quello rosso, sono state abbondantemente dimostrate in vitro ed anche in vivo.

Per questi motivi l'uso degli antiossidanti in farmacologia è stato intensamente studiato, in particolare nei trattamenti dell'ictus e delle malattie neurodegenerative; ma non si sa se lo stress ossidativo sia la causa o la conseguenza di queste malattie. Gli antiossidanti sono largamente usati come ingredienti negli integratori alimentari con la speranza di mantenere il benessere fisico e prevenire malattie come cancro e cardiopatie coronariche.

Gli antiossidanti possono eliminare gli effetti dannosi che i radicali liberi hanno sulle cellule (Sies H., 1997) e le persone che mangiano alimenti ricchi in polifenoli e antocianine hanno un minor rischio di avere il cancro, o malattie cardiovascolari e alcune malattie neurologiche (Stanner et al., 2004). Questa osservazione suggerisce che questi composti possono prevenire condizioni quali degenerazione maculare (Bartlett et al. 2003), diminuzione delle difese immunitarie a seguito di una nutrizione povera (Wintergerst et al., 2006), neurodegenerazione, che sono conseguenza dello stress ossidativo (Wang et al., 2006). Nonostante il chiaro ruolo dello stress ossidativo nelle malattie cardiovascolari, studi controllati con l'utilizzo di vitamine antiossidanti hanno dimostrato che non c'è una significativa riduzione sia nello sviluppo sia nella progressione delle malattie cardiache (Bleys et al., 2006, Cook et al., 2007). Ciò suggerisce che altre sostanze in frutta e verdura (forse flavonoidi) spiegano almeno parzialmente il migliore benessere cardiovascolare in coloro che consumano più frutta e verdura (Cherubini et al., 2005). Negli ultimi anni, un'attenzione considerevole da parte del mondo scientifico è stata prestata agli antiossidanti fenolici naturali.

Alcuni dati epidemiologici evidenziano infatti una correlazione inversa anche tra l'assunzione di alcuni alimenti e il rischio di sviluppare neoplasie (James et al., 2010; Kumar et al., 2010; Diaz-Laviada, 2010; Hsieh et al., 2010): il modo classico di affrontare le malattie è quindi oggi affiancato dalla tendenza a rinforzare le naturali difese del corpo e cercando di riparare i meccanismi che lavorano in contrapposizione alla cascata di eventi che conduce alla formazione del tumore.

Questo tipo di approccio alla malattia viene indicato come chemio prevenzione: l'ingestione di sostanze chimiche naturali in grado di sopprimere o invertire la dinamica tumorale e prevenire l'invasività del tumore rappresenta il modo più diretto per diminuire morbilità e mortalità per questa causa.

La chemioprevenzione individua delle linee guida, cioè dei consigli alimentari e di "stile di vita" supportati da evidenze epidemiologiche.

In modo particolare si raccomanda di rimanere fisicamente attivi, di raggiungere e mantenere il peso ideale e, soprattutto, di ricorrere a una dieta ricca di sostanze antiossidanti poiché le ricerche hanno mostrato che ai principi attivi con queste proprietà ed ai cibi che li contengono, si può assegnare un interessante effetto antitumorale.

INFLUENZA DELLE TECNICHE DI VINIFICAZIONE

PREMESSA

Con la pigiatura i componenti delle parti solide dell'acino passano nel mosto. La quantità di composti fenolici riscontrabili in un vino rappresenta il 20÷30 % di quanto è contenuto nella bacca. (Ribéreau-Gayon et al. 1976). L'estrazione delle sostanze polifenoliche dall'acino è condizionata da molteplici fattori quali la loro localizzazione nell'acino, il livello di maturazione, quindi dalla maggior o minor resistenza meccanica dello strato celluloso-pectico delle bucce, dalle modalità di pigiatura e dalle successive operazioni di vinificazione.

L'estrazione degli antociani dalle bucce avviene nei primi 2 o 3 giorni di macerazione ed è favorita dalla rottura meccanica dei vacuoli, dalla morte dei tessuti dovuta alla presenza nel mosto dell'anidride solforosa e dell'alcol.

Per favorire l'estrazione dei composti sono tradizionalmente impiegati follature e rimontaggi. Le prime consistono nell'affondare nel mosto in fermentazione il cappello costituito dalle bucce e parte dei vinaccioli; la seconda nell'irrorare e far attraversare il cappello dal mosto in fermentazione. L'estrazione delle sostanze coloranti dalle bucce viene, dunque favorita dall'estrazione meccanica sulle bucce (follature) e dall'aumento della superficie di contatto tra bucce e mosto (follature e rimontaggi).

E' stato osservato che la temperatura favorisce l'estrazione di pigmenti fino a 28÷29°C; per valori superiori di temperatura si ottengono intensità di colore inferiori. (Riponi et al., 1985)

DIFFUSIONE DEI COMPOSTI FENOLICI

La cultivar, a parità di condizioni di vinificazione, determina il rendimento dell'estrazione. Confrontando la diffusione dalle bucce degli antociani ad esempio di Barbera e Nebbiolo è stato osservato che la diffusione sembra seguire modalità diverse; infatti l'indice di antociani totali raggiunge il valore massimo al terzo, quarto giorno dalla pigiatura per il Barbera e già al primo o secondo giorno per il Nebbiolo. Tale fenomeno può essere spiegato

con le differenze della struttura celluloso-pectica delle bucce delle due varietà, ma non si può tuttavia dimenticare che queste due varietà presentano un profilo antocianico molto diverso.

La diffusione delle proantocianidine è normalmente lenta e correlata al loro grado di polimerizzazione nonché alla natura dei tessuti da cui originano. L'estraibilità dei composti polifenolici dai semi diminuisce con l'aumentare del grado di maturazione dell'uva, a causa della crescente lignificazione degli stessi (Ummarino e Di Stefano, 1996)

E' possibile pertanto utilizzare tempi di macerazione più lunghi senza rischio di estrarre composti dal carattere amaro e astringente. L'estrazione interessa maggiormente le forme dimere più solubili, ma alcuni Autori hanno constatato essere estraibili anche i polimeri fino ad un massimo di sette unità con PM 2.300÷2.500 (Haslam, 1975), questo fenomeno è favorito dalla presenza di etanolo (Di Stefano e Cravero, 1990).

E' stato rilevato che un riscaldamento durante le fasi finali della macerazione favorisce l'estrazione di complessi tannini-polisaccaridi che conferiscono al vino maggiore morbidezza ed un maggior tenore in polifenoli (Glories, 1978).

TERRE RARE

L'origine geografica è uno dei principali fattori distintivi di un vino. Ciononostante la globalizzazione sta interessando, negli ultimi decenni, anche il prodotto vino. In questo senso, i mercati vitivinicoli costituiscono un interessante caso di globalizzazione in atto, della quale è possibile osservare le tappe e le conseguenze. Inoltre la richiesta sempre più marcata di sicurezza e di qualità da parte del consumatore ha imposto la ***necessità di rendere tracciabili i prodotti agroalimentari italiani ed europei*** e di valorizzazione tali prodotti tipici mediante l'acquisizione e l'impiego di "impronte digitali" utili per la certificazione dell'origine geografica e della qualità, a tutela sia del sistema produttivo sia dei consumatori.

Tipicamente i parametri più adatti in questo contesto sono quelli di natura inorganica, con particolare riguardo agli isotopi di elementi pesanti come il piombo e stronzio. I rapporti isotopici di questi elementi hanno dimostrato di essere potenti traccianti, permettendo il collegamento tra suolo e prodotti. Al contrario, gli isotopi di elementi leggeri (idrogeno, ossigeno, azoto e zolfo), mentre risultano molto affidabili nell'autenticazione dei prodotti alimentari, non sono utili per la tracciabilità poiché i loro rapporti sembrano essere troppo variabili per agire come traccianti del suolo.

Un altro gruppo di traccianti chimici sono i metalli in tracce, tra i quali gli elementi delle terre rare (o REE, Rare Earth Elements) hanno un ruolo dominante. Diversi studi scientifici hanno fornito la prova che i metalli in tracce, e in particolare i REE, possono fungere da marcatori geochimici (Sondag, 1992), ma in pochi casi si è dimostrato che questo ruolo può essere applicato nella tracciabilità dei prodotti alimentari come il vino. Le terre rare sembrano soffrire più di altri elementi di contaminazioni dovute all'utilizzo, durante le pratiche enologiche di processi di chiarificazione o filtrazione o a causa dell'aggiunta di bentoniti (Nicolini et al., 2004).

Vini provenienti dalla stessa regione possono mostrare profili di distribuzione diversi in relazione alle diverse pratiche enologiche utilizzate (Rossano et al., 2007). In letteratura esistono vari studi che hanno utilizzato l'analisi statistica multivariata per discriminare vini prodotti in zone distinte (Jos et al, 2004, Larcher e Nicolini, 2008). Poche ricerche, invece, sono state rivolte allo studio dell'intera filiera produttiva, dal suolo all'uva e fino al vino (Greenough et al 1997, Almeida e Vasconcelos, 2003) Recentemente, Oddone et al (2006) hanno evidenziato come il profilo compositivo delle terre rare si mantenga inalterato nel terreno, nell'uva e nel mosto. Lo stesso profilo può essere riscontrato anche nel vino per quanto riguarda le terre rare a minor peso atomico ma non per gli elementi più pesanti.

La particolare similarità chimica tra gli elementi appartenenti al gruppo delle terre rare (che derivano dalla loro configurazione elettronica) e la caratteristica composizione dei diversi

tipi di terreno, riflesso della loro origine geologica, li rende potenzialmente ideali “marcatori di filiera” (Oddone et al., 2006): vari studi sembrano indicare infatti che il loro profilo distributivo si riscontra nel suolo e nei vegetali su di esso cresciuti (Ichihashi et al., 1992; Wang et al., 1997; Liang et al., 2005; Oddone et al., 2007; Fang et al., 2007) grazie al fatto che i REE hanno un uso antropico ancora limitato, in modo che la loro presenza nell'ambiente non è onnipresente come altri metalli di transizione.

Dal punto di vista fisiologico i REE non hanno un ruolo specifico nel metabolismo delle piante ed è quindi possibile ipotizzare che essi vengano assunti in maniera passiva nel passaggio dal suolo alle piante, senza frazionamento della distribuzione originale (Aceto et al., 2009; Aceto et al., 2013).

Nello studio di tracciabilità di un prodotto alimentare, ogni ulteriore passaggio della catena di produzione deve essere attentamente considerato da questo punto di vista, cioè se possa o no indurre frazionamento nella distribuzione originale dei REE.

DEFINIZIONE

Rare Earth Elements

La 57	Ce 58	Pr 59	Nd 60	Pm 61	Sm 62	Eu 63	Gd 64	Tb 65	Dy 66	Ho 67	Er 68	Tm 69	Yb 70	Lu 71
-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

Lanthanides

H																	He
Li	Be											B	C	N	O	F	Ne
Na	Mg											Al	Si	P	S	Cl	Ar
K	Ca	Sc	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Ni	Cu	Zn	Ga	Ge	As	Se	Br	Kr
Rb	Sr	Y	Zr	Nb	Mo	Tc	Ru	Rh	Pd	Ag	Cd	In	Sn	Sb	Te	I	Xe
Cs	Ba	Lu	Hf	Ta	W	Re	Os	Ir	Pt	Au	Hg	Tl	Pb	Bi	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac	Lr														

Figura 13 - Posizione dei lantanoidi nella tavola periodica degli elementi.

Per lantanidi o più correttamente lantanoidi si intendono i 14 elementi che seguono il lantanio (La) nella tavola periodica e che derivano dall'aggiunta progressiva degli elettroni 4 alla configurazione del La ($[\text{Xe}]5d6s^2$) (fig. 13). In genere si include in questo gruppo anche il lantanio stesso, considerato come il "prototipo" o capostipite della serie (Cotton e Wilkinson, 1984). Secondo la definizione della International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), i lantanidi, insieme a ittrio (Y) e scandio (Sc), costituiscono il gruppo delle terre rare, anche se spesso tutti questi termini sono usati come sinonimi. I lantanidi, in genere presenti nello stato di ossidazione +3 formano ossidi (M_2O_3), simili agli ossidi di Ca, Sr e Ba, e possono formare carbonati, idrossidi, ossalati e fosfati insolubili. Possono dare complessi solubili in acqua con ligandi chelanti quali acido citrico, tartarico e vari amminoacidi.

Il loro nome "terre rare" deriva dal fatto che si trovano in natura sottoforma di miscele di ossidi (anticamente chiamati "terre") e in bassa concentrazione. In realtà non sono elementi particolarmente rari in natura, in varie regioni (es. Cina, Canada, Scandinavia, India, USA, Russia) si trovano infatti giacimenti dati da diversi minerali e soprattutto dalla monazite, un ortofosfato di lantanidi (Hu et al., 2004). Sono presenti anche dispersi in più di 250 minerali accessori in tutti i tipi di rocce e soprattutto in graniti, pegmatiti, gneiss e altre rocce ignee e metamorfiche e nei sedimenti argillosi, mentre concentrazioni minori sono riportate per le rocce ultramafiche e calcaree (Kabata-Pendias, 2001). Nella litosfera sono piuttosto abbondanti (con un contenuto medio pari allo 0.015%) più di altri elementi non considerati come rari e comunque più noti e studiati quali Sn, Co, Ag, As, Cd, Hg, Se e pari a Cu, Zn, Pb e Mo (Cotton e Wilkinson, 1984; Tyler, 2004a). La loro abbondanza media nella crosta terrestre evidenzia una caratteristica generale: il loro contenuto cala all'aumentare del peso atomico e, in accordo con la regola di Oddo-Harkins, gli elementi con numero atomico pari sono più frequenti del successivo e del precedente elemento con numero atomico dispari (Oddo, 1914; Harkins 1917; Tab. 1.8-1). In genere, nei minerali, La, Ce, Pr e Nd costituiscono circa il 90% dei lantanidi totali. L'Europio, data la sua presenza anche nello stato di ossidazione +2, è spesso abbondante nei minerali del gruppo del Ca. Il Pm non esiste in natura se non in ultratracce nei minerali di U come prodotto della fissione spontanea di ^{238}U (Cotton e Wilkinson, 1984).

CONCENTRAZIONE E DISTRIBUZIONE NELLE PIANTE

Fino a poco tempo fa i REE non essendo classificate nè come elementi essenziali alla vita, nè come elementi tossici, non avevano ricevuto grande attenzione. Recentemente, la diffusione di tecniche analitiche adeguate ha facilitato sia l'indagine dei loro livelli di concentrazione nei suoli e nelle piante, sia lo studio delle loro funzioni fisiologiche (Kabata-Pendias, 2001; Tyler, 2004a; Hu, 2004).

Le caratteristiche pedologiche e la presenza di agenti chelanti, influenzando il desorbimento dei REE dal suolo, possono modificare l'assorbimento radicale (Yang et al., 1999). Il tasso di assorbimento dal suolo risulta in genere maggiore del tasso di traslocazione verso gli apici (Hu et al., 2002): nella pianta infatti si osservano quantità maggiori di REE a livello delle radici e poi via via quantità minori nelle foglie, nei fusti, nei fiori e infine nei frutti (Li et al., 1998; Cao et al., 2000; Hu et al., 2004).

RELAZIONE SUOLO-PIANTA

In genere, come sopra descritto, il contenuto di REE è decisamente superiore nel suolo rispetto alle piante; la frazione di ogni elemento assorbibile dalla pianta può essere indicata calcolando il fattore di trasferimento (transfer factor, TF), dato dal rapporto tra le concentrazioni nella pianta e nel suolo, espresse in peso secco. In vari studi su piante forestali questo rapporto per i REE risulta pari a 0.04-0.1, con valori tendenzialmente minori all'aumentare del peso atomico (Markert e Li, 1991; Tyler 2004b). In altre specie vegetali sono riportati valori nettamente minori, circa 10^{-3} - 10^{-4} (Wytttenbach et al., 1996; Uchida et al., 2007). Tyler (2004b) ha riscontrato in *Fagus*, un valore di TF per Eu pari a circa 0.3, valore simile a quello dei cationi bivalenti.

La reazione del suolo influenza la biodisponibilità degli elementi: Diatloff et al. (1996) hanno misurato nella soluzione del suolo contenuti di REE maggiori nel caso di suoli acidi che nei suoli ammendati con CaCO_3 probabilmente perchè a pH acidi aumenta la solubilità di certi composti contenenti REE quali fosfati, carbonati, ossidi e idrossidi. Vari studi mostrano delle somiglianze nelle proporzioni e nella distribuzione dei vari elementi della serie delle terre rare

nelle piante e nei suoli ma altri autori riportano risultati opposti. In genere, piante cresciute su suoli più ricchi di REE, presentano maggiori contenuti di terre rare come evidenziato da Wen et al., (2001) in grano, riso e vari ortaggi. Wang et al. (1997), dopo aver studiato le relazioni tra i contenuti di REE in 17 diverse specie vegetali e nei rispettivi suoli, affermano che in genere il profilo delle terre rare riscontrabile nelle piante riflette quello presente nel suolo.

PARTE SPERIMENTALE

STRUMENTAZIONE UTILIZZATA PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE DEL VINO

Spettrofotometria Uv-Visibile

La spettroscopia studia l'interazione della radiazione con la materia. I metodi spettrometrici si basano sulla misura della quantità della radiazione prodotta o assorbita dalle specie molecolari di interesse e sono ampiamente utilizzati per la determinazione quantitativa e qualitativa di composti organici ed inorganici.

Esistono differenti tecniche spettroscopiche, tra cui la spettroscopia di assorbimento che consiste nella misura della quantità di luce assorbita in funzione della lunghezza d'onda. Si basa sul fenomeno di assorbimento delle specie molecolari di caratteristiche frequenze della radiazione elettromagnetica. L'assorbimento della radiazione attenua il raggio incidente secondo la legge di Lambert-Beer, che dipende dalla concentrazione delle molecole, al coefficiente d'estinzione e al cammino ottico nel quale avviene l'assorbimento. A causa delle interazioni tra i fotoni e le particelle assorbenti, la potenza radiante della radiazione diminuisce da P_0 a P . La trasmittanza (T) della soluzione è la frazione della radiazione incidente trasmessa dalla soluzione:

$$T = P / P_0$$

L'assorbanza (A) di una soluzione è legata alla trasmittanza mediante la funzione logaritmo:

$$A = - \log T$$

Da questa relazione si nota che quando l'assorbanza di una soluzione aumenta, la trasmittanza diminuisce.

La trasmittanza e l'assorbanza, così come sono state descritte, non possono essere misurate perché la soluzione da misurare deve trovarsi in un contenitore trasparente (cuvetta) sulle cui pareti possono esserci perdite per riflessione e dispersione. Inoltre la luce può anche

essere dispersa in tutte le direzioni della superficie da grosse molecole o particelle presenti nel solvente con la possibilità di produrre un'ulteriore attenuazione del raggio quando esso attraversa la soluzione.

Per compensare questi effetti la potenza del fascio trasmesso da una cuvetta contenente la soluzione dell'analita è comparata con la potenza di un fascio trasmesso da una cuvetta identica contenente soltanto il bianco del reagente.

Secondo la legge di Lambert-Beer l'assorbanza è direttamente proporzionale alla concentrazione della specie assorbente (c) e alla lunghezza del cammino ottico (b) del mezzo assorbente:

$$A = abc$$

dove a è una costante di proporzionalità chiamata assorbanza specifica; quando la concentrazione è espressa in moli/litro e b in cm, la costante di proporzionalità viene chiamata assorbanza specifica molare (ϵ):

$$A = \epsilon bc$$

Le assorbanze specifiche dipendono dal solvente, dalla composizione della soluzione e dalla temperatura e per questo motivo non è opportuno utilizzare dati presi dalla letteratura per analisi quantitative.

Per ottenere l'assorbanza specifica in particolari condizioni di analisi si utilizza una soluzione standard dell'analita nello stesso solvente e alla stessa temperatura, inoltre solitamente si usano una serie di soluzioni standard dell'analita al fine di costruire una curva di calibrazione di A in funzione di c in modo tale da ottenere un'equazione di regressione lineare.

Questa legge si applica anche a soluzioni contenenti più di una specie assorbente.

Se non vi è interazione tra le specie l'assorbanza totale è la somma delle assorbanze individuali:

$$A_{tot} = A_1 + A_2 + \dots + A_n$$

La relazione lineare tra l'assorbanza ed il cammino ottico ad una concentrazione fissa non sempre è verificata, in quanto esistono delle limitazioni, chiamate deviazioni reali, che

limitano la validità della legge per esempio a concentrazioni maggiori di 0.01 M non è più verificata la linearità della relazione tra assorbanza e concentrazione.

Per le determinazioni spettrofotometriche è stato utilizzato uno spettrofotometro UV-visibile a doppio raggio JASCO V-550.

Analisi cromatografiche

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) è una tecnica sperimentale che permette di separare gli analiti in base alla loro diversa affinità per due fasi con diversa polarità: la fase stazionaria, contenuta nella colonna di separazione, e la fase mobile costituita dal solvente di trasporto. Si possono distinguere due tipi di cromatografia di ripartizione in funzione della polarità relativa della fase mobile e della fase stazionaria. Se si utilizzano fasi stazionarie molto polari ed un solvente relativamente non polare, il metodo cromatografico è detto in fase diretta. Nella cromatografia a fase inversa (RP-HPLC), invece, la fase stazionaria è un composto non polare spesso un idrocarburo e la fase mobile è polare (ad esempio acqua, metanolo o acetonitrile). Nella cromatografia in fase diretta è eluito prima il componente meno polare, perché in senso relativo è il più solubile nella fase mobile, nei metodi a fase inversa, invece, compare prima il componente più polare. In entrambe le tecniche il tempo di ritenzione degli analiti varia a seconda della polarità della fase mobile.

La fase stazionaria è costituita da silice o da composti a base di silice. Questi solidi sono formati da particelle uniformi, porose e meccanicamente resistenti con diametri da 3,5 a 10 μm . Nella cromatografia in fase diretta la fase stazionaria è normalmente costituita da silice la cui superficie, completamente idrolizzata, è costituita da gruppi Si-OH chimicamente reattivi.

Per la cromatografia in fase inversa, invece, la fase stazionaria più comune è costituita da silice funzionalizzata. La funzionalizzazione prevede la formazione di legami silossanici tra un organocloro silano ed i gruppi Si-OH della silice stessa. La funzionalizzazione può essere fatta con una catena C8 (n-ottile) o C18 (n-ottadecile).

La fase mobile è costituita da un solvente con diverso grado di polarità a seconda della tecnica utilizzata. Sono stati proposti molti indici per descrivere in modo quantitativo la polarità dei solventi. Il più utile per la cromatografia di ripartizione sembra essere l'indice di polarità P' introdotto da Snyder. Questo parametro si basa su misure di solubilità della sostanza

in esame in tre diversi solventi: diossano (accettore di protoni con basso momento di dipolo), nitrometano (accettore di protoni con alto momento di dipolo) ed etanolo (donatore di protoni con elevato momento di dipolo). L'indice di polarità è una misura numerica della polarità relativa dei vari solventi.

In particolare, nel lavoro svolto, si è eseguita un'analisi cromatografica dei campioni utilizzando la tecnica in fase inversa. L'eluizione dei polifenoli, da quelli a minore idrofobicità a quelli più idrofobici, viene garantita dal gradiente di composizione della fase mobile, costituita di solito da due eluenti miscelati in proporzioni che variano nel tempo secondo un particolare gradiente: il primo eluente, molto polare, è normalmente costituito dall'acqua, il secondo, con un maggiore carattere idrofobico, al fine di permettere l'eluizione dei polifenoli via via più apolari, è metanolo.

Per le determinazioni cromatografiche è stato utilizzato un HPLC HP 1090 Hewlett-Packard (Palo Alto, California, United States) con Diode Array Detector (DAD). La colonna utilizzata per la separazione è stata una C18 ODS Hypersil RP-18 (200 x 2.1 mm, 5mm) (Thermo Scientific).

Analisi EPR

La risonanza paramagnetica elettronica (EPR), nota anche con il nome di risonanza elettronica di spin (ESR), è una tecnica che permette di rivelare gli elettroni spaiati presenti in un campione, tramite il loro assorbimento di energia nel campo delle microonde ($\approx 10^{10}$ Hz), quando il campione stesso è immerso in un campo magnetico ($\approx 0,3$ T).

La tecnica e le condizioni di risonanza

L'elettrone possiede un momento magnetico in virtù del suo spin non nullo ($S = 1/2$). In presenza di un campo magnetico, il momento magnetico può assumere due possibili orientamenti, associati a stati di diversa energia. Questi due orientamenti corrispondono ai due stati di spin elettronico ($S = \pm 1/2$). Una radiazione elettromagnetica di appropriata frequenza

ν , perpendicolare al campo magnetico esterno B_0 , può indurre la transizione tra i due stati di spin.

In EPR la condizione base di risonanza è descritta dall'equazione:

$$h\nu = g\beta B_0$$

dove: β è il magnetone di Bohr ($0.92 \cdot 10^{-23}$ JT) e g è il fattore di Landè elettronico (2.0023).

Introducendo nell'espressione la frequenza di precessione di Larmor $\omega = 2\pi\nu$, si ottiene:

$$\omega = \gamma B_0$$

dove $\gamma = \frac{g\beta}{\hbar}$ è il rapporto giromagnetico dell'elettrone ($1.76 \cdot 10^4$ rad S⁻¹ T⁻¹).

La misura

Per campi magnetici B_0 nell'intervallo 0.3-1.2 T, la risonanza elettronica di spin avviene nel campo delle microonde (900 MHz – 3600 MHz, $\lambda=3-0.8$ cm).

Le microonde sono fatte passare attraverso un tubo cavo le cui dimensioni sono legate alla lunghezza d'onda della microonda stessa. I tubi più usati misurano circa 3 cm, valore che corrisponde a una frequenza di circa 900 MHz. Un sistema di questo tipo viene chiamato spettrometro a banda X.

Il sistema risonante, in uno spettrometro a microonde, è chiamato cavità. La cavità, che contiene il campione, è immersa in un campo magnetico che viene fatto variare fino a raggiungere le condizioni di risonanza. Il debole segnale di assorbimento registrato viene amplificato, poiché la cavità costituisce un braccio di una rete bilanciata. Il segnale rivelato è ulteriormente amplificato modulando il campo magnetico. Con una modulazione del campo magnetico minore della larghezza di riga del segnale di assorbimento, un rivelatore sensibile alla fase del segnale, il segnale misurato appare come derivata prima della linea di assorbimento.

I campioni possono essere solidi o soluzioni acquose, con volumi che variano dai 10 ai 50 μ l. La forma della cella portacampione varia a seconda della natura del campione stesso. Il metodo è molto sensibile e permette di misurare, in pochi minuti, concentrazioni di radicali dell'ordine di 1 μ M.

I parametri spettrali

Un segnale EPR è caratterizzato da quattro principali parametri: intensità, valore di g , larghezza di riga e struttura iperfine.

L'area sottesa dal segnale è proporzionale alla concentrazione di spin spaiati che danno origine allo spettro. Molti fattori possono alterare l'intensità spettrale: 1) l'attenuazione del segnale può derivare da un'alta concentrazione di specie paramagnetiche in soluzione; 2) molte risonanze possono essere facilmente saturate (le popolazioni dei due livelli si uguagliano durante la misura); 3) lo spettro in derivata prima può rendere difficile l'integrazione. Spesso, tuttavia, le intensità EPR sono valutate quantitativamente, misurando la profondità da picco a picco dello spettro in derivata prima.

Il valore di g utilizzato per caratterizzare la posizione di una risonanza, è una misura del campo magnetico locale "percepito" dall'elettrone.

Il valore di g è definito come: $g = \frac{h\nu}{\beta B_0}$, dove B_0 è il campo magnetico applicato in condizioni di risonanza. Il valore di g di una molecola che contiene elettroni spaiati è considerato una quantità caratteristica dell'ambiente elettronico. La sua misura è fondamentale per l'identificazione di un segnale sconosciuto.

Il valore di g per un elettrone libero, ed anche per un gran numero di radicali liberi, è 2.0023, mentre, per i metalli di transizione, si possono osservare anche valori di $g = 10$.

Nella maggior parte dei casi il valore di g osservato è anisotropo. Il suo valore, cioè, varia a seconda dell'orientazione della molecola rispetto al campo magnetico applicato. Tuttavia, se la molecola si muove molto velocemente, alterando di continuo i campi magnetici locali, si registra un valore di g medio. Questo fenomeno si verifica spesso quando vengono misurati spettri EPR di campioni in soluzione.

La larghezza di riga in un segnale EPR può essere giustificata considerando due tipi di contributi. Il primo contributo viene chiamato tempo di rilassamento spin-reticolo, ed è caratterizzato da una costante di velocità del primo ordine $1/T_1$. Come in NMR, T_1 è una misura della velocità di recupero della popolazione di spin dopo una perturbazione. Il valore di T_1 dipende dai campi magnetici locali "sentiti" dall'elettrone spaiato. Solamente quelle componenti del campo magnetico che hanno la frequenza appropriata possono indurre la transizione tra i due livelli energetici.

Il secondo contributo alla larghezza di riga dipende dalla leggera diversità che caratterizza i campi magnetici locali di ogni molecola. Queste differenze portano ad un'estensione dei valori delle frequenze di risonanza ed al corrispondente allargamento della banda di risonanza, noto con il nome di allargamento non omogeneo. Questa situazione si verifica quando le molecole sono ferme o si muovono molto lentamente. Se le molecole si muovono più rapidamente questo allargamento statico è in parte mediato, perché il campo magnetico "sentito" da ogni molecola cambia durante la misura. Questo processo di allargamento di riga può essere caratterizzato da un tempo T_2 .

Per la maggior parte dei complessi dei metalli di transizione, la larghezza di riga è determinata dal valore di T_1 . In questi complessi, infatti, spesso il valore di T_1 è così corto che porta ad un eccessivo allargamento della banda di assorbimento.

Il valore di T_1 aumenta drasticamente (qualche volta esponenzialmente) diminuendo la temperatura. Per registrare gli spettri EPR di questi composti, si lavora, quindi, a temperature molto basse (~ 4 K, elio liquido).

Per i radicali liberi, invece, i valori di T_1 sono molto lunghi e l'allargamento di riga è dovuto principalmente a T_2 .

La struttura iperfine ha origine dall'interazione degli spin elettronici con gli spin nucleari. Questa interazione è di due tipi: 1) un'interazione di contatto, isotropa, che deriva dalla delocalizzazione dell'elettrone spaiato sul nucleo e 2) un'interazione dipolare tra gli spin dell'elettrone e del nucleo. L'interazione dipolare è direzionale e quindi non isotropa. Occupiamoci, per ora, solo del contributo isotropo alla struttura iperfine, ipotizzando di avere dei radicali che si muovono velocemente in una soluzione non viscosa. In questo caso, infatti, l'interazione dipolare è mediata a zero dal rapido movimento dei radicali.

L'interazione iperfine isotropa avviene perché lo spin nucleare genera un campo magnetico locale che viene avvertito dall'elettrone. In generale ci saranno $(2I+1)$ possibili orientamenti dello spin nucleare in un campo magnetico, ognuno con un'energia diversa.

L'elettrone spaiato è sensibile a questi orientamenti e così lo spettro EPR risulta essere separato in $(2I+1)$ linee di uguale intensità. La distanza tra queste linee è detta costante di accoppiamento iperfine. Per n nuclei equivalenti, lo spettro EPR è costituito da $(2nI+1)$ linee, le cui intensità relative sono date dalla distribuzione binomiale. Se c'è più di un gruppo di atomi equivalenti, ognuna delle $(2nI+1)$ righe è ulteriormente divisa secondo gli stessi criteri.

In Figura 14 è rappresentata la struttura iperfine del segnale di un elettrone che interagisce con due nuclei, caratterizzati dalla stessa costante di accoppiamento iperfine A ; il primo con momento magnetico nucleare $I = 1$, il secondo con $I = 1/2$.

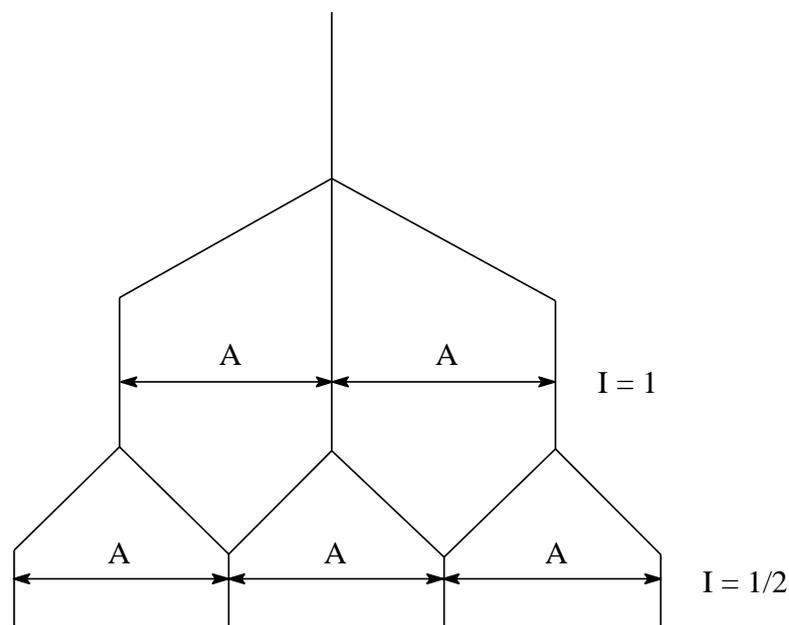


Figura 14 - Esempio di struttura iperfine

Lo spettro EPR non è isotropo

Gli orbitali che contengono gli elettroni spaiati sono generalmente anisotropi. Questa caratteristica determina l'anisotropia di molti dei parametri EPR, come il valore di g e la costante di accoppiamento iperfine A .

In molti radicali liberi organici gli elettroni sono molto delocalizzati, ottenendo una distribuzione dell'elettrone pressoché isotropa. Per i metalli di transizione, invece, gli elettroni sono principalmente localizzati in orbitali d oppure p , in questo caso diventa molto importante il carattere non isotropo della risposta spettrale. Si può in ogni caso avere una risposta isotropa, se le specie in esame si muovono rapidamente in tutte le direzioni.

Il fattore g è caratterizzato da tre principali contributi, g_{xx} , g_{yy} , g_{zz} , che corrispondono ai valori di g misurati lungo gli assi principali del gruppo che contiene l'elettrone spaiato. Gli assi principali vengono scelti in base alla simmetria della molecola. Ogni asse di rotazione di ordine due o superiore, ad esempio, può essere un asse principale. Le molecole con geometria cubica,

tetraedrica ed ottaedrica hanno assi principali equivalenti e quindi il valore di g è isotropo ($g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$).

Molti metalli di transizione presentano una simmetria assiale, tale per cui $g_{xx} = g_{yy} \neq g_{zz}$.

Per convenzione g_{zz} è definito come il valore di g osservato quando il campo magnetico applicato è parallelo all'asse di simmetria e viene identificato come $g_{||}$. Allo stesso modo, g_{xx} e g_{yy} vengono indicati come g_{\perp} , e corrispondono al valore di g osservato quando il campo magnetico è perpendicolare all'asse di simmetria. Per convenzione, in uno spettro, $g_{zz} = g_{||}$ è il valore di g misurato a campi magnetici bassi, mentre $g_{xx} = g_{\perp}$ è quello misurato a campi magnetici alti.

In un singolo cristallo si possono misurare i tre valori di g , applicando il campo magnetico lungo i tre assi della molecola. Per ogni orientazione intermedia il valore di g dipende dall'angolo θ tra la direzione del campo magnetico e l'asse principale.

Per sistemi con simmetria assiale il valore di g varia a seconda dell'orientamento del campo magnetico, secondo l'equazione: $g(\theta)^2 = g_{||}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 \sin^2 \theta$

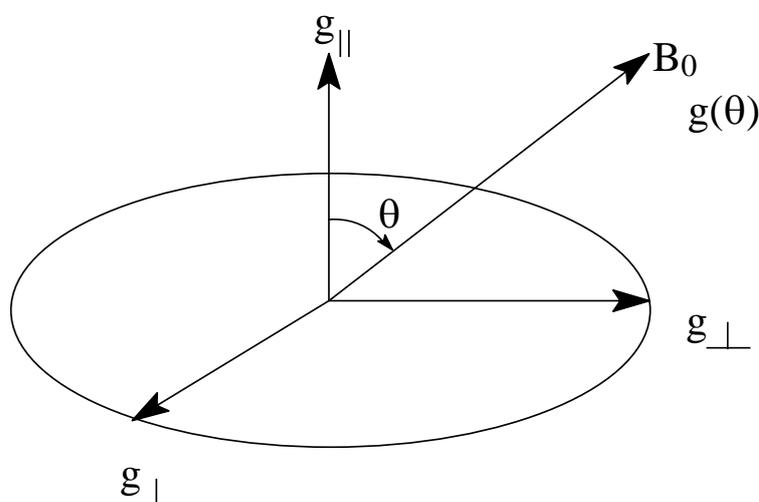


Figura 15 - Andamento del valore di g in sistemi a simmetria assiale

In questo modo, per un singolo cristallo, la variazione di g al variare di θ può dare informazioni sull'orientazione dell'asse principale.

In un campione liquido o ghiacciato le molecole hanno un orientamento casuale, ci sarà, quindi, un intervallo di valori di g che contiene i singoli assorbimenti di ogni molecola con un differente valore di θ . In Figura 16 è rappresentato l'involuppo delle curve di assorbimento

individuali (a) e la corrispondente derivata prima (b), per sistemi con, (A), e senza, (B), simmetria assiale.

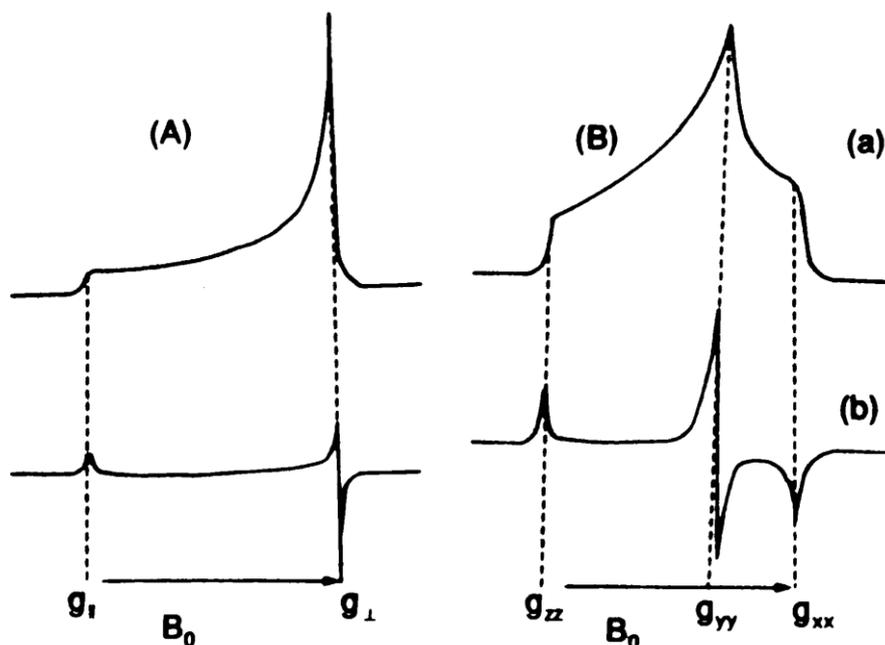


Figura 16 - Spettro di sistemi con simmetria assiale (A) e senza simmetria assiale (B)

In questo esempio, i valori limite di g sono sufficientemente diversi e possono essere chiaramente risolti.

Il contributo anisotropo all'interazione iperfine A , deriva dall'interazione dipolare tra il campo magnetico dell'elettrone e quello del nucleo. Le considerazioni fatte per l'anisotropia del valore di g sono valide anche per il valore di A . Anche l'interazione iperfine, quindi, è caratterizzata da tre contributi A_{xx} , A_{yy} e A_{zz} . Se è presente una simmetria assiale, si assume $A_{yy} = A_{zz}$ e $A_{\perp} = A_{xx} = A_{yy}$.

In Figura 17 è rappresentato l'involuppo di uno spettro, (a), e la sua derivata prima, (b), per un sistema di radicali con orientamento casuale, simmetria assiale ed interazione iperfine anisotropa con un singolo nucleo magnetico ($I = 1/2$), (per semplicità si assume che il fattore g sia isotropo).

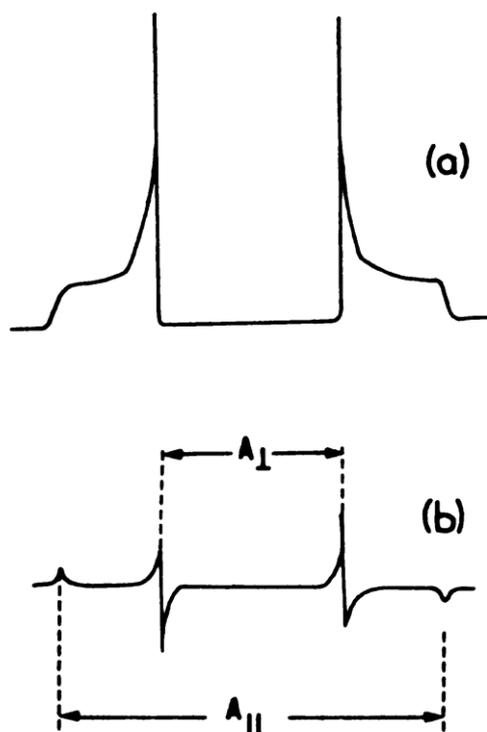


Figura 17 - Spettro di un sistema di radicali con A anisotropo

Misura del potere antiossidante

La risonanza paramagnetica elettronica (EPR) rappresenta uno strumento potente per la determinazione del livello di stress ossidativo in vitro ed in vivo. Solitamente, l'attività antiossidante di una molecola viene misurata valutando la sua capacità di eliminare i radicali all'ossigeno prodotti in vitro. Il radicale superossido è normalmente generato attraverso il sistema ipoxantina / xantina ossidasi, mentre il radicale idrossile viene generato principalmente con la reazione di Fenton. A causa della loro breve durata e ampia larghezza di riga, entrambi questi radicali dell'ossigeno non possono essere rilevati direttamente tramite EPR in soluzione acquosa a temperatura ambiente, e richiedono una particolare tecnica di misura nota come spin trapping per essere misurati. Nel metodo sperimentale noto come spin-trapping, un composto chimico, come ad esempio un nitrone, forma un radicale libero "stabile", legandosi covalentemente alla specie radicalica instabile. Il radicale libero instabile viene così intrappolato in una forma che ha tempi di vita abbastanza lunghi, da permetterne l'osservazione in soluzioni acquose a valori "normali" di pH e temperatura. Uno degli spin trap più utilizzati

per i radicali all'ossigeno è il nitrone 5,5-dimetil-1-pirroloina-N-ossido (DMPO). Sia i sistemi che generano radicali liberi all'ossigeno sia la reazione di spin trapping sono fortemente influenzati dall'ambiente chimico. In particolare, il tipo di tampone, la presenza sia di metalli di transizione redox-attivi, in particolare ferro, sia di agenti chelanti possono interferire con il risultato della misura. Per questo motivo, in questo studio, si è deciso di utilizzare il radicale 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH) per la misura della capacità antiossidante dei vini. Anche se questo radicale non è presente nei sistemi biologici, è spesso impiegato come radicale standard negli studi delle proprietà antiossidanti, poiché è stabile in presenza di acqua e aria, non presenta interferenze e può essere rilevato direttamente tramite EPR. Il DPPH è un radicale stabile grazie alla delocalizzazione dell'elettrone spaiato sull'intera molecola; questo impedisce anche che si abbiano reazioni di dimerizzazione molto comuni su altri radicali. La delocalizzazione elettronica è anche la causa del colore viola intenso della molecola caratterizzata da una banda di assorbimento centrata a circa 520 nm. Quando il DPPH entra in contatto con una sostanza in grado di donare atomi di idrogeno, si trasforma nella sua forma ridotta (DPPHH) con perdita del colore viola (la soluzione assume un colore giallo pallido dovuto al gruppo picrile) (Figura 18).

Lo spettro EPR del DPPH (Figura 19) nei solventi comuni è costituito da 5 linee causate dall'interazione dell'elettrone spaiato con i due atomi di azoto ($I = 1$) presenti nella molecola.

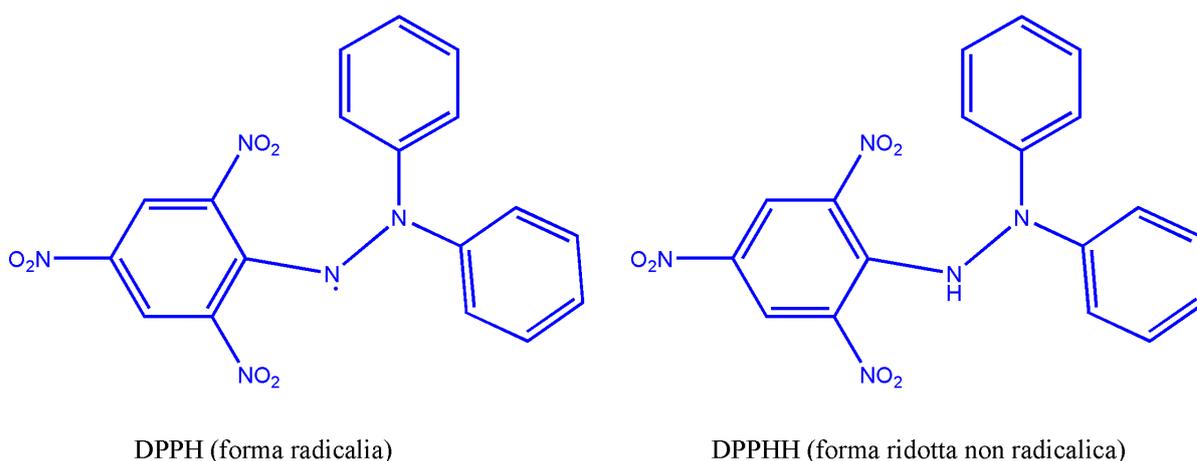


Figura 18 - Struttura del radicale DPPH e della sua forma ridotta DPPHH

Il DDPH reagendo con gli antiossidanti presenti nel vino si trasforma nella specie non radicalica (DPPH-H) ESR silente. Questo comporta una diminuzione dell'area del segnale ESR direttamente proporzionale all'attività antiossidante del vino in esame.

Per le determinazioni del potere antiossidante è stato utilizzato uno spettrometro EPR in banda X JEOL FA-200 ed una cella di misura in quarzo per soluzioni acquose (JEOL ES-LC11).

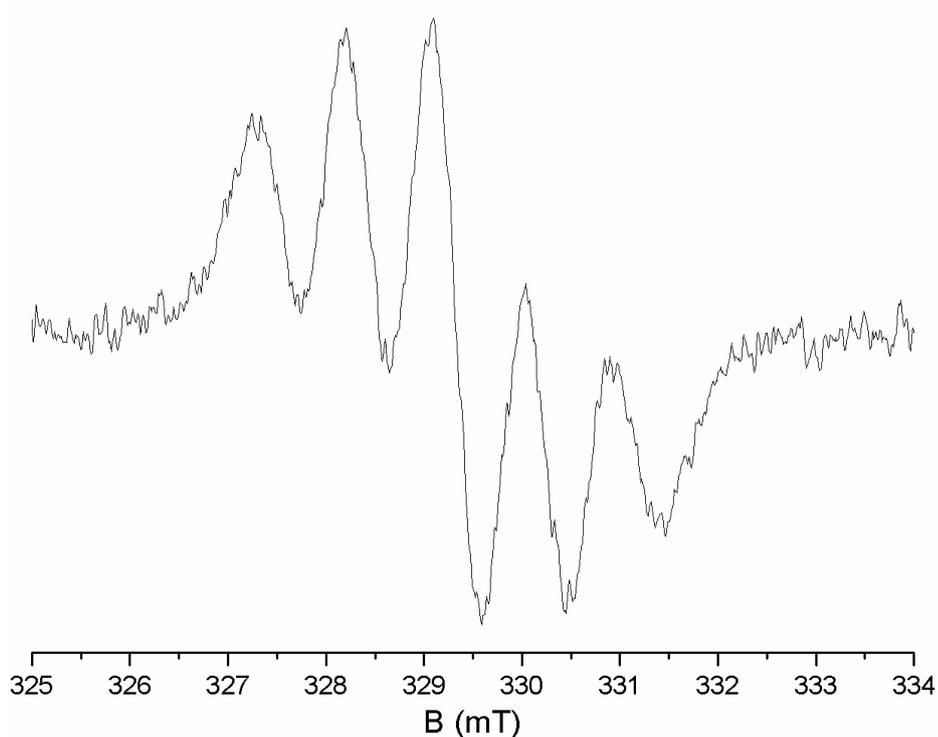


Figura 19 - Spettro EPR del radicale DPPH

STRUMENTAZIONE UTILIZZATA PER LA DETERMINAZIONE DELLE TERRE RARE

Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

L'ICP-MS è attualmente una delle più moderne tecniche analitiche per la determinazione quantitativa di metalli e non metalli che si distingue soprattutto per le sue prestazioni (in un sistema convenzionale il limite di rivelabilità per la maggior parte degli elementi corrisponde a frazioni di ppb, parti per bilione, e per alcuni arriva a frazioni di ppt, parti per trilione), per la sua versatilità (è possibile eseguire analisi multielementari ed isotopiche) e per la sua predisposizione all'impiego interdisciplinare (utilizzo in indagini geologiche, ambientali, biologiche, mediche).

Il principio di funzionamento può essere così riassunto: il campione da analizzare in forma liquida, è nebulizzato attraverso un apposito sistema di introduzione (di tipo pneumatico o ad ultrasuoni); l'aerosol ottenuto viene mandato all'interno di un plasma (gas ionizzato avente temperatura compresa tra i 6000°K ed i 10000°K) originato grazie ad un campo magnetico alimentato da radiofrequenze; l'elevata energia termica, unita all'ambiente ricco in elettroni dell'ICP, stimola la decomposizione e l'eccitamento della sostanza immessa con conseguente ionizzazione; gli ioni così generati vengono quindi estratti dal plasma ed inviati ad uno spettrometro di massa, tramite un adeguato impianto d'interfaccia che sfrutta come forza motrice il sistema di vuoto ed un potenziale elettrico, dove vengono poi discriminati in base al rapporto massa/carica; infine avviene la quantificazione degli ioni, in altre parole la loro misurazione effettiva in concentrazione, con l'ausilio di un rivelatore (che in genere è un elettromoltiplicatore). Tale tecnica presenta indubbi vantaggi nelle sue caratteristiche multielemento, velocità di analisi, limiti di rilevamento e capacità isotopica. L'ICP-MS può inoltre analizzare campioni solidi (previa dissoluzione in opportuno solvente) e liquidi.

La composizione chimica dei suoli, delle uve e dei vini è stata determinata utilizzando uno spettrometro di massa con plasma X Series 5 – Thermo Scientific (Waltham, MA, USA) accoppiato induttivamente (ICP-MS) con spettrometro di massa.

Lo strumento è dotato di una torcia di quarzo con un dispositivo PlasmaScreen, un analizzatore di massa a quadrupolo, lenti ioniche basate su un modello esapolare con un deflettore ionico a chicane e un rivelatore simultaneo con un analizzatore multicanale

elettronico in tempo reale che opera in modalità analogica o in modalità di conteggio degli impulsi.

Per l'introduzione del campione nello spettrometro è stato utilizzato un nebulizzatore ad alta efficienza ESI APEX-Q (Epond SA, Vevey, Svizzera). Lo strumento e gli accessori sono gestiti via PC mediante il software PlasmaLab. I parametri strumentali e di misura sono i seguenti: potenza di emissione 1400 W; flusso del gas nebulizzatore, 0,92 L / min; flusso di gas ausiliario, 1.00 L / min; flusso del gas di plasma, 13,1 L / min; misura in dual mode con peak jumping; dwell time, 10 ms; 25 sweeps; 3 repliche per un tempo di acquisizione totale di 180 s; gli isotopi selezionati sono ^{139}La , ^{140}Ce , ^{141}Pr , ^{146}Nd , ^{147}Sm , ^{153}Eu , ^{157}Gd , ^{159}Tb , ^{163}Dy , ^{165}Ho , ^{166}Er , ^{169}Tm , ^{172}Yb e ^{175}Lu .

Sono stati valutate le seguenti interferenze: $\text{CeO}^+/\text{Ce}^+ < 1\%$ e $\text{Ba}^{2+}/\text{Ba}^+ < 1\%$.

Prima di ogni sessione di analisi è stato effettuato un test di stabilità monitorando le masse di ^7Li , ^{59}Co , ^{115}In , ^{140}Ce and ^{238}U e verificando una precisione superiore al 2%.

La precisione strumentale era superiore al 2% per gli elementi in tracce, mentre l'incertezza complessiva (che coinvolgeva sia la preparazione del campione che l'analisi strumentale), calcolata in base a cinque repliche effettive, era superiore al 5%. Sono stati monitorati i segnali di fondo a 5, 101, e 220 m/z per eseguire un test di sensibilità sui campioni di analiti sopra indicati.

METODOLOGIE DI ANALISI

Determinazione del pH

Poiché il metodo si basa su una misura potenziometrica legata al grado di dissociazione degli acidi presenti, costituisce pertanto un indice di acidità reale e viene determinata attraverso un pHmetro

Si calibra lo strumento utilizzando nell'ordine le soluzioni tampone a pH 7 e pH 3, avendo cura di sciacquare l'elettrodo con acqua distillata ed asciugarlo tra una soluzione e l'altra. In base alla temperatura dell'ambiente si effettuano le eventuali correzioni di pH.

Si immerge l'elettrodo nel vino, e dopo una lenta agitazione, si legge direttamente il valore di pH.

Determinazione del grado alcolico

Si definisce grado alcolico effettivo il numero di mL di alcol etilico contenuti in 100 mL di vino misurati a 20°C (in pratica è la % in volume di alcol etilico).

La determinazione del grado alcolico effettivo viene effettuata secondo il metodo densimetrico mediante bilancia idrostatica.

Questo metodo consiste nella distillazione di 100 ml di vino, per separare l'alcol da tutti gli altri componenti non volatili; si ottiene così una miscela binaria idroalcolica, che viene riportata con acqua al volume originale, da cui si può risalire al contenuto in alcol determinandone la densità.

Mediante un matraccio tarato si prelevano 100 ml di vino, previamente portati a 20 °C e si versano nel pallone di distillazione insieme con le acque di lavaggio (circa 4 lavaggi).

Se l'acidità è troppo elevata occorre una preventiva neutralizzazione aggiungendo 10 ml di latte di calce (120 g di CaO/litro di acqua).

Si collega il pallone al refrigerante e si procede alla distillazione fino a che la quantità di distillato non sia pari a 2/3 del volume iniziale di vino. Come recipiente di raccolta si utilizza lo

stesso matraccio adoperato e, per evitare perdite di alcol, si pongono sul fondo 10 ml di acqua in cui si fa pescare la parte terminale del refrigerante. A fine distillazione si pone il matraccio in bagno termostato a 20 °C, si porta a volume con acqua distillata e si legge la densità a 20°C con la bilancia idrostatica. Mediante apposite tabelle si risale al grado alcolico.

Determinazione dell'anidride solforosa libera (per distillazione)

L'anidride solforosa viene trasportata a contatto con H₂O₂ e pertanto ossidata ad acido solforico, quindi viene titolata con idrossido di sodio.

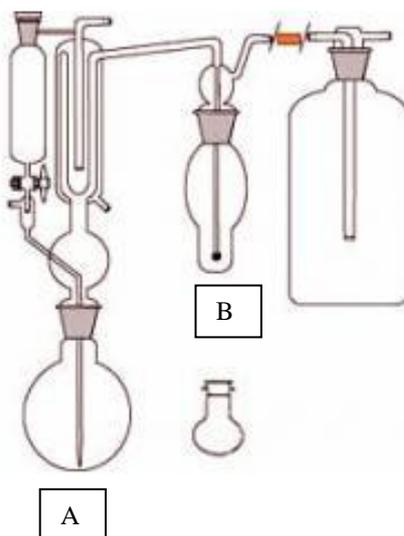


Figura 20 - Apparecchio per la determinazione della solforosa secondo il metodo ufficiale di analisi CE

Dopo aver trasferito 10 mL di vino nel pallone (A) si aggiungono 5 ml di acido fosforico al 25%

La reazione deve avvenire senza riscaldamento, per questo è necessario immergere il matraccio in ghiaccio (Figura 20).

Nell'apposito palloncino con appendice (B) si collocano 3 ml di acqua ossigenata allo 0,3 % e 1 goccia di indicatore misto con punto di viraggio a pH 5,1 (Si sciolgono 0,2 g di verde

bromocresolo e 0,04 g di rosso metile in 80 ml di alcool etilico a 95°. Si porta a volume a 100 ml con acqua).

Si lascia gorgogliare per 30 min e Trascorso il tempo necessario si titola con NaOH 0,01 N il contenuto del palloncino fino al viraggio dal rosso al verde.

I mg/L di SO₂ vengono calcolati nel modo seguente:

$$\text{SO}_2 \text{ mg/l} = V \times 32 \quad (V \times 6.4 \text{ nel metodo ufficiale dove si usano } 50 \text{ ml di vino})$$

$$V = \text{ml di soda consumati nella titolazione.}$$

Indice di polifenoli totali

L'indice di polifenoli totali viene determinato tramite una reazione di ossido-riduzione in cui l'agente ossidante è rappresentato dal reattivo di Folin-Ciocalteu (miscela degli acidi fosfotungstico e fosfomolibdico). In ambiente basico tale reattivo ossida i polifenoli a chinoni dando origine a una miscela complessa di ossidi di colore blu la cui intensità di colorazione è proporzionale alla concentrazione dei polifenoli stessi.

La reazione è aspecifica in quanto il reattivo di Folin-Ciocalteu ossida tutte le sostanze riducenti presenti nel vino (zuccheri, anidride solforosa, acido ascorbico).

0,1 ml di vino vengono prelevati direttamente dalla bottiglia ed introdotti in un matraccio tarato da 20 ml in cui sono stati posti circa 5 ml di acqua; successivamente si aggiungono 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 3÷5 minuti, 4 ml di soluzione di carbonato di sodio al 10%; infine si porta a volume con acqua distillata.

Dopo 90 minuti si effettua una lettura spettrofotometrica a 750 nm su percorso ottico di 1 cm dopo lettura di un bianco preparato nello stesso modo ma in cui il vino è sostituito dall'acqua.

Si calcola l'indice di polifenoli totali come (+)- catechina (mg/l) con la seguente relazione:

$$\text{Indice di polifenoli totali} = E_{1\text{cm}750\text{nm}} \times 173,3$$

dove E è l'assorbanza del campione letta a 750 nm di una cella con percorso ottico di 1 cm.

Indice di antociani totali e flavonoidi totali

Questo metodo di analisi si basa sul principio secondo il quale in ambiente acido tutti i pigmenti antocianici passano nella forma ionizzata e sono determinabili per via colorimetrica.

Gli antociani sono un gruppo di sostanze che presentano un massimo di assorbimento in ambiente alcolico-acido a 540 nm, mentre i flavonoidi presentano un massimo di assorbimento a 280 nm.

Il campione di vino da analizzare viene diluito 40÷50 volte con etanolo cloridrico (costituito da 70 parti di etanolo, 30 di acqua ed 1 di HCl concentrato).

Si registra lo spettro tra 230 e 700 nm del campione così diluito su 1 cm di P.O. e si determina il massimo di assorbanza a 540 nm.

L'indice di antociani totali, espresso come malvina cloridrato si calcola attraverso la formula:

$$\text{Indice di antociani totali} = E_{540} \times 16,17 \times d$$

Dove:

E_{540} è l'assorbanza del campione a 540 nm su un percorso ottico di 1 cm,

d è il numero di diluizioni effettuate,

16,17 è il fattore dedotto dall'assorbanza molare della malvina-3-O-glucoside ($\delta = 33.700$ in metanolo).

Per la determinazione dei flavonoidi totali, il cui massimo di assorbimento cade a 280 nm, è necessario effettuare una correzione grafica tracciando una tangente in corrispondenza dei punti di flesso della curva di assorbanza e considerare come assorbanza corretta la lunghezza del segmento perpendicolare all'asse delle ordinate tracciato a partire dal massimo 280 nm fino alla tangente (Figura 21).

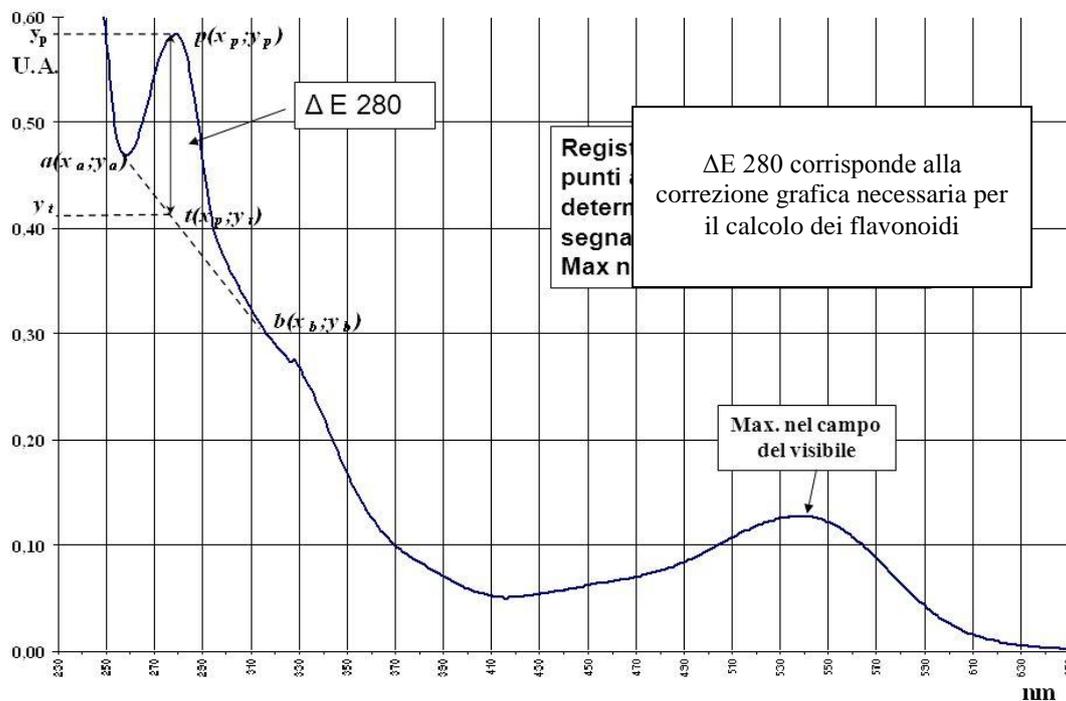


Figura 21 – Metodo grafico utilizzato per la determinazione dei flavonoidi totali

L'indice di flavonoidi totali, espresso come (+)- catechina (mg/l) si calcola attraverso la formula

$$\text{Indice di flavonoidi totali} = E' 280 \times 82,4 \times d$$

Dove:

82,4 è un coefficiente dedotto dall'assorbanza molare di una soluzione di (+) catechina,

E' 280 è l' assorbanza corretta a 280 nm,

d = numero di diluizioni.

Indice di proantocianidine

Il metodo sfrutta la possibilità di idrolizzare le proantocianidine in ambiente acido a caldo con formazione di antocianidine colorate determinabili per via spettrofotometrica. Dall'assorbanza a 532 nm della soluzione si risale al contenuto in proantocianidine espresse come cianina clururo.

0,2 ml di vino vengono posti in un pallone da distillazione da 50 ml. Si aggiungono 12,3 ml di etanolo (in modo tale da arrivare ad un volume totale di 12,5 ml) e, tenendo il pallone in acqua e ghiaccio al fine di bloccare la reazione, si aggiungono 12,5 ml di soluzione di acido cloridrico contenente 300 mg/l di solfato ferroso eptaidrato. Si registra lo spettro tra 360 e 700 nm del campione e si considera l'assorbanza a 532 nm (E1) (bianco).

Si trasferisce quindi il pallone in bagno-maria bollente dopo averlo munito di refrigerante a ricadere e lo si lascia coperto al riparo dalla luce per 50 minuti. Trascorso questo tempo si fa raffreddare il campione in acqua fredda, si registra lo spettro tra 360 e 700 nm e si considera l'assorbanza a 532 nm (E2).

Per ottenere l'indice di proantocianidine si determina l'assorbanza corretta a 532 nm con il metodo grafico proposto per l'analisi dell'indice di flavonoidi totali del bianco (E1) e del campione (E2) dopo idrolisi acida.

Si determina l'indice di proantocianidine espresse come cianina cloridrato:

$$\text{Indice di proantocianidine} = \Delta E \times 1162,5 \times d$$

dove ΔE è la differenza tra la seconda e la prima determinazione spettrofotometrica (E2-E1)

e d è il fattore di diluizione.

Profilo HPLC degli esteri tartarici degli acidi idrossicinnamici (HCTA) e dei flavonoli

Il vino viene acidificato con acido fosforico 1M (4,5 ml di vino + acido fosforico fino a 5 ml), filtrato su membrana da 0,25 μm , iniettato ed analizzato impiegando le condizioni

riportate di seguito.. La rivelazione degli HCTA è stata eseguita registrando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 320 nm mentre quella dei flavonoli a 360 nm, e registrando gli spettri d'assorbimento nell'intervallo 200-700 nm in modo da permettere la loro identificazione usando il DAD

La fase mobile è costituita da una miscela di 2 solventi, acido fosforico 0,001 M (Solvente A) e metanolo (Solvente B) eluiti secondo il gradiente riportato in Tabella 1.

Le condizioni strumentali sono state quelle sotto riportate e in Tabella 1:

- Precolonna Lichrospher 100 C18 (5 μ m) Merck
- Colonna: ODS Hypersil RP-18 (200 x 2.1 mm, 5 μ m)
- Flusso: 0,25 ml/min.
- Volume iniettato: 20 μ l
- Lunghezza d'onda: 320/360 nm

Tabella 1. Condizioni di gradiente della fase mobile

Minuti	Solvente A	Solvente B
	H ₃ PO ₄ 0.001 M	Metanolo
0-5	da 95% a 90%	da 5% a 10%
5-20	da 90% a 70%	da 10% a 30%
20-30	da 70% a 40%	da 30% a 60%
30-40	da 40% a 0%	da 60% a 100%
40-45	0%	100%
45-50	da 0% a 95%	da 100% a 5%
50-55	Tempo di equilibrio	

Nella Figura 22 si possono identificare i picchi relativi a:

- acido cis caffeiltartarico (1)
- acido trans caffeiltartarico (2)
- acido cis p-cumariltartarico (3)
- acido trans p-cumariltartarico (4)
- acido feruliltartarico (5)

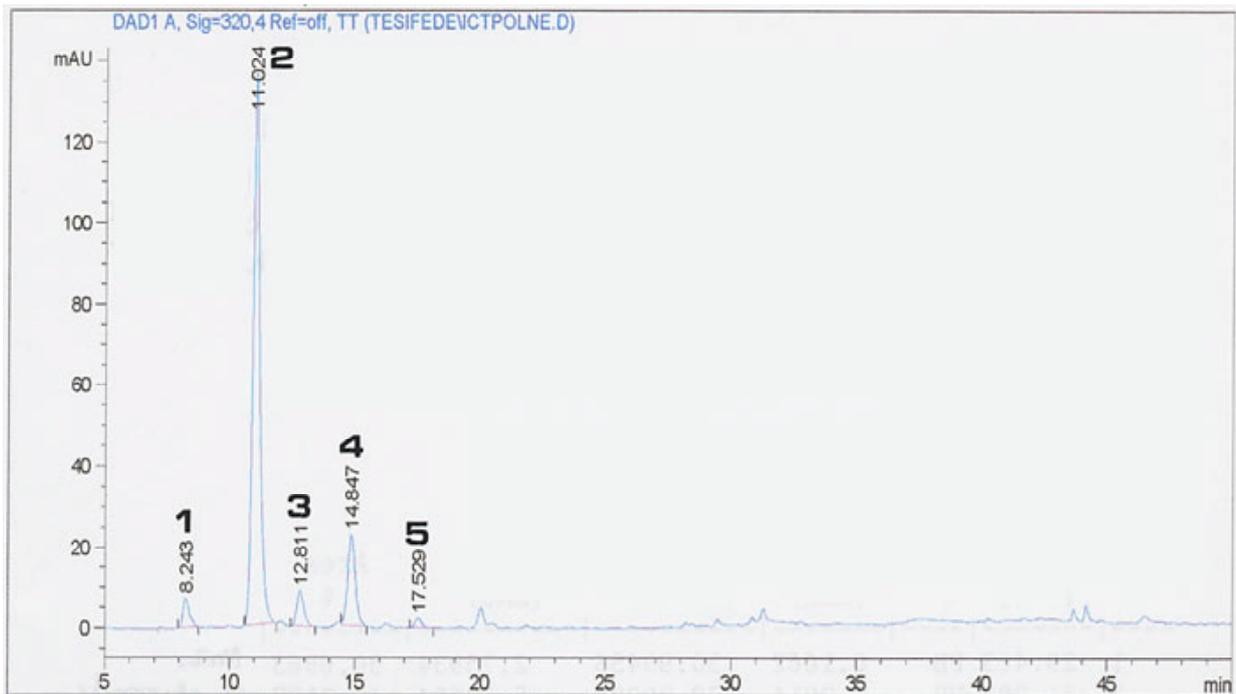


Figura 22 - cromatogramma relativo a un campione di vino analizzato

Determinazione del potere antiossidante tramite EPR

Il potere antiossidante è stato misurato tramite reazione del vino con una soluzione del un radicale organico stabile, il DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)

Sulla bilancia analitica vengono pesati 10 mg di DPPH e trasferiti in matraccio da 25 mL portato a volume con metanolo in modo da ottenere una soluzione 1 mM (soluzione madre). La soluzione ottenuta viene sonicata per 5 minuti in bagno ad ultrasuoni.

Dopo opportuna diluizione (1:10) la concentrazione della soluzione madre viene controllata con spettrofotometro UV-Vis ($\lambda = 515 \text{ nm}$; $\epsilon = 10200 \text{ l cm mol}^{-1}$).

Si procede alla preparazione di una soluzione di DPPH 250 μM (soluzione di lavoro) a partire dalla soluzione madre.

La preparazione del campione avviene miscelando 10 μL di vino con 990 μL della soluzione di lavoro di DPPH per 10 secondi e trasferendoli rapidamente nella cella piatta in quarzo per la misura. Esattamente dopo 5 minuti dalla miscelazione si registra lo spettro in EPR.

La registrazione dello spettro viene ripetuta dopo 10 e 15 minuti dal contatto del vino con il DPPH. La misura dello spettro EPR avviene con i seguenti parametri: centro della finestra spettrale 330 mT, ampiezza della finestra spettrale 5 mT, tempo di scansione 30s, frequenza di misura 9226,33 MHz, potenza della radiofrequenza 4 mW, frequenza di modulazione 100 KHz, ampiezza di modulazione 0,1 mT, costante di tempo 30ms

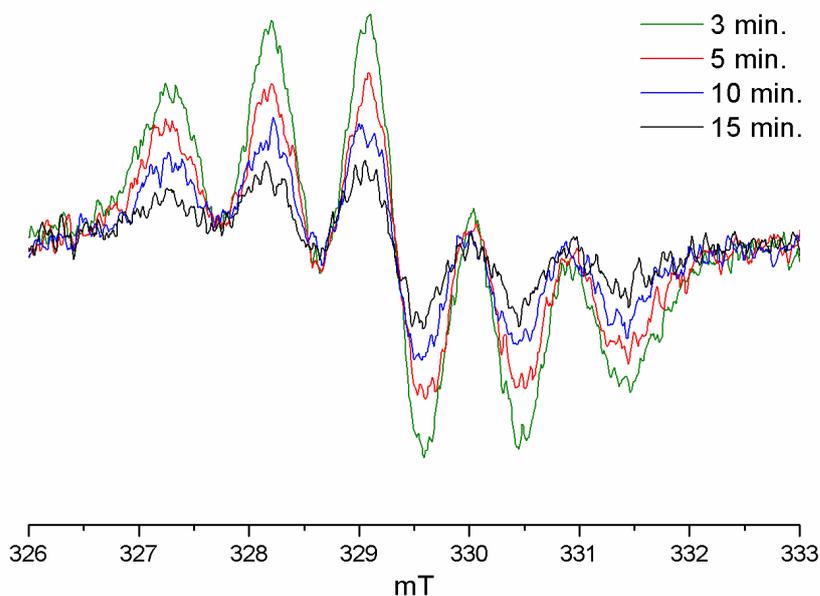


Figura 23 - andamento del segnale EPR nel tempo.

L'area del segnale è misurata tramite doppia integrazione del segnale EPR registrato tra 326 e 330 mT (Figura 23). Si calcola quindi il rapporto percentuale tra le aree del segnale del campione di vino e del campione di riferimento dopo 5, 10, 15 minuti dall'aggiunta di DPPH al vino. Il campione di riferimento è stato preparato aggiungendo 10 μl di una soluzione acquosa di etanolo 12% (v/v) a 990 μl della soluzione di lavoro di DPPH. L'attività antiossidante osservata nei vini viene riportata in equivalenti di (+)-catechina che abbiamo scelto come antiossidante di riferimento. Per poter esprimere i dati in equivalenti di (+)-catechina, è stato necessario procedere con la calibrazione del metodo. A questo scopo, differenti quantità di una soluzione 400 μM di (+) - catechina in metanolo sono stati aggiunti a 400 μl di soluzione di lavoro di DPPH. Si è quindi aggiunta la quantità di metanolo adeguata per ottenere 500 μl di un campione 200 μM in DPPH e con una concentrazione di (+)-catechina compresa tra 8 e 56 μM . Si è poi calcolato il rapporto percentuale tra le aree dei segnali del campione di (+)-catechina e quelli del campione di riferimento 5, 10, 15 minuti dopo l'aggiunta di DPPH. Per le misure con (+) - catechina il campione di riferimento è stata preparato aggiungendo 100 μl di metanolo a 400 μl della soluzione di lavoro del DPPH. In Figura 24 è riportata l'attività antiradicalica osservata per la (+)-catechina. L'attività antiossidante dei vini in esame (T5, T10, T15) è stata riportata come quantità equivalente di

(+)-catechina (mg /L) necessaria per dare un analogo abbattimento del segnale EPR del DPPH a parità di tempo contatto (Figura 24).

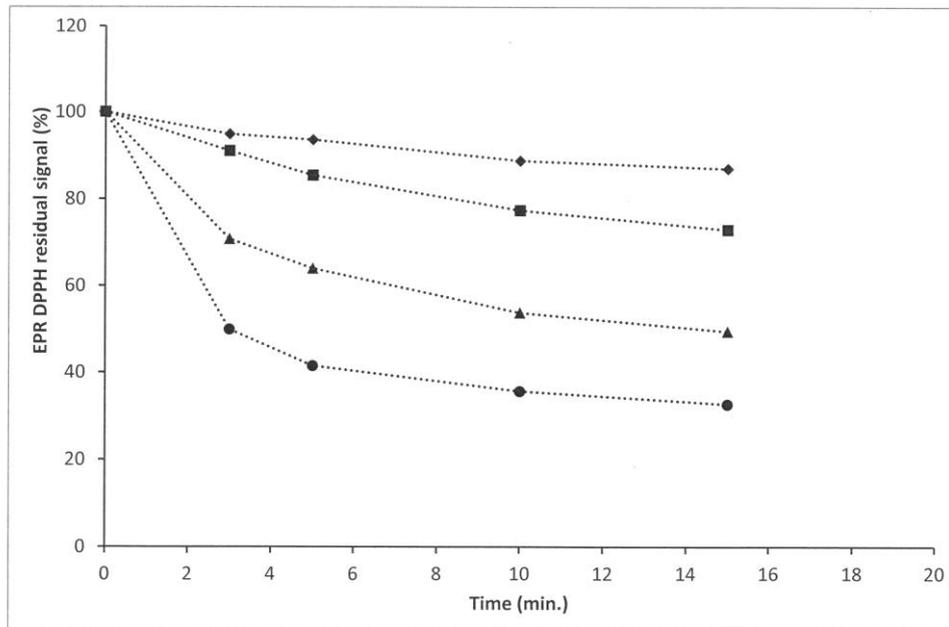


Figura 24 - Andamento con il tempo dell'attività antiradicalica della (+)-catechina 8 μM (rombi), 24 μM (quadrati), 40 μM (triangoli), 56 μM (cerchi).

SELEZIONE DEI CAMPIONI PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE

Le prove sperimentali, volte alla determinazione del potere antiossidante e del contenuto polifenolico, hanno riguardato i seguenti campioni di vino provenienti da cantine sperimentali o di cui le procedure attuate per la vinificazione e la genuinità dei campioni fossero garantite.

I campioni provenivano da diverse regioni d'Italia, appartenevano vendemmie diverse ed erano stati vinificati secondo tecniche differenti (tab.2).

Tabella 2 – campioni di vino analizzati, provenienza e tecniche di vinificazione adottate

Cultivar	Origine	Annata	Tecnica di vinificazione
Albarossa	Piemonte	2010	Tradizionale
Albarossa	Piemonte	2010	Macerazione prefermentativa a freddo
Albarossa	Piemonte	2010	Macerazione prefermentativa a caldo
Cornarea	Piemonte	2010	Tradizionale
Cornarea	Piemonte	2010	Macerazione prefermentativa a freddo
Cornarea	Piemonte	2010	Macerazione prefermentativa a caldo
Refosco	Veneto	2010	Tradizionale
Refosco	Marche	2010	Tradizionale
Refosco	Veneto	2009	Tradizionale
Refosco	Marche	2009	Tradizionale
Nero d'Avola	Veneto	2010	Tradizionale
Nero d'Avola	Marche	2010	Tradizionale
Nero d'Avola	Veneto	2009	Tradizionale
Nero d'Avola	Marche	2009	Tradizionale
Primitivo	Puglia	2008	Tradizionale con affinamento in barrique
Primitivo	Puglia	2009	Tradizionale con affinamento in barrique
Primitivo	Puglia	2010	Tradizionale con affinamento in barrique
Cabernet	Piemonte	2001	Tradizionale
Cabernet	Piemonte	2001	Tradizionale

Cabernet	Piemonte	2001	Tradizionale
Cabernet	Piemonte	2001	Tradizionale
Cabernet	Piemonte	2001	Tradizionale
Cabernet	Piemonte	2001	Tradizionale
Cabernet	Piemonte	2001	Tradizionale
Cabernet	Piemonte	2001	Tradizionale
Cabernet	Piemonte	2001	Tradizionale
Uvalino	Piemonte	2006	Tradizionale
Uvalino	Piemonte	2004	Tradizionale
Primitivo	Puglia	2010	Tradizionale con affinamento in barrique
Primitivo	Puglia	2010	Tradizionale con affinamento in barrique
Primitivo	Puglia	2011	Tradizionale con affinamento in barrique
Primitivo	Puglia	2011	Tradizionale con affinamento in barrique
Gaglioppo	Calabria	2009	Vinificazione in acciaio senza semi
Gaglioppo	Calabria	2009	Vinificazione in acciaio con semi semi
Gaglioppo	Calabria	2009	Vinificazione in barrique senza semi
Gaglioppo	Calabria	2009	Vinificazione in barrique con semi

TECNICHE DI VINIFICAZIONE UTILIZZATE PER LA DETERMINAZIONE DEL POTERE ANTIOSSIDANTE

Vinificazione tradizionale

L'uva è stata pigiadiraspata ed il pigiato è stato trasferito mediante pompa in vasca di lavorazione di acciaio inox. Al pigiato è stato aggiunto metabisolfito di potassio per limitare l'attività della microflora spontanea indesiderata presente sull'uva. Successivamente si è proceduto con l'inoculo di lieviti selezionati. Nel corso dei primi due giorni di fermentazione sono state eseguite due follature al giorno ed il terzo giorno una sola follatura ed il rimontaggio.

Le follature sono state brevi e delicate ed eseguite con un follatore in legno, per bagnare il cappello, al fine di impedire lo sviluppo di batteri acetici sulla superficie delle vinacce e favorire il contatto tra il mosto e le bucce per l'estrazione delle sostanze coloranti, senza però forzare troppo questa estrazione per impedire un'ossidazione spinta dei composti antocianici disostituiti a contatto con un'atmosfera non ancora completamente satura di CO₂.

Vinificazione con criomacerazione

Subito dopo la diraspa-pigiatura è stata eseguita una macerazione prefermentativa a freddo con l'impiego di ghiaccio secco. La macerazione a bassa temperatura così ottenuta è durata 48 ore.

Al termine si è provveduto ad inoculare i lieviti e si è proceduto come nella vinificazione tradizionale. La vinificazione è stata condotta fino al completo svolgimento della fermentazione alcolica.

Vinificazione con macerazione post-fermentativa

Questa tecnica consiste nel portare il mosto per un breve periodo di tempo a temperature elevate (fino a 80-90°C) in maniera da favorire una maggiore estrazione e diffusione dei composti fenolici delle bucce. Subito dopo la diraspa-pigiatura è stata eseguita una macerazione prefermentativa a caldo (15 min. a 60°C). Il mosto in seguito è stato immediatamente raffreddato (20°C), si è provveduto all'inoculazione dei lieviti e si è proceduto come nella vinificazione tradizionale.

Vinificazione senza semi con affinamento in acciaio e in barrique

Durante la fermentazione, svolta in modo tradizionale, i semi cadono sul fondo del vinificatore. Con l'aiuto di un raschietto, i semi vengono raccolti in una vaschetta e con l'attivazione di una valvola pneumatica estratti dal serbatoio. Con l'estrazione dei semi durante

la macerazione e fermentazione si diminuisce l'estrazione di tannini aspri e immaturi (verdi) nel mosto.

I passaggi successivi sono gli stessi della vinificazione tradizionale.

Affinamento in barrique

Al termine della fermentazione alcolica molti vini rossi di qualità prevedono un periodo di affinamento in fusti di piccole dimensioni (barriques). Durante la permanenza in legno, nel vino avvengono reazioni chimiche a carico dei polifenoli e degli antociani, influenzate dalle condizioni di conservazione (ossigeno che permea attraverso la porosità del legno) e dalla presenza di catalizzatori (ellagitannini estratti dal legno).

Queste reazioni sono responsabili della stabilizzazione del colore, della perdita di astringenza e dell'incremento della morbidezza e complessità dei vini. I vini in questione hanno subito un affinamento di dieci mesi in barrique prima dell'imbottigliamento.

METODI DI CAMPIONAMENTO

Campionamento e preparazione dei terreni per la determinazione delle terre rare

I campioni di suolo sono stati prelevati nei vigneti sperimentali della tenuta Cannona e della cantina Tombolini, utilizzando una zappetta per campionare a circa 20 cm dalla superficie.

Il suolo è stato raccolto in tre punti diversi all'interno della parcella sperimentale coltivata con le viti da cui sono stati successivamente prelevati gli acini. Le tre repliche sono state trattate e analizzate separatamente.

I campioni sono stati essiccati in stufa a 105°C per 24 ore e setacciati con setaccio a maglia di 0,2 mm.

Da ogni campione così preparato è stato prelevato 1 grammo di terreno ed è stato trasferito in beuta con collo a smeriglio.

Successivamente sono stati aggiunti 2ml di H₂O₂ al 30% e la beuta è stata trasferita su piastra riscaldante dotata di agitatore magnetico, in modo da permettere il continuo rimescolamento della soluzione durante la fase di ebollizione.

Al termine dell'ebollizione sono stati aggiunti altri 10 mL di H₂O₂ e la reazione è lasciata procedere per circa un'ora fino a riduzione del volume iniziale a circa 3mL e successivamente addizionate con 12mL di acqua regia (3mL di HNO₃ al 69% e 9 mL di HCl al 37%).

Il tutto è stato posizionato, sempre su piastra, sotto refrigerante e lasciato reagire a riflusso per almeno 2 ore.

Dopo raffreddamento, la soluzione ottenuta è stata trasferita in falcon da 50 mL e centrifugata due volte per 5 minuti a 7500 giri/min. Il liquido recuperato è stato poi portato a volume in matraccio da 100 ml con acqua ultrapura ottenuta con lo strumento Milli-Q (Milford, MA, USA).

Campionamento e preparazione dei campioni di uva per la determinazione delle terre rare

I campioni di uve utilizzate ai fini della determinazione delle terre rare sono stati prelevati durante la vendemmia 2012 presso il centro vitivinicolo della Regione Piemonte “Tenuta Cannona” di Carpeneto – Alessandria (dolcetto) e presso l’Azienda Tombolini Oreste di Grottaglie – Taranto (Primitivo).

I campioni sono stati prelevati in vigna prendendo acini da varie piante con diversa esposizione adottando un metodo stabilito per effettuare il campionamento in modo tale che esso sia realmente rappresentativo.

I prelievi sono stati effettuati da una o più viti, avendo cura di prendere in considerazione un opportuno mix costituito da grappoli con buona esposizione, con esposizione intermedia e coperti dai quali sono stati prelevati acini della sommità del grappolo, dal centro e dal basso.

Sono stati selezionati 300 acini e le bucce sono state separate dalla polpa e dai semi. Tagliando l’acino in due parti, si sono separati i semi staccandoli dalla polpa con lo stesso attrezzo utilizzato per tagliare l’acino (bisturi), mentre la polpa è stata recuperata raschiando delicatamente le bucce e lasciandola poi cadere in un becher, mentre la buccia è stata posta in altro contenitore.

Le tre frazioni ottenute sono state pesate e trasferite in stufa per l’essiccamento.

Dopo essiccamento il materiale è stato trasferito in crogiolo di ceramica e passato in muffola per la rimozione della sostanza organica mediante calcinazione.

I tempi e le temperature utilizzate per ottenere le ceneri sono le seguenti:

UVE (POLPA, BUCCIA E SEMI)
15 min a 150°C
60 min a 999°C
10 min a 999°C

Al termine del ciclo i campioni sono stati lasciati raffreddare in muffola per una notte.

Tutti i campioni di uve hanno subito il passaggio dell'incenerimento due volte, fino al raggiungimento di ceneri bianche, prive di tracce di materiale organico.

Le ceneri rimanenti sono state recuperate tramite solubilizzazione con 1 mL di HNO₃ al 69% e risciacquo della capsula con acqua ultrapura. Il tutto viene portato a volume in matraccio da 50 mL.

Nei casi in cui era stato presente un precipitato insolubile i campioni sono stati centrifugati a 7500 giri/min per 5 minuti.

Metodi di campionamento e preparazione dei campioni di mosto e vino per la determinazione delle terre rare

Le vinificazioni delle uve Dolcetto e Primitivo sono state eseguite presso le cantine sopracitate.

I prelievi di mosto e vino sono stati effettuati in epoche diverse e stabilite:

1. prelievo del mosto ad un giorno dalla pigiatura
2. prelievo alla svinatura
3. prelievo del vino dopo fermentazione malolattica

Il primo prelievo è stato congelato per bloccare la fermentazione nel periodo di tempo che intercorreva tra il campionamento e l'analisi.

Al momento dell'analisi circa 30 ml di vino (o mosto) sono stati pesati in crogiolo di porcellana e trasferiti in stufa a 80°C per un giorno (fino ad essiccazione completa).

I crogioli sono stati successivamente trasferiti in muffola per l'incenerimento.

I tempi e le temperature utilizzate sono riportate in tab. 3.

Tabella 3 – Tempi e temperature utilizzate per l'incenerimento dei campioni.

MOSTO E VINO
50 min per raggiungere 750°C
10 min a 750°C
10 min per raggiungere 900°C
10 min a 900°C

Al termine del ciclo i campioni sono stati lasciati raffreddare in muffola per una notte.

TECNICHE DI VINIFICAZIONE UTILIZZATE PER LA DETERMINAZIONE DELLE TERRE RARE

Le uve Dolcetto sono state vinificate senza repliche in due modi: vinificazione in rosso e in rosato.

Vinificazione in rosso

Le uve sono state diraspate e pigiate, aggiunte di SO₂ (4 g / 100 kg di uva) e trasferiti per la macerazione e la fermentazione alcolica in serbatoi di acciaio. Successivamente sono state inoculate con lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Durante le 12 giorni di macerazione i vini sono stati svinati. La fermentazione malolattica (FML) ha avuto luogo in una stanza con aria condizionata a 22-24°C, dopo l'inoculazione di batteri selezionati *Leuconostoc oenos*. Alla fine della FML il vino è stato aggiunto di SO₂ (40 mg / L) e lasciato decantare per i mesi invernali.

Vinificazione in rosato

L'uva viene pigiata e succo e bucce sono lasciati macerare (tenuti in contatto tra loro) per due giorni per estrarre la quantità desiderata di colore o antociani. Successivamente il succo viene separato dalle bucce e fermentato come vino bianco in vasche di acciaio inox. La fermentazione malolattica viene evitata e il vino è stato travasato e trasferito in un altro vasche di acciaio.

Le uve Primitivo, dopo la raccolta, sono state trasportate in cantina e trattate con 20 mg / L di anidride solforosa.

Le uve sono state pigiate, diraspate e il mosto è stato trasferito in vasche dove è avvenuta la macerazione. Dopo un paio di giorni di macerazione a freddo, il mosto è stato inoculato con lieviti selezionati ed ha iniziato la fermentazione.

La quantità di tempo necessario per la fermentazione varia dal tipo di uva e dalla tecnica di vinificazione: nel vino Grottaglie, che aveva una maggiore concentrazione di zuccheri, la fermentazione è durata un mese. Dopo la fermentazione, il succo (ora vino) è stato svinato e lasciato decantare.

Successivamente è stato messo in botti di rovere per l'invecchiamento dove ha svolto la fermentazione malolattica. Questa è una reazione in cui l'acido malico viene convertito in acido lattico e contribuisce alla disacidificazione del vino. In questo caso la fermentazione malolattica, si è verificata naturalmente (senza inoculo). Alla fine della fermentazione malolattica, monitorata con HPLC, sono stati analizzati i campioni.

Questi vini sperimentali non sono stati filtrati e stabilizzati.

I campioni di vini analizzati sono presentati in tab.4.

Tabella 4 – Campioni di vino analizzati

Dolcetto	Primitivo
Mosto 2012	Mosto 2012
Vino rosso dopo fermentazione alcolica	Vino rosso dopo fermentazione alcolica
Vino rosso dopo fermentazione malolattica	Vino rosso dopo fermentazione malolattica
Vino rosato dopo fermentazione alcolica	Vino vendemmia2008
Vino rosato dopo 6 mesi di affinamento in acciaio	Vino vendemmia 2009
	Vino vendemmia 2010
	Vino vendemmia 2011

DETERMINAZIONE DELLE TERRE RARE MEDIANTE ICP-MS

Per la determinazione quantitativa degli elementi presenti nei campioni è stato utilizzato uno standard esterno multielemento, preparato in cinque concentrazioni diverse tra 10 e 10000 ng/L, attraverso diluizione della soluzione madre (100 mg/L) all'1% in acido nitrico.

Per correggere le derive strumentali è stata utilizzata la standardizzazione interna monitorando i segnali dagli isotopi ^{103}Rh , ^{115}In e ^{209}Bi , che sono stati aggiunti a tutti i campioni, agli standard e ai bianchi ad una concentrazione di 10 mg / L; le risposte dei tre isotopi sono state interpolate per ottenere una correzione migliore.

Per valutare le prestazioni e il recupero del trattamento dei campioni proposto, sono stati analizzati tre materiali standard certificati. Sono stati analizzati BCR 668 (tessuto di mitilo) e BCR 670 (lenticchia d'acqua), materiali certificati da IRMM applicando la procedura di incenerimento utilizzata per uve e mosti, mentre il materiale certificato SRM 2586 (tracce di elementi in terreni contenenti piombo da vernice), proveniente dal National Institute of Standards and Technology (NIST), è stato analizzato secondo il trattamento descritto per il campioni di terreno.

Tutte le analisi effettuate hanno mostrato un buon accordo tra il valore di concentrazione certificato e i valori osservati. I recuperi sono riportati in Oddone et al. (2009).

I campioni sono stati diluiti 10 volte in acido nitrico all'1% prima di essere analizzati dallo strumento.

RISULTATI:

Il potere antiossidante dei polifenoli

I 36 campioni di vino rosso ottenuti da 9 cultivar differenti sono stati analizzati relativamente ai 20 parametri già descritti precedentemente in materiali e metodi.

I risultati sono presentati in Tabella 5.

La tabella è stata suddivisa in due parti: nella prima sono riportati i dati relativi alle analisi EPR, spettrofotometriche e di routine, mentre nella seconda parte sono state proposte le analisi HPLC.

La tabella riporta l'intero set di dati ottenuti analizzando ogni campione in triplo.

I vini, prodotti in cantine sperimentali, sono caratterizzati dalla totale assenza di additivi chimici come acido ascorbico o glutatione. Questa caratteristica è molto importante in quanto, essendo entrambi potenti antiossidanti, avrebbero potuto influenzare i risultati dell'analisi. I quantitativi molto modesti di acido ascorbico ritrovati in alcuni campioni sono di origine naturale. Anche la presenza di SO₂ libera è molto modesta con valori compresi tra 0 e 28 mg/L. Questi risultati hanno confermato che le cantine ne hanno aggiunta solo la quantità minima necessaria per proteggere il vino anche se una maggiore aggiunta è legalmente consentita.

Nonostante i numerosi tentativi di trovare delle alternative altrettanto efficaci ma più salutari per l'uomo, l'anidride solforosa rappresenta ancora oggi il conservante enologico per eccellenza.

L'interesse per l'uso di questo additivo in fase di affinamento del vino risiede nella sua capacità pressoché unica di svolgere contemporaneamente un'azione antisettica e antiossidante.

I campioni sono stati prodotti con uve coltivate in diverse zone d'Italia (con diversi terreni e caratteristiche climatiche), provenienti da diverse cultivar, di annate che variano dal 2001 al 2012 e vinificati seguendo tecniche diverse, molto spesso innovative rispetto alla procedura tradizionale. Ciò ha permesso di ottenere un insieme di campioni che sia garanzia di un'adeguata eterogeneità, condizione necessaria affinché i risultati fossero sufficientemente oggettivi.

Come previsto, poiché i vini scelti per lo studio sono molto eterogenei, i valori sperimentali ottenuti dall'analisi dei parametri delle sostanze ad azione antiossidante sono stati molto vari.

In particolare, l'indice di polifenoli totali varia tra 765-5745 mg /L. Cheynier et al. (2006) e Fulcrand et al. (2006) in bibliografia riportano valori medi per l'indice di polifenoli nei vini di circa 2160 mg/L.

Se noi osserviamo quindi gli indici di concentrazione che sono stati riscontrati nei nostri campioni possiamo renderci conto del fatto che alcuni campioni ne presentano quantità molto

basse (ad esempio i Cabernet Sauvignon), mentre in altri, come il Gropello, tale valore è notevolmente superiore alla media (Figura 25). Ciò è da imputare, per quanto riguarda i Cabernet, sicuramente all'invecchiamento del vino.

E' normale, infatti, che con il tempo si siano verificati fenomeni di aggregazione e precipitazione delle sostanze polifenoliche causando un depauperamento quantitativo anche notevole.

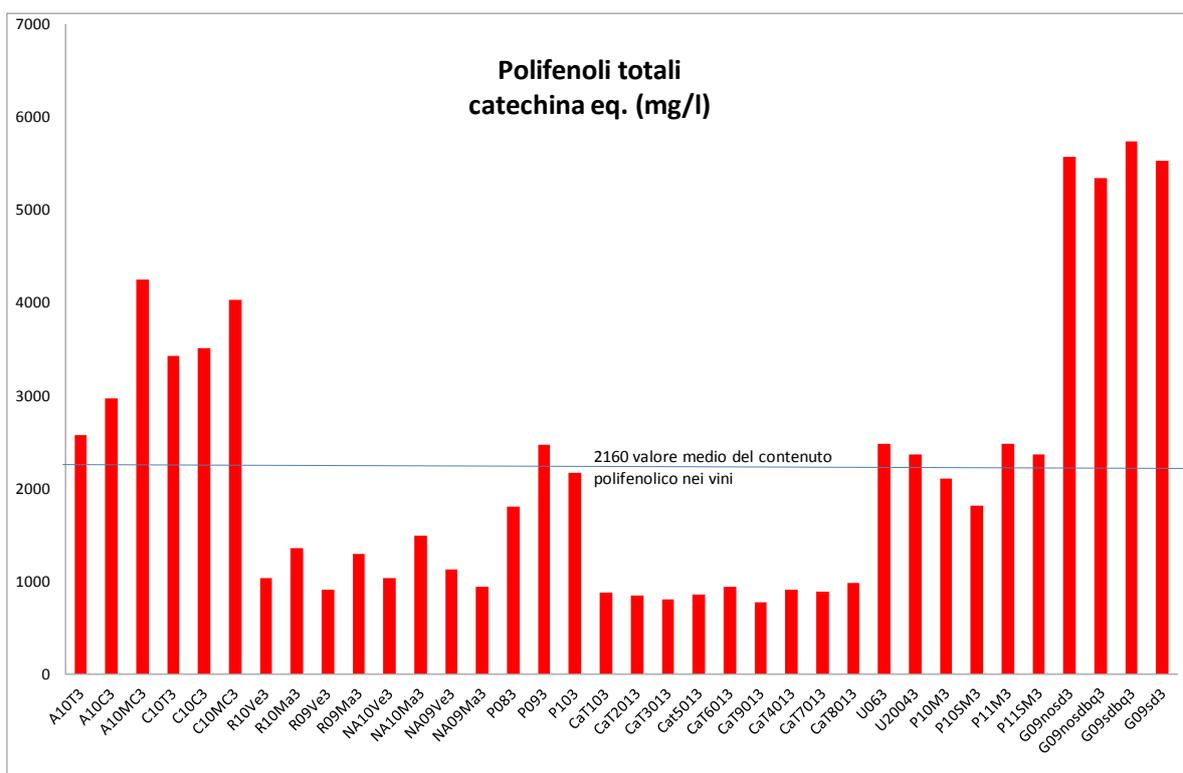


Figura 25 – Tenore in polifenoli totali nei campioni di vino analizzati

L'indice degli antociani totali varia tra 18 e 687 mg/L, l'indice dei flavonoidi tra 810 e 5260 mg/L e l'indice delle proantocianidine oscilla tra i 761 e 6900 mg/L (Figura 26).

Anche questi parametri sono fortemente influenzati dalla varietà, dall'annata e dalle tecniche di vinificazione. Vini come la Cornarea sono notoriamente ricchi in antociani, composti che impartiscono a questi vini la caratteristica colorazione rosso-violacea. Campioni come il Primitivo, il Gropello sono invece caratterizzati dalla presenza di elevati tenori di

tannini (le proantocianidine), che ne garantiscono la longevità nel tempo ed impartiscono loro una corposità notevole.

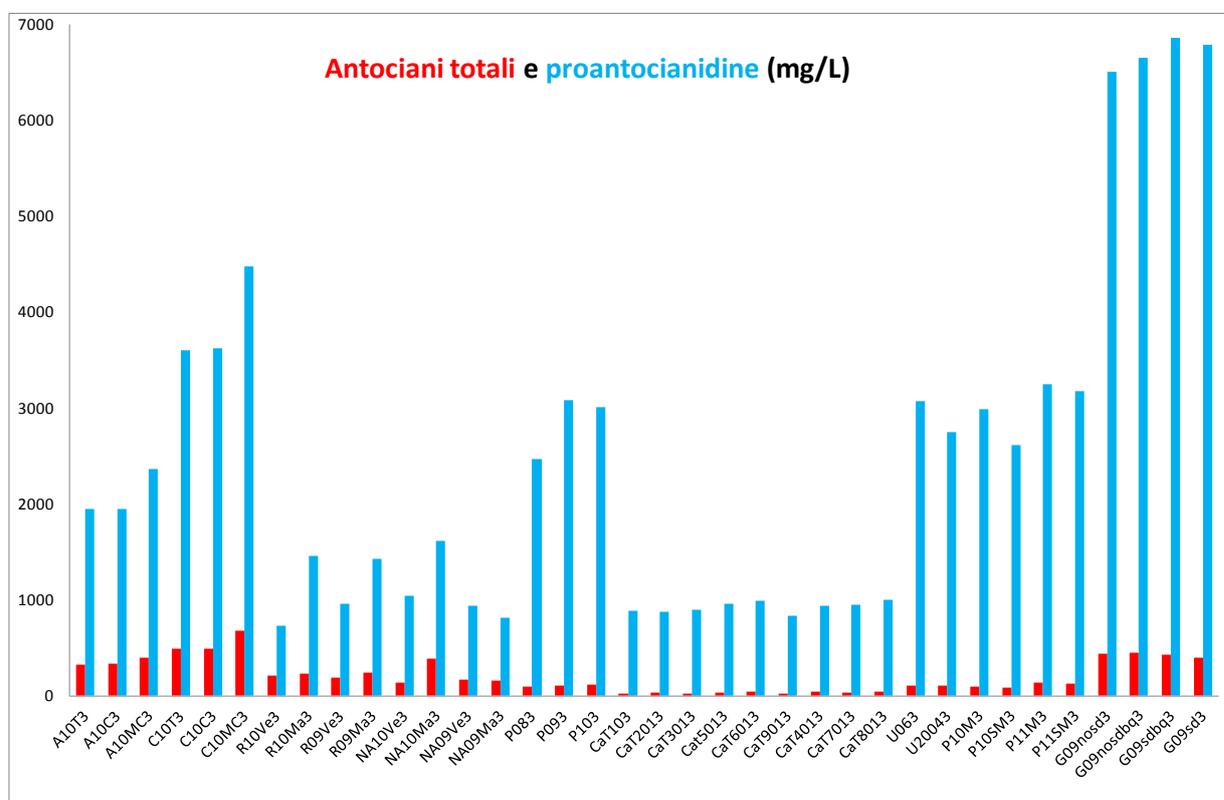


Figura 26 – Concentrazioni di antociani totali e proantocianidine nei campioni di vino analizzati

I vini hanno una gradazione alcolica molto eterogenea, compresa tra 9,64 e il 16,38% andando a rispecchiare la distribuzione dei vini in commercio. Il mercato chiede sempre di più vini a limitatissimo tenore di alcol, inferiore a 10%, spinto in modo determinante dalle restrizioni al consumo di alcolici per chi si mette alla guida. Allo stesso tempo sono ricercati vini adatti all'invecchiamento, come il Primitivo di Manduria, che devono avere un buon tenore alcolico, che ha la funzione di preservare gli stessi dal decadimento e dalla contaminazione microbica.

Gli HCTA (acido caffeiltartarico, cumariltartarico e feruliltartarico) e i flavonoli (quercetina, miricetina e kaempferolo) sono presenti in bassa concentrazione. Singleton et al., (1984), in un lavoro sull'evoluzione dei polifenoli nel vino, mostrano come anche se presenti in alta concentrazione nell'uva, durante la fermentazione e l'invecchiamento questi componenti diminuiscano in modo significativo.

La diminuzione del segnale del DPPH registrato con l'EPR è funzione sia del tempo di contatto che della quantità di composti antiossidanti presenti.

Nella maggior parte dei campioni l'abbattimento del segnale rimaneva pressoché costante dopo i 15 minuti, per questo motivo si è deciso di interrompere le misure a questo tempo.

Come già anticipato, l'attività antiradicalica dei vini analizzati è stata espressa come concentrazione di (+)-catechina (mg L^{-1}) necessaria a provocare il medesimo abbattimento del segnale EPR dopo lo stesso tempo di contatto con il DPPH. Si è scelto di utilizzare come riferimento la catechina dal momento che polifenoli totali e flavonoidi vengono espressi come contenuto equivalente di catechina. In tal modo è stato possibile rendere confrontabili le due tecniche di misura ed eseguire analisi statistiche che correlassero il potere antiossidante al contenuto delle varie frazioni di polifenoli.

I dati EPR di abbattimento del segnale del DPPH (T5, T10 e T15) trovati sui vini, quando espressi come equivalenti di (+)-catechina, sono pressoché costanti al variare del tempo di contatto. Questo indica che la velocità della reazione di spegnimento del radicale per i vini in esame e per la (+)-catechina è molto simile. L'aumento dell'abbattimento del segnale EPR con il crescere del tempo di contatto, avendo un andamento simile per i vini e per la (+)-catechina, viene mascherato esprimendo il dato in equivalenti di (+)-catechina.

I vini Gaglioppo e Cornarea hanno mostrato la più alta attività antiossidante, mentre Nero d'Avola e Cabernet hanno dimostrato un potere antiossidante inferiore. Come già accennato a proposito del contenuto polifenolico esiguo per i vini Cabernet del 2001 ciò può essere spiegato dall'effetto dell'invecchiamento che ne ha causato un drastico impoverimento. In generale, i campioni con un alto contenuto di polifenoli (Groppello, Primitivo, Albarossa, Cornarea e Uvalino) hanno mostrato una buona capacità di spegnimento del DPPH.

Dal momento che i vini appena citati sono anche caratterizzati da un elevato contenuto di alcol e da valori di acidità variabile, si è deciso di approfondire l'effetto di questi parametri sul potere antiossidante.

A tal fine si è testata l'attività antiradicalica di un campione di vino caratterizzato da un basso contenuto di alcool (9,5% v / v di etanolo). Successivamente il suo contenuto di alcol è stato aumentato prima al 12,00% v / v e successivamente al 14,50% v / v aggiungendo etanolo assoluto ed è stata ripetuta l'analisi. Non sono state osservate differenze nell'attività antiradicalica prima e dopo tali aggiunte di etanolo. Pertanto se ne può concludere che la gradazione alcolica di per sé non influisce sulla determinazione del potere antiossidante.

L'effetto del pH sul potere antiossidante è stato valutato utilizzando un vino a pH 3,48. Tale pH è stato variato tra 2,98 e 3,98 aggiungendo rispettivamente acido cloridrico e idrossido di sodio. Anche in questo caso non sono state osservate variazioni nell'attività antiradicalica né acidificando né basificando il campione.

DISCUSSIONE

I dati sperimentali mostrano chiaramente che esistono profonde differenze tra i campioni e la correlazione diretta tra i dati appare complessa. L'approccio classico che consiste nel considerare una variabile alla volta non risulta uno strumento valido per mettere in evidenza eventuali correlazioni tra le diverse classi di composti e la capacità antiossidante complessiva del vino.

Si è pertanto eseguita un'analisi delle componenti principali (PCA) sul set di dati completo in cui le variabili sono state auto-scalate al fine di eliminare la disomogeneità dovuta al fattore di scala. Nella Figura 27 è riportato lo scree plot ottenuto dall'analisi dell'intero dataset di campioni.

Si può chiaramente notare che la prima componente principale (PC1) spiega circa il 61% della varianza totale contenuta nel set di dati e la seconda componente principale (PC2) circa il 15%. Pertanto le successive PC possono essere considerati non statisticamente significative (Figura 27).

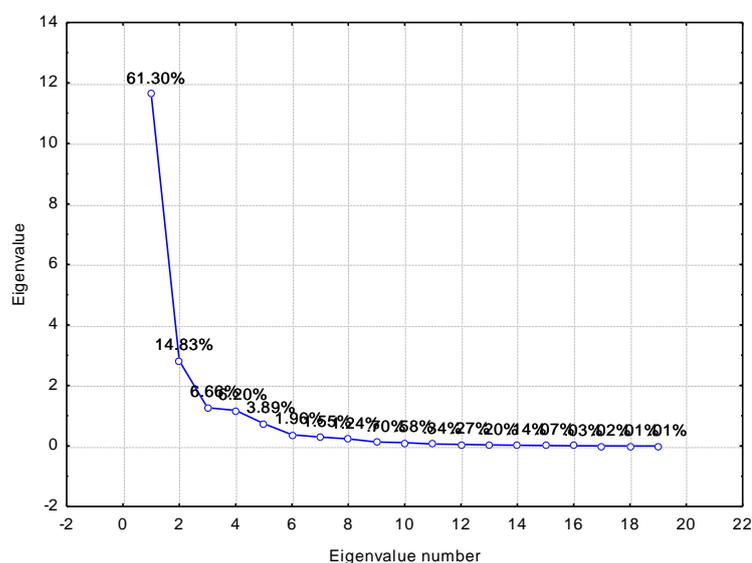


Figura 27 - Scree Plot ottenuto conducendo la PCA sull'intero dataset .

In Figura 28, è presentato lo score plot ottenuto per le prime due PC. I campioni della stessa cultivar hanno lo stesso codice di colore. Le prime due componenti principali

consentono un'effettiva separazione dei campioni in classi diverse. I risultati delle tre ripetizioni del campione sono molto simili ad indicare l'eccellente ripetibilità per tutti i parametri esaminati.

In particolare, possono essere identificati sette gruppi ben definiti (Figura 28), costituiti principalmente da vini provenienti dalla stessa cultivar. Le eccezioni sono il Nero d'Avola e il Refosco, i cui dati sono parzialmente sovrapposti.

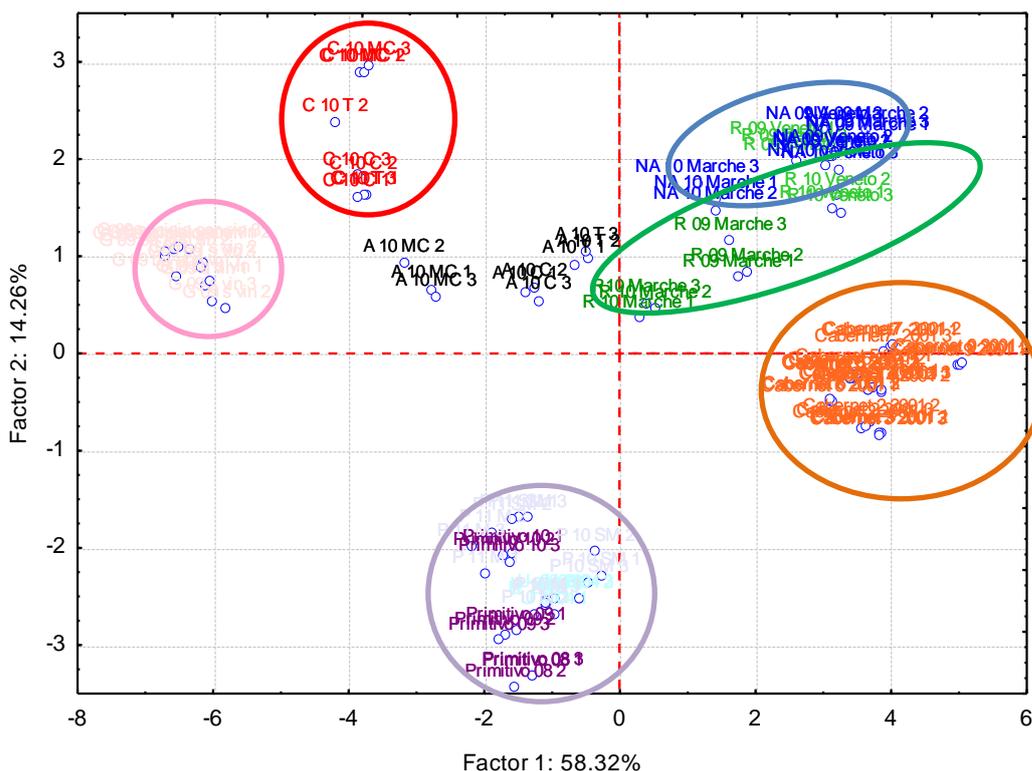


Figura 28 - Score Plot di PC1 su PC2.

L'interpretazione accurata dei fattori responsabili di questo raggruppamento dei campioni richiede le informazioni che vengono fornite dal Loading Plot (Figura 29).

La PC1 mostra pesi negativi per molte delle variabili studiate. In particolare, le variabili relative alle analisi EPR (T5, T10 e T15) e agli indici che raggruppano famiglie di polifenoli, come le proantocianidine, i flavonoidi e polifenoli totali, sono caratterizzate da pesi negativi molto marcati. Inoltre, un contributo inferiore, ma comunque significativo è rappresentato anche dalla quercetina glucoside e glucuronide e dall'acido trans-caffeiltartarico, che presentano sempre un peso negativo. Il pH è l'unica variabile con un peso positivo sulla PC1,

ma il suo valore non è particolarmente elevato. Per quanto riguarda la prima PC, i valori EPR ed il contenuto di polifenoli sono caratterizzati da pesi negativi e ciò indica che vi è una forte correlazione tra loro. Per questo motivo, la macrovariabile PC1 può rappresentare chiaramente il "potere antiossidante" dei campioni. Distingue, infatti, molto bene Gaglioppo e Cornarea (che hanno una elevata capacità antiossidante) da Cabernet Sauvignon, Refosco e Nero d'Avola.

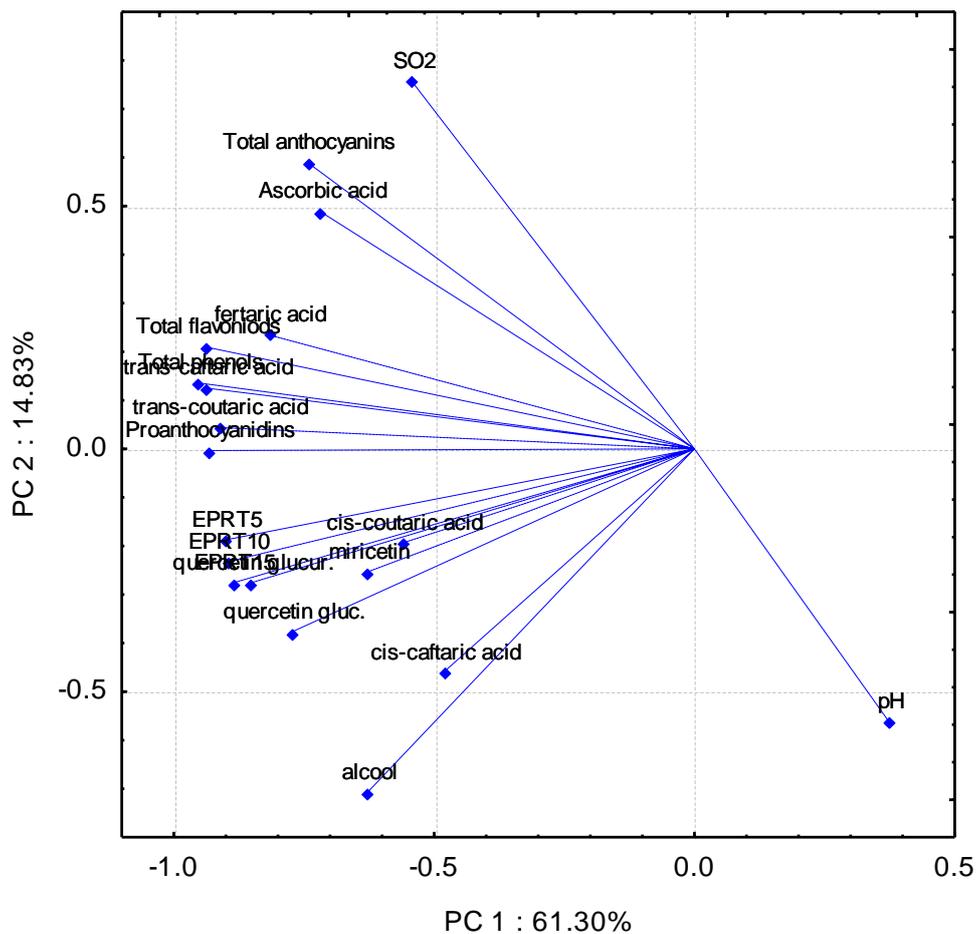


Figura 29 - Loading plot riportante PC1 su PC2

La Figura 28 permette di mettere in evidenza il potere antiossidante dei vini in studio, mostrando la loro posizione lungo l'asse PC1. Spostandosi nella figura da destra verso sinistra, infatti, si osserva un aumento del potere antiossidante.

È importante notare che il potere antiossidante dei campioni Gaglioppo è superiore a quello di tutti gli altri vini, indipendentemente dalle tecniche di vinificazione utilizzate per produrli.

Per descrivere ulteriormente le differenze tra i gruppi sopra menzionati, bisogna anche considerare le variabili che costituiscono la PC2. La PC2 descrive una percentuale residua di varianza di circa il 15% (Figura 29) ed è caratterizzata principalmente dall'aver pesi negativi per tenore in alcool e pH e pesi positivi per SO₂ libera, antociani totali e acido ascorbico.

In Figura 28, si può notare come PC2 separi i gruppi di campioni di Refosco, Nero d'Avola, Albarossa e Cornarea (situati nella parte superiore della figura) dal gruppo di campioni di Primitivo e di Uvalino (situata nella parte inferiore).

La stretta correlazione tra alcool e pH può essere spiegata dal fatto che un elevato contenuto di alcool nei campioni di vino deriva dall'utilizzo di uve ad alto tenore zuccherino (uva molto matura); questo inevitabilmente porta ad un prodotto finale con un pH relativamente alto (bassa acidità). Infatti, Primitivo e Uvalino sono entrambi vini con un alto contenuto di alcool ed una bassa acidità, dal momento che sono stati realizzati con uve molto mature. I fenomeni più evidenti che si verificano nel corso della maturazione sono infatti la diminuzione dell'acidità e l'aumento degli zuccheri.

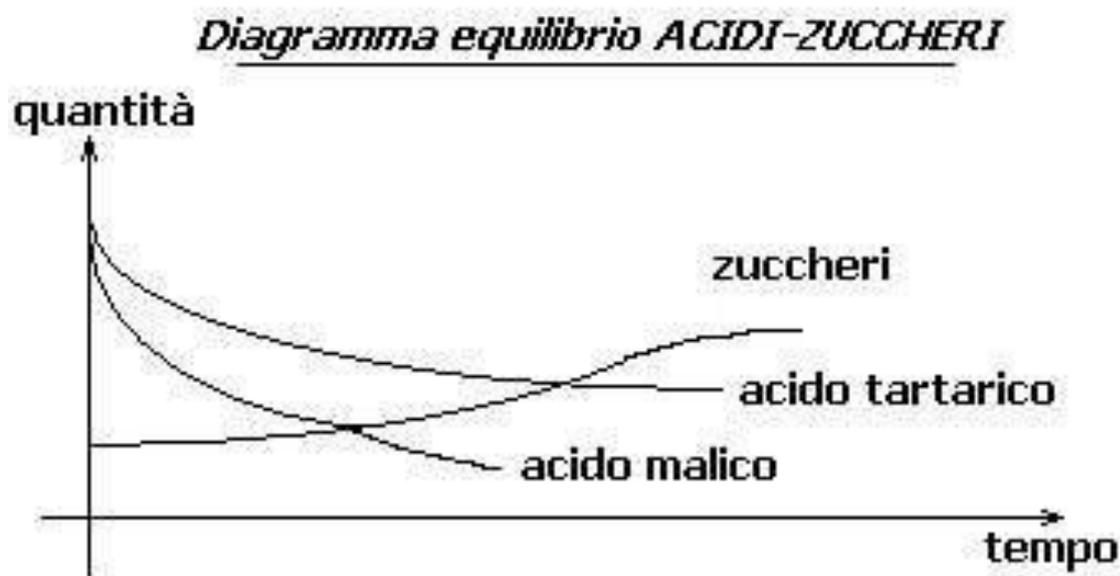


Figura 30 - Andamento del contenuto in zuccheri e acidi organici dell'uva

Soprattutto nei vini meridionali il rapporto zuccheri/acidi è superiore a quello che si riscontra nelle zone settentrionali, poiché nelle prime la fotosintesi clorofilliana è più intensa a motivo delle maggiori temperature raggiunte soprattutto in primavera e in autunno. Il diagramma di equilibrio tra acidi e zuccheri è visibile in Figura 30.

La SO_2 libera ha un peso opposto sulla PC2 rispetto ad alcool e pH. Nonostante le basse quantità di SO_2 trovate in tutti i campioni, questa variabile consente a PC2 di evidenziare le differenze tra campioni di vino biologici come Primitivo e Uvalino e campioni che derivano dai processi di micro-vinificazione come Refosco, Nero d'Avola, Albarossa e Cornarea. La vinificazione di piccoli quantitativi di uva (30-100 Kg) viene utilizzata quando non sia economicamente conveniente lavorare su grandi volumi o si disponga di basse quantità di prodotto trattandosi di nuovi impianti o di tesi sperimentali volte a saggiare le caratteristiche di vitigni, cloni e incroci, la validità dei trattamenti effettuati, dei processi intrapresi e dei prodotti utilizzati. Le microvinificazioni sono condotte presso cantine appositamente allestite con piccole pigiadiraspatrici e torchi, contenitori in acciaio inox da 100 L, climatizzatori fissi o mobili.

Le micro vinificazioni seguono un protocollo di vinificazione standard ideato in modo da limitare al massimo interventi tecnologici e correttivi. Dal momento che la gestione di micro quantità di uve è di più difficile controllo il tenore in SO_2 necessario per prevenire l'ossidazione è leggermente maggiore.

Nella tabelle 5°, 5b, 5c e 5d sono riportati i valori relativi ai singoli parametri presi in esame presentati come valor medio delle tre ripetizioni.

E' stata inoltre riportata anche la deviazione standard rilevata tra le tre ripetizioni.

Tabella 5a – Analisi spettrofotometriche:valor medio delle tre ripetizione

	Antociani totali (mg/L)		Flavonoidi totali (mg/L)		Polifenoli totali (mg/L)		Proantocianidine (mg/L)	
	media	st.dev.	media	st.dev.	media	st.dev.	media	st.dev.
A 10 T	318,33	3,51	2639,33	5,13	2570,67	22,90	1946,33	26,50
A 10 C	330,98	49,31	3033,00	10,15	2971,00	14,73	1950,00	6,56
A 10 MC	396,38	4,64	4143,67	7,09	4252,00	585,43	2364,67	7,51
C 10 T	493,91	7,25	3674,33	21,59	3424,00	4,58	3603,67	7,02
C 10 C	487,22	8,59	3672,33	7,51	3513,00	10,15	3626,00	11,53

C 10 MC	674,46	11,32	4959,33	7,37	4029,67	7,57	4474,67	15,95
R 10 Ve	210,00	5,00	927,00	8,54	1035,33	7,51	730,00	12,29
R10 Marche	226,00	5,29	1305,00	3,00	1353,33	10,69	1457,00	11,53
R 09 Veneto	193,00	7,21	851,67	10,02	905,00	6,24	959,00	4,36
R 09 Marche	242,33	7,51	1307,33	6,03	1294,67	14,64	1425,00	4,00
NA 10 Veneto	140,33	4,51	807,00	3,00	1026,33	4,93	1041,33	6,03
NA 10 Marche	380,67	4,04	1570,00	7,55	1493,33	7,57	1617,33	8,62
NA 09 Veneto	168,67	3,51	1098,67	6,03	1129,33	6,11	935,67	3,21
NA 09 Marche	158,33	3,06	990,00	9,00	939,00	7,94	811,33	3,21
P 08	92,33	2,52	1472,67	5,69	1805,33	6,11	2464,33	1,15
P 09	100,33	5,03	2265,33	6,51	2468,00	3,00	3082,00	10,54
P 10	112,33	2,52	2091,67	13,80	2165,67	10,50	3007,67	9,07
Ca T 1	24,67	0,58	841,67	5,86	878,00	4,36	885,33	7,02
Ca T 2	28,00	1,00	808,00	6,56	843,00	7,55	878,00	10,15
Ca T 3	21,67	2,08	832,67	4,04	801,67	12,22	899,00	119,55
Ca t 5	32,00	2,65	910,33	6,66	854,67	13,58	957,00	6,08
Ca T 6	41,67	1,53	947,33	8,50	940,00	4,36	987,00	12,00
Ca T 9	19,33	1,53	742,33	7,51	770,67	6,66	835,00	7,55
Ca T 4	44,33	1,15	859,33	8,02	911,33	8,96	939,67	3,51
Ca T 7	36,33	1,53	810,33	4,51	884,00	5,00	943,00	10,15
Ca T 8	40,00	2,00	1002,33	5,51	983,33	10,02	1005,00	8,72
U 06	102,00	2,65	2253,00	7,94	2480,33	9,02	3076,00	4,58
U 2004	102,67	3,51	2160,00	9,00	2368,33	8,50	2752,67	6,81
P 10 M	99,00	2,00	1879,67	10,97	2108,00	8,89	2991,67	2,08
P 10 SM	87,67	1,53	1780,67	9,71	1809,33	8,14	2608,67	4,16
P 11 M	137,33	4,93	2149,33	8,39	2478,67	8,33	3245,33	10,50
P 11 SM	127,67	1,53	2083,67	13,58	2368,00	3,61	3179,00	6,56
G 09 no seeds	442,33	8,08	5206,67	9,07	5573,00	9,85	6506,00	7,21
G09 no seeds bq	444,67	10,60	5106,00	7,81	5345,00	7,00	6649,67	7,51
G 09 seeds bq	422,67	3,79	5259,00	9,54	5742,33	3,79	6859,33	40,67
G 09 seeds	394,33	7,57	5085,00	7,94	5524,67	8,74	6785,33	11,85

Tabella 5b – Analisi correnti: valor medio delle tre ripetizione

	alcool % V/V		pH		SO ₂ (mg/L)	
	media	st.dev.	media	st.dev.	media	st.dev.
A 10 T	14,18	0,02	3,28	0,01	22,00	0,00
A 10 C	13,89	0,01	3,25	0,01	19,67	0,58
A 10 MC	13,82	0,02	3,30	0,00	21,33	1,15
C 10 T	13,95	0,01	3,10	0,01	21,00	1,00
C 10 C	13,10	0,02	3,14	0,01	22,00	2,00
C 10 MC	13,26	0,02	3,15	0,00	20,33	1,53
R 10 Ve	10,79	0,03	3,91	0,01	20,00	2,00
R10 Marche	11,99	0,02	3,79	0,01	18,67	1,53
R 09 Veneto	10,33	0,02	3,46	0,01	20,45	1,38
R 09 Marche	12,25	0,02	3,75	0,01	17,44	1,39
NA 10 Veneto	9,65	0,01	3,59	0,01	16,33	1,53
NA 10 Marche	12,57	0,02	3,67	0,01	21,00	1,00
NA 09 Veneto	12,21	0,02	3,41	0,00	20,16	0,28
NA 09 Marche	11,76	0,01	3,15	0,00	14,67	1,15
P 08	16,29	0,02	3,78	0,01	0,00	0,00
P 09	16,17	0,02	3,70	0,01	0,00	0,00
P 10	16,16	0,03	3,71	0,01	4,67	0,58
Ca T 1	12,71	0,01	3,52	0,00	0,00	0,00
Ca T 2	12,78	0,01	3,70	0,00	0,00	0,00
Ca T 3	13,51	0,02	3,72	0,00	0,00	0,00
Ca t 5	12,02	0,02	3,49	0,01	0,00	0,00
Ca T 6	12,93	0,04	3,47	0,01	0,00	0,00
Ca T 9	12,40	0,02	3,71	0,00	0,00	0,00
Ca T 4	12,77	0,02	3,60	0,01	0,00	0,00
Ca T 7	11,82	0,03	3,46	0,00	0,00	0,00
Ca T 8	12,65	0,01	3,45	0,00	0,00	0,00
U 06	16,13	0,03	3,55	0,00	0,00	0,00
U 2004	16,01	0,03	3,61	0,01	0,00	0,00
P 10 M	16,11	0,02	3,70	0,01	2,33	0,58
P 10 SM	16,16	0,02	3,69	0,01	2,33	0,58
P 11 M	16,35	0,03	3,64	0,01	5,33	0,58
P 11 SM	16,27	0,02	3,66	0,01	5,00	1,00
G 09 no seeds	15,24	0,02	3,35	0,01	20,67	1,15

G09 no seeds bq	15,12	0,01	3,46	0,01	23,33	1,53
G 09 seeds bq	15,21	0,02	3,38	0,01	24,67	0,58
G 09 seeds	15,28	0,03	3,35	0,01	27,67	0,58

Tabella 5c – Analisi cromatografiche: valor medio delle tre ripetizione per gli HCTA

	acido cis-caffeil tartarico (mg/L)		acido trans-caffeil tartarico (mg/L)		acido cis-cumaril tartarico (mg/L)		acido trans-cumaril tartarico (mg/L)		acido ferulil tartarico (mg/L)	
	media	st.dev.	media	st.dev.	media	st.dev.	media	st.dev.	media	st.dev.
A 10 T	3,31	0,19	41,36	0,57	3,63	0,13	6,84	0,08	0,79	0,05
A 10 C	4,09	0,07	48,23	0,49	6,83	0,17	20,60	0,47	1,09	0,11
A 10 MC	4,13	0,11	52,91	0,12	7,37	0,12	19,99	0,23	1,94	0,07
C 10 T	0,10	0,17	61,60	0,70	3,86	0,11	16,44	0,14	1,99	0,03
C 10 C	1,18	0,03	61,02	0,12	3,96	0,06	17,11	0,09	2,94	0,09
C 10 MC	0,42	0,07	36,14	5,34	2,61	0,05	12,93	0,06	3,41	0,05
R 10 Ve	0,00	0,00	26,73	0,22	2,28	0,05	8,90	0,07	0,84	0,05
R10 Ma	0,00	0,00	56,38	0,39	7,02	0,08	19,91	0,31	1,27	0,20
R 09 Ve	0,00	0,00	25,95	0,18	7,45	0,10	7,16	0,08	1,95	0,06
R 09 Marche	1,39	0,06	14,10	0,08	2,30	0,06	4,60	0,02	2,70	0,03
NA 10 Veneto	0,00	0,00	24,75	0,52	2,17	0,05	8,09	0,21	1,03	0,17
NA 10 Marche	0,88	0,03	28,52	0,37	1,19	0,11	7,71	0,07	1,20	0,06
NA 09 Veneto	0,00	0,00	13,11	0,10	1,07	0,07	3,37	0,17	0,94	0,06
NA 09 Marche	0,00	0,00	11,24	0,11	2,50	0,15	2,67	0,10	1,28	0,08
P 08	1,62	0,07	28,89	0,12	4,44	0,12	10,80	0,16	2,19	0,07
P 09	1,20	0,02	25,14	1,16	3,73	0,04	8,73	0,07	2,16	0,06
P 10	1,11	0,10	28,16	0,05	3,86	0,12	9,65	0,11	2,10	0,06
Ca T 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca t 5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

U 06	4,04	0,08	46,74	0,06	7,16	0,04	20,23	0,05	1,26	0,02
U 2004	4,08	0,08	39,18	1,12	5,16	0,05	15,40	0,22	1,33	0,02
P 10 M	3,44	0,10	39,39	0,07	6,67	0,06	12,30	0,17	0,95	0,04
P 10 SM	3,33	0,12	34,70	0,33	6,71	0,14	10,34	0,11	1,12	0,11
P 11 M	3,26	0,11	51,36	0,57	3,63	0,13	16,84	0,08	0,79	0,05
P 11 SM	3,32	0,10	41,36	0,57	3,63	0,13	6,84	0,08	0,79	0,05
G 09 no seeds	1,19	0,03	90,94	0,19	3,77	0,17	25,12	0,04	2,86	0,07
G09 no seeds bq	1,32	0,03	90,58	0,48	3,70	0,06	27,27	0,31	2,92	0,10
G 09 seeds bq	1,42	0,04	100,60	0,74	3,55	0,10	27,19	0,16	3,09	0,06
G 09 seeds	1,56	0,02	102,70	0,56	3,04	0,04	24,15	0,17	2,62	0,08

Tabella 5d – Analisi cromatografiche: valor medio delle tre ripetizione per i flavo noli e l'acido ascorbico

	Miri cetina (mg/L)		quercetina glucoside (mg/L)		quercetina glucuronide (mg/L)		acido ascorbico (mg/L)	
	media	st.dev.	media	st.dev.	media	st.dev.	media	st.dev.
A 10 T	1,71	0,04	2,23	0,10	2,53	0,13	0,00	0,00
A 10 C	4,04	0,68	6,28	0,49	6,21	0,45	0,00	0,00
A 10 MC	6,96	0,07	8,21	0,04	9,90	0,09	0,00	0,00
C 10 T	14,26	0,18	9,07	0,03	6,58	0,04	0,00	0,00
C 10 C	4,74	0,07	14,71	0,02	7,17	0,05	0,00	0,00
C 10 MC	5,25	0,12	0,03	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
R 10 Ve	0,03	0,06	1,05	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00
R10 Marche	2,86	0,07	6,10	0,08	10,97	0,19	0,00	0,00
R 09 Veneto	1,38	0,03	1,74	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
R 09 Marche	3,70	0,04	1,75	0,06	2,92	0,04	0,00	0,00
NA 10 Veneto	0,03	0,06	1,10	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00
NA 10 Marche	2,59	0,09	1,70	0,06	1,06	0,07	0,00	0,00
NA 09 Veneto	2,13	0,03	0,92	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00
NA 09 Marche	2,34	0,06	1,04	0,07	0,00	0,00	0,00	0,00
P 08	18,16	0,11	15,59	0,07	16,07	0,11	0,00	0,00
P 09	14,23	0,10	14,29	0,04	14,15	0,06	0,00	0,00
P 10	13,25	0,06	15,10	0,04	11,09	0,07	0,00	0,00
Ca T 1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 2	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Ca T 3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca t 5	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 4	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Ca T 8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
U 06	3,42	0,07	6,88	0,04	6,72	0,03	0,00	0,00
U 2004	2,27	0,23	8,60	0,32	5,65	0,13	0,00	0,00
P 10 M	2,29	0,07	6,60	0,13	5,16	0,07	0,00	0,00
P 10 SM	2,23	0,09	6,67	0,07	5,26	0,07	0,00	0,00
P 11 M	3,71	0,04	9,23	0,10	8,53	0,13	0,00	0,00
P 11 SM	1,71	0,04	2,23	0,10	8,53	0,13	0,00	0,00
G 09 no seeds	6,60	0,12	11,64	0,08	17,48	0,07	0,00	0,00
G09 no seeds bq	6,35	0,11	10,66	0,22	17,38	0,15	0,00	0,00
G 09 seeds bq	7,53	0,39	10,79	0,19	18,33	0,12	0,00	0,00
G 09 seeds	7,24	0,09	9,74	0,27	18,40	0,23	0,00	0,00

RISULTATI:

Terre rare

Le distribuzioni di REE in tutti i campioni seguono la regola Oddo-Harkins, secondo la quale i nuclidi con numeri pari sono più abbondanti di quelli dispari immediatamente prima e immediatamente dopo; le distribuzioni mostrano quindi il tipico profilo del dente di sega con abbondanze decrescenti. La distribuzione illustrata in Figura 31 è quella delle terre rare nei tre terreni provenienti da Grottaglie (TG1; TG2; TG3).

La quantità di promezio (Pm) non è stata determinata, essendo presente in concentrazione estremamente bassa, ma è segnalato tra neodimio e samario nel grafico, per mantenere la regola di Oddo-Harkins.

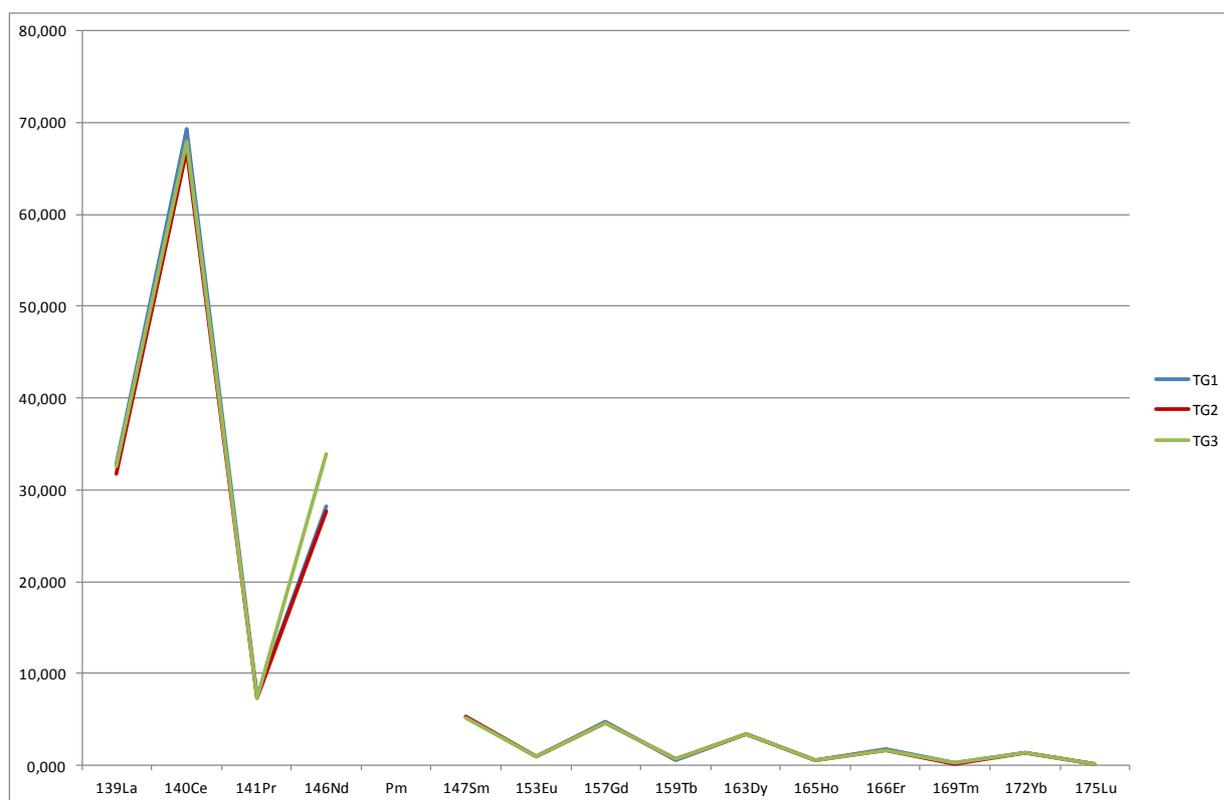


Figura 31 a – Distribuzione delle terre rare in terreni provenienti da Grottaglie.

In geochimica, al fine di eliminare il tipico andamento a dente di sega dovuto all'effetto Oddo-Harkins ed evidenziare il profilo dei REE dei campioni, si è soliti confrontare i dati dopo normalizzazione utilizzando alcuni modelli tipici, come le condriti, rocce meteoriche considerate il miglior parametro rappresentativo delle concentrazioni medie di elementi non volatili nel sistema solare.

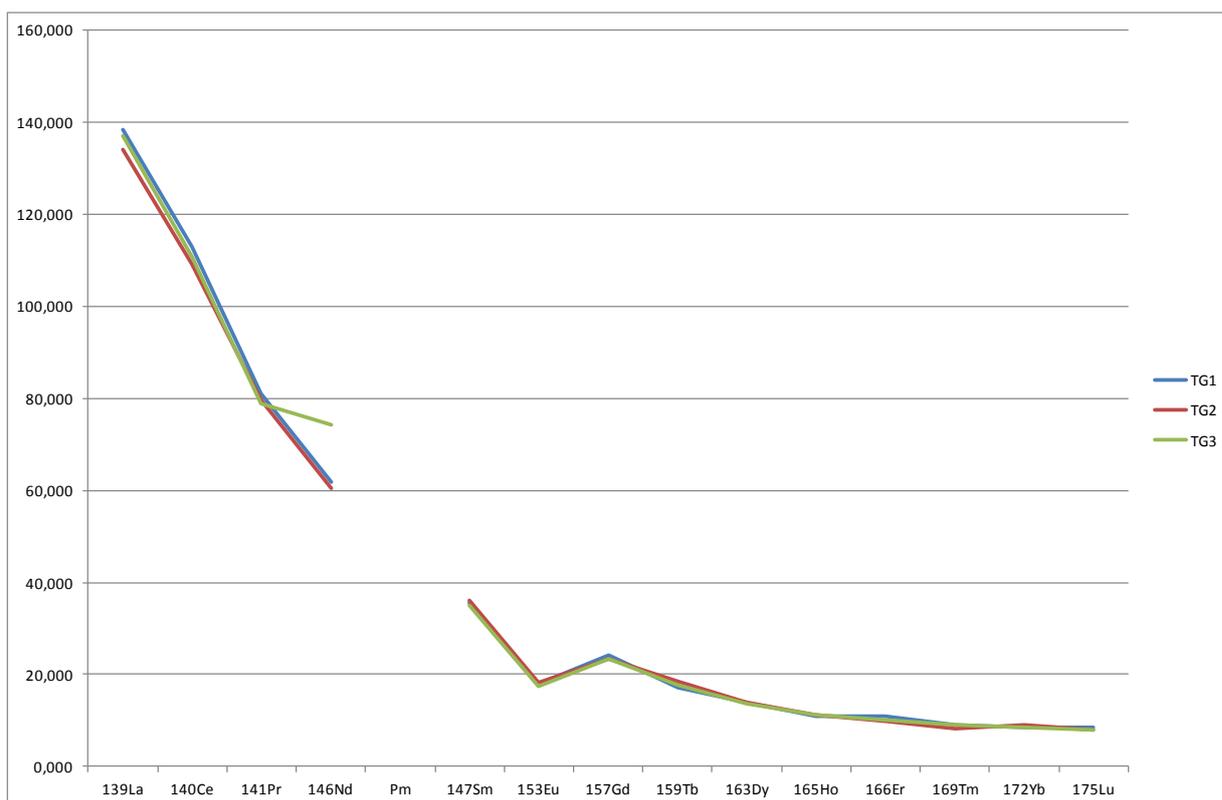


Figura 31 b – Distribuzione delle terre rare in terreni provenienti da Grottaglie normalizzate utilizzando la condrite.

.Le concentrazioni di singoli REE nei campioni sono calcolati in base alla seguente formula:

$$[\text{REE}]_{\text{condrite-normalizzato}} = [\text{REE}]_{\text{campione}} / [\text{REE}]_{\text{condrite}}$$

I dati normalizzati sono visualizzati in figura 31b. In questo studio abbiamo utilizzato i valori di una condrite CI riportato da McDonough e Sun (1995).

Secondo Korotev et al. (2009), infatti, dei lavori attualmente presenti, alcuni sono stati ottenuti dall'analisi di condriti ordinarie (OC), mentre altri su valori (IC) si basano su più dati e sono probabilmente più precisi e rappresentativi rispetto ai dati più vecchi OC. In particolare questi dati (McDonough e Sun, 1995) sono ottenuti dalla media tra dati dei lavori precedentemente pubblicati e nuovi dati e per questo più affidabili. In Tabella 6 sono presentati i valori riportati in bibliografia per l'analisi delle condriti.

Tabella 6 - Valori riportati in bibliografia per l'analisi delle condriti.

Valori di concentrazione in µg/g (ppm)														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	Hask 68/71	Waki 1971	Masu 1973	Naka 1974	Even 1978	Laul 1979	A&E 1982	Boyn 1985	T&M 1985	W&K 1988	A&G 1989	A&G x1.36	Palm 1988	M&S 1995
	OC	OC	OC(L6)	OC	CI	OC	CI	vfCI	vfCI	OC	CI	vfCI	CI	CI
Y	0,10833						1,44		2,01	1,08	1,56	2,12	1,57	1,57
La	0,23056	0,34	0,2625	0,22847	1,69861	0,34	0,16389	0,21528	0,25486	0,20139	1,62986	0,22153	0,17014	0,16458
Ce	0,60833	0,06319	0,67778	0,60069	4,42986	0,05903	0,42778	0,56111	0,66458	0,52986	4,18889	0,56944	0,44306	0,42569
Pr	0,07778	0,08403			0,09637	0,12	0,64514	0,08472	0,09514	0,08125	0,61875	0,08403	0,66667	0,64444
Nd	0,04167	0,04444	0,49722	0,4375	3,29028	0,04444	0,31736	0,41667	0,49375	0,39722	3,14167	0,42708	0,32917	0,31736
Sm	0,12708	0,13542	0,15972	0,14097	1,06944	0,13542	0,10347	0,13542	0,16042	0,12708	1,02153	1,38889	0,10694	0,10278
Eu	0,47569	0,073	0,60139	0,53472	0,05802	0,073	0,056	0,51042	0,087	0,069	0,38889	0,52847	0,058	0,39097
Gd	0,175	0,26	0,21597	0,19167	1,41875	0,26	0,13681	0,17986	0,2125	0,17292	1,36528	0,18542	0,14167	0,13819
Tb	0,047	0,047			0,03745	0,047	0,24653	0,32917	0,058	0,043	0,25208	0,34236	0,25694	0,25069
Dy	0,22014	0,30	0,27083	0,23819	1,76458	0,30	0,17014	0,22361	0,26458	0,20972	1,68542	0,22917	0,17639	0,17083
Ho	0,070	0,078			0,05670	0,078	0,37986	0,49861	0,59097	0,48125	0,38611	0,52431	0,39583	0,37917
Er	0,13958	0,20	0,17708	0,15625	1,15278	0,20	0,11111	0,14583	0,17292	0,1375	1,10347	0,15	0,11528	0,11111
Tm	0,030	0,032			0,02561	0,032	0,17153	0,225	0,24722	0,030	0,16806	0,22847	0,18056	0,17153
Yb	0,14375	0,22	0,17292	0,15278	1,14653	0,22	0,11042	0,14514	0,17222	0,13889	1,12847	0,15347	0,11458	0,11181
Lu	0,22569	0,034	0,26875	0,23542	0,02539	0,034	0,17014	0,22361	0,26458	0,030	0,16875	0,22917	0,17361	0,17083

Inoltre, abbiamo scelto di utilizzare un ulteriore metodo di normalizzazione dividendo la concentrazioni di REE, per ogni campione della catena di produzione, per la rispettiva concentrazione di cerio (Ce) (dal momento che è il più abbondante tra le REE), secondo la seguente formula:

$$[\text{REE}]_{\text{Ce-normalizzato}} = [\text{REE}]_{\text{campione}} / [\text{Ce}]_{\text{campione}}$$

Alcuni autori ritengono che la normalizzazione utilizzando l'elemento interno Ce è più adatto per il confronto di campioni le cui concentrazioni sono di diversi ordini di grandezza. Le concentrazioni di Terre rare nel suolo, infatti, sono circa di tre ordini di grandezza superiori a quello del mosto e ancor più rispetto al vino.

La distribuzione illustrata nella Figura 32 è quello dei REE nei tre terreni provenienti da Grottaglie (TG1; TG2; TG3) e nei tre provenienti da Carpeneto (TC1; TC2; TC3) normalizzati rispetto al Cerio.

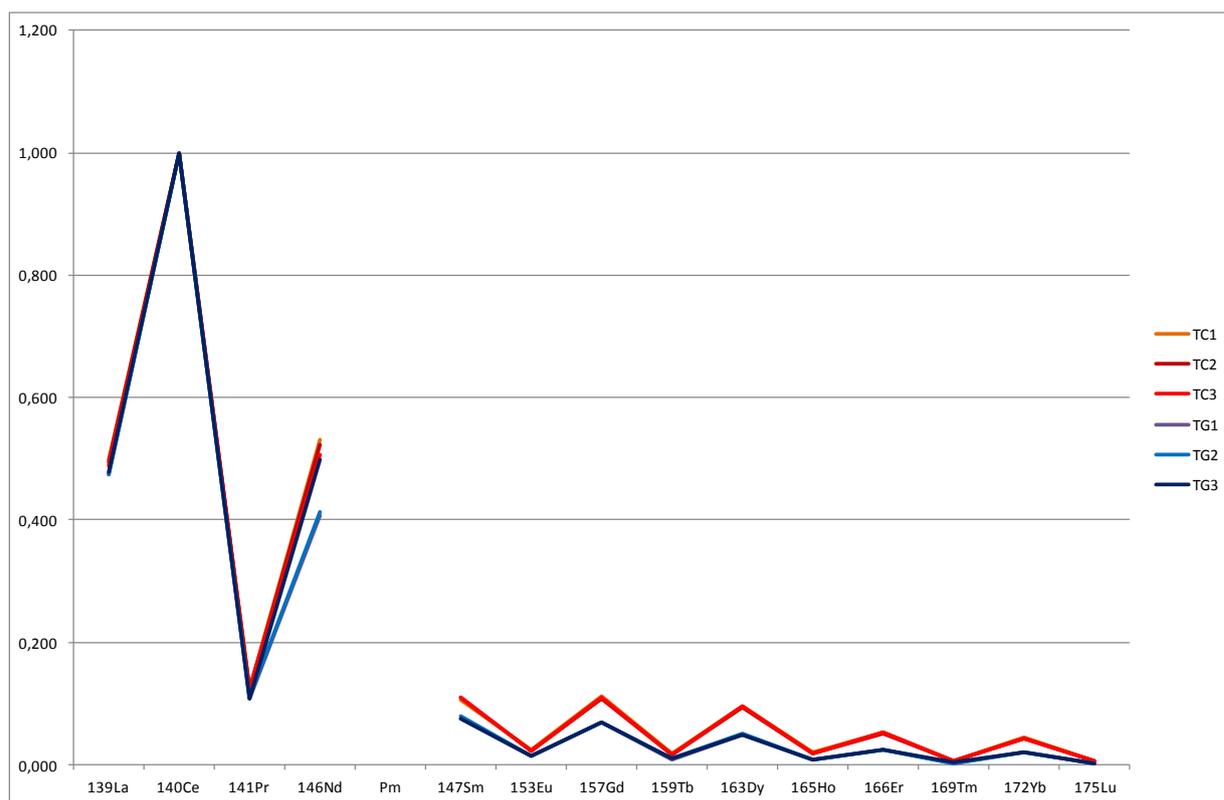


Figura 32 – Confronto tra la distribuzione delle terre rare nei due terreni normalizzati rispetto al cerio

DISTRIBUZIONE DI REE NELLE DIVERSE PARTI DELL'ACINO

Le concentrazioni delle terre rare sono state determinate nelle diverse parti dell'acino (polpa, buccia e semi), per verificare se la distribuzione di REE fosse più o meno costante. Le concentrazioni aumentano nell'ordine, passando dai semi / polpa / buccia (Figura 33a e 33b). Nella filiera b (uve Dolcetto coltivate a Carpeneto) il profilo caratteristico è mantenuto, ma si sono verificate delle perdite tra le concentrazioni presenti nel terreno e quelle riscontrate nelle uve.

Se prendiamo in considerazione il mosto possiamo notare come la distribuzione di REE sia molto simile a quella della polpa.

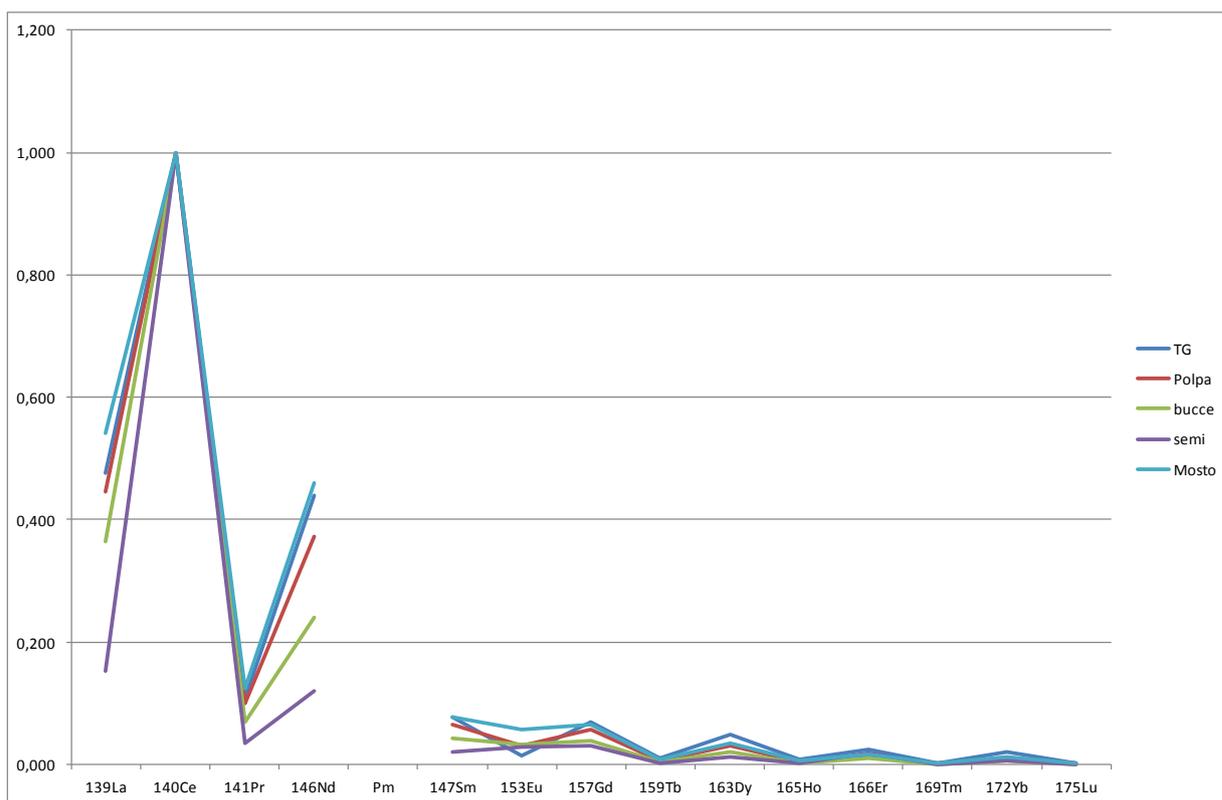


Figura 33 a – Confronto tra la distribuzione delle terre rare nel terreno e nelle uve provenienti da Grottaglie

Il mosto è infatti un liquido ottenuto per pigiatura delle uve, la cui composizione è circa:

l'85% polpa

10% buccia

5% semi

Tale risultato era quindi ampiamente prevedibile.

Un elemento anomalo è l'Europio, apparentemente l'unico metallo che presenta una grande variabilità all'interno della serie. Questo fenomeno non è dovuto a cause di tipo geochimico ma all'interferenza positiva spettrale da cui sono affetti rispettivamente gli isotopi ^{151}Eu e ^{153}Eu da parte degli ioni poliatomici $^{135}\text{Ba}^{16}\text{O}$ e $^{137}\text{Ba}^{16}\text{O}$ nell'analisi ICP-MS.

Il bario ha un comportamento diverso dalle terre rare: dal punto di vista fisiologico può competere con il calcio di cui è antagonista nell'assorbimento atto da parte della pianta.

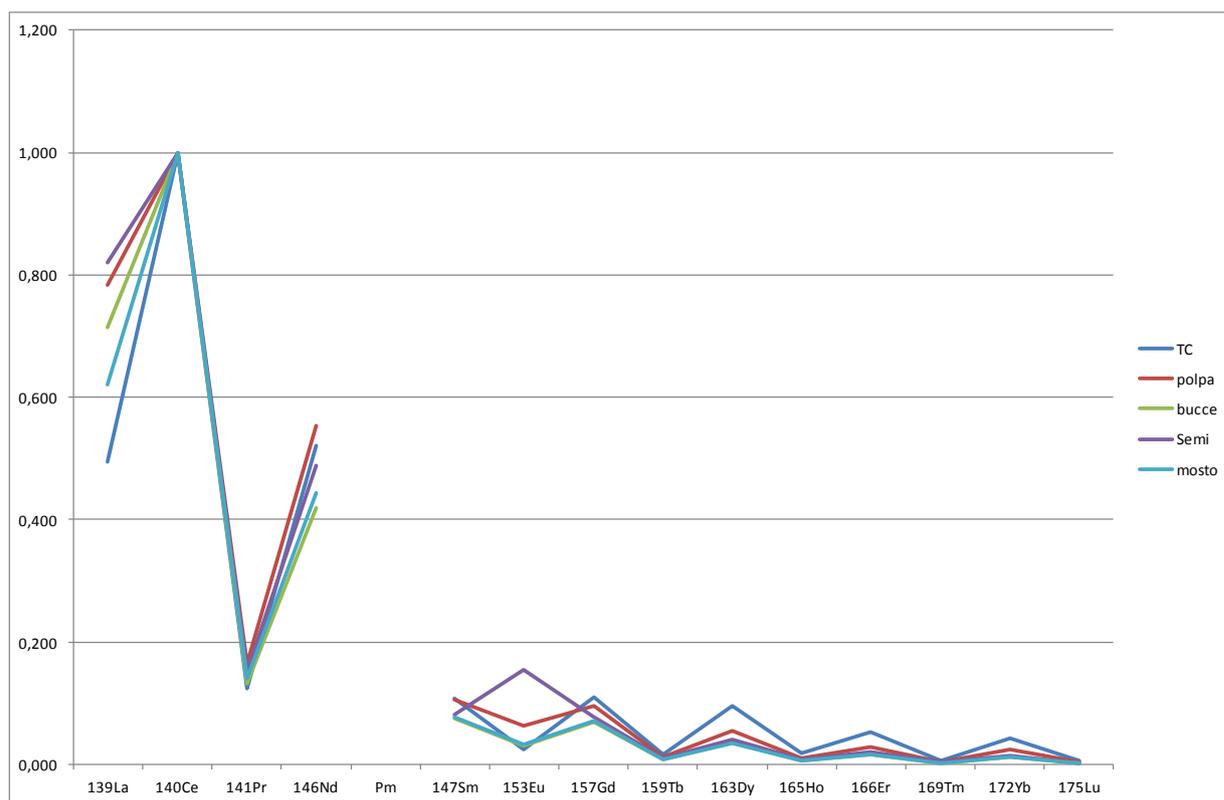


Figura 33 b – Confronto tra la distribuzione delle terre rare nel terreno, nelle uve e nel mosto provenienti da Carpeneto

Si verifica così un arricchimento dal suolo alla pianta. Il suo contenuto è fortemente frazionato nel passaggio dal terreno alle uve così da rendere imprevedibile l'interferenza positiva sui nuclidi dell'eurobio. Per questo motivo, l'eurobio sarà esclusa dalla trattazione dei dati seguenti.

CONFRONTO TRA SUOLO E MOSTO

Il confronto tra i dati ottenuti dall'analisi del terreno e quelli del mosto è un parametro di interessante valutazione per verificare se la distribuzione di REE nel suolo ha mantenuto nel mosto la sua impronta digitale tipica.

Lavori precedenti (Aceto et al., 2009; Aceto et al., 2013) hanno suggerito che non vi è alcun frazionamento di REE nel passaggio dal suolo alle uve e al mosto. La somiglianza è molto evidente se consideriamo il grafico ottenuto attraverso la normalizzazione col Cerio. Il

comportamento anomalo dell'eurobio può essere spiegato come già citato prima: il Ba^{2+} è relativamente più abbondante nel mosto rispetto al suolo, poichè esso è attivamente assorbito dalla vite come sostituto del Ca^{2+} e l'interferenza positiva sugli isotopi dell'Eu è di conseguenza maggiore nel mosto rispetto al suolo.

Se prendiamo in considerazione le due filiere, quella delle uve Primitivo coltivate a Grottaglie in Figura 34a e in quella di uve Dolcetto, coltivate a Carpeneto (Figura 34b) si evince che l'impronta digitale originale del terreno è ben mantenuta anche nel mosto per quanto riguarda la prima filiera, mentre un certo frazionamento si riscontra nella seconda, come già evidenziato nelle uve. Ovviamente, se la distribuzione dei REE ha subito un frazionamento nelle uve di partenza, è normale che si riscontri lo stesso andamento anche nel mosto.

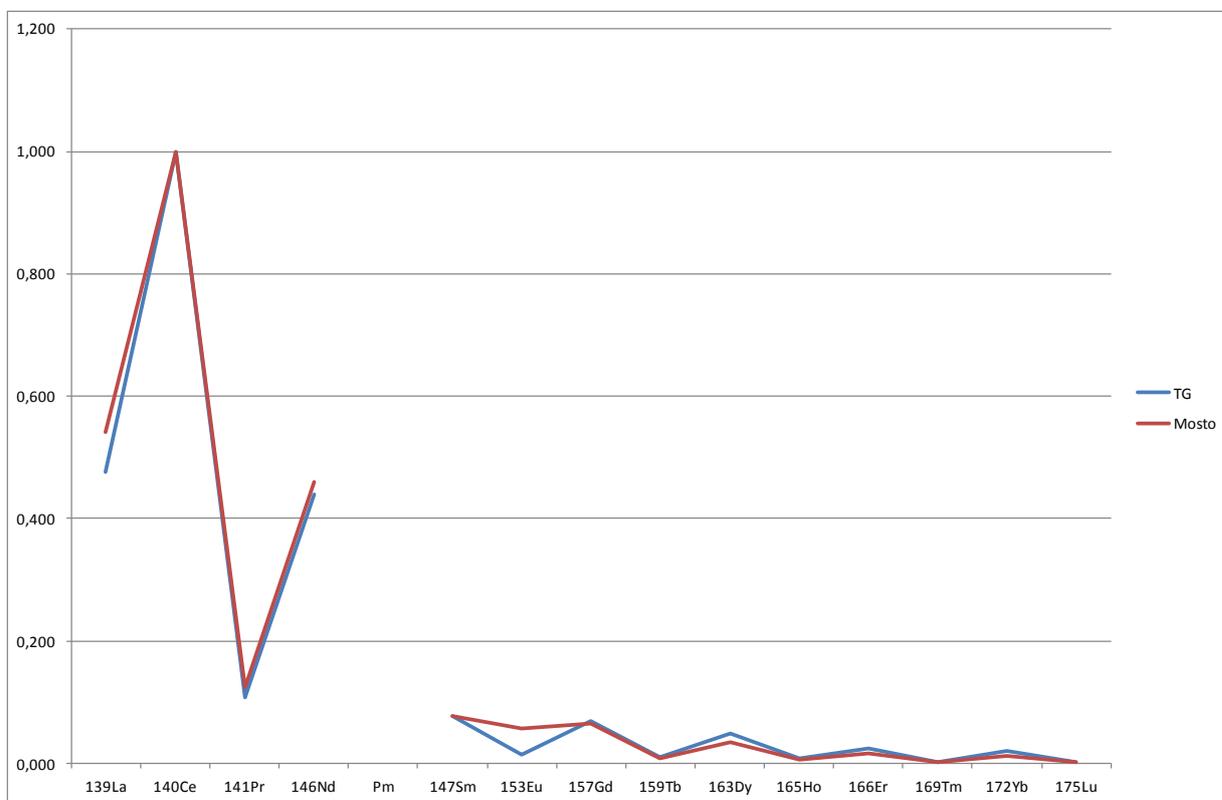


Figura 34a – Confronto tra contenuto in REE nel terreno e nel mosto (Grottaglie)

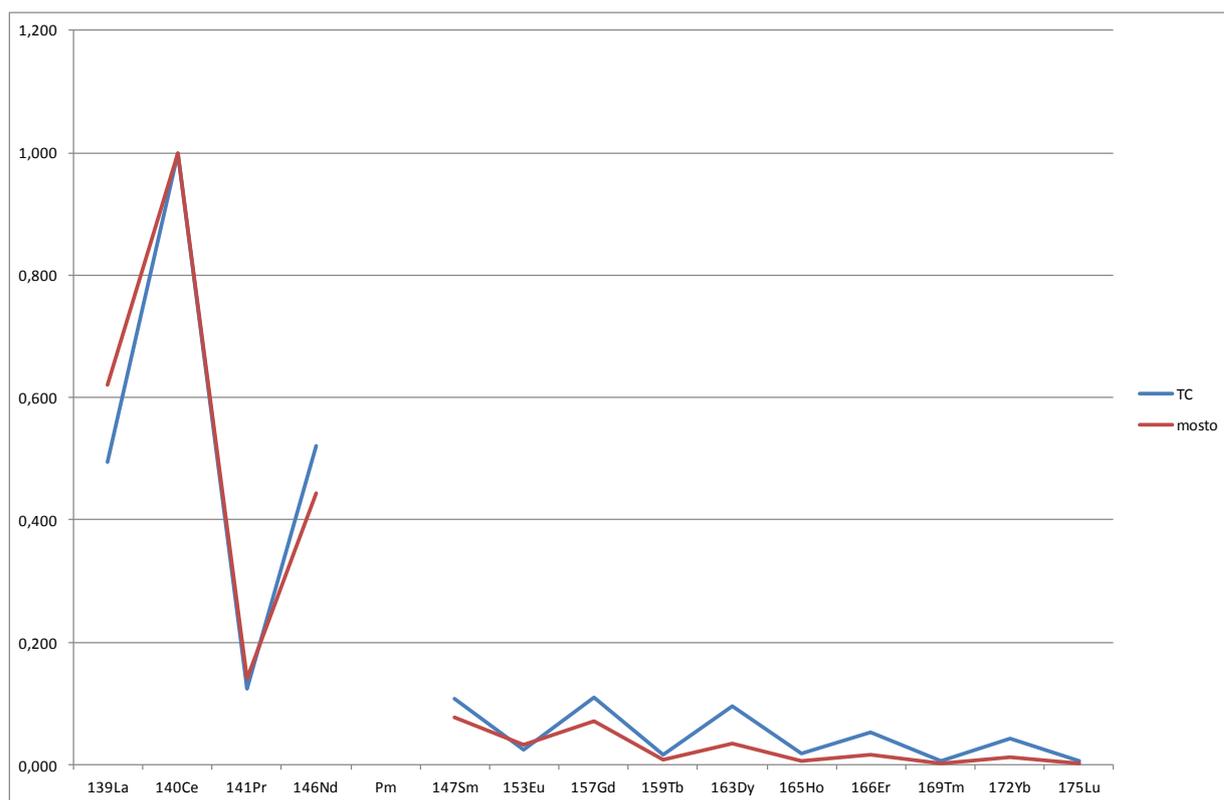


Figura 34b – Confronto tra contenuto in REE nel terreno e nel mosto (Carpeneto)

EFFETTI DEI PROCESSI DI VINIFICAZIONE

Nello studio di Aceto et al. (2013) sulla tracciabilità della filiera del Moscato, gli autori hanno trovato che i processi utilizzati per la vinificazione in bianco avevano causato frazionamento della distribuzione dei REE; questo fenomeno è stato attribuito al rilascio di ioni REE da parte delle bentoniti. Le bentoniti impiegate in enologia sono delle argille montmorillonitiche con una struttura tale da consentire il rigonfiamento (aumentando la superficie) a contatto con l'acqua. Essendo un materiale di tipo argilloso, esso contiene prevalentemente dei cationi, perciò l'aggiunta di bentonite al prodotto può arricchirlo leggermente in cationi, tra cui, seppur in concentrazione molto bassa, i REE. Si usa normalmente nei trattamenti di chiarifica del vino.

Poiché le bentoniti sono raramente utilizzate per la vinificazione in rosso, il presente studio si propone di verificare se le terre rare possono fungere da traccianti lungo tutto la filiera di produzione di un vino rosso. In questo caso, sono state analizzate due filiere:

- a) una per la produzione di vino Primitivo (a Grottaglie)
- b) una per la produzione di Dolcetto (a Carpeneto).

Filiera a

Entrambe le operazioni prevedono l'aggiunta di altre sostanze: lieviti *Saccharomyces cerevisiae* che sono stati aggiunti per promuovere la fermentazione alcolica. Sono inoltre stati aggiunti quantitativi minimi di SO₂ al momento dell'imbottigliamento. Durante la fermentazione e l'affinamento il campione è venuto a contatto anche con superfici che possono potenzialmente rilasciare ioni. Dopo la pigiatura e la diraspatura infatti, l'uva è stata avviata alla fermentazione alcolica che avviene in contenitori detti tini o fermentini. Il materiale costitutivo dei fermentini più moderni è l'acciaio inox. Dopo la fermentazione alcolica il vino è stato trasferito in botte di legno da 225L (barriques) dove ha svolto la fermentazione malolattica ed è venuto a contatto con il legno di rovere di cui sono costituite.

La Figura 35 riporta le distribuzioni di REE nel campione di vino P12SV, prelevato dopo la fermentazione alcolica, e nel campione P12FIN, prelevato dopo la fermentazione malolattica.

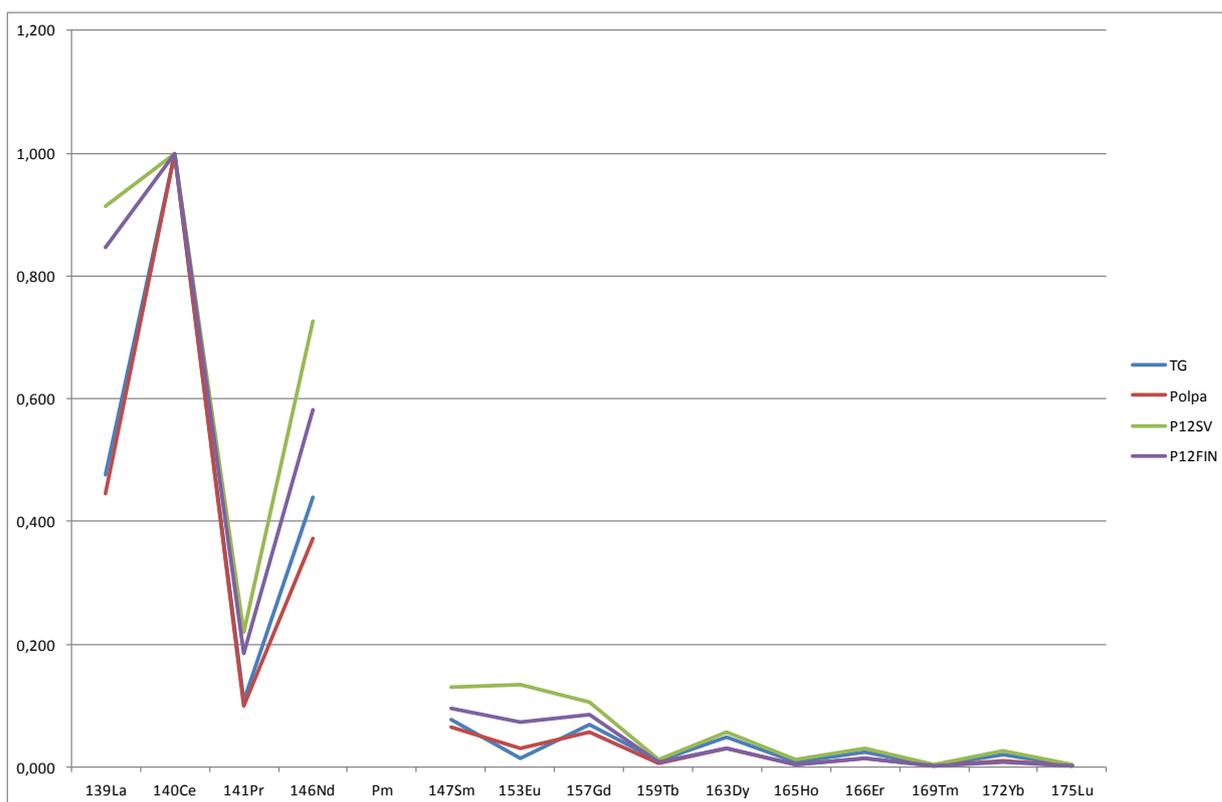


Figura 35 – Andamento dei REE nei vini Primitivo, confrontato con l'andamento nel terreno.

Inoltre nel grafico sono state aggiunte, a scopo di confronto, anche le distribuzioni riscontrate nel suolo e nel mosto.

Oltre alla normale anomalia dell'europio già spiegato con l'interferenza del bario, è evidente che si sia verificato un certo grado di frazionamento, rendendo difficile l'identificazione dell'impronta digitale originale data dal suolo. Entrambi i campioni di vino sembrano essere impoveriti principalmente in Ce e Yb. Le cause di questo frazionamento possono essere dovute alla presenza di additivi inorganici nei prodotti biologici utilizzati per fermentazioni, per il nutrimento del lievito o per rilascio di ioni metallici dalla superficie di serbatoi metallici.

Inoltre, una diminuzione può essere causata da precipitazioni tartariche o proteiche che si verificano nel vino qualora si creino condizioni di soprassaturazione, basse temperature o aumenti di pH o in presenza di tannini del legno. In quest'ultimo caso si forma un complesso tannino-proteina, assimilabile a un colloide idrofobo con carica negativa che floccula per interazione con i cationi presenti nel mezzo. Queste particelle precipitano al fondo del recipiente e possono causare una diminuzione anche nel contenuto di metalli.

Oltre ai campioni di cui abbiamo parlato sono stati analizzati anche campioni di vino provenienti dallo stesso vigneto oggetto di studio, ma vinificati negli anni precedenti. Le tecniche di vinificazione adottate sono le medesime.

Dall'osservazione dell'andamento delle terre rare possiamo notare come i vini non si discostino particolarmente gli uni dagli altri, nonostante le annate diverse di produzione (Figura 36), fatto salvo il solito comportamento anomalo di Eu.

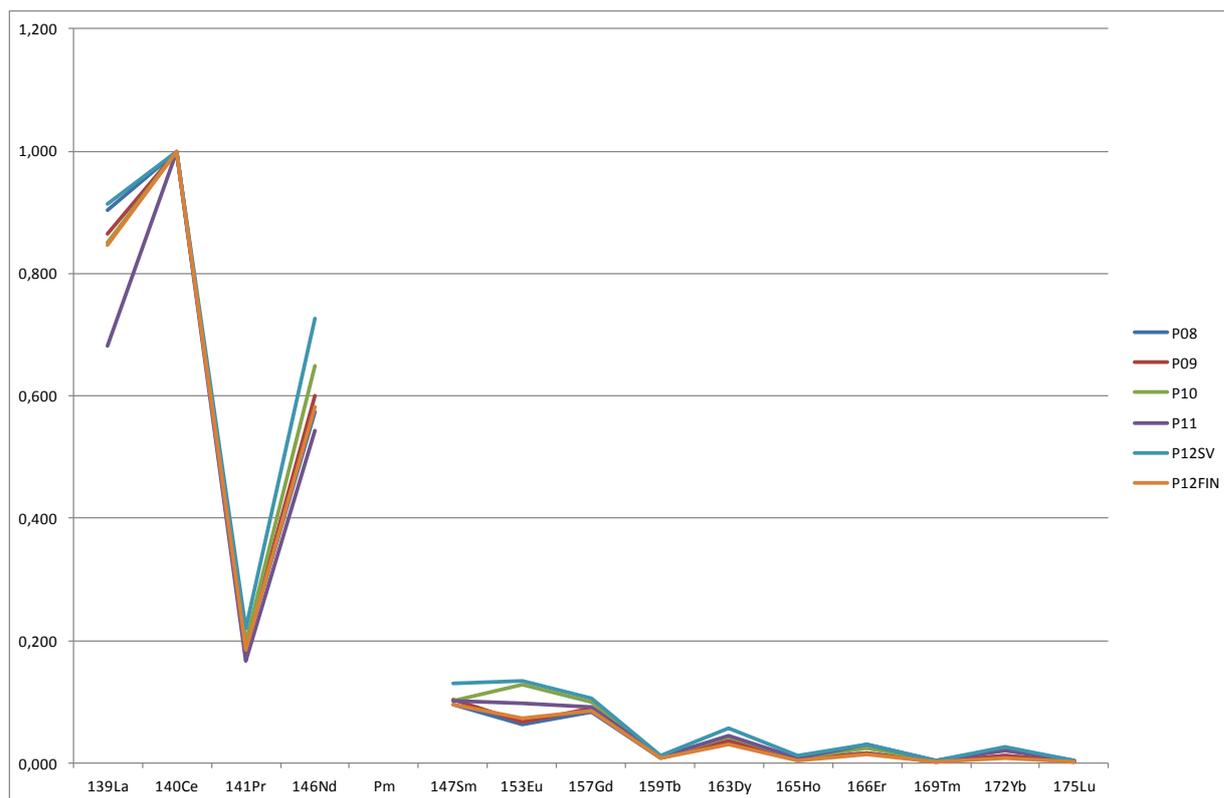


Figura 36 – Andamento dei REE nei vini Primitivo di diverse annate

Filiera b

La seconda filiera di produzione ha previsto l'analisi di campioni di terreno, uve, mosto e quattro campioni di vino, due rossi e due rosati sottoposti a diverse tecniche di vinificazione. Le tecniche sono state descritte nell'introduzione.

Il vino rosso è stato analizzato dopo la fermentazione alcolica avvenuta in acciaio e dopo fermentazione alcolica (sempre in acciaio).

il vino rosato è stato prelevato dopo fermentazione alcolica, ma, non avendo svolto la fermentazione malolattica, è stato prelevato dopo travaso in altro contenitore in acciaio e affinamento di alcuni mesi.

Entrambe le operazioni prevedono l'aggiunta di altre sostanze: lieviti *Saccharomyces cerevisiae* che sono stati aggiunti per promuovere la fermentazione alcolica, nel vino rosso sono stati inoltre aggiunti batteri *Leuconostoc oenos* per facilitare lo svolgimento della fermentazione malolattica. E' inoltre stata aggiunta SO₂ al momento dell'imbottigliamento. Durante la fermentazione e l'affinamento il campione è venuto a contatto anche con superfici che possono potenzialmente rilasciare ioni, come i vasi vinari in acciaio inox.

La Figura 37 riporta le distribuzioni di REE nel campione di vino prelevato dopo la fermentazione alcolica e nel campione prelevato dopo la fermentazione malolattica.

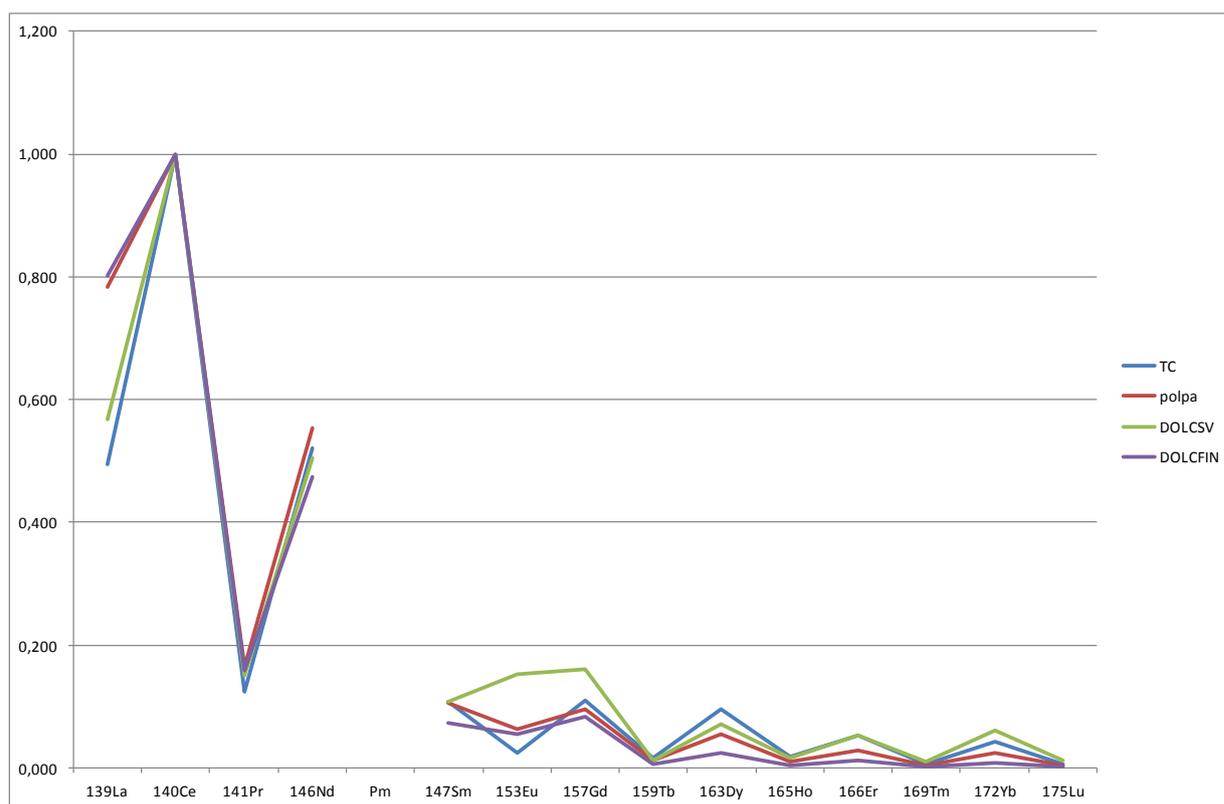


Figura 37 – Distribuzione dei REE nei campioni di vino Dolcetto vinificati in rosso.

Tranne che per l'europio, di cui si è già ampiamente parlato in precedenza, i campioni di vino seguono l'andamento caratteristico presente nel terreno e nel mosto. E' ben visibile

però, la notevole diminuzione che si verifica nel passaggio dal campione dopo la svinatura (DOLCSV) al campione dopo la fermentazione malo lattica (DOLCFIN), soprattutto nei REE più pesanti. I motivi possono essere dovuti a precipitazioni che si verificano in seguito alla variazione di pH che possono aver causato una perdita anche in REE. Durante la fermentazione malolattica si ha infatti un innalzamento di pH dovuto ad una disacidificazione biologica con formazione, a partire da acido malico (acido bicarbossilico), di acido lattico (monocarbossilico).

In Figura 38 sono invece presentati i risultati (sempre normalizzati rispetto al cerio) delle analisi eseguite sui vini rosati. Rispetto ai campioni precedenti la distribuzione dei REE nei due campioni di vino è quasi sovrapponibile.

I campioni rosati hanno semplicemente subito un travaso ed affinamento in acciaio, ma non hanno svolto la fermentazione malolattica.

Osservando questi risultati si ha un'ulteriore conferma sul motivo che ha causato una diminuzione di terre rare nel campione vinificato in rosso: la variazione di pH. In questo caso infatti la disacidificazione non c'è stata ed i campioni non hanno subito trasformazioni rilevanti.

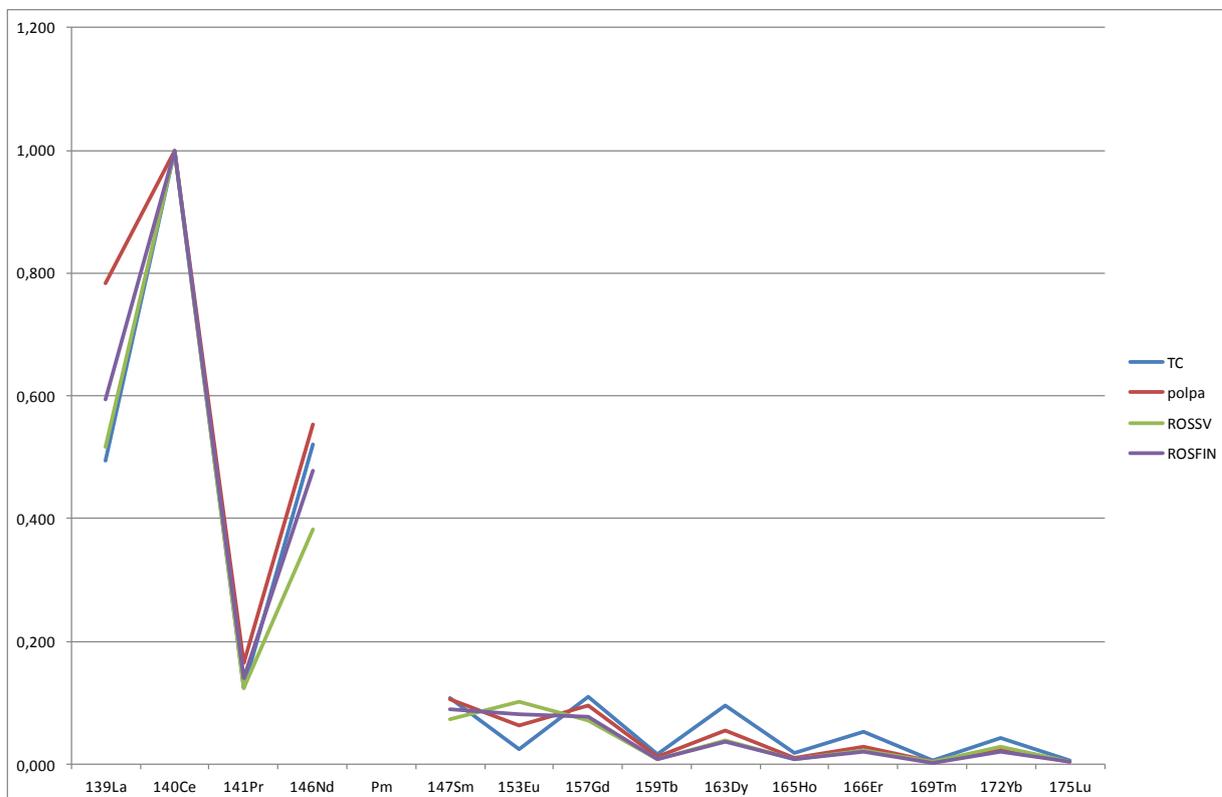


Figura 38 - Distribuzione dei REE nei campioni di vino Dolcetto vinificati in rosato

L'analisi multivariata

Su tutti i dati è stata eseguita un'analisi multivariata chemiometrica per verificare la somiglianza tra le varie distribuzioni REE. Per l'analisi di riconoscimento dei pattern è stato scelto il metodo "Agglomerative hierarchical clustering" (AHC), che utilizza la distanza euclidea come parametro di similarità e il metodo di Ward come metodo di agglomerazione.

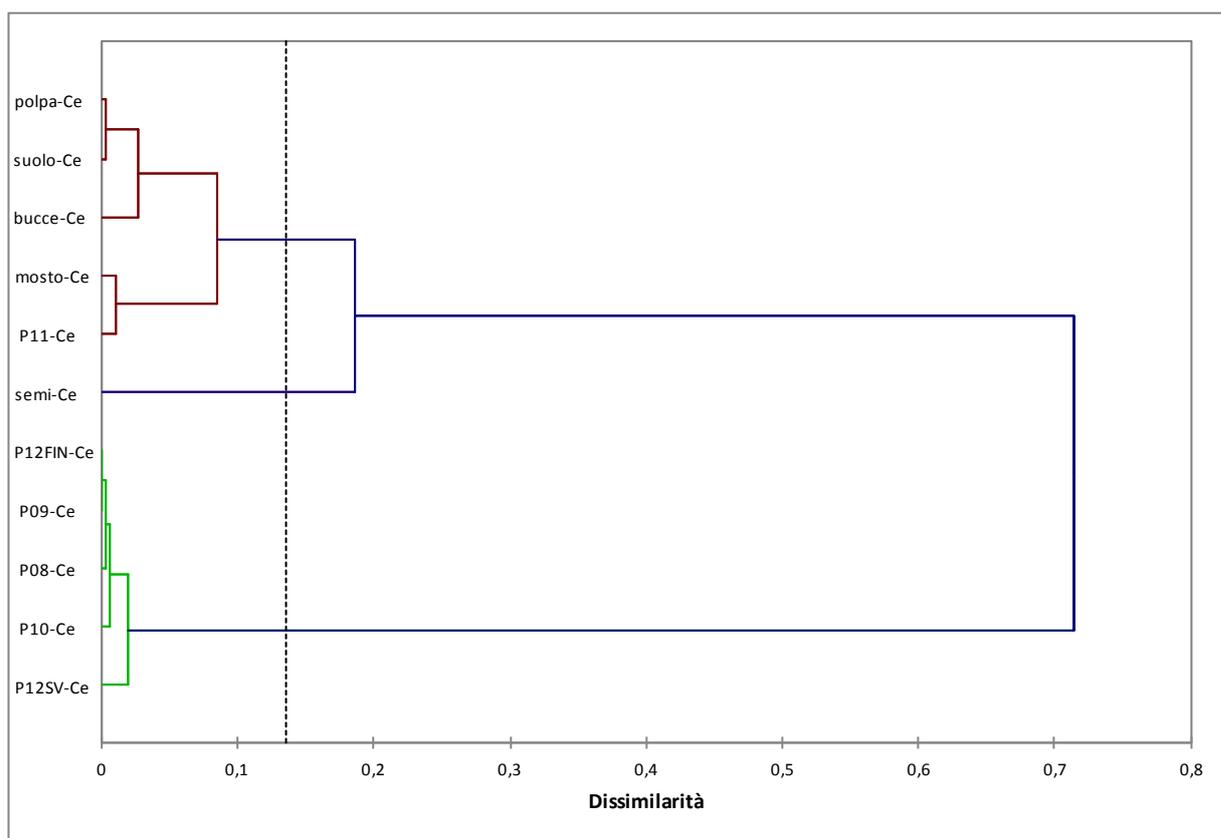


Figura 39 – dendrogramma della filiera a

L'analisi AHC è stata applicata ai dati Ce-normalizzati dopo la centratura e la divisione per la deviazione standard; Ce e Eu sono stati scartati come variabili poiché il primo è ovviamente uguale a 1 in tutti i campioni e il secondo è, al contrario, troppo variabile a causa dell'interferenza del bario. Il risultato della filiera a ottenuto è visualizzato come dendrogramma in Figura 39: è evidente la somiglianza tra campioni non trattati, cioè del suolo, mosto e le varie parti di uva, mentre i campioni di vino, che hanno subito trattamenti, sono

raggruppati in un altro cluster. Un'eccezione è P11 che viene raggruppato con campioni non trattati; la ragione di questo comportamento è legato alle sue anomale concentrazioni di La e Er.

CONCLUSIONI

POTERE ANTIOSSIDANTE DEL VINO

In questo lavoro 36 campioni di vino sono stati completamente caratterizzati dal punto di vista cromatografico, spettrofotometrico e tramite spettrometria EPR per determinare il loro contenuto di specie antiossidanti.

Il set di dati completo ottenuto è stato analizzato con successo con il metodo dell'analisi multivariata delle componenti principali (PCA). Questa analisi ha evidenziato come tutte le sostanze con potere antiossidante presenti contribuiscano all'attività antiradicalica misurata tramite EPR. In particolare, gli indici di flavonoidi totali, polifenoli totali e antociani unitamente all'acido feruliltartarico, all'acido trans-caffeiltartarico, agli acidi trans-cumariltartarico la quercetina, sia glucoside che glucuronide, sono le variabili più importanti che contribuiscono al potere antiossidante del vino.

La PC1 è in grado di separare le sette cultivar differenti in base al loro potere antiossidante. Inoltre, con questo approccio è stato anche possibile spiegare alcune piccole differenze tra i campioni causate da pH, alcool e SO₂ libera (PC2).

Nel complesso l'indagine a cui sono stati sottoposti i campioni di vino ha permesso di individuare i parametri maggiormente coinvolti nella determinazione del potere antiossidante sottolineandone anche il loro relativo contributo.

CONTENUTO IN TERRE RARE

Confrontando distribuzioni REE lungo l'intera catena di produzione di un vino rosso, è possibile affermare che il ruolo di questi elementi come marcatori per la tracciabilità deve essere attentamente considerato e valutato. Infatti, le distribuzioni originali dei terreni sono mantenute inalterate fino al mosto, mentre nei vari passaggi del processo di vinificazione si verificano fenomeni di frazionamento, eventualmente legati all'uso di sostanze chimiche contenute all'interno dei prodotti per la fermentazione o alloro rilascio dalle superfici dei vasi vinari.

E' necessario però approfondire ulteriormente lo studio, attraverso l'analisi di un numero maggiore di filiere di produzione. In questo modo sarà possibile valutare se il frazionamento che si verifica è significativo e va ad inficiare o no il riconoscimento dell'impronta digitale originale del suolo.

BIBLIOGRAFIA

Aceto M., Baldizzone M., Oddone M., 2009. Keeping the track of quality: authentication and traceability studies on wine. In P. O'Byrne (Ed.), *Red wine and health* (pp. 429-466). New York: Nova Science Publishers.

Aceto M., Robotti E., Oddone M., Baldizzone M., Bonifacino G., Bezzo G., Di Stefano, R., Gosetti F., Mazzucco, E. Manfredi, Marengo E., 2013. A traceability study on the Moscato wine chain. *Food Chemistry*, 138, 1914-1922.

Almeida C.M.R., Vasconcelos M.T.S.D., 2003. Multielement composition of wines and their precursors including provenance soil and their potentialities as fingerprints of wine origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 4788-4798.

Amrani Joutei K., Glories Y., Mercier M., 1994. Localisation des tannins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis*. 33, 133-138.

Bartlett H., Eperjesi F., 2003. Age-related macular degeneration and nutritional supplementation: a review of randomised controlled trials. *Ophthalmic Physiol Opt* 23 (5): 383-99.

Bleys J., Miller E., Pastor-Barriuso R., Appel L., Guallar E., 2006. Vitamin-mineral supplementation and the progression of atherosclerosis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Clin. Nutr.* 84 (4): 880-7; quiz 954-5.

Calo A., Tomasi D., Cravero M.C., Di Stefano R., 1984. Contributo alla caratterizzazione e classificazione varietale (*Vitis* sp.), attraverso la determinazione degli antociani e degli acidi idrossicinnamoiltartarici della buccia di varietà a bacca rossa. *Annali dell'Istituto Sperimentale per L'Enologia Asti* 25 (1054), 47-61.

Campbell I.D., Dwek R.A., 1995. *Biological Spectroscopy*, The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc.: Menlo Park.

Cao X., Wang X., Zhao G., 2000. Assessment of the bioavailability of rare earth elements in soils by chemical fractionation and multiple regression analysis. *Chemosphere*, 40: 23-38.

Capasso R., Evidente A., Schivo L., Orru G., Marcialis M.A., Cristinzio G. 1995. Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.*, 79, 393-398.

Castino M., 1991. Caratteristiche sensoriali dei polifenoli flavanici dei vini. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*. 22 (Parte I) 243-251.

Cherubini A., Vigna G., Zuliani G., Ruggiero C., Senin U., Fellin R., 2005. Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. *Curr Pharm Des* 11 (16): 2017-32.

Cheyrier V., Osse C., Rigaud J., 1988. Oxidation of grape juice phenolic compounds in model solutions. *Journal of Food Science*. 53 1729-1732.

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

Cheyrier, V.; Duenas-Paton, M.; Salas, E.; Maury, C.; Souquet, J. M.; Sarni-Manchado, P.; Fulcrand, H., 2006. Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*. 57 (3) 298-305.

Cook E.R., Seager R., Cane M.A., Stahle D.W., 2007. North American drought: reconstructions, causes and consequences. *Earth Science Reviews* 81: 93–134.

Cotton F.A., Wilkinson G., 1984. In: Bresadola S., Peloso A. (eds.). *Chimica inorganica*, 3° edizione. Casa Editrice Ambrosiana, Milano, Italia.

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

Cravero M. C., Guidoni S., Schneider A., Di Stefano R., 1994. Caractérisation variétale de cépages musqués à raisin coloré au moyen de paramètres ampélographiques descriptifs et biochimiques. *Vitis*. 33 (2) 75-80.

Cravero MC., Dell'Oro V., 1995. Il resveratrolo: un composto polifenolico dell'uva e del vino di interesse terapeutico. *Enotecnico*. (4) 67-72.

Diatloff E., Asher C.J., Smith F.W., 1996. Concentration of rare earth elements in some Australian soils. *Australian Journal of Soil Research*, 34: 735-747.

- Díaz-Laviada I., 2010 Effect of capsaicin on prostate cancer cells. *Future Oncol.* 6: 1545-50.
- Di Stefano R.; Cravero M.C.; Gentilini N., 1989. Methods for polyphenol determination in wine. *Enotecnico.* 25 (5) 83-89.
- Di Stefano R.; Cravero M.C., 1989. Red wine colour and phenolic compounds. *Enotecnico.* 25 (10) 81-87.
- Di Stefano R., Cravero M.C., 1990. I composti fenolici e l'origine varietale delle uve. *Riv. Vitic. Enol.*, 1,34-44.
- Di Stefano R., Borsa D., Gentilini N., 1994. Estrazione degli antociani dalle bucce dell'uva durante la fermentazione. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti.* 25 (1) 31-46.
- Di Stefano R., Borsa D., Maggiorotto G., Corino L., 1995. Terpeni e polifenoli dei 'Brachetti' e delle 'Malvasie'. *L'Enotecnico*, 45. 67-75.
- Di Stefano R., Ummarino I., Gentilini N., 1996a. Alcuni aspetti del controllo di qualità nel campo enologico. Lo stato di combinazione degli antociani. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti.* 27 105-121.
- Di Stefano R., 1996b. Composti fenolici e volatili del Barolo. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti.* 27 91-103
- Fang J., Wen B., Shan X-Q., Wang H-H., Lin J-M., Zhang S-Z., 2007. Evaluation of bioavailability of light rare earth elements to wheat (*Triticum aestivum* L.) under field conditions. *Geoderma*, 141: 53-59.
- Finkel T., 1998. Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 248-253.
- Fulcrand, H.; Duenas, M.; Salas, E.; Cheynier, V., 2006. Phenolic reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture.* 57 (3) 289-297.
- Genovese A., Gambuti A., Piombino P., Moio L., 2007. Sensory Properties and Aroma Compounds of Sweet Fiano Wine. *Food Chem.* 103 (3), 1228-1236.
- Glories Y., 1978. Recherches sur la matière colorante des vins rouges. Thèse -Université de Bordeaux 11.

Greenough J.D., Longerich H.P., Jackson S.E., 1997. Element fingerprinting of Okanagan Valley wines using ICP-MS: relationships between wine composition, vineyard and wine colour. *Australian Journal of grape and Wine Research*, 3: 75-83.

Guidoni S., Di Stefano R., Schneider A., Cravero M.C., 1993. Caractérisation ampélographique et aromatique de cépages musqués à raisin coloré. *Atti del Simposio Internazionale "Connaissance Aromatique des cépages et qualité des vins"*. 142-151.

Harkins W.D., 1917. The evolution of the elements and the stability of complex atoms. I. A new periodic system which shows a relation between the abundance of the elements and the structure of the nuclei of atoms. *Journal of the American Chemical Society*, 39: 856-879.

Finkel, H.E., 1998. In *Vino Sanitas? Society of Wine Educators*.

Haslam E., 1975. Natural proanthocyanidines. In «The flavonoids» J.B. Harborne, T.J. Mabry et H. Mabry ed., pp 505-559.

Hsieh T.C., Huang Y.C., Wu J.M., 2010. Control of prostate cell growth, DNA damage and repair, and gene expression by resveratrol analogues, in vitro. *Carcinogenesis*. 32(1):93-101.

Hu X., Ding Z.H., Chen Y.J., Wang X.R., Dai L.M., 2002. Bioaccumulation of lanthanum and cerium and their effects on the growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedling. *Chemosphere*, 48: 621-629.

Hu Z., Richter H., Sparovek G., Schnug E., 2004. Physiological and biochemical effects of rare earth elements on plants and the agricultural significance: a review. *Journal of Plant Nutrition*, 27 (1): 183-220.

Ichihashi H., Morita H., Tatsukawa R., 1992. Rare earth elements (REEs) in naturally grown plants in relation to their variation in soils. *Environmental Pollution*, 76: 157-162.

James M.A., Fu H., Liu Y., Chen D.R., You M., 2010. Dietary administration of berberine or *Phellodendron amurense* extract inhibits cell cycle progression and lung tumorigenesis. *Mol. Carcinog.* 136(3):437-45.

Jos A., Moreno I., González A.G., Repetto G., Cameán A.M., 2004. Differentiation of sparkling wine (Cava e Champagne) according to their mineral content. *Talanta* 63: 377-382.

Kabata-Pendias A., 2001. Trace elements in soils and plants. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA.

Korotev R. L., Zeigler R. A., Jolliff B. L., Irving A. J., and Bunch T. E., 2009. Compositional and lithological diversity among brecciated lunar meteorites of intermediate iron concentration. *Meteoritics & Planetary Science* 44, 1287–1322.

Kumar R., Verma V., Jain A., Jain R.K., Maikhuri J.P., Gupta G. 2010. Synergistic chemoprotective mechanisms of dietary phytoestrogens in a select combination against prostate cancer. *J. Nutr. Biochem.* 22(8):723-31.

Larcher R., Nicolini G., 2008. Elements and inorganic anions in winemaking analysis and applications. In: R. Flamini (ed.). *Hyphenated Techniques in Grape and Wine Chemistry*. John Wiley and Sons, Chichester, West Sussex, cap. 8: 289-333.

Li F., Shan X., Zhang T., Zhang S., 1998. Evaluation of plant availability of rare earth elements in soil by chemical fractionation and multiple regression analysis. *Environmental Pollution*, 102: 269-277.

Liang T., Zhang S., Wang L., Kung H.-T., Wang Y., Hu A., Ding S.-M., 2005. Environmental biogeochemical behaviours of rare earth elements in soil-plant systems. *Environmental Geochemistry and Health*, 27: 301-311.

Markert B., Li Z.D., 1991. Natural background concentrations of rare-earth elements in a forest ecosystem. *Science of the Total Environment*, 103: 27-35.

Mannini F., Argamante N., Credi R., 1995. Improvements in the quality of grapevine Nebbiolo clones obtained by sanitation. *Acta Horticulturae*. (427) 319-324.

Mattivi F., Versini G., 1989. Influenza delle tecnologie di vinificazione sul patrimonio fenolico di vini Teroldego Rotaliano. Atti del Convegno "Il Teroldego Rotaliano" 1989, Suppl. Boll., ISMA, 3, 83-91.

McDonough W. F. & Sun S. S., 1995. The composition of the Earth. *Chemical Geology*, 120, 223-253.

Morton L. W. Caccetta R.A.A., Puddey I.B., Croft K.D., 2000. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. *Clinical and Experimental Pharmacology and Psychology* 27: 152-159.

Nicolini G., Larcher R., Pangrazzi P., Bontempo L., 2004. Changes in the contents of micro- and trace-elements in wine due to winemaking treatments. *Vitis*, 43(1): 41-45.

Nagel CW; Wulf LW., 1979. Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon. *Amer. J. Enol. Viticult.* 30 111-116.

Oddo, G., 1914. Die Molekularstruktur der Radioaktiven Atome. *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie*, 87: 253-268.

Oddone M., Robotti E., Marengo E., Baldizzone M., Aceto M., 2006. Studio di tracciabilità sulla filiera del vino mediante determinazione dei lantanidi con ICP-MS. Coïsson, Arlorio, Martelli (eds.). Atti del VI Congresso italiano "Chimica degli alimenti". Editrice Taro, Italia, pp. 573-577.

Oddone M., Aceto M., Baldizzone M., Musso D., Osella D., 2009. Authentication and traceability study of hazelnuts from piedmont, Italy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(9):3404-3408.

Oddone M., Baldizzone M., Aceto M., Robotti E., Marengo E., 2007. Studio preliminare sull'impiego dei lantanidi come marcatori nelle filiere alimentari: determinazione con ICP-MS, XX Congresso Nazionale di Chimica Analitica - La Chimica Analitica per l'ambiente e gli alimenti, S. Martino al Cimino (Viterbo), 16-20 comunicazione orale.

Ribéreau-Gayon J., Peynaud E., Ribéreau-Gayon P., Sudraud P., 1976. *Traité d'Oenologie-Sciences et Techniques du vin*. Dunod, Paris, 3: 198-225.

Rice-Evans C., Sampson J., Bramley P. M., Holloway D.E., 1997. Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo. *Free Radical Research* 26: 381-398.

Riponi C., Bourzeix M., Heredia N., Benard P., Moutounet M., Escudie J.L., Caillet M., 1985. Analysis of pigment composition. Influence of vinification at different temperatures. *Progres Agricole et Viticole*. 102 (13-14): 331-335.

- Rossano E.C., Szilagyi Z., Malori A., Pocsfalvi G., 2007. Influence of winemaking practices on the concentration of rare earth elements in white wines studied by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 311-317.
- Salgues M, Cheynier V, Gunata Z, Wylde R., 1986. Oxidation of grape juice 2-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid by Botrytis cinerea laccase and characterization of a new substance: 2,5-di-S-glutathionyl caffeoyl tartaric acid. *Journal of Food Science*. 51 1191-1194.
- Sarni P, Fulcrand H, Souillol V, Souquet JM, Cheynier V., 1995 Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 69 (3) 385-391.
- Sies H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*. 82 (2): 291-5.
- Singleton VL., Zaya J., Trousdale E., Salgues M., 1984.v Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing. *Vitis*. 23 113-120.
- Singleton VL., Salgues M., Zaya J., Trousdale E., 1985. Caftaric acid disappearance and conversion to products of enzymic oxidation in grape must and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 36 50-56.
- Sondag F., 1992. Geochemical markers of palaeo-environments: relations between climatic changes, vegetation and geochemistry of lake sediments, southern Brazil. *Applied Geochemistry*, Suppl. Issue 2: 165-170.
- Stanner S.A., Hughes J., Kelly C.N., Buttriss J., 2004. A review of the epidemiological evidence for the "antioxidant hypothesis". *Public Health Nutr*. 7 (3): 407-22.
- Teissedre P.L., Frankel E.N., Waterhouse, A.L., Peleg, H., German, J.B., 1996. Inhibition of human LDL oxidation in vitro by phenolic antioxidants from grapes and wines. *J. Sci. Food Agric*. 70, 55-61.
- Thorngate J.H., Singleton V.L., 1994. Localization of procyanidins in grape seeds. *Am. J. of Enol. & Vit*. 45, 259-262.
- Timberlake CF., Bridle P., 1976. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *Amer. J. Enol. Viticult.* 27 97-105.

- Tyler G., 2004a. Rare earth elements in soil and plant system – a review. *Plant and Soil*, 267: 191-206.
- Tyler G., 2004b. Ionic charge, radius, and potential control root/soil concentration ratios of fifty cationic elements in the organic horizon of a beech (*Fagus sylvatica*) forest podzol. *Science of the Total Environment*. 329: 231–239.
- Uchida S., Tagami K., Hirai I., 2007. Soil-to-plant transfer factor of stable elements and naturally occurring radionuclides (1). Upland field crops collected in Japan. *Journal of Nuclear Science and Technology*, 44(4): 628-640.
- Ummarino, I., Di Stefano, R., 1996. Influenza del numero di semi per acino sulla composizione dell' uva. Journal title: *Rivista di Viticoltura e di Enologia, Conegliano*. 49 (4) 29-37.
- Vinson J.A., Hao Y., Su X., Zubik L., 1998. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J Agric Food Chem*. 46: 3630- 3634.
- Wang Y.Q., Sun J.X., Chen H.M., Guo F.Q., 1997. Determination of the contents and distribution characteristics of REE in natural plants by NAA. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 219(1): 99-103.
- Wang J., Wen L., Huang Y., Chen Y., Ku M., 2006. Dual effects of antioxidants in neurodegeneration: direct neuroprotection against oxidative stress and indirect protection via suppression of glia-mediated inflammation. *Curr Pharm Des*. 12 (27): 3521-33.
- Wen B., Yuan D.A., Shan X.Q. Li F.L., Zhang S.Z., 2001. The influence of rare earth element fertilizer application on the distribution and bioaccumulation of rare earth elements in plant under field conditions. *Chemical Speciation and Bioavailability*. 13: 39-48.
- Wintergerst E., Maggini S., Hornig D., 2006. Immune-enhancing role of vitamin C and zinc and effect on clinical conditions. *Ann Nutr Metab*. 50 (2): 85-94.
- Wytenbach A., Tobler L., Furrer V., 1996. The concentration of rare earth elements in plants and in the adjacent soils. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 204(2): 401-413.
- Yang L.H., Wang X.R., Sun H., 1999. The effect of EDTA on rare earth elements bioavailability in soil ecosystem. *Chemosphere*. 38(12): 2825-2833.

Relazione dell'attività svolta durante il dottorato di ricerca

“Correlazione tra il contenuto in componenti polifenoliche di vini rossi italiani e il loro potere antiossidante determinato con EPR.”

Elenco delle pubblicazioni anno 2010-2014

Partecipazione a convegni

1. Bonello F., Pazo Alvarez M.C., Tsolakis C., Cravero M.C., 2010. Riconoscibilità sensoriale di vini passiti ottenuti da uve Moscato bianco. POSTER presentato al III Convegno Nazionale della SISS. Napoli, 1-2 Dicembre 2010.
2. Bonello F., Costantini A., Vaudano E, Cravero M.C., Garcia-Moruno E. 2011 Influence of selected autochthonous *Oenococcus oeni* on the evolution of wine sensory profile after malolactic fermentation. Atti di OENO 2011 Bordeaux 15-17 giugno, in corso di stampa.
3. Tsolakis C., Bonello F., Dell'oro V., Ciambotti A., Cravero M.C., 2011 Verifica dell'origine geografica di alcuni vini italiani mediante l'analisi dei rapporti isotopici stabili. atti del 34°congresso mondiale oiv, 20 giugno-25 luglio 2011, Oporto, Portogallo Section II - Oenology: F.Wine Analysis and Trade Regulation, Poster communication 275. **ISBN 978-989-20-2449-3.**
4. Guidoni S., Lovisolo C., Borsa D., Cravero M.C., Bonello F., Paravidino E., Tragni R., Schubert A., 2011 Effect of deficit irrigation on Barbera wines in Piedmont. Proceedings 17th International Symposium GiESCO, Asti-Alba (CN), Italy 29 Aug-2 Sept 2011, 491-494.
5. Bonello,F.; Tsolakis, C.; Cravero, M.C.; Ciambotti, A.; Dell'Oro, V.; Sansone, L2012. Rapporti isotopici e profili sensoriali per la tracciabilità dei vini. Proceedings of the 35 th World Congress of Vine and Wine (OIV). 18-22 June 2012, Izmir, Turkey 8 pp.
6. Sansone, L.; Tassinari, R.; Belfiore, N.; Dell'Oro, V., Ciambotti, A., Tsolakis, C., Cravero, M.; Bonello, F.; Ferioli, D.; Vaccaro, C.; Sparacio, A. 2012. Determinazione delle concentrazioni di metalli e di rapporti isotopici (D/H), 13C/12C e 18O/16O per la

tracciabilità geografica dei vini di alcune varietà italiane. Proceedings of the 35 th World Congress of Vine and Wine (OIV). 18-22 June 2012, Izmir, Turkey 8 pp.

7. Borsa, D.; Cravero, M.C.; Bonello, F.; Tsolakis, C. 2012. Effetti dell'insilamento delle vinacce sulla composizione della Grappa di Moscato. Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare - Atti X Convegno CISETA - Milano, 9-10 maggio 2011 10: 19-23
8. Cravero, M.C.; Bonello, F. ; Chiusano, L. 2012. Esperienze di addestramento sensoriale nei bambini. Poster - IV Congresso SISS, Trieste 22-23 novembre 2012 (III P41)
9. Cravero, M.C.; Bonello,F.; Costantini, A.; Vaudano, E.; Garcia Moruno, E. 2012. Influence of selected autochthonous Oenococcus Oeni on the evolution of wine sensory profile after malolactic fermentation. Actes de colloques du 9 symposium international de Bordeaux (15-17 juin 2011) 596-600
10. Cravero, M.C.; Bonello, F.; Tsolakis, C.; Moriondo, G. 2012. Profil sensoriel de vins réalisés avec différents assemblages de cépages à baie rouge indigènes de la Vallée d'Aoste.
Atti - IV Congrès International sur la Viticulture de Montagne et de Forte Pente. Lyon 7-9 Novembre 2012 5-10

Elenco pubblicazioni

1. Asproudi A., Borsa D., Cravero M.C., Bonello F., 2011. Effetti dell'iperossidazione e dell'ossidazione controllata sulla qualità di vini Vermentino. L'Enologo, XLVII, (6): 77-82. **ISSN 1593-6112**
2. Bonello F., Chiusano L., Cravero M.C., 2011 Assaggio delle uve per vendemmie di qualità. L'Informatore Agrario, 24, 53-56. **ISSN 0020-0689**.
3. Cravero M. C.; Bonello F.; Pazo Alvarez M.C.; Tsolakis C.; Bonifacino G.; Tragni R.; 2011. Analyse sensorielle du raisin pour la prévision des caractéristiques qualitatives des vins de Barbera . Le Progrès Agricole et Viticole 128: 20 418-423
4. Cravero M.C.; Tsolakis C.; Bonello F.; Piano F.; Chiusano L. 2011. Valutazione chimica e sensoriale dell'amaro e dell'astringenza nel vino Cisterna d'Asti DOC. Rivista di Viticoltura e di Enologia 64: 1-2-3 135-136

5. Bonello F.; Murgo M.; Cravero M.C. 2012 Confronto tra profili sensoriali di vini Syrah ottenuti da uve coltivate in Piemonte e in Argentina. *L'Enologo* 48: 1-2 85-90
6. Cravero M.C.; Bonello F.; Chiusano L.; Tamborra P.; Savino M. 2012. Caratterizzazione sensoriale di vini Bombino Bianco e Falanghina prodotti in Puglia e ottenuti con diverse tecniche di vinificazione. *Infowine - rivista internet di viticoltura ed enologia* 2: 2 12 pp.
7. Cravero M.C.; Bonello F., 2012. Comparison of wine sensory profiles performed by three trained panels of wine experts. *Rivista di Viticoltura e di Enologia* 65: 2 29-40
8. Cravero M.C.; Bonello F.; Chiusano L. 2012. Che bel profilo! (Il profilo sensoriale dei vini). *Civiltà del bere* 39: 7-8 51-55
9. Cravero M.C.; Bonello F.; Costantini A.; Doria F.; Chiusano L.; Dellavalle D.; Garcia Moruno E. 2012. Selezione di batteri lattici autoctoni in vini piemontesi e studio della loro influenza sulle caratteristiche sensoriali dei vini. Uno studio sui vini piemontesi. *MilleVigne* 7: 3 18-21
10. Cravero M.C.; Bonello F.; Tsolakis C.; Piano F.; Borsa D. 2012. Comparison between Nero d'Avola wines produced with grapes grown in Sicily and Tuscany. *Italian Journal of Food Science* 24: 4 384-387 **Impact Factor: 1.791**
11. Borsa D.; Bonello F.; Tsolakis C.; Cravero M.C. 2013. Effetti dell'insilamento delle vinacce sulla composizione della Grappa di Moscato. *Industrie delle Bevande* 42: 246 11-14
12. Cravero M.C.; Bonello F.; Tsolakis C.; Piano F.; Borsa D. 2013. Comparison between Nero d'Avola wines produced with grapes grown in Sicily and Tuscany. *Italian Beverage Technology* 72: aprile pag.13-18
13. Guaita M., Petrozziello M.; Motta S., Bonello F.; Cravero M.C., Marulli C.; Bosso A. 2013. Effect of the closure type on the evolution of the physical-chemical and sensory characteristics of a Montepulciano d'Abruzzo rosé wine. *Journal of Food Science* 78: 2 160-169 **Impact Factor: 1.791**
14. Juega M.; Costantini A.; Bonello F.; Cravero M.C.; Martinez-Rodriguez A.J.; Carrascosa A.V.; Garcia Moruno E. 2014. Effect of malolactic fermentation by autochthonous *Pediococcus damnosus* strains on the composition and sensory profile of

Albarino and Caino white wines, *Journal of Applied Microbiology*. 116:3 586-595

Impact Factor: 2.386 DOI: 10.1111/jam.12392

15. Piano F.; Petrozziello M.; Vaudano E.; Bonello F.; Ferreira V.; Zapata J.; Hernandez-Orte P. 2014. Aroma compounds and sensory characteristics of Arneis Terre Alfieri DOC wines: the concentration of polyfunctional thiols and their evolution in relation to different ageing conditions *European Food Research and Technology*, 239:267-277
Impact factor 1,387. DOI: 10.1007/s00217-014-2218-8
16. Cassino C., Gianotti V., Bonello F., Cravero M.C, Osella D., Antioxidant composition of a selection of Italian red wines and their corresponding free-radical scavenging ability
LWT - Food Science and Technology. **Submitted**
17. Aceto M., Bonello F., Musso D., Osella D. Wine traceability with Rare Earth Elements. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. **Submitted**

Elenco corsi e convegni frequentati dal novembre 2010 ad oggi

Anno 2010-2011

- 1) “III Convegno Nazionale di Scienze Sensoriali”. Portici (NA), facoltà di Agraria dell’Università degli studi di Napoli Federico II, 1-2 dicembre 2010 - **14** ore
- 2) “X° Congresso CISETA”. Milano, 9-10 Maggio 2011 - **10,30** ore
- 3) Seminario “Interazioni in soluzione fra Molecole e Particelle”. Università degli studi di Milano, 7 giugno 2011 - **3,30**
- 4) OENO 2011 “9° Symposium International d’Oenologie de Bordeaux”. Bordeaux 15-17 giugno 2011 - **19** ore
- 5) Scuola estiva di alta formazione “Biostat 2011: Inferenza statistica in biologia e scienze umane”. Polo Universitario di Asti, 27 giugno-1 luglio 2011 - **35** ore
- 6) “17 th International Symposium Giesco 2011”. Asti-Alba 29 agosto-2 settembre 2011 - **26** ore

Anno 2011-2012

1. Corso “Proprietà chimico-biologiche e qualità degli alimenti”
Giorgio Calabrese **16 ore**

2. Corso per dottorandi “Proprietà chimico-biologiche e qualità degli alimenti”
Giorgio Calabrese **7 ore**

3. Corso “Elaborazione e degustazione degli spumanti metodo classico”
Nizza Monferrato, 28 febbraio 2012 **8 ore**

4. Convegno “Isolamento e caratterizzazione di batteri lattici autoctoni per l’ottenimento di una fermentazione malolattica sicura e per la valorizzazione della tipicità di vini piemontesi”
Martedì 13 dicembre 2011 CRA-ENO Asti **3 ore**

5. Convegno scientifico aggiornamento tecnico-applicativo su Brettanomyces
9 maggio 2012, Ampelion, Facoltà di Agraria, Alba **4 ore**

6. IV Convegno Nazionale di Viticoltura CONAVI.TO 2012
Asti, 10-11-12 luglio 2012 **24 ore**

7. Convegno “La qualità senza ritocchi” Carosino, Taranto 25 agosto 2012 **2 ore**

8. Corso di “Biotecnologie agroalimentari”
prof.Glick **12 ore**

2012-2013

1. Corso individuale di lingua inglese
Polyglot Asti **20 ore**

2. Corso “Non solo Sauvignon”
Nizza Monferrato, giugno 2013 **4 ore**

3. Agricoltura, Alimentazione e salute: le sfide della ricerca per garantire produzione, qualità e proprietà salutistiche degli alimenti
Torino, 21 febbraio 2013 **8 ore**

4. Scuola della fermentazione malolattica
Giovedì 16 Maggio 2013
Ampelion, Facoltà di Agraria, Alba **8 ore**

5. Seminario PerkinElmer “Controllo, caratterizzazione q uali-quantitativa e problematiche analitiche emergenti n ell’ambito dei prodotti viti-vinicoli” Asti, 30 maggio 2013
4 ore

6. Multidimensional nmr of paramagnetic chelates (22-23 maggio 2013) **9 ore**

7. Sicurezza alimentare e difesa dell’autenticità delle produzioni nazionali
Torino 18 novembre 2012 **8 ore**