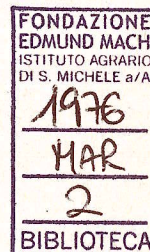


COPIA AD USO
PERSONALE DI RICERCA
DEL COLLEGE DI AGRICOLTURA

Importanza della conoscenza delle sostanze polifenoliche per la caratterizzazione dei vini e dei sottoprodotti della vinificazione



GIULIO MARGHERI

Laboratorio di Analisi e di Ricerca dell'Istituto Agrario provinciale
S. Michele all'Adige (Trento)

L'uva contiene un gran numero di sostanze fenoliche, le quali, per il metabolismo e lo sviluppo della vite, rivestono una importanza non minore dei carboidrati, degli acidi organici, delle sostanze proteiche e dei sali minerali.

BIOSINTESI DELLE SOSTANZE FENOLICHE

Nozioni generali

Si sa che gli idrati di carbonio sono rapidamente elaborati nelle foglie e nei frutti mediante il meccanismo della fotosintesi.

Mentre una parte degli idrati di carbonio sono degradati, per fornire alla pianta una certa energia, altre frazioni di idrati di carbonio sono invece utilizzati per la biosintesi di un numero considerevole di composti.

Di recente, vari ricercatori, studiando la biosintesi dei composti aromatici partendo dagli idrati di carbonio, hanno constatato che l'origine della maggior parte dei composti fenolici è dovuta a due principali precursori e, precisamente, all'acido scichimico e all'acido acetico.

In fig. 1 viene riportato lo schema generale della biosintesi degli acidi fenolici e dei flavonoidi. Dawis (1955), studiando la sintesi degli aminoacidi aromatici da parte di certi microrganismi, ha dimostrato che la biosintesi dei composti aromatici, partendo dagli idrati di carbonio, avviene tramite l'acido scichimico.

L'impiego di elementi radioattivi ha permesso di stabilire i prodotti intermedi, che intervengono in questo meccanismo e la maggior parte degli enzimi utilizzati in queste reazioni. Sprinson (1960), Conu (1964), Freudenzberg (1968).

L'acido scichimico è molto diffuso nel regno vegetale e la trasformazione dell'acido scichimico in fenilalanina e in tirosina (che danno poi gli stessi acidi cinnamici) è stata dimostrata.

Viene spiegata così anche la formazione degli acidi benzoici come l'acido gallico e l'acido protocatechico.

È anche possibile che gli acidi benzoici si possano formare per degradazione degli acidi cinnamici.

Possiamo dunque ritenere che l'accumulo dei fenoli nelle piante e la formazione degli aminoacidi aromatici partendo dal glucosio avvenga

(*) Relazione presentata a Modena il 5 dicembre 1975 in occasione della « Riunione di aggiornamento degli Enotecnici emiliani ».

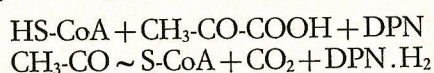
tramite la via dell'acido scichimico. Le cumarine derivano dagli acidi cinnamici per ciclizzazione, mentre la riduzione degli acidi cinnamici conduce all'alcool coniferilico, che è un precursore delle lignine.

I due processi metabolitici della cellula vivente (degli animali, delle piante e dei microrganismi) implicati nello sfruttamento dell'energia contenuta nel suo alimento (idrato di carbonio), sono la fermentazione e la respirazione. Mentre la fermentazione dà prodotti ancora ricchi di energia, la respirazione produce la totale demolizione del carboidrato negli ossidi semplici CO_2 e H_2O di bassissima energia potenziale.

Si è accertato che la fermentazione e la respirazione hanno in comune una fase anaerobica fino al punto della formazione dell'acido piruvico.

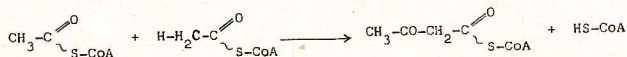
Poi la fermentazione alcolica continua in condizioni anaerobiche, mentre la respirazione richiede ossigeno. Nel processo della respirazione, l'acido piruvico, metabolita molto labile, prenderà parte a più schemi biologici, in particolare al ciclo di Krebs, nella formazione degli acidi grassi, steroli ed anche fenoli.

È necessario a questo punto ricordare che nella biogenesi dei fenoli (anello benzenico) intervengono derivati degli acidi ed un coenzima A (CoA) (HS-CoA), che mette in evidenza il gruppo funzionale ed essenziale tiolico, del tipo $\text{CH}_3\text{-CO} \sim \text{S-CoA}$, nel quale la presenza di un legame di elevata energia (segnato $\sim$) permette il trasferimento del radicale acetile. Il cosiddetto coenzima A è largamente distribuito in natura e svolge una parte di primaria importanza in molti processi metabolici. Il CoA interviene nella decarbossilazione dell'acido piruvico e si lega al rimanente gruppo acetilico, mentre DPN effettua la deidrogenazione, riducendosi



acetilcoenzima A difosfopiridinucleotide. H_2

Il coenzima A fa accrescere la mobilità degli idrogeni del gruppo metile e permette facilmente una acilazione sul carbonio corrispondente (C-acilazione):



Questo schema, che riassume il meccanismo della autocondensazione di due molecole di acetilcoenzima A, in realtà è molto più complesso. Quando una molecola di un acido qualunque (R-COOH) reagisce sotto forma di acetilcoenzima A con 3 molecole di acido acetico sotto forma di malonil-coenzima A, il prodotto della condensazione può essere un composto aromatico.

Se l'acido iniziale che interviene nella ciclizzazio-

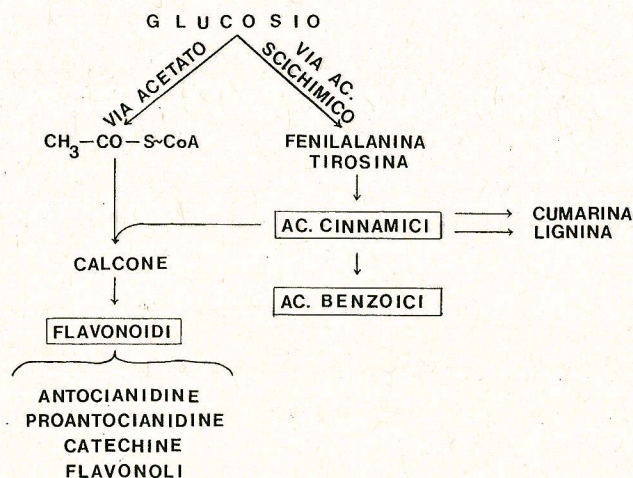


Fig. 1.

ne è l'acido cinnamico ($\text{R} = \text{C}_6\text{H}_5\text{-CH=CH-COOH}$) si ottiene un calcione - un anello del floroglucinolo o differenti flavonoidi.

Per quanto riguarda la formazione dell'anello B e della catena centrale a tre atomi di carbonio, Underhill e coll. (1957) hanno dimostrato che i migliori precursori della quercetina sono l'acido scichimico, la fenilalanina, gli acidi cinnamici e l'acido p-cumarico.

In fig. 3 viene riportata la formazione dei flavoni, dei flavani (catechine, proantocianidine, leucoantociani) e delle antocianidine partendo dal calcione.

La ciclizzazione del calcione si effettua per isome-

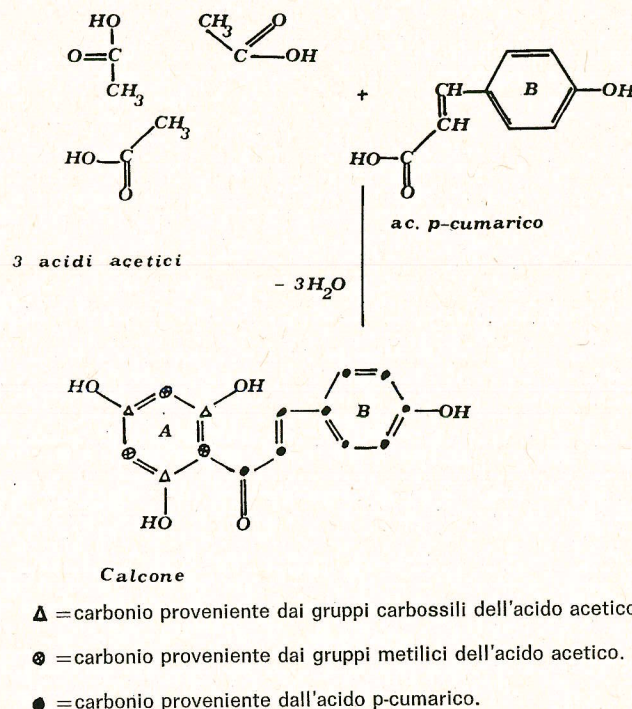


Fig. 2.

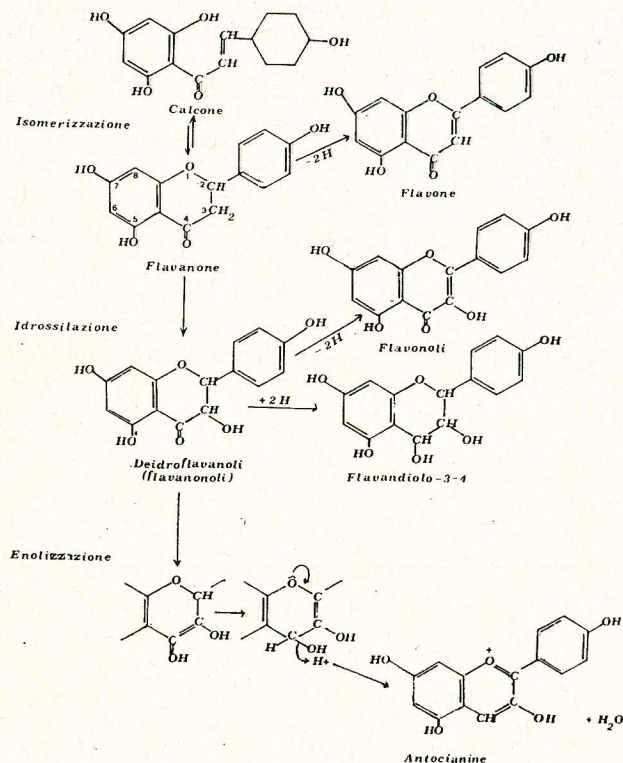


Fig. 3 — Formazione dei diversi tipi di flavonoidi a partire dal calcone.

rizzazione sotto forma di flavanone, che è stabilizzato dalla formazione di un legame H fra il CO e il gruppo OH in posizione 5. I flavanoni, ed in particolare i loro prodotti di idrossilazione, i flavanonoli (o diidroflavanoli) rivestono un ruolo di intermediari nella formazione dei differenti tipi di flavonoidi.

LE SOSTANZE FENOLICHE DELL'UVA E DEL VINO

In base alle attuali conoscenze della biochimica vegetale, possiamo distinguere le sostanze fenoliche contenute nell'uva e nel vino in due principali gruppi:

- acidi fenolici
- flavonoidi.

a) Gli acidi fenolici

Chiamiamo generalmente con questo termine le molecole organiche formate da un solo anello benzenico, al quale sono legate direttamente una o più funzioni fenoliche, più o meno sostituite da gruppi metossilici, ed un radicale carbossile, che può essere legato sia direttamente all'anello, sia portato da una catena alifatica, la quale è legata direttamente all'anello benzenico. Attualmente, con il termine di « acidi fenolici » intendiamo essenzialmente due tipi di composti:

a) sostanze fenoliche contenenti l'unità base fenilcarbossilica C_6-C_1 . A questo gruppo appartengono gli acidi benzoici, mono- di- e tri-idrossilati;

b) sostanze fenoliche contenenti l'unità base del fenilpropano C_6-C_3 . A questo gruppo appartengono gli acidi cinnamici mono- di- e tri-idrossilati.

In fig. 4 e 5 sono riportati i più rappresentativi acidi benzenici e cinnamici che, nell'uva, si trovano sotto forma di esteri, mentre nel vino sono in gran parte sotto forma libera. Il loro contenuto nel vino raramente supera i 50 mg/litro.

FORMULA GENERALE	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	DENOMINAZIONE USUALE DEGLI ACIDI
	OH					BENZENICO
		OH				SALICILICO
			OH			M-IDROSSIBENZOICO
						P-IDROSSIBENZOICO
	OH			OH		GENTISICO
		OH	OH	OH		GALLICO
	O-CH ₃	OH				VANILLICO
	O-CH ₃	OH	O-CH ₃			SIRINGICO

Fig. 4 — Acidi benzoici.

FORMULA GENERALE	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	DENOMINAZIONE USUALE DEGLI ACIDI
$\begin{array}{c} \text{C}_6 - \text{C}_3 \\ \text{CH}=\text{CH}-\text{COOH} \\ \text{R}_6 \quad \text{R}_2 \\ \text{R}_5 \quad \text{R}_3 \\ \text{R}_4 \end{array}$	OH	OH	OH			CINNAMICO
						O-CUMARICO
						M-CUMARICO
						P-CUMARICO
						CAFFEICO
						FERULICO
						SIRINGICO

Fig. 5 — Acidi cinnamici.

b) I flavanoidi

Questo gruppo di sostanze fenoliche ha, come unità base, lo scheletro di carbonio C₆-C₃-C₆, nel quale due anelli aromatici sono uniti tra di loro da un frammento alifatico C₃ ossigenato. I flavonoidi si distinguono in base al grado di ossidazione del frammento alifatico o eterociclo ossigenato C₃ in tre grandi gruppi:

- 1) le antocianine
- 2) le catechine e le proantocianidine o leucoantocianidine
- 3) i flavonoli.

Come si può facilmente constatare dalla fig. 6, l'eterociclo ossigenato C₃ è rappresentato nelle antocianidine dal pirilio, nei flavani dal pirano e nei flavonoli dal pirono.

Le antocianine

Le antocianine sono dei flavani nei quali la catena eterociclica è rappresentata dall'anello del pirilio. Per questo motivo le antocianine posseggono il grado di ossidazione più elevato della serie dei flavani.

In altri termini, l'anello del pirilio è interamente non saturo, cosicché le molecole delle antocianine hanno tutte i doppi legami coniugati.

Le antocianine sono quindi composte da un anello di benzopirilio e da un anello fenolico, che assieme prendono il nome di flavilio (fig. 6).

Va sottolineato che questo è un composto di ossonio e che si trova in natura sotto forma di cloruro. Le posizioni degli atomi di carbonio 3-5 sono occupate da ossidril.

Le antocianine si trovano nella linfa dei vacuoli delle cellule vegetali per lo più sotto forma di glucosidi solubili in acqua. Questi glucosidi sono formati da un aglicone che può essere separato dalla frazione zuccherina, normalmente legata in posizione 3 dell'eterociclo ossigenato, per idrolisi enzimatica o acida.

L'aglicone viene detto antocianidina.

Il residuo zuccherino può essere un esoso come il glucosio o il galattosio, o un pentoso come il ramnosio. Come esempio, viene riportato in fig. 7 il monoglucoside-3-malvidina.

Qualche volta, una seconda molecola di zucchero si può trovare legata nella posizione 5. In questo caso si ha a che fare con un diglucoside. Come esem-

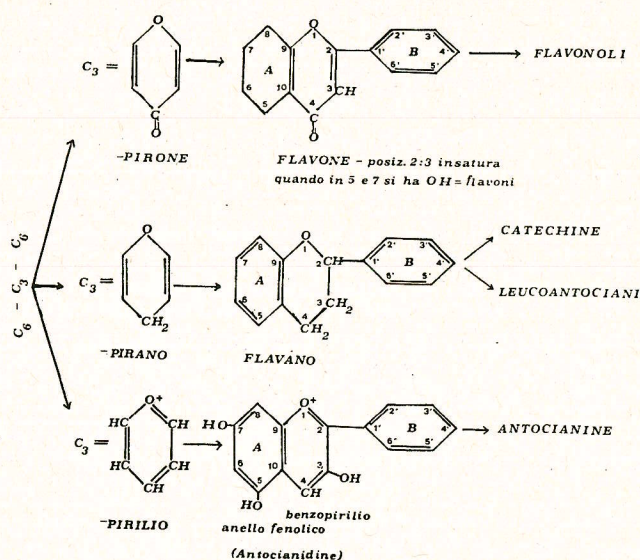


Fig. 6a — Struttura dei flavonoidi.

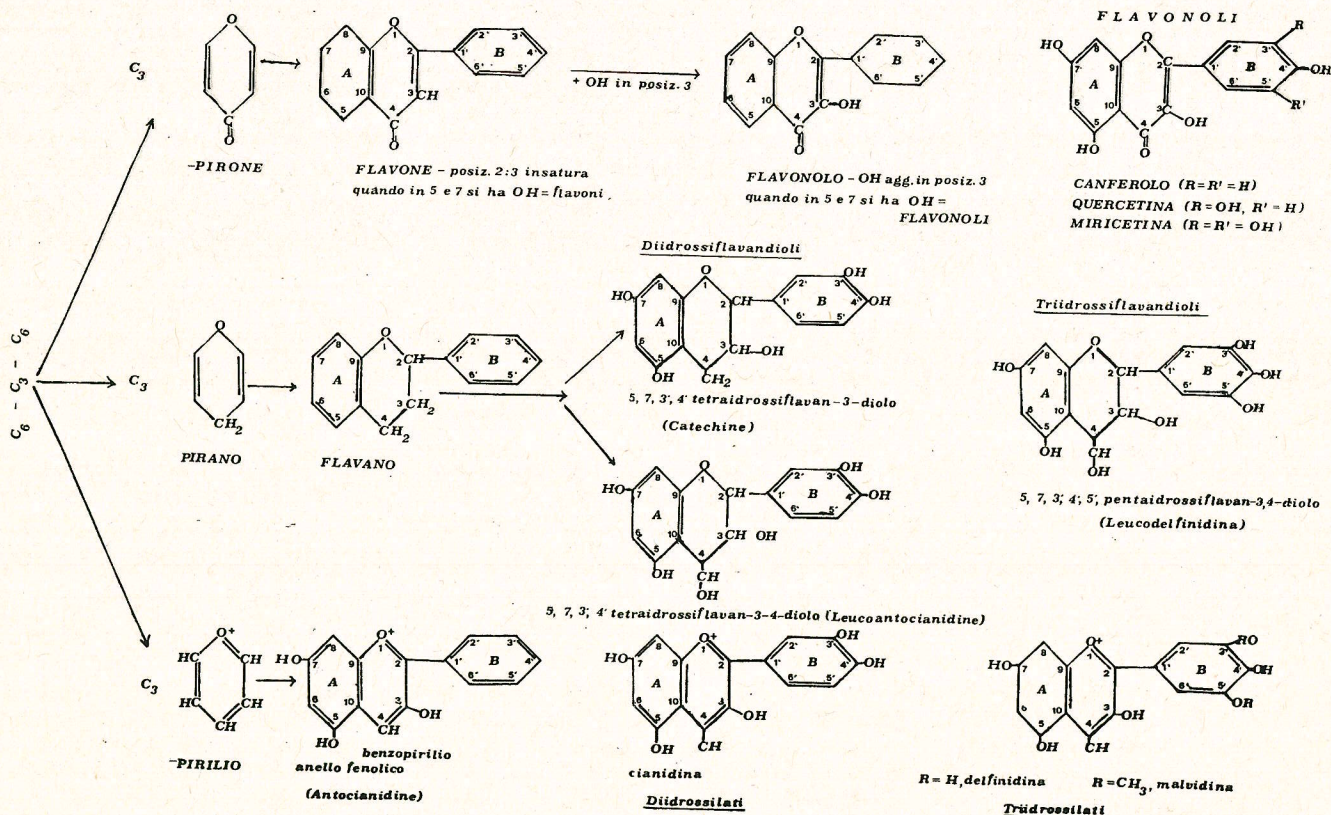


Fig. 6b — Struttura dei flavonoidi.

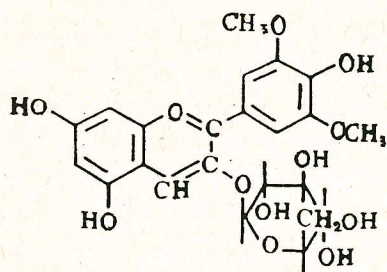


Fig. 7 — Monoglucoside-3-malvidina.

pio, viene riportato in fig. 8 il diglucoside-3,5-malvidina.

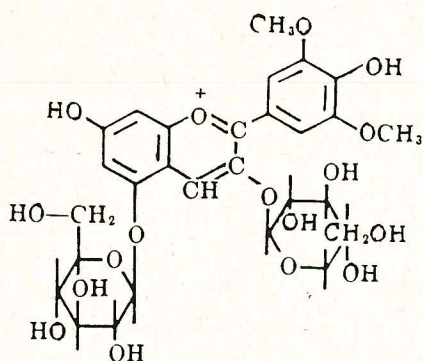


Fig. 8 — Diglucoside-3,5-malvidina.

Ci sono anche delle antocianine acilate, quando i gruppi ossidrilici degli zuccheri sono esterificati con acidi che possono essere sia della serie alifatica, come l'acido malico o malonico, sia della serie aromatica, come gli acidi benzoici o cinnamici. Come esempio, viene riportato in fig. 9 il (p-cumaril-4-glucoside)-3-malvidina.

In base alla formula di struttura delle antocianine, vengono spiegate le modificazioni del colore delle antocianidine al variare del pH.

Infatti, in ambiente molto acido le antocianidine¹ presentano una struttura ionica positiva, nella quale la carica positiva è localizzata su un atomo di ossigeno, come « ossonio » o su un atomo di carbonio dell'eterociclo. Questa struttura ionica corrisponde alla colorazione rossa delle antocianine. In ambiente poco acido si ha un equilibrio tra la forma ionica

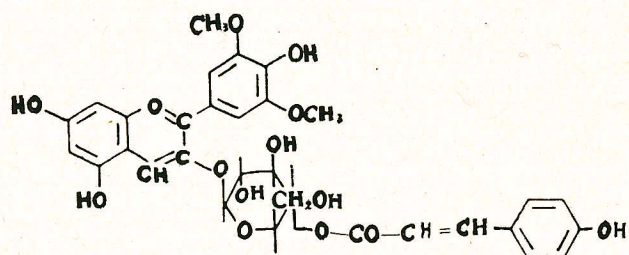


Fig. 9 — (p-cumaril-4-glucoside)-3-malvidina.

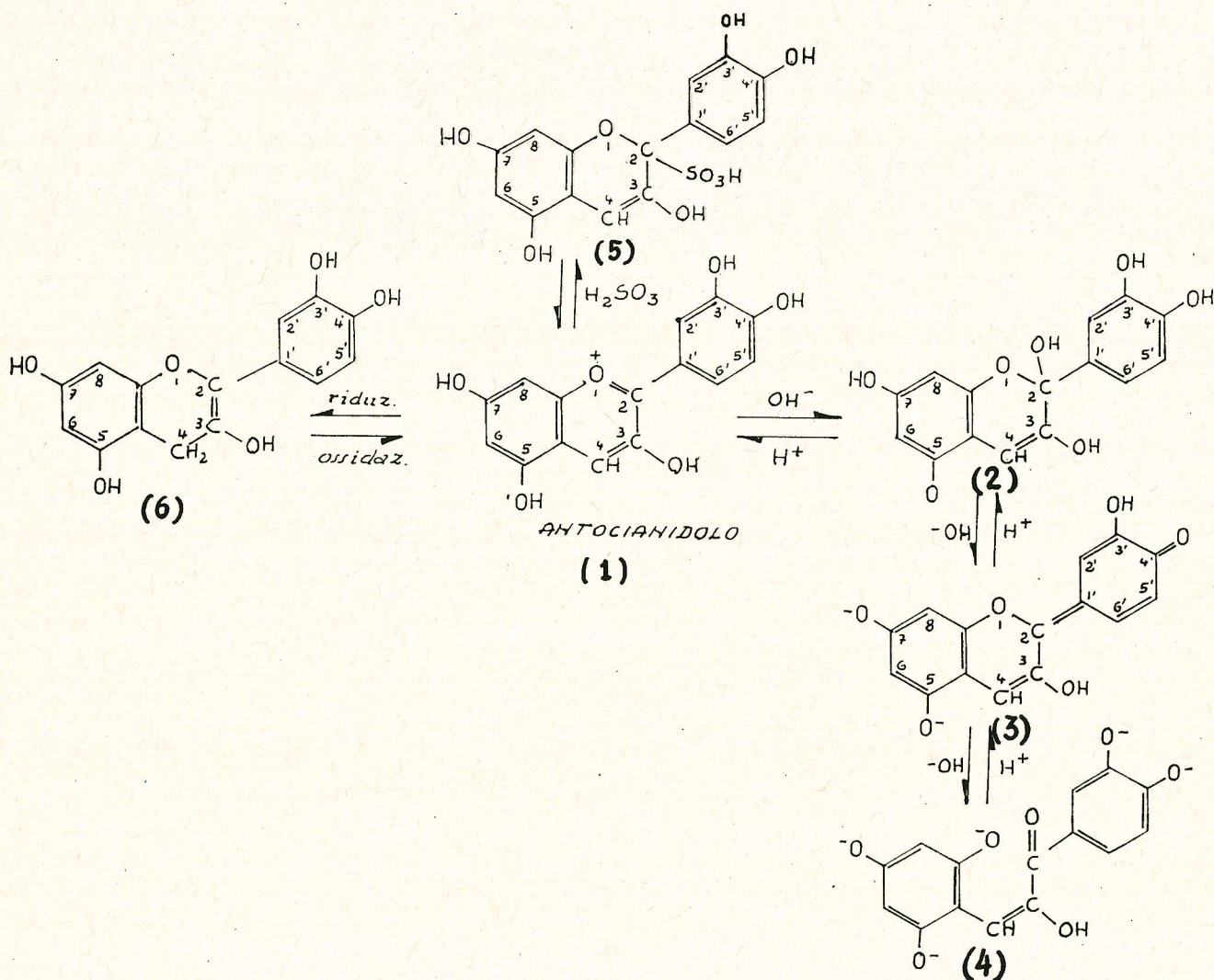


Fig. 10 — Modificazione della struttura degli antociani al variare del pH — della riduzione — dell'SO₂.

colorata in rosso e una pseudobase o base carbinolica incolore². La posizione di questo equilibrio dipende dal pH.

Sotto questa forma, gli antociani si trovano nel vino e la prevalenza di una delle due forme sull'altra dipende dal pH.

Infine, a pH 7 la colorazione vira verso il bleu-bleu-verde. A questo pH le funzioni fenoliche vengono ionizzate con formazione di fenati³. A pH superiore a 8 gli antociani si scompongono con apertura dell'eterociclo e a pH 12 si ha la formazione di un calcone⁴. Le antocianine si decolorano in presenza di acqua ossigenata, bisolfito di sodio⁵, perché queste sostanze alterano il gruppo cromoforo. Le antocianine possono inoltre essere decolorate per riduzione⁶. Questa forma incolore può essere in equilibrio con la forma colorata in rosso. Così si spiega perché certi vini poco rossi immediatamente dopo la fermentazione, divengono più colorati dopo qualche mese. Quando l'anello fenolico B delle antocia-

nine viene aggiunto di gruppi ossidrilici, si hanno varie antocianine colorate in azzurro e l'intensità del colore aumenta con l'aumento del numero di ossidrilici, mentre l'aggiunta di gruppi metossilici anziché ossidrilici, causa una più intensa colorazione rossa (vd. fig. 11).

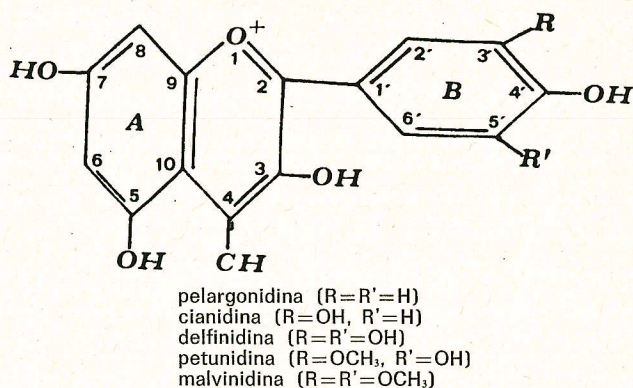


Fig. 11 — Antocianidine.

Diversi Autori hanno approfondito le loro ricerche sulle modificazioni che subiscono le antocianine, sia quando dall'uva ammostata e fermentata passano al vino, sia durante l'invecchiamento del vino.

Fra le più importanti modificazioni possiamo ricordare:

- 1) l'idrolisi delle antocianine in zucchero e l'aglicone corrispondente, favorito dall'acidità del vino;
- 2) l'aglicone così formato non è più stabile, quindi si può ossidare, polimerizzare per condensazione con formazione di molecole complesse e colorate di grandi dimensioni che precipitano;
- 3) si è constatato che le antocianine metossilate sono più facilmente degradabili durante l'invecchiamento del vino.

Secondo Somers (1968), durante la vinificazione vi sarebbe una estrazione preferenziale dei pigmenti non acilati rispetto agli acilati.

Alcuni ricercatori sono dell'opinione che proprio come certi componenti del sangue sono importanti per gli animali, così i glucosidi (antocianine) solubili nella linfa dovrebbero avere una certa importanza nella fisiologia della pianta.

Inoltre, tutti questi glucosidi sono tipici per determinate specie di piante e sono strettamente controllati dai geni specifici di queste piante; sembra perciò che essi debbano avere una notevole importanza fisiologica.

Secondo Singleton ed Esau (1968) il carattere varietale viene ad essere configurato dalla sovrapposizione di una maggiore o minore capacità di produrre pigmenti di- o tri-idrossilati della serie cioè della cianidina o della delphinidina con la maggiore o minore capacità di produrre pigmenti più o meno metilati o pigmenti acilati o meno.

In sostanza, una determinata varietà si configura nella capacità di sintetizzare in maggiore o minore quantità le singole antocianine fondamentali.

I flavani e i tannini

I flavani sono dei flavanoidi nei quali l'eterociclo ossigenato C₃, dello scheletro di carbonio C₆-C₃-C₆, è rappresentato dal pirano.

Dalla fig. 6 si può facilmente constatare che a questo gruppo di sostanze fenoliche appartengono le catechine e le proantocianidine o leucoantocianidine o anche leucoantociani.

Sebbene di struttura chimica molto simile, le catechine infatti corrispondono a 5, 7, 3', 4' tetraidrossiflavan-3-olo ed i leucoantociani a 5, 7, 3', 4' tetraidrossiflavan-3-4-diolo, presentano delle proprietà molto diverse. Infatti, i leucoantociani possono trasformarsi in cianidine di colore rosse, quando vengono trattate a caldo con soluzioni di acidi minerali (fig. 12), mentre le catechine trattate nello stesso

modo si polimerizzano formando dei prodotti di colore rosso-bruno insolubili, noti come flobafeni. Le molecole delle catechine e dei leucoantociani sono molto reattive ed hanno la tendenza ad unirsi le une con le altre per formare dei polimeri e degli aggregati più o meno importanti.

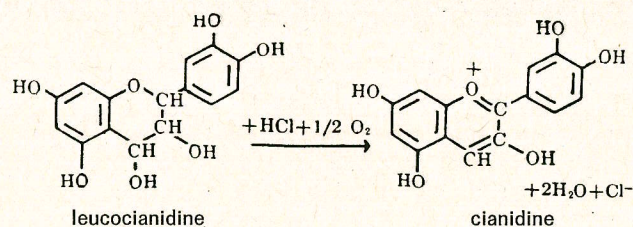


Fig. 12.

I tannini dell'uva e del vino sono appunto dei prodotti ottenuti dalla polimerizzazione per condensazione di molecole elementari dei flavani, come i leucoantociani e le catechine. Per questo, i tannini dell'uva e del vino sono chiamati anche flavolani. Secondo Ribereau-Gayon (1968) o Swain (1952), il loro peso molecolare è compreso approssimativamente tra 600 e 3.000.

I tannini dell'uva e del vino sono sostanze molto importanti dal punto di vista enologico, in quanto contribuiscono in larga misura al colore ed alle caratteristiche organolettiche dei vini rossi.

La natura ed il grado di polimerizzazione hanno una grande importanza per le proprietà dei tannini.

I meccanismi di reazione, sia chimica che enzimatica, che intervengono in queste polimerizzazioni, sono ancora poco noti.

Sono state avanzate molte ipotesi sul modo come avvengono le condensazioni, ma nessuna è stata dimostrata totalmente:

— Drewes e Ilsley (1969) sostengono che la polimerizzazione avvenga tramite un legame del tipo *eterossido* fra due molecole di leucoantociani;

— Lontie, Vancraenenbroeck, Rollmann (1966),

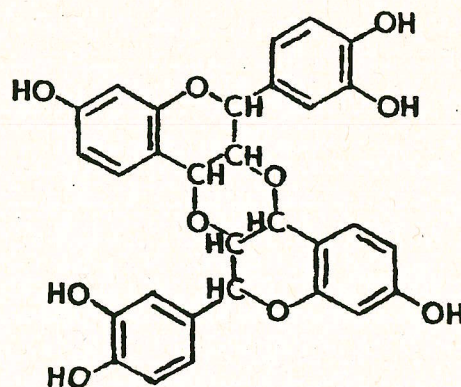


Fig. 13 — Legame eterossido tra due molecole di leucocianidine secondo Drewes e Ilsley (1969).