

RISOLUZIONE OIV-OENO 675A-2022

MONOGRAFIE SPECIFICHE SULLE PROCIANIDINE/PRODELFINIDINE

L'ASSEMBLEA GENERALE,

VISTO l'articolo 2, paragrafo 2 iv dell'Accordo del 3 aprile 2001 che istituisce l'Organizzazione internazionale della vigna e del vino,

CONSIDERATI i lavori del Gruppo di esperti "Specificazione dei prodotti enologici",

CONSIDERATO la risoluzione OIV-OENO 624-2022 "Aggiornamento della monografia sui tannini enologici" che descrive una monografia generale,

CONSIDERATA la necessità di creare monografie specifiche per ogni famiglia di tannini,

DECIDE, su proposta della Commissione II "Enologia", di aggiungere la monografia COEI-1-PROCYA al *Codex enologico internazionale*:

TANNINI ENOLOGICI

Monografia specifica sui tannini enologici contenenti procianidine/prodelfinidine

Le procianidine/prodelfinidine sono una sottoclasse di tannini condensati (anche detti proantocianidinici). Appartengono a questa sottoclasse i tannini estratti da uva, bucce e vinaccioli di *Vitis vinifera*.

1. Metodo per la determinazione dell'appartenenza alle sottoclassi

1.1. Caratterizzazione mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

1.1.1. Principio

Questo metodo permette di verificare la presenza di componenti caratteristici dei tannini condensati della sottoclasse delle procianidine/prodelfinidine e di misurarne la concentrazione totale. Si applica a preparati a base di tannini enologici dichiarati puri e che non contengono dunque tannini di piccola massa molecolare di famiglie o

sottoclassi diverse.

1.1.2. Reagenti, strumenti e apparecchiatura

1.1.2.1. Reagenti

(+)-catechina (N. CAS 154-23-4)

Acqua ultrafiltrata (resistività: 18,3 MΩ·cm)

Acqua (grado HPLC)

Metanolo (grado HPLC)

Acido formico (grado HPLC)

1.1.2.2. Strumenti

Matraccio in vetro borosilicato da 100 mL

Filtri in cellulosa con pori del diametro di 0,45 µm

Siringa in plastica da 1 mL

1.1.2.3. Apparecchiatura

Bilance tecniche con risoluzione di 0,01 g

Bilancia analitica con risoluzione di 0,1 mg

Vetreteria volumetrica di classe A

Sistema cromatografico con rilevamento mediante spettrometria di massa composto da:

- pompa a gradiente binaria o quaternaria,
- iniettore con loop da 10 µL,
- rivelatore spettrofotometrico a lunghezza d'onda fissa di 280 nm,
- colonna Eclipse Plus C 18 (ad esempio): 2,1×100 mm, granulometria 1,8 µm
- sorgente di ionizzazione ESI-SIM (Electro Spray Ionisation-Single Ion Monitoring),
- rivelatore spettrometrico di massa: analizzatore a quadrupolo time-of-flight (Q-TOF).

1.1.3. Preparazione di campioni e standard

Campioni: pesare circa 0,5 g di tannini enologici sulla bilancia analitica e annotarne il peso. Disciogliere i tannini enologici in 100 mL di acqua ultrafiltrata in un matraccio in vetro borosilicato da 100 mL e miscelare bene.

Preparazione delle soluzioni standard: preparare una soluzione di 10 mg di (+)-catechina in 50 mL di acqua ultrafiltrata corrispondente a una concentrazione di 200 mg/L. Diluire in acqua ultrafiltrata fino a ottenere concentrazioni di 5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L.

Solvente A: acqua (grado HPLC) contenente 0,1% di acido formico.

Solvente B: metanolo contenente 0,1% di acido formico.

1.1.4. Procedimento

Filtrare la soluzione del campione e le soluzioni standard con filtri da 0,45 µm (diametro dei pori) e analizzarle mediante cromatografia nelle seguenti condizioni:

Volume iniettato: 10 µL della soluzione del campione o soluzione standard di (+)-catechina

Rivelazione a 280 nm

Composizione del gradiente di eluizione: (tempo, % di solvente A)

0 min, 99,0%; 0,5 min, 94,0%; 20 min, 50,0%; 25 min, 0,0%; 32 min, 94,0% e 10 min per l'equilibrio

Velocità del flusso: 0,3 mL/min

Quantificazione e rilevamento dei componenti caratteristici dei tannini condensati del sottogruppo (sottoclasse) delle procianidine/prodelfinidine [(+)-catechina, (-)-epicatechina, (+)-gallocatechina, epigallocatechina, (-)-epicatechina-3-*O*-gallato, (-)-epigallocatechina-3-*O*-gallato, dimeri B1, B2, B3 e B4, B2-3-*O*-gallato, trimeri] mediante scansione ESI-SIM e rilevamento Q-TOF (ad esempio).

Tabella 1: Esempi di formule chimiche e masse di diverse procianidine/prodelfinidine

Composto	Formula chimica	m/z
(+)-catechina	$C_{15}H_{14}O_6$	290,1
(-)-epicatechina	$C_{15}H_{14}O_6$	290,1
(-)-epicatechina-3- <i>O</i> -gallato	$C_{22}H_{18}O_{10}$	442,1
Dimero B1	$C_{50}H_{26}O_{12}$	578,1

Dimero B2	$C_{50}H_{26}O_{12}$	578,1
Dimero B3	$C_{50}H_{26}O_{12}$	578,1
Dimero B4	$C_{50}H_{26}O_{12}$	578,1
B2-3-O-gallato	$C_{37}H_{30}O_{16}$	730,1
Trimeri	$C_{45}H_{38}O_{18}$	866,2

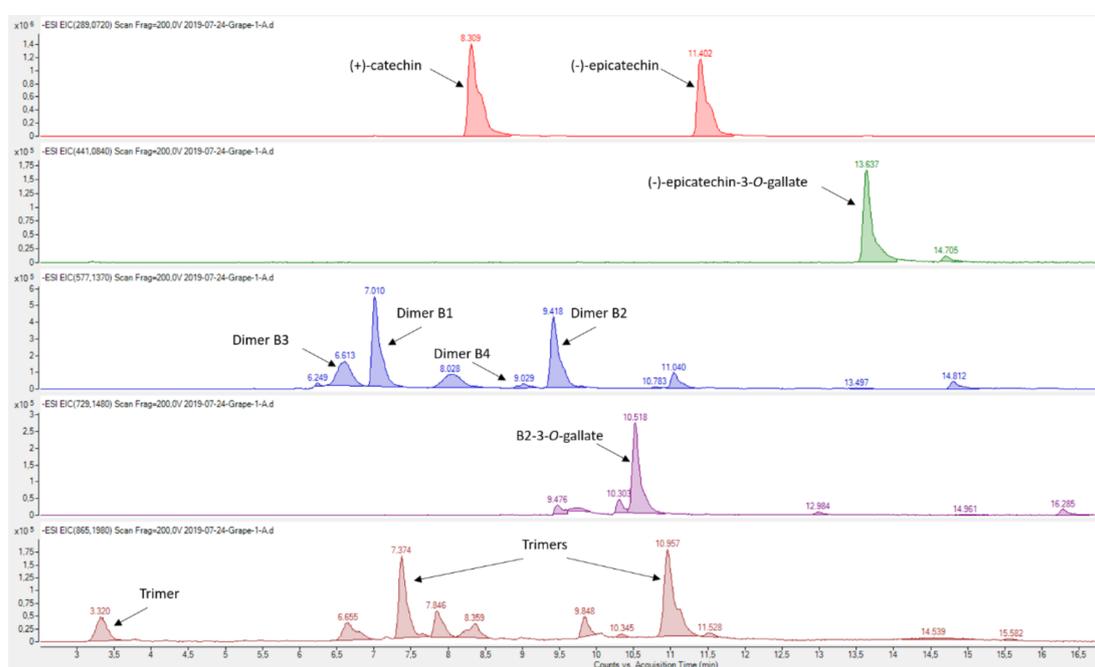


Figura 1: Esempio di scansione ESI-SIM delle procianidine/prodelfinidine

1.2. Conclusione

Un tannino enologico si considera appartenente alle procianidine/prodelfinidine quando:

- il suo contenuto polifenolico totale è superiore al 65% (metodo gravimetrico dell'allegato 1 della monografia generale OIV-OENO 624-2022),

- il suo contenuto di procianidine/prodelfinidine, misurato mediante il metodo HPLC, è superiore a 120 mg equivalenti di (+)-catechina per grammo di tannini enologici.

2. Metodi di misurazione delle proprietà e funzionalità

I metodi e i criteri di conformità indicati di seguito sono applicabili solo quando la proprietà/funzione è dichiarata sul preparato di tannini.

2.1. Capacità antiossidante

2.1.1. Principio

Determinazione della capacità delle procianidine/prodelfinidine volta a contribuire alla protezione di mosti e vini dall'ossidazione.

2.1.2. Prodotti

2.1.2.1. Capacità antiossidante

DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazile): PM = 394,32

Trolox (acido 6-idrossi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carbossilico): PM = 250,29

Metanolo (99,9% vol.)

Lettore per micropiastre 96-well (FLUOstar Omega - BMG Labtech, ad esempio)

2.1.2.2. Consumo diretto di ossigeno (OCR)

Etanolo (96% vol.) (N. CAS 64-17-5)

Acido tartarico: PM = 150,09 (N. CAS 87-69-4)

Cloruro di Ferro (III) esaidrato: PM = 270,30 (N. CAS 7705-08-0)

Solfato di Rame (II) pentaidrato: PM = 249,68 (N. CAS 7758-98-7)

Bottiglie in vetro trasparente dotate di sensori con una capacità di 0,75 L

Ossimetro NomaSens (ad esempio)

2.1.3. Procedimento

2.1.3.1. Capacità antiossidante (test DPPH)

Soluzione di tannini enologici 0,15 g/L: disciogliere 37,5 mg di tannini enologici in 500 mL di soluzione di vino modello (acqua distillata, 12% vol. di etanolo, 4 g/L di acido

tartarico e pH portato a 3,5). Se il valore dell'assorbanza fosse superiore a 1, potrebbe esser necessario diluire la soluzione di tannini enologici (in tal caso includere la diluzione nel calcolo).

Soluzione di Trolox 1mM: disciogliere 125 mg di Trolox in 500 mL di soluzione di vino modello (acqua distillata, 12% vol. di etanolo, 4 g/L di acido tartarico e pH portato a 3,5).

Curva di calibrazione: disciogliere 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 mL di soluzione di Trolox 1mM in 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 0,9 mL di soluzione di vino modello. Queste quantità corrispondono rispettivamente a concentrazioni finali di 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,1 mM di Trolox.

Soluzione di DPPH 6·10⁻⁵ M: disciogliere 2,36 mg di DPPH in 100 mL di metanolo. La soluzione deve essere preparata fresca.

2.1.3.2. Consumo diretto di ossigeno (OCR)

Soluzione di tannini enologici 1 g/L: disciogliere 0,75 g di tannini enologici in 750 mL di soluzione di vino modello.

Soluzione di vino modello: disciogliere 4 g di acido tartarico, 2,25 mg di cloruro di ferro (III) esaidrato e 0,225 mg di solfato di rame (II) pentaidrato in 90 mL di etanolo e 660 mL di acqua distillata. Portare il pH a 3,5.

2.1.4. Test

2.1.4.1. Capacità antiossidante

Misurare un bianco contenente unicamente il reagente DPPH (RB) a 515 nm introducendo 190 µL di soluzione di DPPH (1.3.1) in tutti i pozzetti della piastra. Successivamente, aggiungere 10 µL di soluzione di tannini enologici (campioni), acqua distillata (bianco) o la soluzione di Trolox per la curva (standard) nei pozzetti e misurare (MS) a 515 nm dopo 30 min.

La figura 2 fornisce un esempio d'uso della piastra.

La formula da applicare per il calcolo della capacità antiossidante è la seguente:

$$1) RB - MS = x$$

$$2) \text{capacità antiossidante (mg eq. Trolox per g di tannini)} = \frac{250,29 \text{ (mg)}}{0,15 \text{ (g)}} \times \frac{x-b}{a}$$

dove *a* e *b* corrispondono rispettivamente alla pendenza e alla costante della curva di

calibrazione di Trolox: Assorbanza= f ([Trolox]) □ Assorbanza= ax + b

In ogni caso, le procianidine/prodelfinidine devono presentare una capacità antiossidante e nello specifico devono contenere più di 500 ± 50 mg equivalenti di Trolox per grammo di tannini (estratto commerciale).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	T 0.1	T 0.1	T 0.2	T 0.2	T 0.4	T 0.4	T 0.6	T 0.6	T 0.8	T 0.8	T 1	T 1
B	T 0.1	T 0.1	T 0.2	T 0.2	T 0.4	T 0.4	T 0.6	T 0.6	T 0.8	T 0.8	T 1	T 1
C	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
D	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
E	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
F	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
G	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11
H	Blank	OT 1	OT 2	OT 3	OT 4	OT 5	OT 6	OT 7	OT 8	OT 9	OT 10	OT 11

T = Trolox

OT = Oenological Tannins

Figura 2: Esempio di una piastra 96-well

2.1.4.2. Consumo diretto di ossigeno (OCR)

Saturare la soluzione di vino modello con 8 mg/L di ossigeno facendo gorgogliare l'aria per 10 min a 20-25 °C. Successivamente, aggiungere i tannini enologici alla soluzione di vino modello nelle bottiglie riempite fino a 0,75 L. Sigillare ermeticamente le bottiglie e agitare fino a completa omogeneizzazione.

1. Misurare l'ossigeno consumato ogni due giorni cominciando 1 h dopo il riempimento delle bottiglie.
2. Per determinare il tasso di consumo di ossigeno, seguire il procedimento mostrato in **figura 2**:
 - rappresentare il consumo di ossigeno in funzione del tempo,
 - rappresentare successivamente l'inverso dell'ossigeno consumato in funzione dell'inverso del tempo,
 - il tasso di consumo di ossigeno corrisponde all'inverso del coefficiente di pendenza:
 - OCR t mg di O₂ per L consumato al giorno e per g di tannini = 1/A, dove A è il coefficiente della pendenza

In ogni caso, le procianidine/prodelfinidine devono avere la capacità di consumare direttamente l'ossigeno e nello specifico devono essere in grado di consumare almeno $0,10 \pm 0,05$ mg di O_2 al litro, al giorno e per grammo di tannini (estratto commerciale).

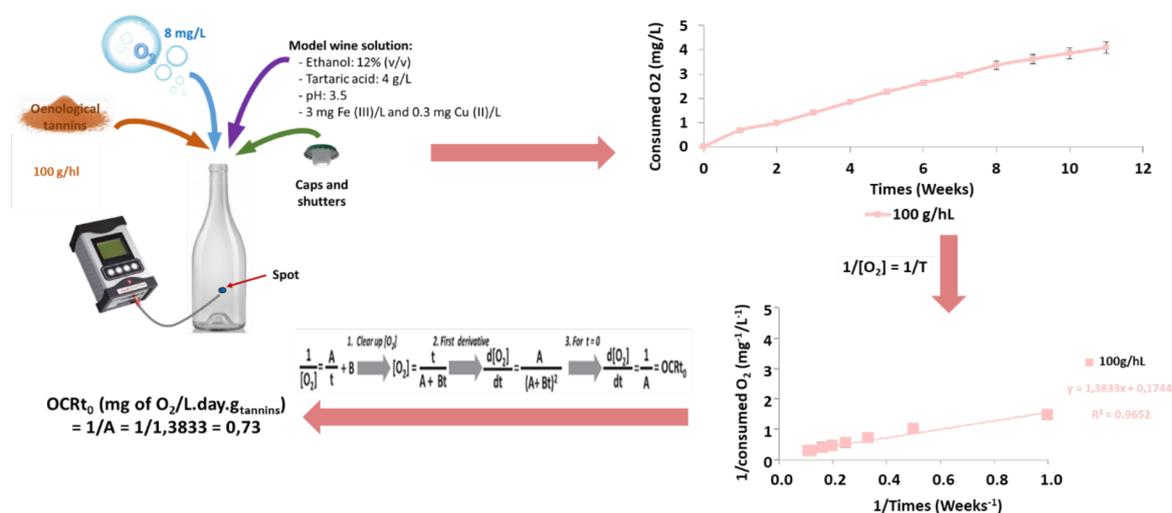


Figura 3: Procedimento per determinare il tasso di consumo di ossigeno

2.1.4.3. Capacità antiossidasica

2.1.4.3.1. Principio

Determinazione della capacità antiossidasica delle procianidine/prodelfinidine volta a contribuire alla protezione antiossidasica dei composti dei mosti e dei vini dall'attività laccasica.

2.1.4.3.2. Prodotti

Etanolo (96% vol.) (N. CAS 64-17-5)

Acido tartarico: PM = 150,09 (N. CAS 87-69-4)

Acetato di sodio: PM = 82,03 (N. CAS 6131-90-4)

Siringaldazina (4-idrossi-3,5-dimetossibenzaldeide azina): PM = 360,36 (N. CAS 14414-32-5)

Polivinilpolipirrolidone (PVPP) (N. CAS 25249-54-1)

Mosto bottrizzato con attività laccasica

Acqua distillata (grado HPLC)

2.1.4.3.3. Procedimento

Soluzione di tannini enologici 2 g/L: disciogliere 200 mg di tannini enologici in 100 mL di soluzione di vino modello (acqua distillata, 12% vol. di etanolo, 4 g/L di acido tartarico e pH portato a 3,5).

Soluzione tampone 8,2 g/L: disciogliere 410 mg di acetato di sodio in 50 mL di acqua distillata.

Soluzione di siringaldazina 0,06 g/L: disciogliere 30 mg di siringaldazina in 500 mL di etanolo.

2.1.4.4. Test

1. Aggiungere 4 mL di mosto botritizzato a 1 mL di soluzione di tannini enologici in una provetta che corrisponderà al campione.
2. Aggiungere 4 mL di mosto botritizzato a 1 mL di soluzione di vino modello in una provetta che corrisponderà al controllo.
3. Dopo 4 minuti (esatti), aggiungere 0,8 g di PVPP in entrambe le provette (campione e controllo), agitare e centrifugare per 10 min a 8500 rpm.
4. Prelevare 1 mL del surnatante (del campione e del controllo), e introdurlo in 1,4 mL di soluzione tampone e 0,6 mL di soluzione di siringaldazina. Introdurre la miscela in una cuvetta di plastica per spettrofotometro (lunghezza cammino ottico 10 mm).
5. Misurare l'assorbanza a 530 nm una volta al minuto per 5 minuti (incluse le misurazioni al tempo 0).
6. Successivamente determinare l'attività laccasica e l'attività laccasica residua utilizzando le seguenti equazioni e la **figura 3**:

$$\text{Attività laccasica} = 46,15 \times \Delta A \mu\text{mol L}^{-1}\text{min}^{-1} = 46,15 \times \Delta A \text{ UL}$$

$$\% \text{ di attività residua} = (\text{attività laccasica}_{\text{campione}} / \text{attività laccasica}_{\text{controllo}}) \times 100$$

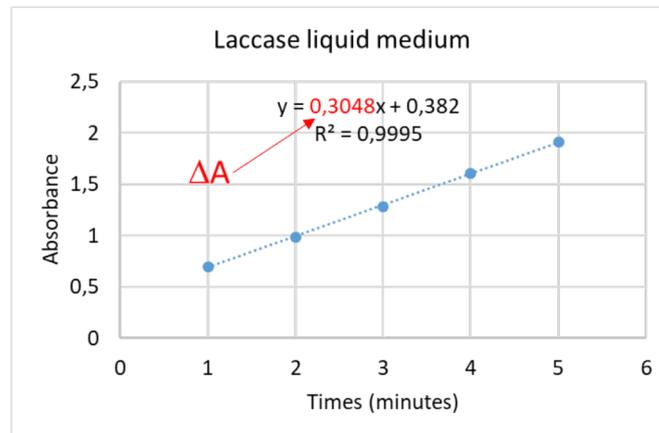


Figura 4: Esempio della determinazione di ΔA

In ogni caso le procianidine/prodelfinidine devono presentare una capacità antiossidasica e nello specifico devono essere in grado di ridurre l'attività laccasica residua almeno del 50%. Questo valore è valido per mosti e vini contenenti meno di 5 UL (unità laccasi).

2.1.5. Stabilizzazione del colore

2.1.5.1. Principio

Determinazione della capacità delle procianidine/prodelfinidine di stabilizzare il colore volta a promuovere l'espressione, la stabilizzazione e la preservazione del colore di mosti e vini rossi.

2.1.5.2. Prodotti

Etanolo (96% vol.) (N. CAS 64-17-5)

Acido tartarico: PM = 150,09 (N. CAS 87-69-4)

Malvidina-3-O-glucoside: PM = 528,87 (N. CAS 18470-06-9)

2.1.5.3. Procedimento

Soluzione di tannini enologici 0,8 g/L: disciogliere 80 mg di tannini enologici in 100 mL di soluzione di vino modello (acqua distillata, 12% vol. di etanolo, 4 g/L di acido tartarico e pH portato a 3,5).

Soluzione di malvidina-3-O-glucoside 0,1 g/L: disciogliere 10 mg di malvidina-3-O-glucoside in 100 mL di soluzione di vino modello (acqua distillata, 12% vol. di etanolo, 4

g/L di acido tartarico e pH portato a 3,5).

2.1.5.4. Test

1. Introdurre 0,75 mL di soluzione di tannini enologici e 0,75 mL di soluzione di vino modello in una provetta conica con tappo da 2 mL (di seguito: provetta) e conservarla al buio e a temperatura ambiente. Questa provetta verrà denominata "T0".
2. Introdurre 0,75 mL di soluzione di malvidina-3-O-glucoside e 0,75 mL di soluzione di vino modello in una provetta, e conservarla al buio e a temperatura ambiente. Questa provetta verrà denominata "M".
3. Introdurre 0,75 mL di soluzione di tannini enologici e 0,75 mL di soluzione di malvidina-3-O-glucoside in una provetta, e conservarla al buio e a temperatura ambiente. Questa provetta verrà denominata "TM".
4. Dopo 7 giorni, misurare l'assorbanza a 450, 520, 570 e 630 nm delle tre provette (T_M , T_0 e M).
5. Sottrarre i valori dell'assorbanza di T_0 a T_M per ottenere l'assorbanza tenendo conto dell'assorbanza dei tannini enologici utilizzati.

$$A(T_M) - A(T_0) = A(T)$$

6. Successivamente, determinare le coordinate CIELAB (L^* , a^* e b^*) corrispondenti alla soluzione di tannini con malvidina-3-O-glucoside (T) e la soluzione di malvidina-3-O-glucoside (M) con il software gratuito MSCV (<https://www.unirioja.es/color/descargas.shtml>) o un software equivalente.

Le formule da applicare per il calcolo dell'indice di copigmentazione sono le seguenti:

$$1) \Delta E_{ab.TS} = \sqrt{(L^*_T - L^*_W)^2 + (a^*_T - a^*_W)^2 + (b^*_T - b^*_W)^2}$$

$$2) \Delta E_{ab.CS} = \sqrt{(L^*_M - L^*_W)^2 + (a^*_M - a^*_W)^2 + (b^*_M - b^*_W)^2}$$

$$3) \text{ Copigmentation Index (\%)} = 100 \times \frac{\Delta E_{ab,TS} - \Delta E_{ab,CS}}{\Delta E_{ab,CS}}$$

$\Delta E_{ab,TS}$: differenza totale di colore tra la soluzione di malvidina-3-*O*-glucoside contenente tannini commerciali (T) e una soluzione di colore bianco puro (W).

$\Delta E_{ab,CS}$: differenza totale di colore tra la soluzione di malvidina-3-*O*-glucoside (M) e una soluzione pura di colore bianco (W).

Le coordinate CIELAB di una soluzione di colore bianco puro sono $L^* = 100,00$, $a^* = 0,00$ e $b^* = 0,00$.

In ogni caso, le procianidine/prodelfinidine devono essere in grado di stabilizzare il colore e nello specifico devono presentare un indice di copigmentazione superiore al $7,0 \pm 2,0$ % dopo 7 giorni.

Nota: Il dosaggio può essere eseguito con metodi alternativi a tutti quelli descritti sopra purché siano stati sottoposti a validazione interna.

3. Bibliografia

1. Sarneckis, C. J., Dambergs, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J., Smith, P. A., "Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis", *Australian Journal of Grape Wine Research*, 2006, vol. 12, pagg. 39-49.
2. Vignault, A., González-Centeno, M. R., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Iturmendi, N., Canals, J. M., Zamora, F., Teissedre, P. L., "Chemical characterization, antioxidant properties and oxygen consumption rate of 36 commercial oenological tannins in a model wine solution", *Food Chemistry*, 2018, vol. 268, pagg. 210-219.
3. Vignault, A., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Fermaud, M., Roudet, J., Canals, J. M., Teissedre, P. L., Zamora, F., "Impact of enological tannins on laccase activity", *OENO One*, 2019, vol. 53, pagg. 27-38.
4. Vignault, A., Pascual, O., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Teissedre, P. L., Zamora, F., "Recent advances of the OIV working group on oenological tannins in the study of the functionalities of oenological", *BIO Web of Conferences*, 2019, vol. 15, 02015.
5. Vignault, A., Gombau, J., Pascual, O., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Zamora,

- F., Teissedre, P. L., “Copigmentation of Malvidin-3-O-Monoglucoside by Oenological Tannins: Incidence on Wine Model Color in Function of Botanical Origin, pH and Ethanol Content”, *Molecules*, 2019, vol. 24, pagg. 1-15.
6. Vignault, A., Gombau, J., Jourdes, M., Moine, V., Canals, J. M., Fermaud, M., Roudet, J., Zamora, F., Teissedre, P. L., “Oenological tannins to prevent Botrytis cinerea damage in grapes and musts: kinetics and electrophoresis characterization of laccase”, *Food Chemistry*, 2020, vol. 316, 126334.
7. Vignault, A., *Tanins œnologiques : caractéristiques, propriétés et fonctionnalités. Impact sur la qualité des vins*, tesi di dottorato dell’Università di Bordeaux e dell’Università Rovira i Virgili, 2019.