

Il destino della SO₂ nei vini

Nuove indagini gettano luce sulle sue reazioni

Panagiotis Arapitsas ⁽¹⁾, Graziano Guella ^(2,3), Fulvio Mattivi ^(1,2)

⁽¹⁾ Department of Food Quality and Nutrition, Fondazione Edmund Mach (FEM), San Michele all'Adige

⁽²⁾ Centre for Agriculture, Food and the Environment, University of Trento, San Michele all'Adige

⁽³⁾ Bioorganic Chemistry Laboratory, Department of Physics, University of Trento, Trento

Una serie di lavori di gruppi di ricerca italiani sta aprendo la porta ad una migliore comprensione delle reazioni che avvengono durante l'affinamento dei vini, offrendo una nuova prospettiva per un uso più mirato della SO₂ in vinificazione.

La reazione di solfonazione potrebbe essere una buona notizia per gli amanti del vino!

La reazione di solfonazione

La solfonazione, ovvero l'aggiunta del gruppo funzionale solfonico (-SO₃H) a un composto organico, è un processo utilizzato nella sintesi industriale di diversi prodotti, tra cui coloranti, pigmenti, farmaci, tensioattivi, pesticidi e intermedi organici.

Inoltre, la solfonazione modula le attività biologiche di una vasta gamma di sostanze chimiche, come farmaci, sostanze tossiche, ormoni e neurotrasmettitori.

Cosa hanno in comune i composti solfonati? Molti acidi solfonici sono isolati, immagazzinati e commercialmente

disponibili per una semplice ragione: *sono stabili!*

Il messaggio importante di questo studio è che le forme libere dei solfiti (solfito, bisolfito e anidride solforosa) sono in larga misura convertite durante l'affinamento del vino in molteplici composti organici solfonati stabili, che vanno a modificare la composizione dei vini.

Nei vini invecchiati (come Amarone, Sagrantino e Brunello di Montalcino, considerati in questo studio), nei vini affinati lungamente in bottiglia (come gli spumanti Trentodoc riserva), e più in generale nei vini fini d'annata che sono consumati dopo un lungo affinamento, una importante frazione dei solfiti utilizzati nella vinificazione viene convertita in derivati solfonati.

Ne consegue che le persone "sensibili" ai solfiti potrebbero meglio tollerare questo tipo di vini.

Va però ricordato che l'emivita dei solfiti nell'uomo è di circa 15 minuti e pertanto i sintomi della "sensibilizzazione" alla solforosa dovrebbero eventualmente comparire in questo lasso di tempo.

Se si tratta di sintomi che insorgono dopo diverse ore da una abbondante bevuta, i solfiti non hanno colpe!

La metabolomica per lo studio dei solfiti

I solfiti sono un gruppo di additivi alimentari ampiamente presenti nella nostra dieta.

L'esposizione a queste sostanze è ancora motivo di preoccupazione: l'elenco degli alimenti e delle bevande che li contengono è infatti così

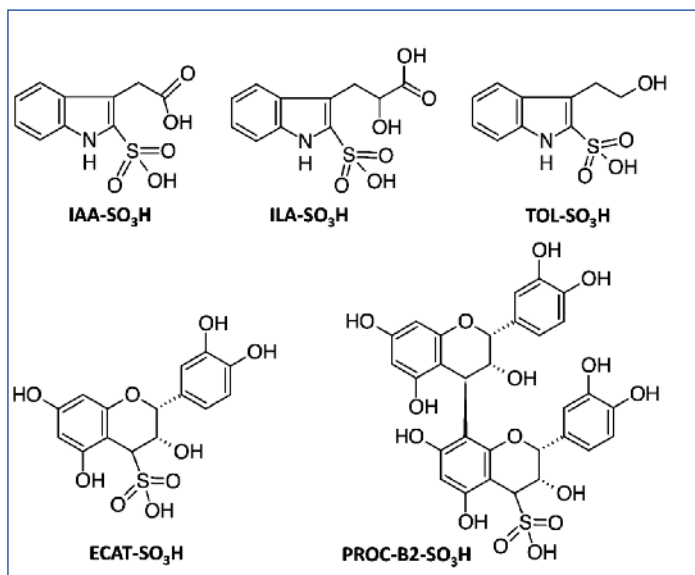


Figura 1 - Strutture dei composti dell'epicatechina solfonata (ECAT-SO₃H), procianidina tipo B₂ (PROC-B2-SO₃H), triptofolo solfonato (TOL-SO₃H), acido indol-lattico solfonato (ILA-SO₃H) ed acido indol-acetico solfonato (IAA-SO₃H).

lungo da poter superare la lunghezza di questo articolo.

L'attenzione alla loro presenza nei vini è dovuta al fatto che, insieme ai preparati a base di carne, i vini sono considerati una delle fonti più significative dell'esposizione a solfiti della popolazione adulta ed anziana [1].

L'anidride solforosa (SO₂) è l'additivo di più difficile eliminazione nella produzione dei vini. Grazie alle sue molteplici azioni antiossidanti, antimicrobiche e di inibizione enzimatica, questo composto contribuisce a proteggere i vini da varie indesiderate reazioni e contaminazioni, e viene ancora oggi considerato dagli enologi un correttivo indispensabile [2].

Anidride solforosa e solfiti sono considerati allergenici [3], e sono normati da limiti legali. Per quanto riguarda l'OIV, i limiti massimi consentiti sono fra 150 e 210 mg/L per i vini secchi, mentre per alcuni casi eccezionali i limiti possono arrivare ai 400 mg/L [4].

Anche se la SO₂ è fra i più contestati additivi chimici utilizzati in enologia, tanto che è piuttosto diffuso lo sforzo dei produttori a contenerne l'uso ben al di sotto dei limiti

| Vini | Vendemmie | Origine | Campioni |
|---------------------------------|-----------|----------|----------|
| Chardonnay | 2015 | Trentino | 34 |
| Pinot grigio | 2015 | Trentino | 31 |
| Verdicchio dei Castelli di Jesi | 2002-2016 | Marche | 24 |
| Trentodoc | 2004-2010 | Trentino | 28 |
| Sagrantino di Montefalco | 2004-2006 | Umbria | 16 |
| Brunello di Montalcino | 2004-2006 | Toscana | 12 |
| Amarone di Valpolicella | 1986-2011 | Veneto | 9 |

Tabella 1 - Vini commerciali usati nello studio.

consentiti, fino ad oggi non si sono trovate alternative altrettanto efficaci da permetterne la sostituzione. Inoltre, la sua presenza nei vini è inevitabile dato che una parte viene prodotta nei processi fermentativi. Una limitazione importante è data dal fatto che il dosaggio della solforosa è ad oggi ancora largamente empirico, e sconta il fatto che partite diverse di vino consumano quantità significativamente differenti, per motivi finora quanto misteriosi.

Una serie di lavori recenti sta aiutando a colmare queste lacune.

Due nostri recenti studi basati su un approccio di "metabolomica non mirata" hanno cercato di dare una risposta a questa problematica.

Temperatura di conservazione dei vini rossi

Il primo studio [5], ha valutato le implicazioni chimiche della temperatura di conservazione dei vini rossi.

Seguendo per due anni la cinetica di evoluzione di vini Sangiovese invecchiati con due diverse condizioni di conservazione, ottimale (cantina) rispetto a conservazione domestica, è stato possibile evidenziare per la prima volta una via di reazione, dipendente dalla temperatura, di addizione del bisolfito a catechine e proantocianidine, che porta alla formazione di diversi flavanoli solfonati.

Questa reazione è stata poi riprodotta su piccola scala in laboratorio, permettendo di scoprire la presenza di ben definiti flavanoli solfonati del vino: sono composti idrofili con maggiore solubilità rispetto ai flavanoli liberi, come l'epicatechina (ECAT) e la procianidina tipo B₂ (PROC-B₂). La loro formazione avviene anche attraverso la scissione di oligomeri più grandi, i tannini. In particolare, abbiamo dimostrato che questo processo di solfonazione porta, con

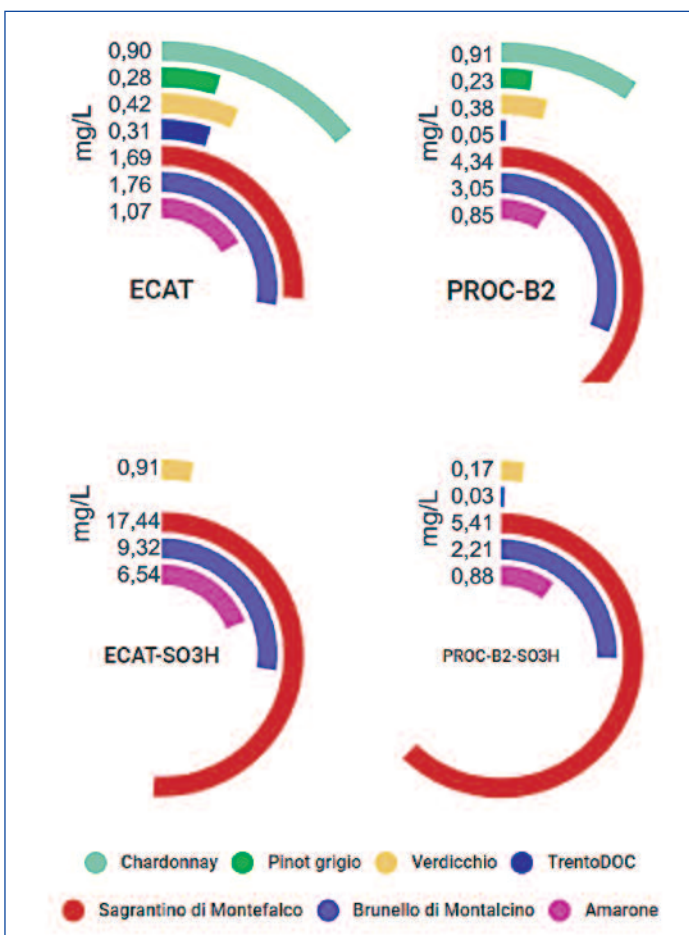


Figura 2 - Grafico di comparazione delle concentrazioni medie di ECAT e PROC-B₂ e dei loro solfonati (ECAT-SO₃H e PROC-B₂-SO₃H) misurate in sette vini italiani.

ottime rese e con richieste regio- e stereochimiche molto stringenti, alla addizione del gruppo solfonico in posizione 4 e stereochimica relativa β , sia della epicatechina (prodotto finale epicatechina 4 β -solfonato, ECAT-SO₃H) che della procianidina B₂ (prodotto finale procianidina B₂ 4 β -solfonato, PROC-B₂-SO₃H) [6], Figura 1. Questi composti sono stati strutturalmente caratterizzati sia con misure NMR avanzate che con tecniche tandem MS.

Il destino dei solfiti nei vini bianchi

Il secondo studio [7] si è concentrato invece sul destino dei solfiti nei vini bianchi. Scoprendo, anche in questo caso tramite analisi "metabolomica non mirata", la veloce formazione nel vino di vari composti solfonati; in particolare, abbiamo caratterizzato la presenza di derivati S-solfonati di cisteina, glutatione e pantothenina, di derivati solfonati del triptofolo e dell'acido indol-3-lattico glucoside. Abbiamo qui anche dimostrato che il consumo di SO₂ risulta favorito dalla presenza di livelli più elevati di ossigeno nell'imbottigliamento [8].

Aver focalizzato la nostra attenzione su queste problematiche ci ha anche in qualche modo imposto di riuscire a dare una risposta scientifica robusta ad almeno altre due questioni: a) quali sono le concentrazioni di questi composti solfonati nei vini? b) quali sono gli altri fattori che favoriscono la formazione di questi prodotti naturali solfonati?

Con lo scopo di rispondere a queste domande è nato un nuovo progetto, diviso in tre moduli: a) sintesi chimica dei composti solfonati identificati che non sono disponibili come standard commerciali; b) sviluppo di un metodo LC-MS per la quantificazione di questi prodotti nel vino; c) estensione dell'analisi ad un grande numero di vini, per cercare di comprendere fino a che punto le informazioni sulla loro presenza ed importanza potevano essere generalizzate.

Vini analizzati e metodi utilizzati

La Tabella 1 riporta i dati dei 154 vini commerciali italiani usati nello studio.

I vini fermi bianchi provenivano da Trentino (Chardonnay e Pinot grigio) e Marche (Verdicchio dei Castelli di Jesi), mentre i vini fermi rossi da Umbria (Sagrantino di Montefalco), Toscana (Brunello di Montalcino) e Veneto (Amarone della Valpolicella). Gli spumanti erano tutti Trentodoc, di varietà Chardonnay o/e Pinot nero, ed includevano spumanti Riserva e Rosé.

Per la quantificazione dei composti è stato sviluppato e validato un metodo UHPLC-MS/MS usando un cromatografo liquido accoppiato con

spettrometro di massa a triplo quadrupolo XEVO (Waters), utilizzando come fase stazionaria una colonna a fase inversa (HSST3, Waters). Nelle nostre mani, questo metodo è in grado di quantificare 32 composti, analizzando un campione ogni 15 minuti.

I composti solfonati ECAT-SO₃H, PROC-B₂-SO₃H, ILA-SO₃H (acido indol-lattico solfonato), IAA-SO₃H (acido 3-indol-acetico solfonato) e TOL-SO₃H (triptofolo solfonato) sono stati da noi sintetizzati e la loro struttura è stata confermata tramite analisi NMR (Figura 1).

Maggiori dettagli sui vini analizzati e sulla metodologia analitica si trovano in una nostra recentissima pubblicazione [9].

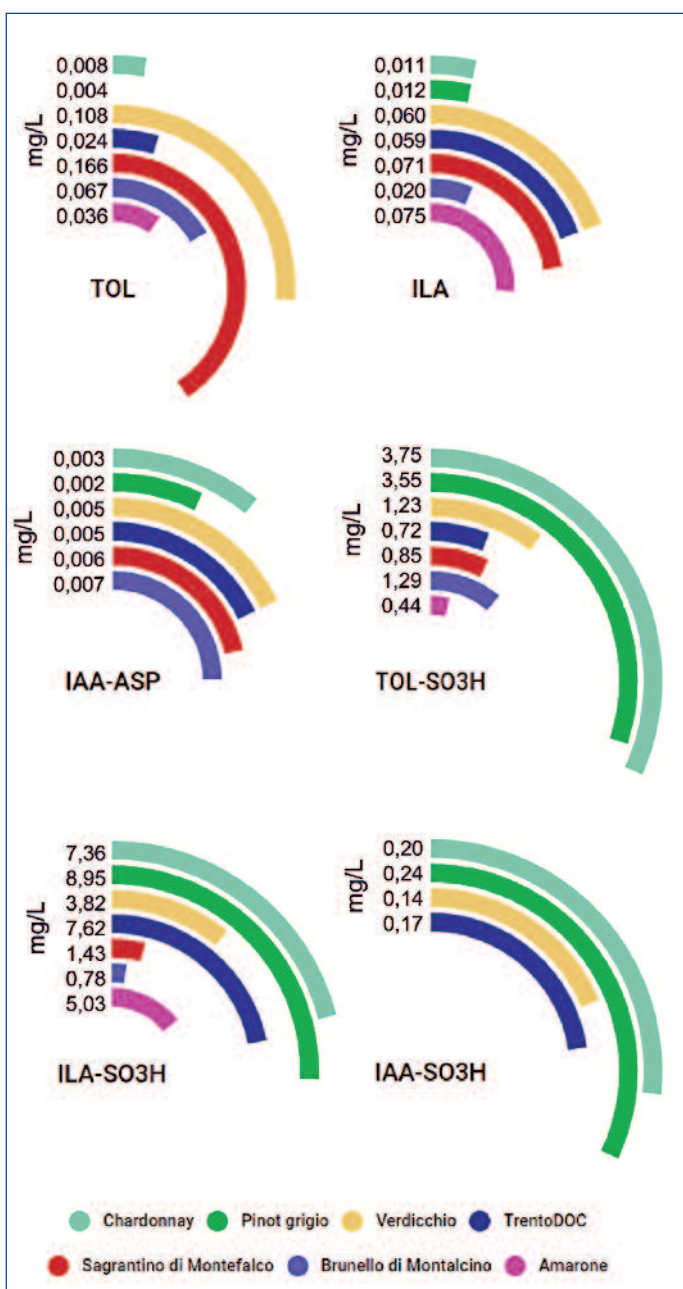


Figura 3 - Grafico di comparazione delle concentrazioni medie di TOL, ILA e IAA e dei loro solfonati (TOL-SO₃H, ILA-SO₃H e IAA-SO₃H) misurate in sette vini italiani.

Risultati

Le Tabelle 2 e 3 riportano le concentrazioni medie trovate nei 7 gruppi di 154 vini analizzati, ed offre una visione generale sulla concentrazione che questi composti assumono in alcuni vini italiani. Il campionamento dei vini commerciali, anche se limitato a 7 categorie, includeva vini bianchi e rossi, spumanti e fermi, giovani e invecchiati, di basso e alto prezzo, dal nord e sud Italia. Alcuni dei campioni rappresentano dei vini importanti e riconosciuti a livello internazionale.

Le Figure 2 e 3 visualizzano i dati delle Tabelle. Come si può notare i vini rossi non solo sono più ricchi in monomeri e dimeri di flavanoli ma contengono anche quantità superiori dei loro corrispondenti prodotti solfonati.

La concentrazione massima sia di ECAT-SO₃H che di PROC-B₂-SO₃H è stata osservata per i vini Sagrantino di Montefalco, con valori medi 17,4 e 5,4 mg/L (Figura 2 e Tabella 2). Per questo gruppo di composti solfonati (flavanoli solfonati) bisogna fare due osservazioni: a) le concentrazioni dei solfonati sono state trovate superiori ai loro corrispondenti composti liberi; b) il rapporto flavanoli solfonati/flavanoli non-solfonati è molto più favorito per i vini rossi. Peraltro, non era così inatteso, considerato il loro maggior contenuto in polifenoli, che la solfonazione fosse un processo più significativo nei vini rossi.

Invece per vini bianchi e spumanti, dove la concentrazione di polifenoli è molto più bassa (sia per differenza di vie metaboliche che di tecniche di vinificazione) è stata notata una concentrazione di indol-solfonati maggiore rispetto a quella contenuta nei vini rossi.

In questo gruppo di composti indolici solfonati, il solfonato dell'acido indol-lattico (ILA-SO₃H) è stato trovato relativamente il più abbondante, con le maggiori concentrazioni medie intorno agli 8 mg/L (8,9 mg/L per Pinot grigio, 7,6 per gli Spumanti e 7,4 mg/L per gli Chardonnay). Le più elevate concentrazioni medie per il solfonato del triptofolo (TOL-SO₃H) sono state

trovate per Chardonnay e Pinot grigio (3.7 e 3.5 mg/L). Infine, il solfonato dell'acido 3-indol-acetico (IAA-SO₃H) è stato quantificato solo nei vini bianchi e spumanti, e trovato in concentrazioni inferiori agli altri due indoli solfonati (Figura 3 - Tabelle 2 e 3). Anche in questo caso le considerazioni sono simili: a) la concentrazione dei solfonati è superiore rispetto ai corrispondenti composti liberi; b) il rapporto degli indoli solfonati/indoli non-solfonati è molto più favorito nei vini bianchi.

Che nella vinificazione di vini bianchi e rossi servano diverse dosi di SO₂ è ben noto. Anche se il pH dei vini bianchi è generalmente più basso, il contenuto in polifenoli dei vini rossi li protegge maggiormente da processi indesiderati. Combinando i risultati delle due classi di metaboliti secondari del vino (flavanoli e indoli), abbiamo dimostrato che la solforosa ha un comportamento differente fra vini bianchi e rossi.

Fino oggi si sapeva della importanza del pH (che determina la distribuzione relativa degli idrossi-acidi della SO₂), degli antociani (legano SO₂ e attività antiossidante) e di numerosi altri composti in grado di formare complessi reversibili con la solforosa (le aldeidi in particolare, etc) e dei polifenoli in generale (attività antiossidante). Questo studio sottolinea però l'importanza anche di altri fattori, in particolare evidenziando il fatto, decisamente rilevante per la chimica enologica, che la SO₂ tende ad aggiungersi ai gruppi indolici (in posizione 2) nei vini bianchi (probabilmente a causa del loro minore contenuto in polifenoli) mentre si aggiunge essenzialmente ai flavanoli (in posizione 4) nei vini rossi (essendo i metaboliti di questa classe presenti qui a concentrazioni maggiori).

Un'ultima considerazione riguarda gli aspetti cinetici di questo processo di solfonazione dei metaboliti del vino; i nostri studi hanno infatti dimostrato che la velocità di solfonazione degli indoli è molto più elevata di quella della solfonazione dei flavanoli [5-7, 9].

Il metodo analitico usato misura solo i composti solfo-

| Vino | ECAT | ECAT-SO ₃ H | PROC-B ₂ | PROC-B-SO ₃ H | ILA |
|--------------------------|------------------|------------------------|---------------------|--------------------------|------------------|
| | media (std.dev.) | media (std.dev.) | media (std.dev.) | media (std.dev.) | media (std.dev.) |
| Chardonnay | 0,90 (0,26) | n.r. | 0,91 (0,22) | n.r. | 0,011 (0,004) |
| Pinot grigio | 0,28 (0,15) | n.r. | 0,23 (0,08) | n.r. | 0,012 (0,004) |
| Verdicchio | 0,42 (0,38) | 0,91 (0,21) | 0,38 (0,34) | 0,17 (0,16) | 0,060 (0,053) |
| Trento Doc | 0,31 (0,34) | n.r. | 0,05 (0,04) | 0,03 (0,01) | 0,059 (0,042) |
| Sagrantino di Montefalco | 1,69 (0,55) | 17,44 (9,43) | 4,34 (1,12) | 5,41 (2,61) | 0,071 (0,035) |
| Brunello di Montalcino | 1,76 (0,69) | 9,32 (7,60) | 3,05 (0,88) | 2,21 (1,26) | 0,020 (0,011) |
| Amarone | 1,07 (0,86) | 6,54 (4,39) | 0,85 (0,76) | 0,88 (0,59) | 0,075 (0,073) |

Tabella 2 - Concentrazioni in mg/L dei composti studiati nei vari vini. ECAT: epicatechina; PROC-B₂: procianidina B₂; ILA: acido 3-indol-lattico; n.r. non rilevato.

nati riportati in Figura 1. Non si può escludere, anzi è del tutto probabile, la presenza nel vino di altri solfonati, sia flavanolic (monomerici o oligomerici) che indolici. Infatti, questo metodo non è in grado di rilevare la presenza attesa, ad esempio, del solfonato glucosidato dell'acido 3-indol-lattico trovato nel lavoro di metabolomica [7].

Una osservazione più dettagliata di questi risultati ha evidenziato che questi composti solfonati aumentano con il tempo e diventano componenti a concentrazione importante per l'impronta metabolica dei vini invecchiati [9].

Considerando che la solfonazione è una reazione sfruttata per disattivare l'attività biologica di alcuni composti in grado di essere riconosciuti e legarsi a proteine/enzimi [10, 11], si potrebbe pensare che la solfonazione di flavanoli ed indoli possa eventualmente modificare alcune proprietà (chimico-fisiche-biologiche) dei composti non solfonati. Per esempio, la solfonazione dei flavanoli (monomerici ed oligomerici) potrebbe cambiare il modo in cui il consumatore percepisce i tannini dei vini rossi.

Infine una considerazione importante, già richiamata in apertura, riguarda il meccanismo di potenziale tossicità dei solfiti nell'uomo. Una larga parte dei solfiti ingeriti, stimata al 70-97%, viene rapidamente assorbita nell'intestino [1]; una volta in circolo viene convertita dall'enzima solfito-ossidasi prevalentemente nel fegato e trasformata in solfati, secreti nelle urine. Una parte minore dei solfiti può invece essere ridotta dalla flora intestinale formando idrogeno solfuro (H₂S); un'altra parte ancora, specie in casi di esposizione a larghe quantità, produce per via non enzimatica derivati solfonati allo zolfo della cisteina e del glutatone, che abbiamo osservato anche nei vini.

Ebbene, riteniamo che la formazione di solfonati stabili osservati nei nostri studi dovrebbe annullare la tossicità di questa frazione legata dell'anidride solforosa. Infatti il solo studio approfondito nel topo e nel ratto della farmacocinetica di un composto alifatico solfonato,

il 3-deoxy-4-sulfohexosulose, ha evidenziato come questo (a differenza dei solfiti) possa essere considerato un metabolita inerte, che viene solo parzialmente assorbito nei biofluidi, e rapidamente eliminato per via renale [12].

Per questo, la reazione di solfonazione potrebbe essere una buona notizia per gli amanti del vino!

Bibliografia

- [1] Scientific Opinion on the re-evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite (E 228) as food additives. EFSA J. 14, (2016).
- [2] Ribereau-Gayon P. et al. "Handbook of Enology" 2 Volume Set; John Wiley, 2006.
- [3] World Health Organization "Evaluation of certain food additives." in World Health Organization technical report series 55-65 (2012).
- [4] OIV in *International Code of Oenological Practices* (2015).
- [5] Arapitsas P., Speri G., Angeli A., Perenzoni D., Mattivi F. (2014) "The influence of storage on the 'chemical age' of red wines." *Metabolomics* 10, 816-832.
- [6] Mattivi F., Arapitsas P., Perenzoni D., Guella G. (2015) "Influence of storage conditions on the composition of red wines." *ACS Symp. Ser.* 1203, 29-49.
- [7] Arapitsas P. et al. (2016) "Wine metabolomics reveals new sulfonated products in bottled white wines, promoted by small amounts of oxygen." *J. Chromatogr. A* 1429, 155-65.
- [8] Arapitsas P. et al. (2016) "Verso l'uso intelligente della solforosa." *OICCE Times* Numero 66, 23-27.
- [9] Arapitsas P., Guella G., Mattivi F. (2018) "The impact of SO₂ on wine flavanols and indoles in relation to wine style and age." *Sci. Rep.* 8, 858.
- [10] Kauffman F. C. (2004) "Sulfonation in Pharmacology and Toxicology." *Drug Metab. Rev.* 36, 823-843.
- [11] Gamage N. et al. (2006) "Human Sulfotransferases and Their Role in Chemical Metabolism." *Toxicol. Sci.* 90, 5-22.
- [12] Walker R., Mendoza-Garcia M. A., Quattrucci E., Zerilli, M. (1983) "Metabolism of 3-deoxy-4-sulphohexosulose, a reaction product of sulphite in foods, by rat and mouse." *Food Chem. Toxicol.* 21, 291-7.

| Vino | ILA-GLU* | ILA-SO ₃ H | IAA-ASP | IAA-SO ₃ H | TOL | TOL-SO ₃ H |
|--------------------------|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| | media (std.dev.) | media (std.dev.) | media (std.dev.) | media (std.dev.) | media (std.dev.) | media (std.dev.) |
| Chardonnay | 0,028 (0,005) | 7,36 (1,84) | 0,003 (0,001) | 0,20 (0,04) | 0,008 (0,005) | 3,75 (0,83) |
| Pinot grigio | 0,040 (0,009) | 8,95 (1,85) | 0,002 (0,001) | 0,24 (0,06) | 0,004 (0,003) | 3,55 (0,57) |
| Verdicchio | 0,051 (0,016) | 3,82 (2,44) | 0,005 (0,003) | 0,14 (0,04) | 0,108 (0,047) | 1,23 (0,68) |
| Trento Doc | 0,015 (0,012) | 7,62 (7,40) | 0,005 (0,001) | 0,17 (0,04) | 0,024 (0,020) | 0,72 (0,44) |
| Sagrantino di Montefalco | 0,047 (0,025) | 1,43 (0,62) | 0,006 (0,004) | n.r. | 0,166 (0,120) | 0,85 (0,27) |
| Brunello di Montalcino | 0,018 (0,009) | 0,78 (0,47) | 0,007 (0,003) | n.r. | 0,067 (0,048) | 1,29 (0,57) |
| Amarone | 0,041 (0,041) | 5,03 (1,38) | n.r. | n.r. | 0,036 (0,030) | 0,44 (0,22) |

Tabella 3 - Concentrazioni in mg/L dei composti studiati nei vari vini. ILA-GLU: glucoside dell'acido 3-indol-lattico; IAA-ASP: coniugato dell'acido 3-indol-acetico con l'acido aspartico; TOL: triptofolo; *ILA-GLU è quantificata come ILA; n.r. non rilevato.