

INDAGINI SUGLI EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON ULTRASUONI SUI PRECURSORI TIOLICI DELLE UVE

Tomás Román¹, Loris Tonidandel¹, Giorgio Nicolini¹, Roberto Larcher¹ and Emilio Celotti².

¹Fondazione Edmund Mach – Centro di Trasferimento Tecnologico, via Edmund Mach 1, San Michele all'Adige 38050. Italy.

²Department of Agricultural, Food, Environmental and Animal Sciences, University of Udine, Via Sondrio 2/A, 33100, Udine, Italy.

tomas.roman@fmach.it

Introduzione

Gli ultrasuoni (US) sono onde di natura meccanica che si propagano in un mezzo elastico e liquido e che presentano la particolarità di provocare non solo una variazione della pressione, ma anche di apportare energia nel mezzo di propagazione. Le onde generano cicli di compressione e rarefazione delle particelle del mezzo che portano alla creazione di bolle di vapore o di gas disciolto nel fluido - fenomeno noto come cavitazione - che poi collassano una volta raggiunte le dimensioni critiche. Queste caratteristiche sono ampiamente sfruttate nell'ambito delle tecnologie di trasformazione degli alimenti sia per il loro effetto meccanico che per quello chimico che deriva dalla formazione di radicali liberi all'interno delle bolle di cavitazione. L'importanza dei due effetti varia tuttavia in funzione della frequenza impiegata e, ai valori bassi (20-100 kHz) propri degli ultrasuoni di potenza, predomina l'effetto meccanico dovuto alla cavitazione di tipo instabile; più la frequenza è vicina ai 20 kHz, maggiore sarà la violenza con cui le bolle collassano. La produzione di radicali alle basse frequenze può essere rilevante ed è provocata dalla sonolisi delle molecole e dalla distruzione della struttura del solvente e del soluto.

La tecnologia ad ultrasuoni, pur a fronte di diverse applicazioni nel settore alimentare e delle bevande, in enologia non è stata ancora introdotta in modo significativo, sebbene siano molteplici gli studi di laboratorio relativi agli effetti durante alcune fasi del processo di vinificazione. Sono riportate interessanti applicazioni nell'ottimizzazione delle fasi fermentativa e post-fermentativa quali l'effetto sulla lisi del lievito (Cacciola et al., 2013, Del Fresno et al., 2018 e 2019), sull'invecchiamento accelerato (Garcia Martin e Sun, 2013; Ferraretto e Celotti, 2016) o sull'estrazione di composti presenti nelle bucce delle uve a bacca rossa (Celotti e Ferraretto 2016; El Darra *et al.*, 2013, Ferraretto et al., 2013; Morata et al., 2017). Recenti lavori sembrano anche evidenziare l'effetto positivo della sonicazione sulle reazioni di polimerizzazione dei tannini nei vini rossi, probabilmente per azioni radicaliche attivate dal trattamento (Ferraretto e Celotti, 2016). Tutte queste evidenze hanno portato recentemente all'inserimento da parte dell'OIV della tecnologia ad ultrasuoni tra le pratiche ammesse nel trattamento dell'uva pigiata per l'estrazione di composti dalle bucce (Risoluzione OIV-OENO 616-2019).

A seguito dei positivi risultati sull'estrazione dei composti dal pigiato delle uve rosse e di esperienze preliminari su uve bianche (Celotti e Ferraretto, 2016), si è voluto verificare la possibilità di sostituire la macerazione prefermentativa di uve bianche aromatiche con un breve trattamento con ultrasuoni. Questa tecnica permetterebbe da una parte di minimizzare i potenziali rischi associati alla macerazione, quali lo sviluppo di microrganismi dannosi per la

qualità del vino, e, dall'altra, di ottimizzare le risorse in termini di frigorie e di volume a disposizione durante la vendemmia (in vasca o in pressa). Le ricerche di seguito presentate sono il risultato di un approccio empirico iniziato con un prototipo industriale utilizzato per il trattamento dell'uva. I positivi risultati sensoriali ottenuti hanno spinto ad approfondire in scala di laboratorio la capacità estrattiva e l'effetto degli ultrasuoni sulle molecole precursori dei tioli varietali.

Materiali e metodi

Prove di cantina con prototipo industriale

Le esperienze sono state condotte su Sauvignon Blanc in due cantine appartenenti rispettivamente alle denominazioni di origine Collio (Friuli Venezia Giulia/Italia) e Penedès (Catalogna/Spagna). Il prototipo industriale utilizzato per la sonicazione prodotto dall'azienda Padovan (Vittorio Veneto, TV, Italia) - ha lavorato in continuo in uscita dalla pigiadiraspatrice. L'alimentazione in entrata del prototipo è stata realizzata in continuo a valle della pigiadiraspatrice utilizzando una valvola ad "Y" che consentiva di alimentare in modo omogeneo l'impianto ad ultrasuoni e il testimone in macerazione, garantendo la confrontabilità delle prove. L'impianto ad ultrasuoni operava alla frequenza di 27 kHz con un tempo di trattamento di 2 min, con un'amplitudine degli ultrasuoni del 90 %. Il campione sonicato (US) è stato direttamente mandato in pressa pneumatica, mentre il controllo non sonicato (TEST) ha subito 8 ore di macerazione prefermentativa in serbatoio a 15 °C; per entrambi sono stati poi utilizzati i medesimi protocolli e condizioni di vinificazione fino alla valutazione sensoriale dei vini.

Efficacia estrattiva degli ultrasuoni

Cinque campioni di uve Sauvignon Blanc e cinque di Gewürztraminer sono stati diraspati manualmente col pedicello per mantenere l'integrità della bacca e limitare la formazione di precursori. Dopo omogeneizzazione, tre repliche per ciascun campione sono state pigiate manualmente e sonicate per 3 e 5 min (Sonoplus HD 2200, Bandelin electronic, Berlino, Germania) a 20 kHz di frequenza, 153 µm di ampiezza e con un'uscita nominale totale di 200 W. Le condizioni di trattamento sono state impostate sulla base di precedenti lavori (Celotti e Ferraretto, 2016) realizzati in condizioni di cantina.

Interazione fra ultrasuoni e precursori tiolici in soluzione modello

La verifica dell'interazione tra ultrasuoni e precursori tiolici è stata eseguita in soluzione modello di acqua contenente cloruro di potassio (3 g/L) e acido tartarico (6 g/L), regolata a pH 3.0 e 3.5 con idrossido di sodio. Le soluzioni sono state poi addizionate dei precursori tiolici: glutationil 3-mercaptoesan-1-olo (GSH-3MH; 140 µg/L), cisteinil 3-mercaptoesan-1-olo (Cys-3MH; 30 µg/L), glutationil 4-mercapto-4-metil pentan-2-one (GSH-4MMP; 60 µg/L) e cisteinil 4-mercapto-4-metil pentan-2-one (Cys-4MMP; 83 µg/L). Cinque campioni della soluzione sono stati sottoposti ad un trattamento di sonicazione di 5 min alle stesse condizioni dell'esperimento del mosto d'uva (20 kHz; 153 µm; 200 W). Altre cinque aliquote sono state riscaldate in un bagno d'acqua termostatico fino a raggiungere una temperatura massima comparabile a quella del mosto trattato, in un tempo simile.

Analisi sensoriale

Le valutazioni organolettiche sono state realizzate da un panel di 11 enologi esperti nella produzione di Sauvignon Blanc ai quali è stata chiesta la preferenza in termini qualitativi globali dei vini degustati alla cieca. Un secondo test sensoriale è stato effettuato da un gruppo di 30 esperti che hanno valutato - su una scala da 1 a 9 - l'intensità dei parametri relativi al colore, olfatto e gusto dei vini.

Metodi analitici e statistici

I parametri di controllo qualitativo sono stati valutati mediante spettrometria nell'infrarosso in trasformata di Fourier calibrata con i metodi ufficiali OIV. Fenoli totali, acidi idrossicinnamiltartarici, catechine e tannini condensati sono stati quantificati rispettivamente secondo i metodi proposti da Singleton et al. (1999), Ribéreau-Gayon (1970), Zironi et al. (1992) e Bate-Smith (1954).

La determinazione dei precursori tiolici nei mosti e in soluzione modello è stata eseguita in LC-MS/MS applicando il metodo proposto da Larcher et al. (2013). La quantificazione dei composti liberi è stata realizzata dopo derivatizzazione e successiva analisi in GC-MS/MS alle condizioni di analisi proposte da Larcher et al. (2015).

L'elaborazione dei risultati è stata realizzata con il software Statistica 13 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). La valutazione delle differenze sensoriali e chimiche è stata realizzata mediante analisi della varianza univariata (ANOVA) e applicando il metodo LSD di Fischer per la definizione dei gruppi omogenei ($p < 0.05$). Nelle figure, lettere diverse indicano risultati statisticamente differenziati.

Risultati e discussione

Prove di cantina con prototipo industriale

La divisione del pigiato con una valvola ad "Y" ha permesso di garantire la confrontabilità delle prove. In queste, il trattamento con ultrasuoni e in assenza di macerazione (US) è l'unica variabile introdotta rispetto al controllo a cui è stata applicata una macerazione prefermentativa secondo i protocolli propri di ciascuna cantina per la vinificazione del Sauvignon Blanc. Il resto delle condizioni di vinificazione (compresa la pressatura) sono rimaste invariate per quanto possibile a livello industriale. I risultati medi della valutazione sensoriale ($n=30$) realizzata indicativamente 6 mesi dopo la fine della fermentazione sono riportati nella figura 1A. Non si osservano differenze significative ($p < 0.05$) per nessuno dei descrittori utilizzati, ad eccezione dell'intensità colorante del vino prodotto nel Penedès, aspetto probabilmente legato alla maggiore estrazione dei composti fenolici operata dalla macerazione tradizionale. L'assenza di differenze fra i parametri gustativi e olfattivi per entrambe le prove conferma sensorialmente che il trattamento con ultrasuoni può sostituire la tradizionale macerazione prefermentativa delle uve bianche aromatiche. L'inevitabile estrazione di polifenoli associata ad entrambe le tecniche sarà gestibile in vinificazione con opportuni interventi di stabilizzazione in funzione della quantità estratta e dell'obiettivo enologico. Nella valutazione della preferenza (fig 1B), pur limitata ad un giudizio complessivo, i degustatori ($n=11$) hanno evidenziato nei vini prodotti nel Penedès l'assenza di differenze fra i due protocolli di lavorazione dell'uva, mentre in quelli del Collio circa il 70% dei degustatori hanno preferito il campione trattato con ultrasuoni ed un ulteriore 10% non ha riportato una preferenza fra i due trattamenti.

Il contenuto di tioli totali espressi come glutatione è stato quantificato nei vini alla fine dell'affinamento, facendo rilevare valori sostanzialmente identici fra i trattamenti nel caso dei vini del Penedès (37 e 38 mg/L rispettivamente per TEST e US); nel caso dei Collio, invece, il campione sonicato (US, 100 mg/L) è risultato più dotato del rispettivo TEST (60 mg/L). Il parametro analitico utilizzato in questa prova di cantina tiene conto di tutti i composti contenenti una funzione tiolica, fra cui la più importante è il glutatione, ma non permette di isolare l'effetto dei tioli varietali, molecole note per caratterizzare la tipicità del Sauvignon Blanc (Lund et al., 2009) e che nell'uva sono presenti in forma di precursori non volatili.

In conseguenza di questi risultati, si è voluto approfondire l'effetto della tecnologia ad ultrasuoni sulla capacità estrattiva dei precursori tiolici presenti nelle uve.

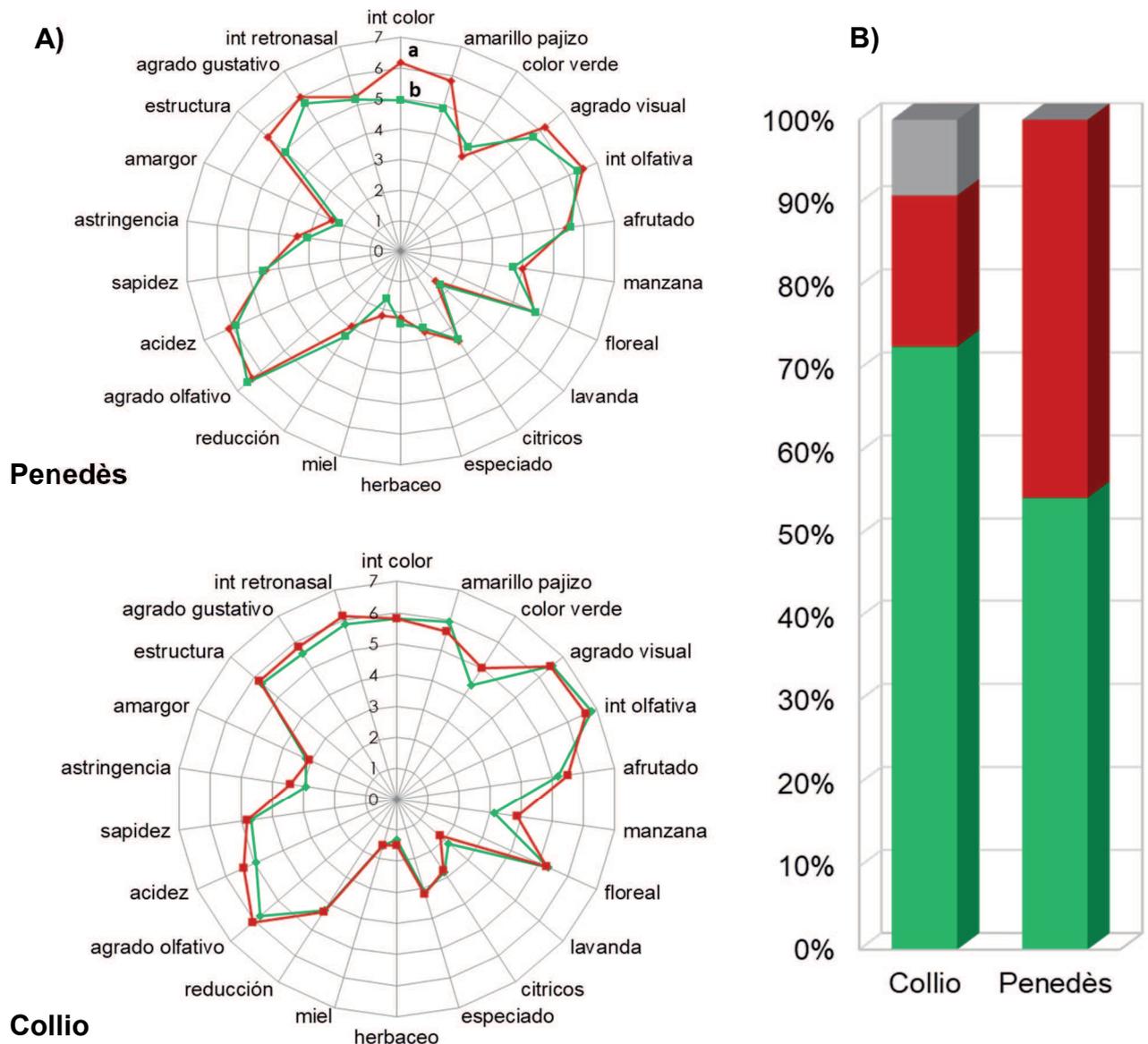


Figura 1. Valore medio dei descrittori aromatici (A) e del test di preferenza (B) all'analisi sensoriale dei vini prodotti nel Penedès e nel Collio applicando la macerazione tradizionale del pigiadiraspato (■) o gli ultrasuoni (■). In relazione al test di preferenza, il colore grigio (■) indica l'assenza di preferenza espressa dai degustatori.

Efficacia estrattiva degli ultrasuoni

La verifica dell'effetto estrattivo degli ultrasuoni sui precursori tiolici è stata realizzata con due varietà - Sauvignon Blanc e Gewürztraminer - note per l'impatto positivo dei tioli sull'aroma e sulla tipicità dei loro vini (Lund et al., 2009; Roman et al., 2018). Per ogni campione sono stati analizzati alcuni parametri della componente fenolica (catechine, polifenoli totali, acidi idrossicinnamiltartrici, tannini totali) e la conduttività, utilizzati come indicatori dell'efficacia estrattiva del trattamento. I risultati (fig. 2) mostrano per entrambe le varietà un andamento dei valori medi degli indicatori fenolici e minerali di estrazione utilizzati crescente con l'aumentare del tempo di sonicazione, con differenze significative fra trattamenti ($p < 0.05$) in tutti tranne che per i tannini.

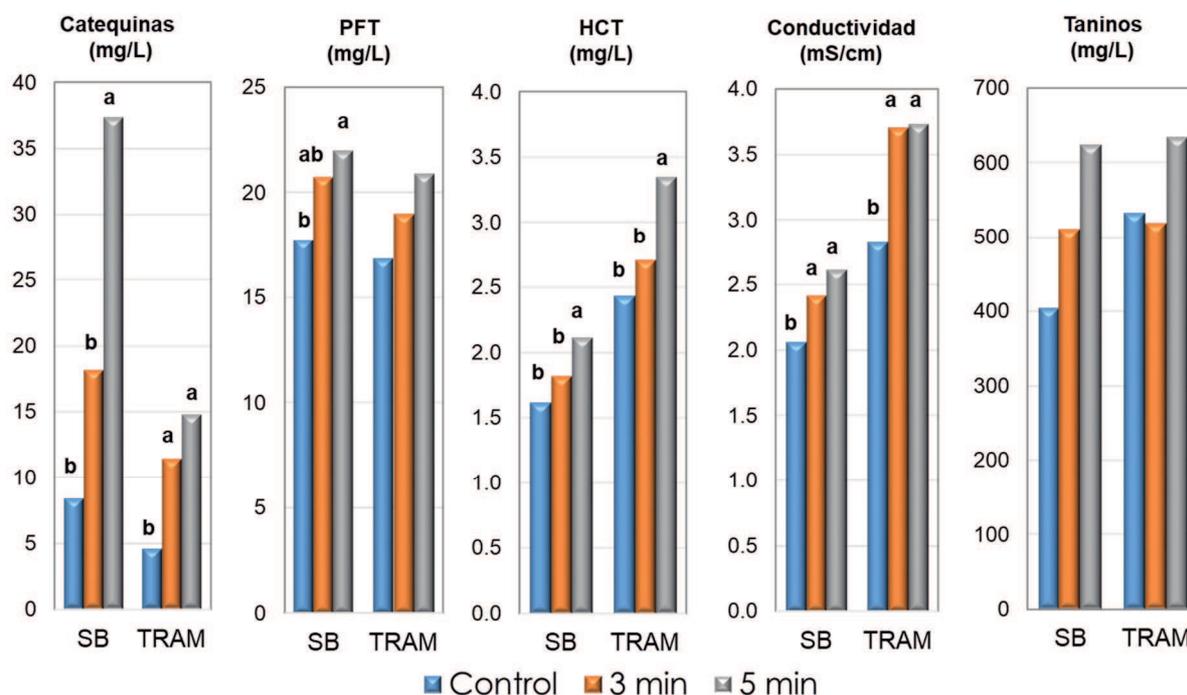


Figura 2. Evoluzione della concentrazione media (n=5) degli indicatori estrattivi fenolici e della conduttività in funzione del tempo di trattamento con ultrasuoni. PFT: Polifenoli totali; HCT: Acidi idrossicinnamiltartrici.

La concentrazione media di precursori tiolici è presentata nella figura 3. In relazione al Gewürztraminer, nessuno dei campioni ha fatto registrare valori di precursori del 4MMP oltre al limite di quantificazione, come peraltro in gran parte atteso visto la limitata presenza dei precursori del 4MMP nei mosti di Gewürztraminer nel Trentino (Nicolini et al. 2020). Il precursore cisteinillato del 3MH presenta un andamento crescente con il tempo di applicazione, coerente con i risultati ottenuti per la frazione fenolica, e con valori mediamente differenziati dopo 5 minuti di trattamento. Inaspettatamente, questa tendenza non si riscontra per il precursore glutationilato (GSH-3MH) per il quale la concentrazione media rimane pressoché invariata, analogamente a quanto si osserva per il Cys-3MH in Sauvignon Blanc. L'assenza di differenze da un punto di vista statistico si ripete anche per il resto dei precursori tiolici quantificati in quest'ultima varietà, tuttavia con un trend medio decrescente. Tendenza che si riscontra anche in ogni singolo lotto di Sauvignon Blanc.

L'effetto discordante del trattamento sulla concentrazione tra gli indicatori estrattivi e i precursori tiolici suggerisce l'esistenza di un'interazione con i composti solforati, forse attraverso la formazione di radicali liberi. L'ipotesi formulata - già dimostrata per altri tioeteri in

altre matrici e condizioni sperimentali (Wu et al., 2005) - è rafforzata da due fattori. Il primo è il pH più basso dei campioni di Sauvignon Blanc (media: 3.00; min: 2.92; max: 3.09) rispetto a Gewürztraminer (media: 3.52; min: 3.39; max: 3.62), differenza che favorirebbe la formazione di radicali liberi in Sauvignon Blanc durante la sonicazione dei mosti. I risultati mostrano eventualmente la sommatoria di effetti estrattivi e degradativi, quest'ultimi di minor entità nelle prove condotte su Gewürztraminer, per il quale il pH è maggiore. Il secondo fattore è dato dalla diminuzione della concentrazione nel mosto di glutazione in forma ossidata (GSSG) in funzione del tempo di sonicazione. Calo di concentrazione che è accompagnato da valori pressoché identici del composto nella forma ridotta (dati non riportati). Entrambe le considerazioni rafforzerebbero l'ipotesi dell'interazione degli US con le molecole contenenti un legame -S- in seguito alla sonicazione.

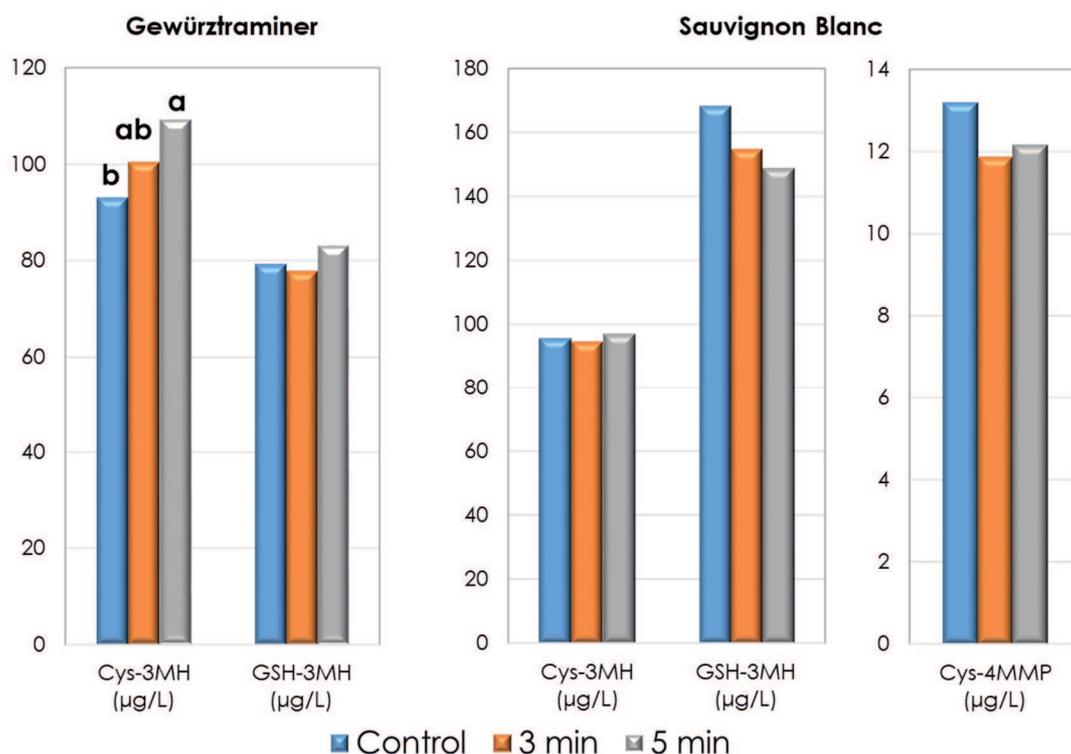


Figura 3. Evoluzione della concentrazione media (n=5) dei precursori tiolici in funzione del tempo di trattamento con ultrasuoni.

Interazione fra ultrasuoni e i precursori tiolici in soluzione modello

Per verificare l'esistenza della possibile interazione nel mosto fra gli ultrasuoni e i precursori tiolici, sono stati condotti esperimenti in soluzione modello arricchita di precursori del 3MH e del 4MMP, aggiustando il pH a valori simili a quelli dei mosti della precedente prova (3.0 e 3.5) e trattando successivamente con US per 5 minuti alle stesse condizioni operative già citate.

La figura 4 mostra la distribuzione della concentrazione di ciascun precursore in funzione del trattamento e del pH della soluzione. Nel complesso, appare chiaramente l'effetto di degradazione dei precursori a seguito del trattamento con US, più marcato alle condizioni di pH più basse.

Più in dettaglio, in relazione ai precursori cisteinilati si può osservare una diminuzione significativa del precursore del 4MMP a pH 3.0 di circa l'8%. I risultati sono coerenti con quelli ottenuti nelle uve (figura 3), nei quali questo composto in Sauvignon Blanc si mostrava più degradato dal trattamento rispetto a quello del Cys-3MH. Inoltre, in relazione a quest'ultimo

precursore il risultato netto estrattivo in Gewürztraminer (a pH maggiore) è risultato positivo mentre non si osserva alcun effetto nei campioni di Sauvignon Blanc (a pH inferiore).

La diminuzione causata dal trattamento con ultrasuoni è più evidente in relazione ai precursori glutationilati, per i quali la degradazione è significativa ad entrambi i pH. Anche questi risultati sono coerenti con quanto riportato nelle verifiche estrattive condotte sulle uve, in cui i precursori legati al glutazione sembrano maggiormente influenzati dal trattamento con gli US: effetto netto estrattivo impercettibile in Gewürztraminer e un trend negativo per SB. Le differenze osservate tra i due livelli di pH circa il livello di degradazione sono altresì congrue con l'ipotesi iniziale per la quale i precursori potrebbero interagire con gli ultrasuoni a causa della formazione di radicali liberi, e la riduzione media di precursori glutationilati a pH 3.0 è risultata superiore (mediamente ~20%) rispetto a pH 3.5 (~10%).

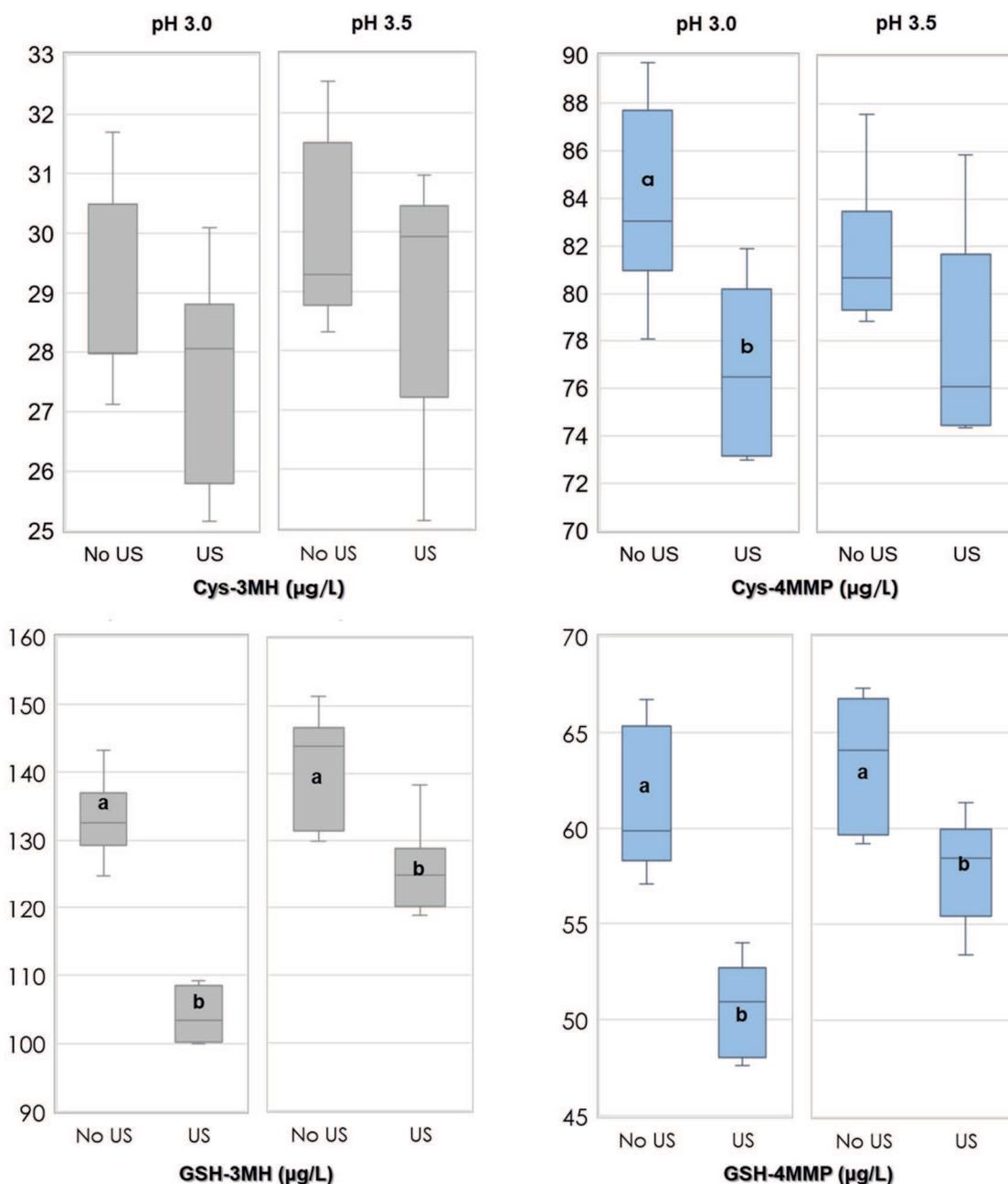


Figura 4. Distribuzione della concentrazione in soluzione modello dei precursori dei tioli varietali dopo trattamento con ultrasuoni (US) e senza trattamento (No US). Lettere diverse indicano valori medi statisticamente differenziati

Dal punto di vista enologico, la degradazione dei precursori avrebbe un senso tecnologico esclusivamente se fra i prodotti di degradazione si potessero ritrovare le molecole tioliche aromatiche libere. I box plot della figura 5 dimostrano come la diminuzione dei precursori sia accompagnata da un chiaro e significativo aumento ($p < 0.05$) della concentrazione dei composti aromatici ad entrambi i livelli di pH. La formazione di tioli volatili è più rilevante a pH 3.0, coerentemente con la maggior degradazione dei precursori. Il tasso di formazione dei composti liberi rispetto ai precursori degradati (mol:mol) è risultato mediamente del 1.3% a pH 3.0 e dello 0.9% a pH 3.5. Questi rapporti non possono essere tuttavia estrapolati dal contesto sperimentale e applicati alle condizioni industriali, sia per il diverso potenziale redox del mosto che per l'eventuale perdita di composti volatili determinata dall'effetto stripping dalle bolle create per cavitazione. Ciononostante, a titolo meramente indicativo va rimarcato il fatto che questi valori si trovano all'interno del normale ordine di grandezza del tasso di liberazione operato dal lievito dai precursori presenti nel mosto.

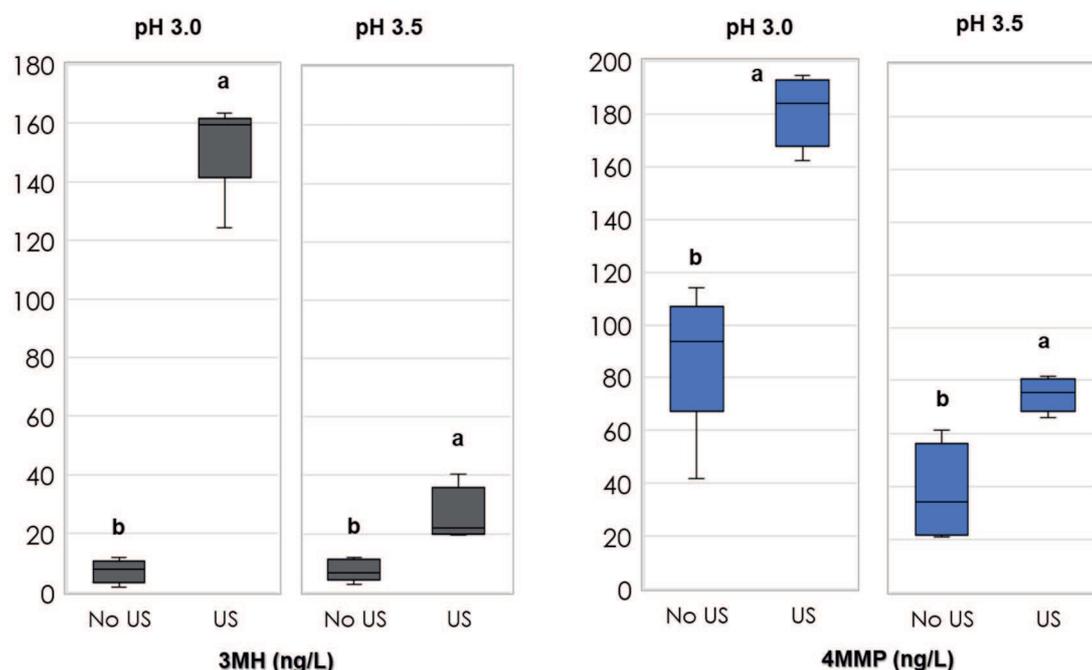


Figura 5. Distribuzione della concentrazione in soluzione modello dei tioli varietali dopo trattamento con ultrasuoni (US) e senza trattamento (No US). Lettere diverse indicano valori medi statisticamente differenziati

Conclusioni

I risultati di questo lavoro hanno permesso di mettere in evidenza sensorialmente la possibilità di sostituire la macerazione prefermentativa con il trattamento ad ultrasuoni del pigiato, cosa che permetterebbe di ridurre i rischi associati a questa pratica enologica in termini di sviluppo di microorganismi indesiderati e di disponibilità di volumi per la macerazione o di frigorifici. La conferma dell'effetto positivo sui meccanismi di estrazione dalle uve della frazione fenolica e la dipendenza dal tempo di trattamento permettono di ipotizzare la modularità del trattamento stesso - attraverso le variabili di processo - in funzione degli obiettivi enologici.

Le indagini realizzate a livello di laboratorio hanno permesso di evidenziare la possibile degradazione dei precursori tiolici determinata dall'applicazione degli ultrasuoni, più evidente per i composti legati al glutatone e alle condizioni di pH più basse; degradazione che è accompagnata da un aumento dei composti tiolici aromatici liberi 3MH e 4MMP.

È necessario tuttavia studiare più approfonditamente i meccanismi di interazione e gli effetti degli ultrasuoni applicati a livello industriale affinché i risultati da noi osservati possano essere utilizzati a pieno nell'ottimizzazione dei protocolli di lavorazione in funzione della varietà, al fine di migliorare l'espressione aromatica e la tipicità dei vini caratterizzati da questa famiglia di composti.

Bibliografia

1. Bate-Smith, E.-C. (1954). Leucoanthocyanins. I. Detection and identification of anthocyanin formed from leucoanthocyanins in plant tissues. *Biochem J* 11, 1153-1156.
2. Cacciola V., Ferran Batllò I., Ferraretto P., Vincenzi S., Celotti E. (2013). Study of the Ultrasound effects on yeast lees lysis in winemaking. *Eur Food Res Technol*, 236:(2) 311-317.
3. Celotti, E.; Ferraretto, P. Studies for the ultrasound application in winemaking for a low impact enology. In Proceedings of the 39th World Congress of Vine and Wine, Bento Gonçalves, Brazil, 23–28 October 2016; p. 132.
4. Del Fresno J.M., Loira I., Morata A., González C., Suárez-Lepe J., Cuerda R. (2018). Application of ultrasound to improve lees ageing processes in red wines *Food Chemistry* 261, 157–163.
5. Del Fresno, J.M.; Morata, A.; Escott, C.; Loira, I.; Cuerda, R.; Suárez-Lepe, J. (2019). Sonication of Yeast Biomasses to Improve the Ageing on Lees Technique in Red Wines. *Molecules*, 24, 635.
6. Egwim, I. O., & Gruber, H. J. (2001). Spectrophotometric measurement of mercaptans with 4, 4'-dithiodipyridine. *Analytical biochemistry*, 288(2), 188-194.
7. El Darra N., Grimi N., Maroun R.G., Louka N., Vorobiev E. (2013). Pulsed electric field, ultrasound, and thermal pretreatments for better phenolic extraction during red fermentation. *European Food Research and Technology* 236, 1, 47-56.
8. Ferraretto P., Cacciola V., Ferran Batllò I., Celotti E., (2013). Ultrasound application in winemaking: grape maceration and yeast lysis. *Italian Journal of Food Science*, 25 (2), 160-168.
9. Ferraretto P., Celotti E. (2016). Preliminary study of the effects of ultrasound on red wine polyphenols. *CyTa J. of Food*, 14, 529–535.
10. García Martín, J.F., & Sun, D.-W. (2013). Ultrasound and electric fields as novel techniques for assisting the wine ageing process: The state of the art research. *Trends in Food Science & Technology*, 33, 40–53.
11. Larcher, R., Tonidandel, L., Villegas, T. R., Nardin, T., Fedrizzi, B., & Nicolini, G. (2015). Pre-fermentation addition of grape tannin increases the varietal thiols content in wine. *Food Chem*, 166, 56-61.
12. Larcher, R., Nicolini, G., Tonidandel, L., Román Villegas, T., Malacarne, M. & Fedrizzi, B. (2013). Influence of oxygen availability during skin-contact maceration on the formation of precursors of 3-mercaptohexan-1-ol in Müller-Thurgau and Sauvignon Blanc grapes. *Aust J Grape Wine R*, 19(3), 342-348.
13. Lund, C. M., Thompson, M. K., Benkwitz, F., Wohler, M. W., Triggs, C. M., Gardner, R., Hildegard H. & Nicolau, L. (2009). New Zealand Sauvignon blanc distinct flavor characteristics: Sensory, chemical, and consumer aspects. *Am J Enol Viticult*, 60(1), 1-12.
14. Morata, A., Loira, I., Vejarano, R., González, C., Callejo, M. J., & Suárez-Lepe, J. A. (2017). Emerging preservation technologies in grapes for winemaking. *Trends in Food Science & Technology*, 67, 36–43.
15. Nicolini, G., Román, T., Gasperi, C.A., Bottura, M., Paolini, M., Barbero, A., Celotti, E. (2020). Precursori dei tioli varietali durante la maturazione e la pressatura delle uve del Traminer aromatico. *L'Enologo* 2020(6), *in stampa*

16. Ribéreau-Gayon, P. (1970). Les dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique* 52, 627-631.
17. Risoluzione OIV-OENO 616-2019. Trattamento delle uve pigiate mediante ultrasuoni per favorire l'estrazione dei composti.
18. Román, T., Tonidandel, T., Larcher, R., Celotti, E., & Nicolini, G. (2018). Importance of polyfunctional thiols on semi-industrial Gewürztraminer wines and the correlation to technological treatments. *Eur Food Res Tech*, 244(3), 379-386.
19. Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Method Enzymol* 299, 152-178.
20. Wu, Z., Ondruschka, B., & Stark, A. (2005). Ultrasonic cleavage of thioethers. *The Journal of Physical Chemistry A*, 109(16), 3762-3766.
21. Zironi, R., Buiatti, S. & Celotti, E. (1992). Evaluation of a new colourimetric method for the determination of catechins in musts and wines. *Wein-Wissenschaft* 47, 1-7.