



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI UDINE
FACOLTÀ DI AGRARIA

Corso di Laurea in
VITICOLTURA ED ENOLOGIA

(D.M. 509/99)

Tesi di Laurea

**TECNICHE INNOVATIVE PER LA VALUTAZIONE
DELLO STATO OSSIDORIDUTTIVO DEI VINI ROSSI**

Relatore:
Dott. FRANCO BATTISTUTTA

Correlatore:
Dott.ssa LAURA BROTTTO

Correlatore:
Prof.ssa ROSANNA TONIOLO

Laureanda:
LORENZA SCOLLO

ANNO ACCADEMICO 2009/2010

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Dottor Franco Battistutta per avermi permesso di intraprendere questo lavoro, stimolante e affascinante al tempo stesso, e la Prof.ssa Rosanna Toniolo per il tempo e l'attenzione che mi ha dedicato. La loro professionalità e la loro conoscenza della materia oggetto di questa tesi sono stati un aiuto davvero prezioso.

Desidero poi ringraziare la Dott.ssa Laura Brotto non solo per il sostegno teorico, pratico e psicologico che mi ha concesso ma anche, e soprattutto, per la sua disponibilità, la sua gentilezza e la sua generosità doti che, racchiuse in un'unica persona, sono davvero rare da trovare.

RIASSUNTO

La valutazione della possibile evoluzione ossidoriduttiva di un vino e della sua probabile vita commerciale si basa, oggi, prevalentemente sulla conoscenza del proprio prodotto e sull'esperienza acquisita. Questi metodi prettamente empirici, però, risultano essere imprecisi se confrontati con le metodiche analitiche attualmente a disposizione dei tecnici.

Negli ultimi vent'anni, infatti, in molte cantine si sono diffusi strumenti analitici come gli spettrofotometri UV-VIS, gli spettrofotometri IR, i polarografi, che vengono utilizzati essenzialmente con un approccio di tipo univariato e che, se venissero invece impiegati con un approccio multivariato, potrebbero portare ad una maggiore comprensione delle numerose informazioni contenute nei dati che permettono di ottenere.

Questo studio preliminare si propone di valutare se queste tecniche sono in grado di fornire questo tipo di supporto agli esperti del settore e quali di queste tecniche possono essere le più utili a comprendere quella che sarà l'evoluzione del vino e la sua possibile vita commerciale.

Il lavoro è stato condotto su 60 vini rossi di diversa annata, origine e varietà, su cui è stata effettuata da una parte una serie di determinazioni analitiche (SO₂ libera, spettri UV, VIS, MIR, NIR e voltammetria ciclica) e dall'altra un'analisi sensoriale volta a studiare lo stato ossidoriduttivo dei campioni. Nello specifico si è valutata l'esistenza di correlazioni fra la percezione sensoriale dello stato ossidoriduttivo dei vini rossi e i suddetti metodi analitici (spettri UV, VIS, MIR, NIR e tracciati voltammetrici) tramite elaborazione statistica multivariata dei dati.

Sono stati individuati dei modelli di regressione solo tra spettri VIS e analisi sensoriale e tra tracciati voltammetrici ed analisi sensoriale. E' stata fatta, poi, una valutazione di confronto tra i risultati ottenuti in questo studio sui vini rossi e quelli ottenuti in uno studio precedente, del tutto analogo, sui vini bianchi (Berto, 2010) dalla quale è emerso che questi ultimi hanno permesso di ottenere un maggior numero di modelli di regressione validi e questo, probabilmente, a causa della maggiore complessità dei vini rossi e della maggiore difficoltà riscontrata dai giudici nel valutarli in modo concorde.

Inoltre, nel corso di questo lavoro, è stata messa in evidenza l'efficacia di una scheda sperimentale di tipo non strutturato nella valutazione dello stato evolutivo dei vini, sia bianchi che rossi, mettendola a confronto con una scheda di tipo strutturato tradizionale.

INDICE

1. Il sistema redox nei vini rossi	pag. 4
1.1 Introduzione	pag. 4
1.2 La frazione fenolica	pag. 5
<u>1.2.1 Gli acidi fenolici</u>	pag. 6
<u>1.2.2 I flavonoidi</u>	pag. 6
1.3 L'evoluzione della frazione fenolica	pag. 9
<u>1.3.1 Reazioni di polimerizzazione</u>	pag. 10
<u>1.3.2 Reazioni di condensazione</u>	pag. 10
1.4 Gli effetti delle reazioni chimiche durante l'affinamento e l'invecchiamento dei vini rossi	pag. 11
<u>1.4.1 Modificazioni del gusto causate dalle reazioni che coinvolgono i tannini</u>	pag. 12
<u>1.4.2 Modificazioni del colore causate dalle reazioni che coinvolgono gli antociani</u>	pag. 13
1.5 Il potenziale redox	pag. 14
<u>1.5.1 I fattori che influenzano il potenziale redox</u>	pag. 16
1.6 L'ossidazione dei vini rossi e i difetti ad essa associati	pag. 17
<u>1.6.1 L'ossidazione chimica dei vini rossi</u>	pag. 19
<u>1.6.2 Pratiche preventive dei fenomeni di ossidazione nei vini rossi</u>	pag. 22
<u>1.6.3 L'impiego del diossido di zolfo</u>	pag. 23
1.7 La riduzione dei vini rossi e i difetti ad essa associati	pag. 25
<u>1.7.1 Pratiche preventive e curative dei fenomeni di riduzione nei vini rossi</u>	pag. 26
2. Lo strumento dell'analisi sensoriale	pag. 29
3. Analisi univariata ed analisi multivariata. Due metodiche a confronto	pag. 32
3.1 Elaborazione statistica nell'analisi multivariata dei dati	pag. 33
4. Tecniche analitiche impiegate nel settore alimentare	pag. 37
4.1 Spettrometria UV-VIS	pag. 37
4.2 Spettroscopia FT-IR	pag. 38
4.3 Voltammetria ciclica	pag. 40

5. Relazioni possibili tra l'analisi sensoriale e le tecniche spettrali e voltammetriche	pag. 42
6. Scopo di questa tesi	pag. 44
7. Materiali e metodi	pag. 46
7.1 Descrizione dei campioni	pag. 46
7.2 Analisi sensoriale	pag. 47
7.3 Determinazione dell'anidride solforosa	pag. 48
7.4 Acquisizione degli spettri UV-VIS	pag. 48
7.5 Acquisizione degli spettri FT-MIR e FT-NIR	pag. 49
7.6 Voltammetria ciclica	pag. 51
7.7 Elaborazione statistica dei dati	pag. 51
8. Risultati e discussioni	pag. 53
8.1 Analisi sensoriale dell'evoluzione dei vini	pag. 53
8.2 Approccio univariato nella valutazione dello stato redox dei vini rossi	pag. 58
8.3 Approccio multivariato nella valutazione dello stato redox dei vini rossi	pag. 64
<u>8.3.1 Studio della correlazione tra analisi sensoriale e spettri UV</u>	pag. 65
<u>8.3.2. Studio della correlazione tra analisi sensoriale e spettri VIS</u>	pag. 68
<u>8.3.3. Studio della correlazione tra analisi sensoriale e spettri FT-MIR</u>	pag. 72
<u>8.3.4. Studio della correlazione tra analisi sensoriale e spettri FT-NIR</u>	pag. 73
<u>8.3.5. Studio della correlazione tra analisi sensoriale e tracciati voltammetrici</u>	pag. 75
9. Vini rossi e vini bianchi: analogie e differenze	pag. 79
9.1 Analisi sensoriale e spettri FT-MIR	pag. 79
9.2 Voltammetria ciclica e stato ossidoriduttivo dei vini	pag. 84
10. Conclusioni	pag. 86
11. Bibliografia	pag. 89

1. Il sistema redox nei vini rossi

1.1 Introduzione

Nel processo di vinificazione i fenomeni redox sono responsabili di profonde modificazioni che si esplicano principalmente in alterazioni del colore e dell'aroma. La degradazione della componente aromatica e la trasformazione della componente colorante sono causate sostanzialmente da questi meccanismi redox (Ferreira *et al.*, 2003).

La gestione dell'ossigeno, pertanto, è uno degli aspetti più importanti e complessi dell'attività dell'enologo. A partire dal mosto fino ad arrivare alla maturazione in bottiglia, possono essere individuati molti *steps* critici di esposizione della materia all'ossigeno, nei quali la quantità di ossigeno fornita può avere impatti diversi sulle caratteristiche organolettiche del vino finito (Martins *et al.*, 2008).

Il ruolo dell'ossigeno, nelle differenti epoche, ha dato luogo a considerazioni contrastanti. Inizialmente, e per un lungo periodo di tempo, l'ossigeno è stato considerato un "nemico" del vino. Pasteur fu il primo a comprendere che l'ossigeno, al contrario, è un fattore indispensabile all'evoluzione di un vino rosso. Successivamente i suoi studi e le sue conclusioni sono state "rivisitate" e per qualche decennio la protezione contro ogni tipo di ossidazione è stata considerata pratica essenziale. Oggi, l'atteggiamento nei confronti della gestione del sistema redox, è sicuramente più misurato.

Si è compreso che una certa protezione dei mosti è necessaria ma, per contro, sono state proposte tecniche di stabilizzazione che si basano proprio su ossidazioni anche spinte ma controllate (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Il vino è, da un punto di vista chimico, una complessa miscela di acqua, alcol, acidi organici, composti fenolici, zuccheri, aminoacidi e diversi minerali. Tra questi componenti, i composti fenolici meritano un'attenzione particolare perché sono direttamente coinvolti nei processi di ossidazione che si verificano durante la vinificazione e l'invecchiamento. La frazione fenolica rappresenta nei vini rossi lo 0.2% del peso totale (nei vini bianchi lo 0.01%), è responsabile del colore, dell'aroma e della struttura dei vini rossi (e in misura minore dei vini bianchi) e gioca un ruolo chiave nel determinare la loro capacità antiossidante (Karbowski *et al.*, 2010).

1.2 La frazione fenolica

I polifenoli sono una classe di composti che gioca un ruolo fondamentale nei processi di vinificazione. Hanno riconosciute proprietà battericide, vitaminiche, protettive e, soprattutto, antiossidanti. Il “paradosso francese” è divenuto un termine largamente diffuso e accettato per descrivere gli effetti positivi correlati al consumo di vino rosso nella prevenzione delle malattie cardiache. I composti maggiormente coinvolti in questa azione protettiva dell'apparato cardiovascolare sono proprio i polifenoli che agiscono come antiossidanti, prevenendo l'ossidazione delle low-density lipoprotein (LDL) e incrementando i livelli delle high-density lipoprotein (HDL), ovvero di quello che è comunemente noto con il termine di “colesterolo buono” (Piljac *et al.*, 2004).

La composizione in termini di polifenoli nei vini rossi dipende principalmente da tre fattori. In primo luogo, varietà diverse presentano grosse differenze in termini di classi e concentrazioni di polifenoli e a questo fattore si somma l'effetto delle condizioni climatiche e del suolo. Le pratiche viticole, poi, in termini di grado di maturazione e qualità delle uve al momento della vendemmia, sono determinanti per la estraibilità degli stessi. Secondariamente, le tecniche di vinificazione, ed in particolare le trasformazioni durante il processo di vinificazione, rappresentano uno *step* cruciale per la loro estrazione. Ad esempio, una fermentazione tradizionale a contatto con le bucce tende a favorire la loro estrazione rispetto ad una macerazione carbonica o ad una termovinificazione. Altri fattori quali la qualità del frutto, la temperatura di macerazione, la durata della macerazione, le movimentazioni, l'aggiunta di enzimi pectolitici influiscono fortemente sulla composizione in termini di polifenoli del vino finito. Infine, le numerose reazioni chimiche che coinvolgono tali molecole sia durante la fermentazione sia durante l'invecchiamento contribuiscono a creare differenti vie di evoluzione della frazione fenolica (Karbowiak *et al.*, 2010).

Durante il processo di vinificazione, quindi, i polifenoli vengono estratti dalle differenti parti della bacca e subiscono poi tutta una serie di modificazioni della loro struttura nel corso dell'affinamento e della maturazione del vino; queste variazioni sono in funzione delle condizioni in cui tali processi si esplicano e le reazioni coinvolte sono di polimerizzazione, di ossidazione, di condensazione e di idrolisi.

Il fenolo, in quanto tale, nel vino non esiste; sono i polifenoli ad essere presenti, i quali hanno due o più gruppi ossidrilici (OH), a volte sostituiti, solitamente metilati (O-CH₃).

La frazione fenolica comprende due grandi classi: gli acidi fenolici e i flavonoidi.

1.2.1 Gli acidi fenolici

Gli acidi fenolici si dividono in acidi benzoici e acidi cinnamici.

- Acidi benzoici: sono noti sette acidi del tipo benzoico che differiscono tra loro per il grado e per la natura dei sostituenti dell'anello benzenico. Si trovano nell'uva anche sotto forma di eterosidi e di esteri (tannini gallici ed ellagici) ma le forme libere sono maggiormente presenti, soprattutto nei vini rossi (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003) e derivano da reazioni di degradazione di molecole più complesse, in particolare degli antociani, sotto l'azione del calore.
- Acidi cinnamici: sono presenti in forma esterificata con l'acido tartarico o come eterosidi del glucosio. Le forme libere sono poco rappresentate. Gli esteri con l'acido tartarico, in particolare l'acido caftarico (o acido caffeil tartarico) sono i substrati delle PPO (polifenolossidasi) dell'uva e quindi sono responsabili dell'imbrunimento dei mosti (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Passando a composti polifenolici più complessi, una classe che ha assunto nel corso degli ultimi anni una grande importanza è quella degli stilbeni (due anelli benzenici uniti per mezzo di una catena etanica o etilenica) con particolare riferimento all'isomero trans del resveratrolo che è prodotto dalla vite in risposta ad attacchi di parassiti fungini. Il resveratrolo è localizzato nelle bucce, viene estratto soprattutto durante la vinificazione in rosso ed è il composto a cui si attribuiscono le proprietà farmacologiche e salutistiche legate al suddetto "paradosso francese" (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

1.2.2 I flavonoidi

Sono i principali responsabili del colore e della struttura di un vino; si trovano nell'uva a livello di buccia, polpa e semi. La struttura base, chiamata aglicone, è costituita da due anelli aromatici (A e B) uniti tra loro per mezzo di un eterociclo ossigenato (o anello piranico C).

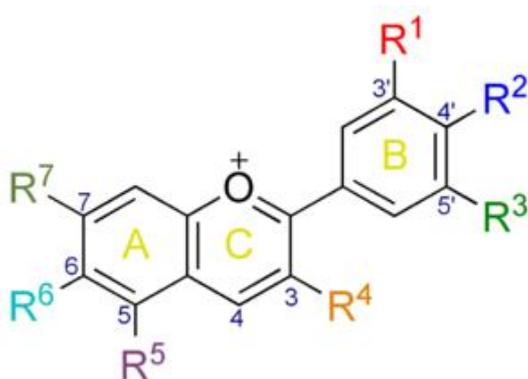


Figura 1: Struttura base di un flavonoide.

(http://it.wikibooks.org/wiki/Chimica_organica/Eterociclici)

Le differenze nello stato di ossidazione, e quindi la loro classificazione in differenti famiglie, risultano dalla variazione in idrogeni, idrossili e chetoni associati ai carboni 2, 3 e 4 (figura 1) (Ursini *et al.*, 1997).

- Antociani: appartengono alla famiglia dei flavonoidi e sono una delle più importanti classi di pigmenti idrosolubili presenti non solo nell'uva ma anche in molti altri frutti, nei fiori e nelle foglie. La molecola degli antociani è costituita da due anelli benzenici uniti per mezzo di un eterociclo ossigenato, insaturo e dotato di carica positiva, lo ione flavilio. Nelle uve e nei vini, a seconda della natura dell'anello laterale B (ed in particolare a seconda dei sostituenti presenti su tale anello), si distinguono cinque molecole (cianidina, peonidina, delphinidina, malvidina, petunidina; la pelargonidina non è presente nell'uva – figura 2).

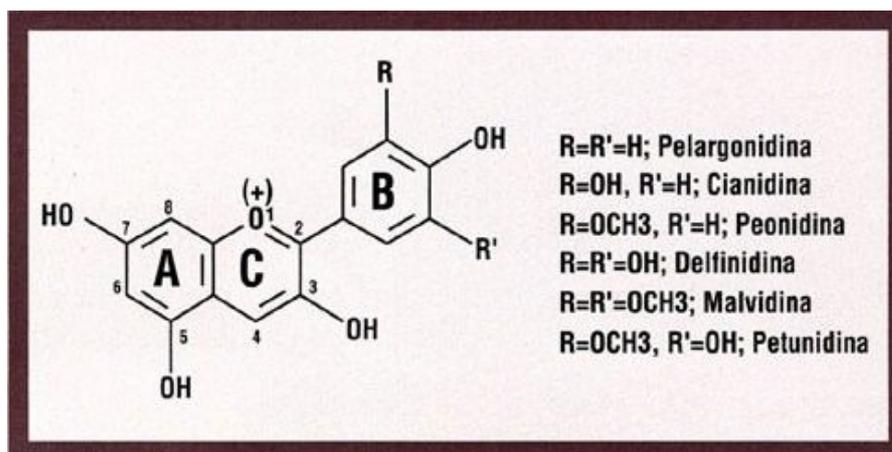


Figura 2: Le sei antocianidine presenti in natura.
(www.darapri.it/immagini/nuove_mie/degustazione/app_sostanzeresponsabilicolore.htm)

Queste molecole, però, sotto forma di agliconi (antocianidine) sono molto meno stabili che sotto forma eterosidica (antocianine) quando, cioè, alla struttura antocianica, è legato uno zucchero con legame glucosidico sempre in posizione 3. La presenza dello zucchero è fonte di stabilità (le antocianine sono più stabili delle antocianidine). Nelle uve della varietà *Vitis vinifera* sono state identificate solo antocianine monoglucosilate; la presenza di antociani diglucosidi è specifica di certe specie delle varietà *Vitis riparia* e *Vitis rupestris*. Lo zucchero, inoltre, può essere ulteriormente legato ad un acido (o un acido cinnamico, di solito il cumarico, o l'acido acetico) a dare l'antocianina acilata. Il colore di questi pigmenti è funzione della composizione del mezzo (pH, SO₂) e dipende dalla loro

struttura molecolare e da quella delle altre sostanze presenti. Per quanto riguarda le condizioni del mezzo, le antocianine sono sostanze anfotere, quindi il loro colore è in stretta relazione con il pH dell'ambiente. Le soluzioni acide contenenti queste sostanze sono di colore rosso e si decolorano a mano a mano che il pH aumenta. La massima

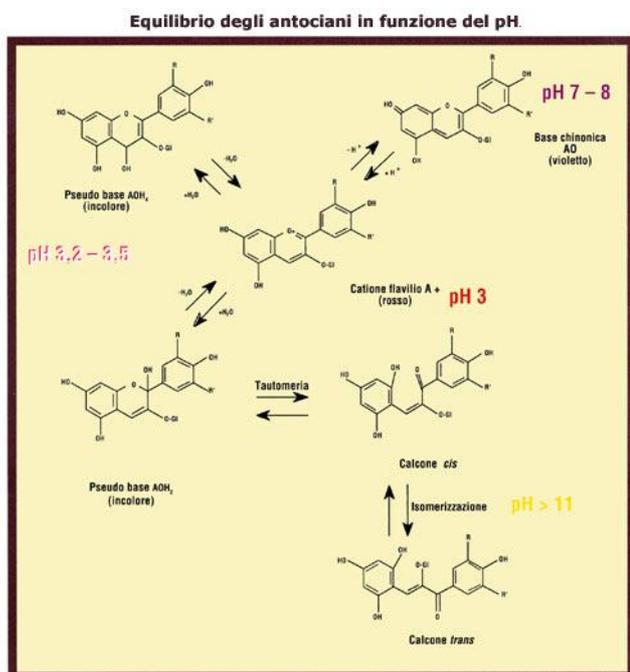


Figura 3: Variazione del colore in funzione del pH.
www.darapri.it/immagini/nuove_mie/de gustazione/app_sostanzeresponsabilicolore.htm

decolorazione si osserva a pH compresi tra 3.2 e 3.5, quando lo ione flavilio (colorato di rosso) tende ad essere in equilibrio con la pseudobase (forma incoloro); per pH maggiori di 4 il colore varia dal malva al blu in quanto lo ione flavilio entra in equilibrio con la forma chinonica colorata di viola (figura 3) (Ursini *et al.*, 1997).

La SO₂ può provocare un temporaneo calo della colorazione del vino perché si verifica una rottura nella coniugazione dell'anello a seguito di

addizione, ma questa reazione è reversibile. La sostituzione del ciclo laterale, invece, causa uno spostamento verso il colore malva mentre la glucosilazione e l'acilazione spostano il colore verso l'arancio. Un fenomeno noto con il termine di "copigmentazione", inoltre, può portare verso una colorazione blu anche molto intensa. La copigmentazione riguarda la formazione di complessi, caratterizzati da debole energia (legami idrogeno e interazioni idrofobiche) sia fra le diverse forme degli antociani, sia fra antociani e altri composti fenolici di solito incolori (acidi fenolici, flavani, flavoni, ecc.). Si tratta di associazioni voluminose che modificano la risonanza del catione e impediscono la sostituzione dei carboni 2 e 4. Questo fenomeno dipende da diversi fattori, quali pH, temperatura, concentrazione e natura degli antociani presenti.

Il colore delle antocianine, quindi, può variare dal rosso al blu (figura 4), a seconda delle condizioni del mezzo, della struttura molecolare e della formazione di addotti con le altre molecole presenti nei tessuti in cui si trovano; questo spiega i diversi colori che le bacche delle uve rosse possono presentare (Ribéreau-Gayon *et al.* 2003).

Gli antociani sono responsabili della tonalità e dell'intensità di colore dei vini rossi

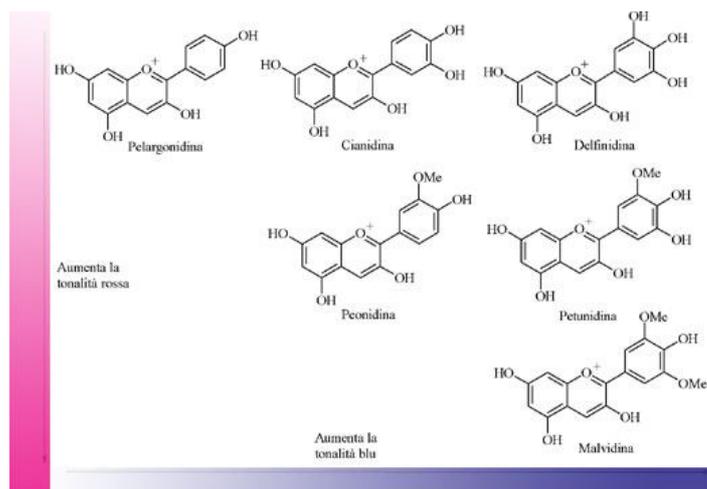


Figura 4: I possibili diversi colori delle antocianine.

(www.darapri.it/immagini/nuove_mie/degustazione/app_sostanzeresponsabilicolore.htm)

giovani. La tonalità di colore di un vino rosso risulta strettamente legata alla tipologia di antociani presenti e dipende dalla idrossilazione dell'anello laterale; aumentando il numero di sostituenti idrossilici la tonalità si sposta verso il blu, mentre la tonalità rossa si intensifica con il grado di metilazione (Mangani *et al.*, 2008).

- **Flavoni:** l'anello centrale presenta un carbonile con gruppo cheto; hanno un colore giallo (sono responsabili della colorazione dei vini bianchi) e proprietà antiossidanti.
- **Flavani:** sull'anello centrale non è presente la carica positiva sull'ossigeno, non è presente il doppio legame e non c'è coniugazione tra anelli; sono caratterizzati quindi da due gruppi aromatici indipendenti e la molecola non è più colorata. La classificazione distingue le catechine e le epicatechine (flavan-3-oli) dalle proantocianidine e procianidine (flavan-3,4-dioli), composti che tendono tutti a polimerizzare.
 - **Tannini:** si tratta di polimeri delle catechine e delle proantocianidine, ovvero flavani polimerizzati. Derivano quindi dalla polimerizzazione di molecole monomeriche contenenti funzioni fenoliche e sono sostanze che mostrano una forte reattività con le proteine e con i polisaccaridi. Devono avere dimensioni sufficientemente grandi per combinarsi in modo stabile con le proteine ma, al tempo stesso, se sono troppo ingombranti non riescono ad avvicinarsi ai siti attivi di queste molecole. I tannini attivi, pertanto, hanno masse molecolari comprese fra 600 e 3.500 (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

1.3 L'evoluzione della frazione fenolica

A partire dalla pigiatura della materia prima fino ad arrivare all'invecchiamento del vino in bottiglia, la frazione fenolica subisce tutta una serie di trasformazioni dovute a reazioni diverse. Le due classi di reazioni più importanti sono quelle di polimerizzazione e quelle di condensazione.

1.3.1 Reazioni di polimerizzazione

In assenza di ossigeno e in un mezzo acido, le procianidine sono in grado di formare un carbocatione che può reagire con le posizioni negative di un'altra procianidina aumentando così il suo grado di polimerizzazione. Questa reazione, che può subire un'accelerazione a causa della temperatura, è detta "polimerizzazione ordinata via carbocatione" di tipo C4-C8 e porta alla formazione di procianidine polimere. Nel vino questa reazione provoca dapprima un imbrunimento fino a quando il polimero diventa così grande da precipitare (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

In un mezzo ossidante, invece, si possono formare radicali liberi fortemente reattivi che possono attaccare qualsiasi molecola in qualsiasi punto. Si possono formare dimeri (due unità), trimeri (tre unità), ..., fino ad arrivare a pigmenti bruni che poi precipitano. Si tratta di una "polimerizzazione ossidativa non ordinata" che nel vino deve essere contrastata perché provoca una degradazione e un impoverimento delle componenti strutturali e aromatiche.

Nel caso di una somministrazione contenuta e controllata di ossigeno, invece, l'ossidazione accoppiata delle procianidine conduce alla formazione di acetaldeide a partire dall'etanolo. La frazione fenolica, in ambiente acido, può autoprottonarsi producendo un carbocatione. Il carbocatione può attaccare un flavano in posizione 6 o 8 e si origina una molecola con un gruppo OH che può nuovamente autoprottonarsi producendo un altro carbocatione. Il carbocatione può attaccare un altro flavano in posizione 6 o 8 e così via. L'acetaldeide, quindi, fa da "ponte" tra due catechine ed i polimeri che si formano per questa via, detta "polimerizzazione con intermedio acetaldeide" sono meno aggressivi di quelli che si formano con la polimerizzazione ordinata via carbocatione (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

1.3.2 Reazioni di condensazione

Le molecole degli antociani contengono un nucleo di tipo flavilio che possiede un ossigeno carico positivamente (catione ossonio). La carica è delocalizzata sull'intero ciclo che risulta così stabilizzato per risonanza. In generale le molecole degli antociani non sono molto stabili, la loro concentrazione diminuisce sensibilmente nel corso dei primi mesi di affinamento e si annulla nel giro di qualche anno; pur tuttavia il vino rimane rosso. Questa diminuzione è dovuta da una parte a reazioni di degradazione e dall'altra alla combinazione di queste molecole con i diversi composti presenti nel vino, in particolare con i tannini. Il catione flavilio, infatti, può reagire con diversi composti a dare pigmenti di struttura complessa, molto meno sensibili alle variazioni di pH e alla SO₂ dei composti di partenza. Questo è in grado di spiegare il

mantenimento o addirittura l'aumento del colore rosso durante i processi di invecchiamento del vino a fronte della scomparsa degli antociani (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Si tratta di meccanismi di condensazione tra antociani e tannini che possono avvenire secondo numerosi meccanismi e portano alla produzione di composti il cui colore varia dal malva all'arancio.

Nel caso della condensazione Antociani-Tannini (AT) si forma il carbocatione sull'antociano colorato e l'antociano carico attacca il tannino; si arriva così ad un composto non colorato perché l'antociano sacrifica la carica per attaccare il tannino. In presenza di ossigeno, comunque, questo composto torna a ricolorarsi. Questa reazione è favorita da un pH acido (< 3,5) ed è attraverso questo meccanismo che il vino acquista colore dopo la svinatura.

Per quanto riguarda invece la condensazione Tannini-Antociani (TA), il carbocatione si forma sul tannino e il tannino carico attacca l'antociano sotto forma di base carbinolo neutra e non colorata. In questo caso, quindi, si parte da una molecola non colorata e si arriva ad un composto che presenta un colore rosso arancio. Questa condensazione non richiede la presenza di ossigeno; si tratta di una reazione relativamente lenta che interviene nel corso dell'invecchiamento in bottiglia.

Nel caso della condensazione con intermedio acetaldeide, invece, l'etanal in un mezzo acido forma un carbocatione in grado di attaccare o l'antociano non carico (base carbinolo) o il tannino. Si possono formare, quindi, o antociani carichi o tannini carichi legati da ponte acetaldeide. L'antociano carico, infine, si comporta da terminatore della catena di accrescimento per evitare che il tannino assuma dimensioni troppo voluminose (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

1.4 Gli effetti delle reazioni chimiche durante l'affinamento e l'invecchiamento dei vini rossi

Durante l'invecchiamento dei vini rossi, l'obiettivo da perseguire è una evoluzione armonica dei diversi costituenti che vanno ad influenzare il colore, l'aroma e il sapore. La modificazione del colore si esplica con un passaggio dal rosso ciliegia, al rosso scuro, al rosso mattone, fino all'aranciato, caratteristico dei vini più vecchi. La modificazione del sapore, invece, è caratterizzata da un ammorbidimento del vino, da una diminuzione della sua astringenza e, in alcuni casi, da un'eccessiva perdita di struttura (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Queste trasformazioni avvengono con una velocità che dipende dalle condizioni esterne e dalla composizione del vino stesso. Quando si parla di condizioni esterne ci si riferisce ai fenomeni ossidativi (O₂, SO₂), alla temperatura e al tempo. Quando si considera la composizione del vino, invece, ci si riferisce alla quantità totale di polifenoli, al rapporto tannini/antociani e alle caratteristiche dei tannini.

1.4.1 Modificazioni del gusto causate dalle reazioni che coinvolgono i tannini

Se si analizza l'evoluzione dei vini durante il periodo che va dalla fine della fermentazione malolattica a dopo l'imbottigliamento, si osserva che la concentrazione di tannini cambia poco durante l'affinamento mentre tende a variare in modo regolare dopo l'imbottigliamento e questo si verifica a causa delle reazioni di polimerizzazione di cui si è parlato nel precedente paragrafo e a causa delle reazioni di condensazione. Delle reazioni di condensazione dei tannini con gli antociani si è già detto nel paragrafo 1.3.2, ma occorre aggiungere che, se queste permettono una intensificazione ed una stabilizzazione del colore, quelle dei tannini con i polisaccaridi e con le proteine, anche se meno note, e condizionate dalla temperatura, vanno a modificare il gusto.

La polimerizzazione ordinata produce molecole sempre più reattive nei confronti delle proteine e, quindi, caratterizzate da una tannicità sempre più accentuata. La polimerizzazione non ordinata porta ad un impoverimento delle componenti strutturali e di quelle aromatiche. La polimerizzazione per mezzo del ponte acetaldeide, invece, induce un ammorbidimento gustativo e le molecole che così si formano sono molto meno reattive (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Con un'ossidazione controllata del vino durante il suo affinamento, quindi, si dovrà cercare di privilegiare quest'ultimo tipo di polimerizzazione e questo si può fare adottando tre possibili strategie: o utilizzando fusti di rovere (le cosiddette *barriques*), o per mezzo di travasi caratterizzati da forte aerazione del vino oppure per mezzo della micro-ossigenazione. I fusti di rovere, essendo permeabili all'ossigeno, permettono una leggera ossidazione del vino e cedono ellagitannini che agiscono poi da catalizzatori di tali reazioni. L'ossidazione troppo violenta del vino, in realtà, può dare origine a reazioni di degradazione degli antociani con conseguente perdita di colore dunque l'eventuale impiego di travasi caratterizzati da forte aerazione deve essere valutato in rapporto alle quantità relative di antociani e tannini presenti nel vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). La micro-ossigenazione è una pratica che consiste nella somministrazione controllata di piccole quantità note di ossigeno che viene trasferito ad

un diffusore per mezzo di un circuito a bassa pressione e immesso nel vino. La micro-ossigenazione è generalmente impiegata nei vini rossi come un'alternativa "economica" all'invecchiamento nei fusti di rovere quando viene abbinata all'utilizzo dei *chips* (Lesica *et al.*, 2009).

1.4.2 Modificazioni del colore causate dalle reazioni che coinvolgono gli antociani

Se si analizza l'evoluzione dei vini durante il periodo che va dalla fine della fermentazione malolattica a dopo l'imbottigliamento, si osserva che gli antociani monomeri scompaiono rapidamente in quanto, come è stato già detto, si tratta di composti instabili che devono combinarsi con i tannini per formare i pigmenti stabili responsabili del colore dei vini evoluti. E' stato dimostrato, infatti, che i tannini sono fortemente coinvolti nella composizione dei pigmenti dei vini vecchi (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

La diminuzione della concentrazione degli antociani è dovuta sia alle reazioni di degradazione sia alle reazioni di stabilizzazione. Gli antociani, nel corso del tempo, subiscono reazioni di degradazione che causano la perdita della struttura flavilio; queste reazioni possono essere causate dal calore o da un'ossidazione violenta. Gli antociani si combinano direttamente con i flavanoli, formando dei complessi aranciati con strutture xantilio. Altre reazioni portano alla formazione di pigmenti di colore rosso-aranciato aventi un nuovo eterociclo ossigenato legato in posizione 4 e 5 alla struttura flavilio. Al momento dell'imbottigliamento, circa il 50% degli antociani si trova già legato ai tannini mediante ponte etile, sotto forma di complessi rosso-malva che si formano durante l'affinamento in presenza di ossigeno. Durante l'invecchiamento una parte di questi complessi evolve verso strutture di colore bruno-aranciato (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Le reazioni di stabilizzazione fra antociani e tannini possono avvenire secondo le tre vie suddette (reazione diretta degli antociani (+) sui tannini (-); reazione diretta dei tannini (+) sugli antociani (-); reazione dei tannini e degli antociani per mezzo dell'etanale che si forma a partire dall'etanolo a causa dell'ossidazione del mezzo).

Tutte queste reazioni portano ad una sostanziale modificazione del colore dei vini rossi che può variare dal rosso al malva, al rosso mattone, fino al bruno aranciato.

Durante la lavorazione delle uve e la loro trasformazione, il colore del vino si intensifica per ossidazione alla svinatura e ad essere maggiormente coinvolta è la reazione diretta degli antociani sui tannini.

Durante l'affinamento del vino, invece, si dovrà cercare di privilegiare la reazione dei

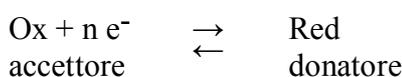
tannini e degli antociani con ponte acetaldeide attraverso le medesime tre strategie individuate per favorire la polimerizzazione dei tannini per mezzo del ponte etanale (i fusti di rovere, i travasi caratterizzati da aerazione del vino o la micro-ossigenazione).

Durante l'invecchiamento in bottiglia, infine, in un ambiente privo di ossigeno, si osserva un'evoluzione del colore verso il rosso mattone causato dal prevalere della reazione diretta dei tannini sugli antociani. E' stato osservato, comunque, che il colore di un vino ricco in antociani combinati per via ossidativa, evolve più lentamente in bottiglia rispetto a quello di un vino povero in antociani combinati per questa via.

Se, da una parte, un'ossidazione troppo violenta del vino può dare origine a reazioni di degradazione degli antociani con perdita eccessiva del colore, dall'altra parte i pigmenti devono essere stabilizzati attraverso meccanismi ossidativi che favoriscono la reazione del terzo tipo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Occorre pertanto stabilire qual è la quantità di ossigeno in grado di stabilizzare il vino senza danneggiarlo. E la resistenza di un vino all'ossidazione è funzione principalmente di tre parametri: la concentrazione totale di antiossidanti naturali o aggiunti, la quantità di ossigeno disciolto e il potenziale redox (Oliveira *et al.*, 2002).

1.5 Il potenziale redox

Vengono definiti equilibri redox quelli in cui la particella scambiata è l'elettrone: la forma ossidata, (povera di e⁻), può acquistare elettroni riducendosi e la forma ridotta (ricca di e⁻) può perdere elettroni ossidandosi.



Nel vino sono numerose le reazioni chimiche caratterizzate da trasferimenti di elettroni che portano a fenomeni di ossidazione e di riduzione; i fenomeni sono simultanei e proseguono fino al raggiungimento di un equilibrio. Il potenziale di ossidoriduzione del vino esprime il livello di ossidazione e di riduzione del mezzo ad un certo equilibrio. Il suo valore è legato alla quantità di ossigeno disciolto.

Nel mosto e nel vino un numero notevole di composti coesistono come miscela delle loro forme ossidata e ridotta, le cosiddette "coppie redox". E' possibile definire il potenziale normale E₀ di un data coppia ossidante/riducente, come il valore per il quale la sostanza si trova per metà

in forma ridotta e per metà in forma ossidata; esso definisce la sua capacità di ossidazione.

Le reazioni redox, pertanto, avvengono sempre in contemporanea: per una specie che si riduce ve n'è una che si ossida e la somma di tali semireazioni, all'equilibrio, andrà a definire il potenziale redox (E_H ovvero il potenziale ossidoriduttivo), misurato in millivolts (mV), espresso dall'equazione di Nerst:

$$E_H = E_O + \frac{RT}{nF} \log \frac{[Ox]}{[Red]}$$

dove:

E_O è il potenziale normale del sistema

R è la costante universale dei gas

T è la temperatura (in gradi K)

n è il numero di elettroni che prendono parte alla reazione parziale di riduzione

F è la costante di Faraday

[Ox] concentrazione delle specie ossidate

[Red] concentrazione delle specie ridotte

Da questa formula appare evidente che il potenziale redox di un vino dipende dalla concentrazione di specie ridotte e ossidate nel mezzo; esso in un vino areato è dell'ordine di 400-500 mV, mentre in un vino tenuto al riparo dall'aria per lungo tempo è di circa 100-150 mV (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Le sostanze che hanno potenziale più alto sono agenti ossidanti è tra queste, il composto più attivo nei mosti e nei vini, è l'ossigeno. Altri agenti ossidanti presenti nei vini e nei mosti sono alcuni metalli pesanti, come il ferro e il rame, che fungono da catalizzatori di reazione aumentando notevolmente l'azione dell'ossigeno e la velocità delle reazioni di ossidazione. Inoltre dall'ossidazione dei composti fenolici possono derivare radicali liberi e perossidi in grado di agire come pro-ossidanti.

Le sostanze che hanno potenziale più basso, invece, sono agenti riducenti; nel vino, i composti riducenti più importanti sono l'anidride solforosa, l'acido ascorbico, i composti fenolici ed il glutatione. Quest'ultimo è un tripeptide (costituito da acido glutammico, glicina e cisteina) attivo nei confronti dei radicali liberi e di altri composti di reazione dell'ossigeno e quindi può rallentare fortemente il processo di ossidazione dei mosti (Zironi *et al.*, 2010).

Maggiore è la concentrazione di forme ridotte più basso sarà il potenziale di quel vino e maggiore sarà la sua sensibilità all'ossidazione. Le sostanze che hanno potenziale più basso

(come ad esempio la SO₂ o l'acido ascorbico, ecc.) tenderanno ad ossidarsi prima rispetto a quelle che presentano potenziale più alto (come ad esempio i polifenoli) in presenza di un ossidante (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Per un certo periodo di tempo è prevalsa l'opinione che si dovesse eliminare dal vino tutto ciò che poteva facilmente ossidarsi in presenza di ossigeno (polifenoli, glucidi), metodo questo che ha assunto il nome di "enologia sottrattiva". Oggi si è diffusa, invece, quella che viene definita "enologia conservativa" secondo la quale è indispensabile, al fine di ottenere un prodotto di qualità, conservare tutto il potenziale presente nella bacca, valorizzandolo in modo da sfruttarlo per poter stabilizzare il prodotto finale (Zironi *et al.*, 2007).

Dall'equazione di Nerst, infatti, si evince che se le concentrazioni delle forme ossidate e delle forme ridotte sono elevate, delle variazioni di queste due forme avranno come risultato una variazione limitata del loro rapporto. In questo caso si avrà un vino con un elevato potere tampone ossidativo, maggiormente protetto nei confronti dei difetti ossidativi. Una situazione di questo tipo si osserva, generalmente, nei vini rossi da invecchiamento, ricchi in composti fenolici (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

1.5.1 I fattori che influenzano il potenziale redox

La velocità di consumo dell'ossigeno è sempre maggiore nei vini rossi rispetto ai vini bianchi a causa della loro superiore ricchezza in sostanze ossidabili. Il ferro ed il rame sono dei catalizzatori di ossidazione. Nei vini rossi, in presenza di rame e di ferro, si osserva una rapida diminuzione sia di E_H sia di E_O (tabella 1). In presenza di antiossidanti (SO₂ e acido ascorbico) non si osservano, invece, variazioni significative né della velocità istantanea di consumo dell'ossigeno né del potenziale normale del vino rosso (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Tabella 1: Influenza del ferro (8 mg/L) e del rame (2 mg/L) sul consumo di ossigeno e sul potenziale di ossidoriduzione in un vino rosso e in un vino bianco (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

		Vi (mg/L O ₂ – min)	E _{HM} (mV)	$\frac{dE_H}{dt}$	E _O (mV)
Vino rosso	Testimone	0.45	528	- 0.70	273
	Aggiunto di Fe + Cu	0.90	461	- 1.42	252
Vino bianco	Testimone	0.20	574	- 0.27	223
	Aggiunto di Fe + Cu	0.38	530	+ 0.41	330

Vi = velocità istantanea di consumo dell'O₂

$\frac{dE_H}{dt}$ = var. del potenziale 72 h dopo la saturazione

E_{HM} = potenziale max dopo saturazione di O₂

E_O = potenziale normale calcolato

Se si analizza l'influenza che i costituenti del vino hanno sul potenziale ossidoriduttivo, si osserva che l'etanolo induce un aumento della velocità istantanea di ossidazione ed una modesta riduzione del valore di potenziale. I composti fenolici, invece, si oppongono alle variazioni di potenziale e gli antociani, in particolare, consumano rapidamente l'ossigeno determinando un rapido abbassamento del potenziale. Le catechine e le proantocianidine oligomere sono più attive delle polimere e questo ci dice che un vino ricco in flavanoli e in tannini poco condensati consuma più ossigeno di uno che contiene soltanto tannini condensati.

Se si analizzano, invece, i fattori esterni che possono influenzare il potenziale ossidoriduttivo, si osserva che la temperatura gioca un ruolo fondamentale. Passando da 0 °C a 30 °C si ha una variazione del potenziale ossidoriduttivo pari a 100 mV; questo è dovuto al fatto che andando da +5 °C a +35 °C, la dose di ossigeno in grado di saturare un vino passa da 10.5 mg/L a 5.6 mg/L. Ad influenzare il processo ossidoriduttivo, infine, intervengono le caratteristiche dei recipienti impiegati per l'affinamento e la conservazione del vino. I fusti di rovere (in particolare quelli nuovi) consentono di mantenere un tenore costante in ossigeno ed un potenziale più elevato rispetto alle vasche (tabella 2) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Tabella 2: Influenza del contenitore sullo stato di ossidoriduzione di un vino rosso conservato per 8 mesi (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

	O₂ disciolto (mg/L)	E_H medio (mV)
Barriques bordolese di 1 anno	0.4	245
di 2 anni	0.2	228
di 3 anni	0.2	218
Vasca inox 70 hl	< 0.1	220
Vasca in cemento 85 hl	< 0.1	215
Vasca in plastica 20 hl	< 0.1	194

1.6 L'ossidazione dei vini rossi e i difetti ad essa associati

Quando l'ossigeno si dissolve nel vino, è necessario quello che si potrebbe definire uno "step di attivazione" che lo rende reattivo e in grado di svolgere la sua azione ossidante. Non è chiaro se questa attivazione sia dovuta agli ioni metallici, alla luce, ai radicali liberi o

alla combinazione di questi tre fattori ma, una volta attivato, si formano dei derivati dell'ossigeno ancora più reattivi, come il radicale idroperossido (HOO•), il radicale idrossido (OH•) e il perossido d'idrogeno (H₂O₂). Gli effetti fortemente ossidanti del perossido di idrogeno in presenza di sali di metallo sono stati descritti, per la prima volta, da Fenton 100 anni fa. Quarant'anni dopo si è compreso che questi effetti sono legati alla formazione di un radicale idrossido molto reattivo. Da allora, molti ricercatori hanno studiato il legame tra questo radicale e i processi ossidativi, ma solo recentemente alcuni di essi hanno ammesso che questa può essere la chiave per comprendere il processo di ossidazione e di invecchiamento del vino (Laurie *et al.*, 2006).

L'ossigeno molecolare, allo stato fondamentale, presenta due elettroni spaiati, su orbitali molecolari differenti, con spin parallelo; nonostante si tratti di una molecola diradicalica, in questa configurazione è relativamente stabile e inerte (³O₂). L'assorbimento di una quantità sufficiente di energia permette il passaggio di questa molecola al suo stato eccitato caratterizzato da un paio di elettroni con spin antiparallelo (¹O₂). In ambiente acquoso l'ossigeno molecolare può ridursi accettando un elettrone (che deriva normalmente dall'ossidazione di uno ione metallico come Fe²⁺/Fe³⁺) trasformandosi così in un anione superossido (O₂•⁻). Questo radicale che si origina dalla riduzione dell'ossigeno può comportarsi sia da ossidante sia da riducente e ai valori di pH del vino esiste come forma protonata del radicale idroperossido (HOO•) che non è di per sé molto reattivo ma è il precursore di altre specie derivanti dall'ossigeno fortemente reattive come il radicale idrossido (HO•). Mentre la prima reazione di riduzione dell'ossigeno è endotermica, la seconda reazione è esotermica e spontanea.

Inoltre, l'anione superossido (O₂•⁻), in presenza di ioni metallici come Fe²⁺/Fe³⁺ o Cu⁺/Cu²⁺ che fungono da catalizzatori, ai valori di pH del vino, può essere ridotto ad anione perossido (O₂²⁻) e velocemente protonato a dare il perossido d'idrogeno (H₂O₂) (figura 5) (Karbowski *et al.*, 2010).

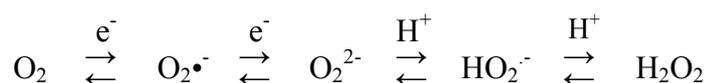


Figura 5: Reazioni a carico dell'ossigeno (Karbowski *et al.*, 2010).

Nell'ambiente vino questa attivazione si verifica in quanto delle piccole quantità di ioni metallici, derivanti dalle uve, da residui di polvere e da apparecchiature di cantina di

materiale diverso dall'acciaio, sono sempre presenti (Laurie *et al.*, 2006).

In presenza degli ioni metallici e a partire dal perossido d'idrogeno (H₂O₂), a seguito della reazione di Fenton (figura 6), si generano il radicale idrossido (HO•) e lo ione idrossido (HO⁻); si parte da deboli precursori e si arriva a specie derivanti dall'ossigeno fortemente reattive (Karbowiak *et al.*, 2010).

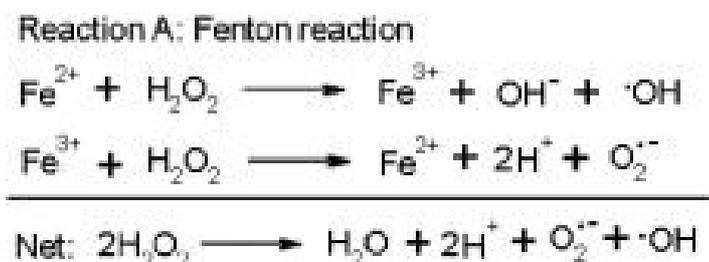


Figura 6: Formazione dell'idrossido radicale (Li *et al.* 2007).

Queste specie molecolari radicaliche dell'ossigeno diventano via via più reattive a mano a mano che aumenta il loro livello di riduzione: ossigeno molecolare < anione superossido < radicale idroperossido < anione idroperossido < radicale idrossido. Quest'ultimo può essere coinvolto in moltissimi processi ossidativi così come in reazioni a catena con numerosi e diversi substrati organici. Con il termine "auto-ossidazione" ci si riferisce generalmente alla reazione chimica tra l'ossigeno molecolare e i composti organici. Questa reazione, che coinvolge i radicali liberi, è tradizionalmente descritta come un processo che prevede tre *steps*: l'iniziazione, la propagazione e la terminazione. L'iniziazione è caratterizzata dalla lenta formazione di nuovi radicali liberi a partire da specie stabili; poi questi radicali liberi si propagano indefinitamente generando vari prodotti di ossidazione; infine la terminazione interviene solo quando i radicali liberi reagiscono con altri radicali liberi o con molecole antiossidanti. Questo schema generale è importante per comprendere in che modo il contatto con l'ossigeno molecolare può essere considerato responsabile dall'iniziazione dei processi di ossidazione nel vino (Karbowiak *et al.*, 2010).

1.6.1 L'ossidazione chimica dei vini rossi

I costituenti polifenolici sono il primo substrato di ossidazione dei vini a causa delle loro capacità antiossidanti. Sono i principali donatori di elettroni e dalla loro ossidazione si generano i radicali liberi semichinoni e chinoni. Le presunte vie di ossidazione dei polifenoli sono due.

Secondo la prima ipotesi, l'ossidazione dei polifenoli è direttamente mediata da metalli di transizione come $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ o $\text{Cu}^+/\text{Cu}^{2+}$ e porta alla formazione del radicale semichinone che viene poi ossidato nel corrispondente chinone. Nella catena ciclica delle reazioni radicaliche, la successiva e parallela riduzione coinvolge l'ossidazione degli ioni metallici e porta alla formazione di tre specie molto reattive derivanti dall'ossigeno: il radicale idroperossido, il perossido di idrogeno e il radicale idrossido. Quest'ultima specie, in particolare, è caratterizzata da una grande instabilità e reagisce molto velocemente innescando una serie di reazioni di ossidazione non selettive che non coinvolgono solo i composti polifenolici ma anche tutte le altre sostanze ossidabili presenti nel vino; le sostanze presenti in maggiore concentrazione nel vino saranno i più probabili substrati di ossidazione. A causa della sua elevata concentrazione nel vino, ad esempio, l'etanolo può essere ossidato dal radicale idrossido (che si riduce ad acqua), si forma così un radicale carbonico che può reagire con l'ossigeno dando acetaldeide e un nuovo radicale idroperossido. Si innesca pertanto un meccanismo di rigenerazione dei radicali che perpetua l'ossidazione dei composti fenolici nelle rispettive forme chinone (Karbowiak *et al.*, 2010).

La teoria maggiormente accettata a proposito dell'ossidazione dei polifenoli del vino, quindi, postula che durante la loro "autossidazione", si generi un potente agente ossidante, chiamato H_2O_2 , in grado di ossidare sia l'etanolo che l'acido tartarico (con formazione, rispettivamente, di acetaldeide e di acido gliossilico), ovvero i due costituenti presenti in concentrazione maggiore nel vino. A partire dall' H_2O_2 , inoltre, si forma $\text{OH}\cdot$ mediante una reazione catalizzata dai sali di ferro e a causa della natura fortemente ossidante di questo radicale, non solo l'alcol e l'acido tartarico ma molti altri costituenti del vino, in proporzione alla loro concentrazione, possono andare incontro ad ossidazione con conseguente produzione di aldeidi e di chetoni cioè di sostanze che, oltre ad avere un impatto diretto sull'aroma, possono inoltre reagire con i polifenoli influenzando la stabilità del colore.

Sono state evidenziate interazioni tra flavonoidi e acetaldeide e tra flavonoidi e acido gliossilico (prodotto dell'ossidazione dell'acido tartarico operata proprio dal radicale idrossido). Sembra inoltre possibile che una parte dell'acido piruvico che reagisce con gli antociani creando un pigmento stabile si origini dall'ossidazione dell'acido malico operata, ancora una volta, dal radicale idrossido (Laurie *et al.*, 2006)

Per quanto riguarda, invece, la seconda possibile strada, si ipotizza una prima reazione a carico dell'ossigeno, mediata da ioni metallici, che porta alla formazione di una specie reattiva in grado di fungere da ossidante. L'ossigeno cioè viene ridotto a radicale idroperossido

(reazione mediata dal Fe^{2+} che si ossida a Fe^{3+}) e in questa forma va ad ossidare i composti polifenolici con conseguente produzione di radicale semichinone che viene poi a sua volta ossidato nel corrispondente chinone. I composti polifenolici sono dei buoni donatori di idrogeno e conseguentemente permettono al radicale idroperossido di estrarre protoni dai gruppi idrossili. Il radicale idroperossido si riduce così a perossido di idrogeno accettando l'idrogeno radicale. In seguito può essere ridotto a radicale idrossido, per mezzo di una reazione mediata ancora una volta dagli ioni metallici, e si arriva nuovamente alla specie più reattiva.

Come dimostrano chiaramente questi meccanismi di ossidazione, le proprietà antiossidanti di un vino dipendono fortemente dal suo contenuto in polifenoli. I prodotti delle suddette reazioni, i semichinoni, sono stabilizzati per risonanza dalla delocalizzazione degli elettroni in posizione orto e para dell'anello aromatico e questo li rende sensibili ad altre reazioni radicaliche. Due radicali liberi semichinoni possono condividere i due elettroni spaiati formando un legame covalente e si crea così un dimero che può reagire con l'ossigeno. I semichinoni possono legarsi a dare trimeri, tetrameri e molecole più grosse che possono generarsi anche dall'unione di un semichinone e un polifenolo. L'imbrunimento dovuto ai chinoni aumenta all'aumentare del grado di polimerizzazione degli stessi (Karbowiak *et al.*, 2010).

Per quanto riguarda le ripercussioni che questi meccanismi hanno sull'aroma, il carattere cosiddetto "ossidato", conosciuto anche come "svanito", è ritenuto una pecca grave nei vini per i quali la freschezza dovrebbe essere dominante, è ricercato nell'affinamento di alcuni particolari tipi di vini (come il maderato) ed è considerato un difetto in tutti gli altri casi. Questo carattere svanito è legato a numerose trasformazioni. La combinazione di qualche mg/L di ossigeno induce inizialmente la scomparsa degli odori e successivamente la comparsa di nuovi odori come quello tipico di mela appena tagliata dovuto alla presenza di etanale. La velocità di formazione del carattere svanito è maggiore in presenza di temperature più elevate (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Una caratteristica comune dei vini svaniti, quindi, è la presenza di etanale libero che proviene dall'ossidazione diretta dell'etanolo in presenza di catalizzatori (Fe^{3+} , Cu^{2+}). Quest'aldeide, inoltre, può derivare anche da una debole dissociazione del diossido di zolfo combinato all'etanale, a seguito dell'ossidazione dell'anidride solforosa libera. Si può supporre, però, che la sola presenza dell'etanale non sia sufficiente a spiegare la comparsa di questo difetto; a tal proposito si può constatare che in un vino rosso fortemente ossidato, se si desidera far sparire il carattere svanito, occorre aggiungere una dose di anidride solforosa superiore a quella che sarebbe necessaria per combinare la totalità dell'etanale presente

(Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

I composti a cui si attribuiscono questi sentori di ossidato sono l'esanale, il metionale, l'eugenolo e varie aldeidi ma, a causa della complessità della matrice vino, non è noto il contributo di ognuna di queste sostanze nella formazione di questo *off-flavour* (Escudero *et al.*, 2002).

Le operazioni enologiche in grado di indurre questo tipo di difetto sono il travaso, l'imbottigliamento e il prelevamento di campioni dal momento che comportano delle aerazioni. L'ossidazione durante l'operazione di imbottigliamento è un fenomeno noto che colpisce maggiormente i vini rossi (perché meno solfitati) ed è conosciuto con il termine "malattia della bottiglia". Da qui nasce l'esigenza di conservare i vini per un certo periodo di tempo in cantina, in modo da lasciare il tempo al fenomeno della riduzione di bloccare il carattere dello svanito (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

1.6.2 Pratiche preventive dei fenomeni di ossidazione nei vini rossi

I vini rossi sono meno sensibili all'ossidazione rispetto ai vini bianchi; durante il loro affinamento, per prevenire i fenomeni ossidativi, occorre gestire nel modo opportuno non soltanto il fattore ossigeno ma anche quello temperatura. L'arieggiamento deve essere favorito nella fase iniziale per permettere da una parte la fuoriuscita dei gas dal vino e dall'altra la formazione di composti di combinazione con l'etanale di colore malva. Successivamente l'arieggiamento deve essere ridotto, ma non eliminato del tutto, in modo da mantenere un potenziale ossidoriduttivo sufficientemente elevato e tale da favorire l'evoluzione dei tannini. I dosaggi sono strettamente legati alla concentrazione di composti fenolici presenti nel vino stesso: in un vino povero di tannini, le reazioni di degradazione possono essere molto importanti mentre in un vino ricco di tannini i danni causati da tali reazioni saranno maggiormente tamponati (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

La conservazione del vino a basse temperature favorisce la dissoluzione dell'ossigeno e rallenta le diverse reazioni. La temperatura, infatti, influenza sia la dissoluzione sia l'attività dell'O₂ nei mosti e nei vini; a 20-25 °C la quantità massima di ossigeno disciolto è di circa 6-7 mg/L ma questa quantità può aumentare a temperature più basse ed è di circa 10 mg/L a 5 °C. Temperature elevate, in presenza di un ambiente ossidante, al contrario, favoriscono le reazioni di degradazione degli antociani e causano un viraggio del colore verso i toni aranciati (l'ossidazione degli antociani avviene più velocemente a 30 °C che a 20 °C) (Zironi *et al.*, 2010). Tuttavia la conservazione prolungata del vino a basse temperature non è consigliata perché può impedire l'evoluzione del prodotto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

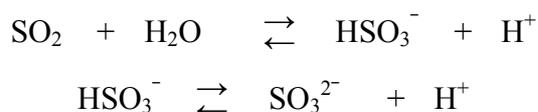
1.6.3 L'impiego del diossido di zolfo

Il diossido di zolfo (altrimenti chiamato anidride solforosa o, più semplicemente, SO₂) presenta numerose proprietà che lo rendono uno strumento pressoché indispensabile nei processi di vinificazione. Tra queste, le più importanti sono:

- la capacità antisettica: è in grado di inibire lo sviluppo dei microrganismi con un'attività che è maggiore nei confronti dei batteri piuttosto che dei lieviti. Durante la conservazione, l'anidride solforosa è in grado di opporsi allo sviluppo di tutti i microrganismi evitando, in questo modo, intorbidimenti dovuti ai lieviti, rifermentazioni dovute ai residui zuccherini, sviluppo di lieviti filmogeni (fioretta) e alterazioni di origine batterica;
- la capacità antiossidativa: è in grado di inibire in modo istantaneo l'azione degli enzimi ossidativi (tirosinasi, laccasi). Grazie a questa attività, l'anidride solforosa è in grado di proteggere i mosti dall'ossidazione prima dell'avvio della fermentazione;
- la capacità di legarsi: si combina con l'etanale e con altri composti simili proteggendo l'aroma dei vini;
- la capacità antiossidante: in presenza di catalizzatori, è in grado di combinare l'ossigeno disciolto, proteggendo i vini da un'eccessiva ossidazione dei composti fenolici e di alcune sostanze aromatiche, secondo la reazione:



Quando la SO₂ viene solubilizzata, si stabiliscono i seguenti equilibri (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003):



Nel vino esiste un equilibrio tra la forma molecolare e la forma ionica. Ai valori di pH del vino può esistere in forma molecolare, come SO₂, ma generalmente è più presente nella forma ionica, come ione bisolfito (HSO₃⁻). Lo ione solfito (SO₃²⁻) appare solo a valori di pH elevati e ai valori di pH del vino è presente in bassissime concentrazioni.

Una volta solubilizzato nel vino, il diossido di zolfo può combinarsi con un gran numero di molecole come l'acetaldeide, gli antociani, l'acido piruvico, l'acido glutarico, il glucosio e certi composti fenolici; di queste, l'etanale, l'acido piruvico e l'acido α-chetoglutarico sembrano quelle in grado di legarsi con maggiore efficienza. Il diossido di

zolfo è in grado di combinarsi anche con le aldeidi, i chinoni e gli acidi cheto che derivano dalle reazioni di ossidazione. Con il termine di “SO₂ libera” ci si riferisce alla SO₂ e al HSO₃⁻ non legati mentre con il termine “SO₂ combinata” alla SO₂ e al HSO₃⁻ legati principalmente ai composti insaturi (Karbowiak *et al.*, 2010).

La somma tra SO₂ libera e SO₂ combinata dà la SO₂ totale; solo la SO₂ libera è veramente attiva nei confronti dei processi di ossidazione mentre la SO₂ combinata ha proprietà antiossidanti molto meno importanti.

In realtà, si ipotizza ormai da qualche anno che il diossido di zolfo non svolga un'azione antiossidante vera e propria ovvero non consumi l'ossigeno (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003); grazie al suo basso potenziale ossidoriduttivo, la SO₂ in forma libera è in grado, invece, di ridurre i chinoni a catechine ossidandosi a solfato (Makhotkina, Kilmartin, 2009) (Limmer, 2005c).

La SO₂, inoltre, è in grado di reagire con il perossido d'idrogeno con conseguente diminuzione del potenziale ossidante. La reazione prevede uno spostamento nucleofilo di HSO₃⁻ ad opera del perossido d'idrogeno (H₂O₂) a dare HSO₄⁻. In questo modo il diossido di zolfo può inibire la reazione di formazione delle aldeidi fungendo da competitore per il perossido d'idrogeno (Karbowiak *et al.*, 2010).

Durante la vinificazione dei vini rossi, la soluzione di diossido di zolfo viene generalmente aggiunta dopo la pigiatura delle uve per proteggere il mosto, durante la conservazione e prima dell'imbottigliamento.

L'utilizzo di questo composto, comunque, è regolamentato e limitato a causa della sua accertata tossicità e ormai da molti anni si cercano delle soluzioni a tale problematica. Una delle alternative proposte è l'impiego dell'acido ascorbico (vitamina C) che, a differenza della SO₂, non è in grado di far regredire l'ossidazione dei composti fenolici, ma è un ottimo accettore di ossigeno. Sull'efficacia di tale trattamento, però, sono stati espressi a tutt'oggi pareri decisamente contrastanti. (Li *et al.*, 2008; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). E' stato dimostrato, infatti, che questo composto, nei vini, può reagire con l'ossigeno formando perossido di idrogeno; è proprio per evitare questo problema che l'acido ascorbico è normalmente utilizzato nei vini in combinazione con la SO₂ che è in grado di reagire con il perossido di idrogeno riducendo così il rischio di “danni da ossidazione” (Zironi *et al.*, 2010).

1.7 La riduzione dei vini rossi e i difetti ad essa associati

I difetti organolettici che vengono riassunti con la dicitura “carattere ridotto” derivano sovente dalla presenza nei vini di composti solforati quali tioli (R-S-H), solfuri (R-S-R) e disolfuri (R-S-S-R). I tioli sono conosciuti anche con il termine “mercaptani” in quanto possono formare precipitati di sali insolubili con il mercurio (Valitutti *et al.*, 1998). Questo legame tra il carattere ridotto e la presenza di prodotti solforati è in effetti giustificabile. I sistemi redox tioli-disolfuri, infatti, presentano valori di potenziale normale particolarmente bassi ($-270 \leq E_0 \leq -222$ mV) in rapporto ai valori di potenziale redox dei vini ($+ 220 \leq E \leq + 450$ mV). Dunque la comparsa dei tioli e dei sentori corrispondenti in certi vini può ragionevolmente far supporre un potenziale ossidoriduttivo eccessivamente basso di questi ultimi.

Composti solforati, responsabili di odori sgradevoli, possono svilupparsi già durante la fermentazione alcolica, ad opera dei lieviti e a causa della complessità del loro metabolismo dello zolfo. I meccanismi biochimici alla base della produzione di queste molecole sono numerosi, le teorie che ne spiegano l’insorgenza sono contraddittorie e, al momento, non sono conosciute strategie preventive sicure (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

I composti implicati in questo tipo di difetto organolettico possono essere classificati in due categorie: composti solforati “leggeri” e composti solforati “pesanti”.

- Composti solforati “leggeri”: hanno un punto di ebollizione inferiore a 90 °C e sono responsabili di odori particolarmente sgradevoli (uovo marcio, aglio, cipolla, ...); anche se presenti in basse concentrazioni, pari a qualche $\mu\text{g/L}$, sono in grado di distruggere l’aroma di un vino. Fra tutti i composti solforati leggeri identificati e dosati nei vini, i mercaptani sono quelli maggiormente coinvolti nei difetti di riduzione; nei vini “ridotti”, la loro concentrazione è sempre molto superiore alla soglia di percezione. L’idrogeno solforato (H_2S) e il metantiolo sono mercaptani che derivano direttamente dal metabolismo dei lieviti. L’idrogeno solforato deriva dalla riduzione enzimatica dei solfati e dalla biosintesi di cisteina e metionina (aminoacidi solforati). Il metantiolo, invece, è sintetizzato dai lieviti a partire dalla metionina.

La produzione eccessiva di H_2S si verifica durante la fermentazione di mosti carenti di azoto, con meccanismi che però non sono ancora chiari. Secondo alcuni, nei mosti carenti di azoto, è stimolata l’attività proteasica dei lieviti con conseguente formazione, a partire dalle proteine del mosto, di aminoacidi solforati. Secondo altri le proteasi acide fungine

sono inattive sulle proteine dell'uva. Comunque sia, in presenza di una fonte di azoto facilmente assimilabile, i lieviti non producono più H₂S a partire dagli aminoacidi solforati; quindi l'aggiunta di solfato di ammonio ai mosti carenti di azoto, per prevenire la formazione di H₂S, è pratica comune e corretta.

La produzione di H₂S da parte dei lieviti dipende anche dalla composizione in aminoacidi del mosto: cisteina, omocisteina, acido aspartico, acido glutammico, glicina, istidina, omoserina, lisina, ornitina, traonina e serina favoriscono la produzione di H₂S mentre la metionina ne inibisce la formazione (retro-inibizione della via di attivazione e di riduzione dei solfati) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003)

- Composti solforati “pesanti”: hanno un punto di ebollizione superiore a 90 °C. Sono anch'essi originati dal metabolismo dei lieviti, sono stati identificati in gran numero nei vini, ma sono stati molto meno studiati rispetto ai composti solforati “leggeri” in quanto solo qualcuno partecipa in modo significativo al sentore di ridotto. Fra questi occorre sicuramente citare il metionolo, prodotto dai lieviti in seguito alla cosiddetta reazione di Ehrlich che consiste nella iniziale deaminazione e successiva decarbossilazione della metionina. Si forma così un'aldeide (metionale) ridotta poi enzimaticamente nell'alcol corrispondente. Un altro composto solforato pesante che occorre ricordare è il 2-mercaptoetanol, generato dai lieviti a partire dalla cisteina del mosto mentre il 2-metiltetraidrotiofenone interviene solo come schermo olfattivo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

La comparsa nei vini di difetti di riduzione, quindi, è riconducibile alla produzione da parte dei lieviti, nel corso della fermentazione alcolica, di molecole solforate dall'odore sgradevole in concentrazioni elevate ed anormali (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). Un vino, quando viene imbottigliato, non può essere mai completamente esente da solfuri. Il processo fermentativo lascia un'impronta solforata la cui composizione dipende dal tipo di lievito e dalle condizioni nutritive nelle quali la fermentazione si svolge. Una volta che il vino è stato imbottigliato non vi è più alcuna nuova fonte di composti solforati dunque la spiegazione logica dell'insorgere dei difetti da tioli e solfuri nel vino in bottiglia è legata alla rottura per riduzione dei disolfuri formati per ossidazione dei tioli (Limmer, 2005a).

1.7.1 Pratiche preventive e curative dei fenomeni di riduzione nei vini rossi

Abbassare i livelli di H₂S è relativamente semplice a causa della grande volatilità di questo composto; è sufficiente, infatti, operare un travaso con aerazione.

Abbassare i livelli di metantiolo e di metionolo, invece, non è altrettanto semplice. La concentrazione di questi composti rimane costante o, addirittura, aumenta nel corso della conservazione. E' quindi molto importante evitare la formazione di questi composti maleodoranti.

Assumono a questo proposito grande importanza la scelta del ceppo di lievito (che deve essere basso produttore di composti solforati), l'analisi dell'azoto prontamente assimilabile presente nel mosto (il cosiddetto APA), le dosi di solfitazione del mosto e poi del vino. E' indispensabile, inoltre, controllare il vino giovane tutti i giorni, prelevando un campione dal fondo del recipiente, per constatare il più velocemente possibile l'eventuale comparsa di tale difetto (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Al primo sentore di odori solfidrici, occorre intervenire rapidamente in quanto queste prime deviazioni olfattive si eliminano facilmente; una pratica comune in cantina è rappresentata infatti dall'arieggiamento del vino mediante travaso. La spiegazione della scomparsa del sentore ridotto va ricercata nella relativamente facile ossidazione dei tioli a disolfuri. Il metantiolo, ad esempio, ha una soglia di percezione di 0.2 µg/L; a contatto con l'ossigeno si ossida originando disolfuro di metile che ha una soglia di percezione pari a 12 µg/L e questo porta, sensorialmente, ad una scomparsa del difetto. Questa reazione, però, è di tipo reversibile per cui, mesi dopo, in bottiglia, il difetto riapparirà se l'ambiente sarà eccessivamente ridotto a causa dell'impiego di tappi a bassissima permeabilità all'ossigeno (Limmer, 2005a). Se non si interviene rapidamente, però, trascorso un certo periodo di tempo, si formano mercaptani più stabili e meno sensibili ai trattamenti ossidanti. L'insorgenza di questo problema è più rara nei vini affinati in *barriques* dove il potenziale di ossidoriduzione è mantenuto ad un livello più elevato (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda, invece, le pratiche "curative", una delle tecniche più diffuse per eliminare i solfuri formati in post-fermentazione consiste nell'aggiunta di rame in pre-imbottigliamento, rame che ha la capacità di rimuovere i composti solforati leggeri quali tioli (mercaptani) e idrogeno solforato (H₂S). Questo tipo di trattamento, però, non ha effetto sui composti solforati che non reagiscono con il rame tra i quali ci sono i disolfuri.

L'aggiunta di rame, inoltre, presenta alcuni problemi. Prima di tutto il rame, al di sopra di una certa concentrazione, può divenire instabile (la casse rameica può instaurarsi sopra gli 0.5 mg/L, concentrazione che può essere superata se si vuole mantenere una certa presenza di rame libero) ed inoltre il regolamento CE autorizza l'impiego di 1 g/hL di solfato di rame alla condizione che il tenore in rame del vino trattato non superi 1 mg/L, limiti legali che con questa pratica possono essere facilmente superati. Tale composto, poi, ha un effetto

negativo sugli aromi varietali di alcuni vitigni. Infine, cosa ancora più importante, il rame interviene come catalizzatore nelle reazioni ossidative del vino (reazione di Fenton).

Stabilito che queste tecniche curative presentano diverse e gravi controindicazioni, l'ultima opzione possibile per risolvere il problema dell'insorgenza del ridotto consiste nel permettere l'ingresso dell'ossigeno in bottiglia. I tioli, è stato già accennato, si ossidano con facilità quindi l'ingresso in bottiglia di una piccola quantità di ossigeno, sufficiente a mitigare l'accumulo di tioli, sembra essere il metodo più semplice e meno problematico per raggiungere il suddetto obiettivo. Questo è, in effetti, il compito che è stato svolto dal tappo di sughero per secoli: consentire l'ossidazione dei tioli a disolfuri, permettendo quindi il passaggio da composti che hanno una bassa soglia di percezione a composti che hanno una soglia di percezione molto superiore (Limmer, 2005b).

2. Lo strumento dell'analisi sensoriale

L'analisi sensoriale può essere definita come “lo studio, l'analisi, la descrizione, la definizione e la classificazione” del prodotto mediante l'uso dei sensi. Nonostante l'analisi chimica dei vini abbia compiuto notevoli progressi negli ultimi anni, permettendo la quantificazione dettagliata delle sostanze polifenoliche e aromatiche, ovvero dei composti importanti per le proprietà organolettiche, l'analisi sensoriale è ancora oggi il principale mezzo per la valutazione della qualità di un vino. Questo è dovuto al gran numero di composti presenti nel vino, che solo in parte sono stati identificati, e alla complessità dei rapporti che tra essi intercorrono. Anche nel settore enologico, così come nella maggior parte dei settori del comparto alimentare, l'analisi sensoriale consente di conoscere le preferenze dei consumatori, di controllare la qualità durante il processo produttivo e di valutare gli impatti che le nuove tecnologie hanno sul prodotto considerato (Kobler, 2008).

Nel corso degli ultimi anni l'obiettivo è stato quello di sviluppare metodi qualitativi e quantitativi per misurare, in modo oggettivo, la percezione sensoriale e per correlarla con le proprietà del prodotto. Lo scopo di tale ricerca è quello di mettere in relazione le qualità sensoriali del prodotto con misure strumentali oggettive delle sue proprietà chimiche e/o fisiche (Cozzolino *et al.*, 2005).

Sono stati proposti diversi metodi in campo sperimentale atti a quantificare le sensazioni percepite dai sensi come quelli basati sulla discriminazione (test triangolare, duo-trio test) e quelli basati sulla descrizione (valutazione dei profili sensoriali di un prodotto in modo quantitativo) (Pagliarini *et al.*, 2002).

Un aspetto molto importante nell'analisi sensoriale è la scelta del tipo di scala da utilizzare per la valutazione del prodotto e occorre distinguere tra scala di misura strutturata e scala di misura non strutturata.

Una scala di misura strutturata (o discontinua) è quella che fornisce non solo la classifica dei vini assaggiati ma anche le distanze tra di loro. Una scala di questo tipo presenta degli indubbi vantaggi in quanto i valori ottenuti da queste schede sono adatti ad essere sottoposti a tutti i procedimenti matematici e statistici; se la scala viene suddivisa in un numero sufficiente di intervalli, la distribuzione dei dati si avvicina alla curva di Gauss. Una scala di questo tipo, però, presenta anche delle limitazioni di ordine psicologico in quanto il degustatore ha a disposizione un ristretto numero di graduazioni precostituite e può essere condizionato dal significato semantico dei numeri presenti sulla scala.

Una scala di misura non strutturata (o continua o grafica) è caratterizzata da due soli punti di riferimento posti alle estremità. Le schede con scale di misura di questo tipo si sono affermate nel corso degli ultimi anni in concomitanza con il diffondersi della tecnica descrittiva dei profili e risolvono alcuni dei problemi suddetti. Il degustatore può valutare il vino in esame nel modo più libero possibile consentendo così all'utente la formulazione di giudizi molto differenziati (Kobler, 2008). Nelle schede non strutturate a ruota, le scale di misura si identificano con i raggi di una ruota, come nella scheda di Brandy (figura 7).

- 1 Tonalità cromatica (giallo al centro, marrone alla periferia)
- 2 Finezza aromatica
- 3 Fruttato
- 4 Ricchezza aromatica
- 5 Sapore amaro
- 6 Intensità cromatica
- 7 Franchezza arom.
- 8 Aroma di affinamento
- 9 Alcolicità al gusto
- 10 Armonia
- 11 Intensità aromatica
- 12 Aroma alcolico
- 13 Morbidezza al gusto
- 14 Persistenza

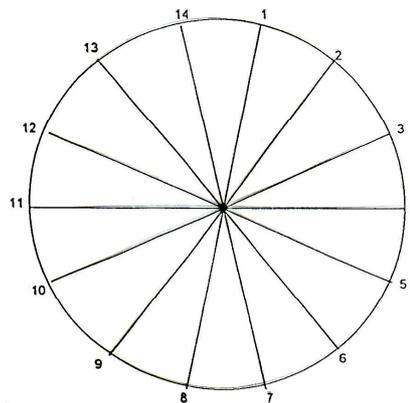


Figura 7: Scheda a ruota di Brandy (Pagliarini et al., 2002).

Un altro esempio di scheda non strutturata è quella nella quale la scala di misura è rappresentata dalla diagonale di un quadrato; è indicata per quei parametri nei quali l'espressione ottimale di una caratteristica coincide con il suo massimo (figura 8).

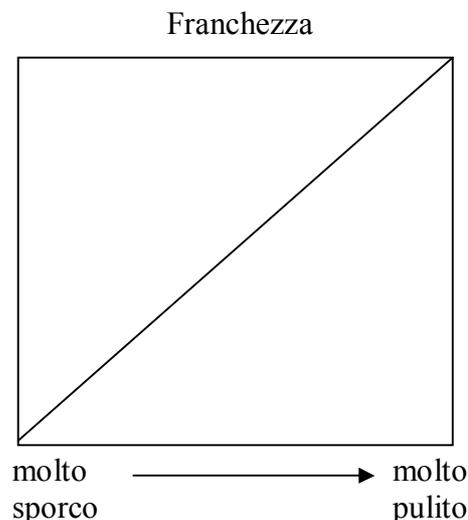


Figura 8: Scheda non strutturata modificata (Kobler, 2008).

Una scala di forma triangolare (figura 9) è stata proposta, invece, per valutare quelle caratteristiche sensoriali per le quali il raggiungimento dell'espressione ottimale avviene prima del raggiungimento del valore massimo (come, ad esempio, l'evoluzione del contenuto polifenolico); in questa scheda l'apice corrisponde all'evoluzione ottimale del prodotto (Kobler, 2008).

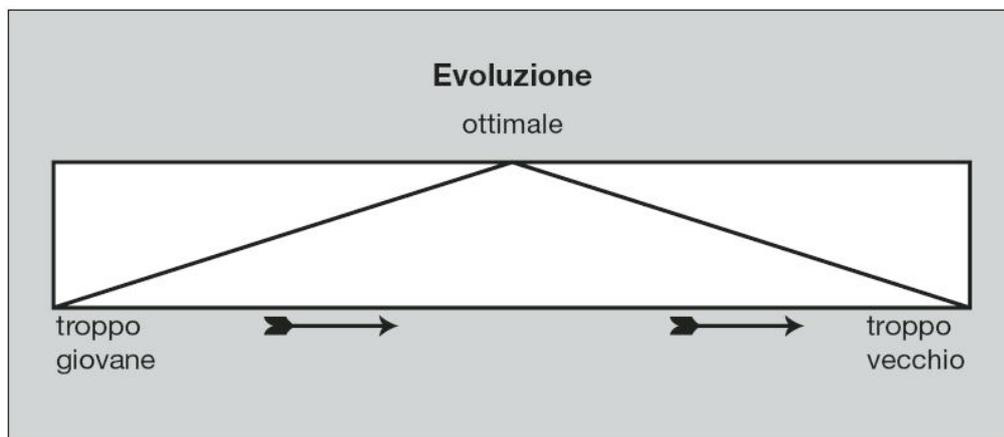


Figura 9: Scala non strutturata di evoluzione di un vino (Kobler, 2008).

Queste schede, quindi, presentano delle scale generalmente costituite da una linea continua con due soli punti di riferimento alle estremità; il giudice è tenuto ad indicare graficamente la posizione che assume il campione in assaggio in funzione dell'intensità della percezione (lo scopo è quello di sottolineare anche graficamente il nesso tra intensità e giudizio). La sua valutazione viene poi convertita in numero misurando fisicamente la distanza che intercorre tra il segno messo dal giudice e l'estremità della scala (Kobler, 2008).

Questo approccio grafico e non strutturato si dimostra particolarmente utile nella valutazione sia delle caratteristiche sensoriali complesse, come lo stato evolutivo di un vino, sia della eventuale presenza di caratteri di ossidazione o di riduzione.

3. Analisi univariata ed analisi multivariata. Due metodiche a confronto

Tradizionalmente, le ricerche nel campo dell'uva e del vino, sono state condotte con metodiche che si possono adeguatamente definire con il termine "univariate" in quanto prendono in considerazione l'effetto di una sola delle variabili che compongono l'intera matrice.

Molti metodi statistici, infatti, si sono evoluti intorno al 1920, quando i campioni erano "economici" mentre le analisi molto costose. Nel corso dei decenni, però, la tecnologia ha subito profondi cambiamenti e oggi sono spesso i campioni ad essere costosi mentre le analisi sono divenute molto più economiche.

Analizzando l'effetto di una variabile alla volta per mezzo della tecnica nota come "Analisi della Varianza" (ANOVA), è possibile ottenere delle utili informazioni descrittive ma non si riescono ad ottenere informazioni specifiche sulle relazioni tra le diverse variabili e sulle altre importanti relazioni presenti nella matrice considerata nel suo insieme (Cozzolino *et al.*, 2009). I sistemi reali sono normalmente "multivariati" e quindi non possono essere adeguatamente descritti selezionando e studiando una sola delle variabili senza correre il rischio di rappresentarli in modo errato (Cozzolino *et al.*, 2005).

L'analisi multivariata dei dati nasce nel 1960 e viene impiegata, inizialmente, per analisi nel campo della chimica organica ed analitica. Questa metodica si evolve grazie all'introduzione di strumenti moderni, in grado di dare risposte multivariate per ognuno dei campioni analizzati e grazie alla disponibilità di computer sempre più sofisticati.

Nel campo delle misurazioni della chimica moderna si ha oggi a che fare con così tanti dati che l'informazione essenziale può non essere immediatamente evidente (come nel caso delle analisi cromatografiche dove per ogni campione vengono registrati molti picchi, o quelle spetttrali dove si considerano numerose lunghezze d'onda per ogni campione). Tradizionalmente, gli analisti hanno cercato di eliminare le interferenze della matrice isolando o estraendo l'analita in modo da rendere la misura semplice e certa. Questo approccio, però, non prende in considerazione il campione nella sua totalità ma nelle sue singole componenti e questo non consente di mettere in luce i possibili effetti delle interazioni chimiche e fisiche che si possono instaurare fra i diversi costituenti presenti e le conseguenze sull'intera matrice, aspetto questo evidente quando si opera con materie prime complesse come l'uva e il vino.

L'analisi univariata prende in considerazione il contributo di una sola variabile e

questo può portare ad una semplificazione e ad una “banalizzazione” del sistema che si sta analizzando. L’analisi multivariata, invece, permette di superare la visione “unidimensionale” tipica dell’analisi univariata. In molte situazioni, l’analisi multivariata consente di mettere in luce quelli che sono i costituenti più importanti attraverso differenti interferenze ed interazioni. Può apparire, in prima battuta, come una metodica che fornisce risultati meno certi, meno sicuri, ma in realtà, considerando il sistema nella sua complessità, produce risultati molto più attendibili.

Le tecniche chemiometriche di tipo multivariato consistono nell’applicazione di metodi matematici e statistici alla chimica; diversamente dalla statistica classica, prendono in considerazione più variabili simultaneamente, analizzando le variazioni di una variabile, o di un gruppo di variabili, in termini di co-variazioni con altre variabili. Questo tipo di analisi può descrivere matematicamente il grado di associazione tra le variabili (Co-varianza) e può inoltre individuare delle funzioni matematiche (modelli di regressione) per mezzo delle quali il valore di una variabile dipendente (predittore) viene calcolato a partire dal valore delle variabili indipendenti (regressori) misurate.

Oggi molte tecniche di valutazione della qualità dei prodotti alimentari sono multivariate e basate sulla misura indiretta delle proprietà chimiche, fisiche e sensoriali. Frequentemente queste tecniche strumentali mostrano che non c’è interazione diretta con la proprietà d’interesse come, ad esempio, con la concentrazione di una particolare sostanza chimica nel campione ma piuttosto con le interferenze chimiche e fisiche che si originano nel campione stesso.

La ricerca sull’analisi multivariata dei dati comprende molti differenti metodi che possono essere applicati in diversi campi della scienza e della tecnologia. Le tecniche di analisi multivariata dei dati più comunemente impiegate nel campo enologico sono l’analisi delle componenti principali (PCA, Principal Component Analysis) e la regressione mediante metodo dei minimi quadrati parziali (PLS, Partial Least Squares) (Cozzolino *et al.*, 2009).

3.1 Elaborazione statistica nell’analisi multivariata dei dati

Per quanto concerne il campo enologico, in letteratura sono riportate sia applicazioni quantitative che qualitative dell’analisi multivariata dei dati. Molte riguardano l’uso della PCA e della PLS.

PCA. L'analisi delle componenti principali è un metodo di elaborazione statistica dei dati finalizzato ad estrarre la massima informazione possibile contenuta in una struttura di dati multivariati, sintetizzandola in poche combinazioni lineari delle variabili stesse. Questo metodo viene frequentemente impiegato nella prima fase di elaborazione dei dati e serve a dare una visione generale del problema, a capire le relazioni tra gli oggetti e/o le classi considerate e a fornire un'indicazione preliminare sul ruolo delle variabili. Dal punto di vista geometrico la PCA consiste in un processo di rotazione dei dati originali, effettuato in modo che il primo nuovo asse sia orientato nella direzione della massima varianza dei dati, il secondo sia perpendicolare al primo e sia nella direzione della successiva massima varianza dei dati, e così di seguito. Il numero di questi nuovi assi (le componenti principali o fattori) sarà pari al numero di variabili originali. La prima componente principale sarà in grado di spiegare la maggior percentuale di varianza, la seconda ne spiegherà un po' meno, la terza meno ancora e così via, fino a che le ultime componenti contribuiranno a spiegare poco o nulla della variabilità presente nei dati in esame. Un aspetto di grande rilevanza nello studio di problemi multivariati riguarda la possibilità di vedere graficamente i dati. La PCA ci consente di rappresentare graficamente sia i soli oggetti (casi o campioni), mediante quello che è definito *score plot*, sia delle sole variabili mediante quello che è definito *loading plot*, sia degli oggetti e delle variabili contemporaneamente (*biplot*) in funzione dei valori assunti da due delle componenti principali costruite dalla funzione matematica. Per ogni componente principale utilizzato nella costruzione del grafico viene espressa anche la quantità percentuale di varianza spiegata dalla singola componente (Rencher, 2002).

PLS. Un modello di regressione lineare semplice consente di studiare la relazione lineare tra una variabile di risposta Y (detta variabile dipendente o predittore) e una variabile esplicativa (detta variabile indipendente o regressore). La regressione lineare multipla è una variante della precedente in cui la variabile di risposta Y è studiata a partire da più variabili esplicative (Conzen, 2006).

La PLS è un sistema di regressione lineare multipla in cui prima di costruire la retta di regressione viene effettuata una fattorizzazione dei dati (rappresentazione dei dati originali in un sistema di coordinate più efficiente) mediante analisi delle componenti principali. La regressione non viene quindi costruita a partire dai dati originali (assorbimento alle diverse lunghezze d'onda), ma a partire dai fattori ottenuti mediante un'analisi delle componenti principali (PCA) effettuata tenendo conto sia dei valori assunti dalle variabili esplicative, che dei valori della variabile di risposta. Il primo fattore generalmente spiega le maggiori

variazioni spettrali, con i fattori successivi si caratterizza la varianza residua.

Lo sviluppo di un modello multivariato mediante la tecnica PLS prevede di seguire una precisa sequenza di operazioni:

1. Misura accurata degli spettri dei campioni di calibrazione e dei valori di riferimento relativi alla variabile da predire.
2. Verifica del *set* di dati per identificare l'eventuale presenza di *outlier* o di campioni non corretti. L'individuazione di eventuali *outlier* può essere effettuata in diverse fasi del processo di costruzione del modello (Conzen, 2006). Nella fase iniziale si effettua una PCA che permette di individuare graficamente campioni che presentano un comportamento molto diverso da quello del resto del *dataset* (Lieti *et al.*, 2005).
3. Selezione del *range* di dati su cui lavorare (*range* spettrale nel caso di analisi spettroscopiche) e scelta del tipo di pretrattamento da applicare ai dati. I *software* statistici sviluppati per la costruzione di modelli PLS a partire dai dati spettrali offrono una vasta gamma di possibilità di pretrattamento dei dati (Normalizzazione Minimo-Massimo, *Offset Correction*, Normalizzazione Vettoriale, *Multiplicative Scattering Correction*, Derivata Prima, Derivata Seconda), che permettono di amplificare le differenze tra i campioni. Generalmente i *software* dedicati a questo tipo di analisi offrono la possibilità di individuare in maniera automatica le zone spettrali e il tipo di pretrattamento dei dati che consentono di ottenere i modelli migliori (Conzen, 2006; Romia *et al.*, 2009).
4. Costruzione del modello di calibrazione.
5. Validazione del modello. Durante questa fase del processo viene valutata la capacità del metodo di regressione individuato di predire il valore della variabile dipendente in un *set* di campioni incogniti. Per la validazione si può utilizzare la tecnica della Validazione interna (*Cross validation*) o della Validazione esterna (*Test set validation*). Nel primo caso la validazione viene effettuata con lo stesso *data set* di campioni utilizzato per la calibrazione, mediante esclusione dal *data set* di un campione per volta e analisi del resto dei campioni utilizzando il modello precedentemente costruito. Nel secondo caso il *data set* viene diviso in due sottogruppi omogenei, uno dei quali è utilizzato in calibrazione per la costruzione del modello e l'altro in validazione per valutare l'efficacia del modello in predizione (Conzen, 2006; Naes *et al.*, 2002; Romia *et al.*, 2009). In questa fase vengono calcolati una serie di parametri utili a valutare la bontà e la robustezza del modello di regressione che è stato costruito:

- R² in calibrazione ed R² in validazione:
È dato dal quadrato del coefficiente di correlazione tra i valori reali ed i valori stimati e indica la percentuale di varianza spiegata dal modello di regressione. Tanto più è alto tanto maggiore è la correlazione tra il predittore e le variabili esplicative e tanto maggiore è la percentuale di varianza spiegata dal modello.
- RMSEE (Root Mean Square Error of Estimation):
Da un'indicazione dell'errore commesso in calibrazione e viene calcolato a partire dalla somma dei residui al quadrato, dove per residui si intende la differenza tra il dato reale e il dato ricostruito dopo la fattorizzazione. Un vantaggio derivante dall'utilizzo dell'RMSEE risiede nel fatto che viene espresso nella stessa unità di misura dei dati originali.
- RMSECV (Root Mean Square Error of Cross Validation):
Fornisce una misura quantitativa della precisione con cui i campioni sono predetti durante la validazione interna. Come il precedente presenta il vantaggio di essere espresso con la stessa unità di misura dei dati originali.
- RMSEP (Root Mean Square Error of Prediction):
Fornisce una misura quantitativa della precisione con cui i campioni sono predetti durante la validazione esterna (*Test set validation*).
- RPD (Residual Prediction Deviation):
È un indice che fornisce indicazioni sulla robustezza del metodo, cioè sulla capacità del metodo di predire correttamente il valore della variabile dipendente anche per campioni con caratteristiche diverse da quelle dei campioni utilizzati in calibrazione. È dato dal rapporto tra la deviazione standard dei valori di riferimento e l'errore standard in predizione. Può essere impiegato per valutare la robustezza del metodo sia in calibrazione che in validazione. In fase di validazione per valori RPD < 2.5 si ritiene che il metodo non sia ancora sufficientemente robusto per poter predire correttamente il valore della variabile dipendente in un campione incognito. Si considerano buoni modelli con RPD > 5 ed eccellenti modelli con RPD > 8 (Conzen, 2006; Naes *et al.*, 2002).

4. Tecniche analitiche impiegate nel settore alimentare

Nel settore dell'industria alimentare si stanno diffondendo sempre più alcune tecniche analitiche che permettono di studiare in modo rapido ed economico le caratteristiche qualitative dei prodotti come la spettrofotometria UV-VIS e la spettroscopia di assorbimento infrarosso FT-IR. La spettroscopia del vicino infrarosso (NIR), ad esempio, registra la risposta dei legami molecolari dei costituenti chimici alla radiazione del vicino infrarosso (ad esempio dei legami O-H, N-H, C-H) e, in tal modo, produce uno spettro caratteristico che funge da “impronta digitale” del campione (Cozzolino *et al.*, 2005). Questa tecnica, in particolare, fornisce l'informazione relativa alla composizione del campione sulla base del comportamento vibrazionale delle combinazioni dei legami delle molecole in esso presenti (Liu *et al.*, 2008). E' una metodica che ha raggiunto una certa popolarità perché è rapida, semplice e sensibile (Kocaoglu-Vurma *et al.*, 2009). La spettroscopia del medio infrarosso (MIR), invece, permette la discriminazione dei costituenti organici e produce un'impronta biochimica distinta e riproducibile (Kocaoglu-Vurma *et al.*, 2009). Tutto questo apre alla possibilità di usare gli spettri per determinare i complessi attributi degli alimenti come gli aspetti qualitativi e le caratteristiche sensoriali. In questo senso, le tecniche spettrali che lavorano nelle regioni dell'ultravioletto (UV), del visibile (VIS), del medio infrarosso (MIR) e del vicino infrarosso (NIR), abbinate all'analisi multivariata dei dati e alla costruzione di modelli di regressione, offrono la possibilità di acquisire i dati in modo molto rapido (i campioni possono essere analizzati in linea) e di ottenere simultaneamente un numero elevato di parametri (Cozzolino *et al.*, 2005).

4.1 Spettrometria UV-VIS

La spettrofotometria UV-VIS si basa sull'assorbimento selettivo, da parte di molecole, delle radiazioni con lunghezza d'onda compresa fra 10 nm e 780 nm. Si distinguono tre regioni principali:

- da 10 nm a 200 nm detto UV lontano (a queste lunghezze d'onda si ha l'assorbimento dell'ossigeno per cui si opera sottovuoto per non avere rumore di fondo);
- da 200 nm a 380 nm detto UV vicino;
- da 380 nm a 780 nm detto visibile.

Nel settore enologico la spettrometria UV-VIS è ampiamente utilizzata per la valutazione di diversi parametri. Misurando l'assorbimento a 280 nm, caratteristico dei cicli benzenici della maggior parte dei polifenoli, si analizza il contenuto in polifenoli di un determinato vino. Misurando l'assorbimento a 520 nm, caratteristico degli antociani (colore rosso), a 420 nm, caratteristico dei tannini polimerizzati (colore giallo) e a 620 nm, caratteristico del complesso antociani-tannini legati mediante ponte etanale (colore blu), si possono poi calcolare l'intensità colorante (che è uguale alla somma dei tre), la tonalità (che è uguale al rapporto tra DO420 e DO520), la tinta, la composizione del colore e la purezza del colore rosso di un determinato vino.

Tale metodica è impiegata anche per la valutazione di molti altri parametri analitici la cui determinazione è basata sulla lettura dell'assorbimento ad una specifica lunghezza d'onda (analisi enzimatiche, analisi degli zuccheri, ...). In questo caso, però, l'approccio analitico è di tipo "univariato" in quanto mette in relazione un solo parametro con la misura ottenuta.

Molto più interessante appare, invece, un approccio multivariato che permetta di considerare l'assorbanza alle diverse lunghezze d'onda dello spettro e di individuare le possibili relazioni esistenti tra le caratteristiche dello spettro e i parametri analitici o sensoriali (Roussel *et al.*, 2003; Cozzolino *et al.* 2004; Cozzolino *et al.* 2006; Janik *et al.*, 2007).

Anche nel settore enologico, l'uso dell'analisi multivariata, in combinazione con le tecniche spettrali, offre spesso un nuovo e migliore approccio nel complesso problema della misura delle numerose componenti chimiche e della loro influenza. Questo metodo si sta diffondendo proprio per la versatilità, la flessibilità, l'efficacia e la ricchezza delle informazioni che permette di ottenere (Cozzolino *et al.*, 2009).

4.2 Spettroscopia FT-IR

La spettroscopia di assorbimento infrarosso, il cui acronimo FT-IR deriva dall'inglese Fourier Transform Infrared Spectroscopy, si basa sull'assorbimento da parte di molecole delle radiazioni con lunghezze d'onda comprese tra:

- da 780 nm a 2.500 nm detto IR vicino (NIR);
- da 2.500 nm a 50.000 nm detto IR medio (MIR);
- da 50.000 nm a 100.000 nm detto IR lontano (FIR).

È una tecnica analitica che presenta numerosi vantaggi in quanto necessita di ridotte

quantità di campione per l'analisi (non è distruttiva), offre la possibilità di analizzare il campione tal quale e permette di eseguire velocemente sia analisi qualitative che quantitative su composti in qualsiasi stato fisico (solidi - cristallini, microcristallini o amorfi – liquidi o gassosi).

In figura 10 è riportata la rappresentazione delle regioni principali dello spettro elettromagnetico con l'esempio di uno spettro FT-IR raccolto nella regione del medio infrarosso.

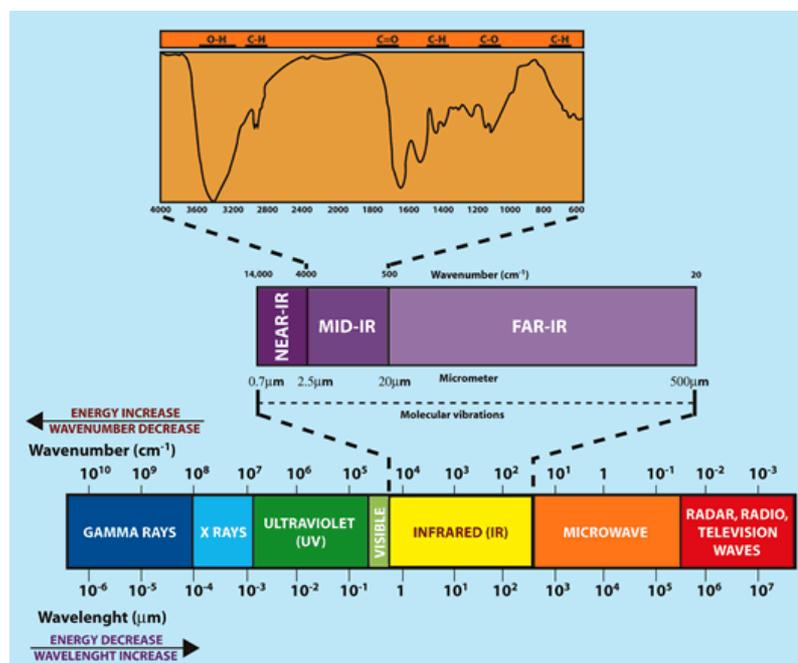


Figura 10: Esempio di spettro FT-IR raccolto nella regione del medio infrarosso.
<http://www.enco-journal.com/journal/ej30/birelli.html>

Le principali tecniche utilizzate per l'acquisizione degli spettri FT-IR sono:

- **Trasmissione:** è la tecnica di analisi più semplice e consiste nel far passare la radiazione IR attraverso il campione. L'applicazione di questa tecnica è possibile su campioni sia solidi che liquidi purché siano omogenei e presentino uno spessore molto ridotto. Spesso l'utilizzo di questa tecnica richiede un'attenta e lunga preparazione del campione.
- **Riflettanza diffusa:** a differenza di quanto accade nella tecnica per trasmissione in questo caso viene misurata la quantità di radiazione riflessa dal campione ed è una tecnica non distruttiva che richiede ridotti interventi di preparazione del campione. Quando una radiazione IR viene focalizzata su di un campione si possono osservare diversi fenomeni: assorbimento, riflessione diretta, riflessione interna, diffusione (in tutte le direzioni). Nel caso della riflettanza diffusa viene acquisita dal rivelatore la quantità di radiazione che viene riflessa in tutte le direzioni per diffusione. Questa tecnica è particolarmente adatta all'analisi di campioni solidi o di polveri caratterizzati da una certa disomogeneità.

- Riflettanza totale attenuata (ATR): è una tecnica di riflessione in cui la radiazione IR è convogliata attraverso un elemento di riflessione interna costituito da un cristallo trasparente all'IR dotato di un elevato indice di rifrazione (Diamante, Germanio, Seleniuro di zinco). La riflessione all'interno del cristallo genera una radiazione evanescente che fuoriesce dalla superficie del cristallo e penetra nel campione che viene posto in contatto con il cristallo stesso. Penetrando nel campione la radiazione subisce un'attenuazione dovuta all'assorbimento da parte del campione stesso in determinate regioni spettrali. La radiazione attenuata viene rilevata dal detector e fornisce informazioni sulla composizione e sulla struttura del campione. Questa tecnica analitica può essere applicata sia sui liquidi che sui solidi e non richiede preparazione del campione. L'unica condizione che deve essere rispettata è lo stretto contatto tra il campione ed il cristallo (Lin *et al.* 2009).

L'applicazione delle tecniche FT-IR nel settore dell'industria alimentare e conseguentemente anche in campo enologico è strettamente legata allo sviluppo dei sistemi di analisi multivariata dei dati (Cozzolino *et al.*, 2009a). Gli spettri FT-IR contengono un'elevata quantità di informazione relativa alla composizione e alla struttura del campione, ma quest'informazione non è correlabile in maniera semplice e diretta ad un dato analitico a meno di non utilizzare sistemi complessi di elaborazione statistica dei dati che consentano di separare l'informazione dal rumore e che tengano conto delle interazioni tra le variabili (Lin *et al.*, 2009).

Nel settore enologico l'applicazione di queste tecniche è stata sfruttata per la valutazione dei parametri di base nell'uva e nel vino (grado alcolico, acidi, zuccheri, ecc.) sia con tecniche FT-MIR, che hanno permesso l'analisi contemporanea di 12 parametri in meno di 90 secondi (Patz *et al.*, 2004), che con tecniche FT-NIR (Urbano-Cuadrado *et al.* 2004; Cozzolino *et al.*; 2004; Janik *et al.*; 2007; Fernández-Novales *et al.*; 2009). Le stesse tecniche analitiche sono state utilizzate anche per costruire modelli di classificazione dei vini in base alla varietà (Roussel *et al.*; 2003) o all'origine (Cozzolino *et al.*, 2009b; Liu *et al.*, 2008).

4.3 Voltammetria ciclica

Si tratta di una tecnica elettrochimica che si basa sulla misura della corrente che fluisce attraverso un elettrodo, immerso in una soluzione contenente specie elettroattive, quando ad esso viene applicata una tensione variabile nel tempo secondo un caratteristico diagramma triangolare. Questo elettrodo, detto elettrodo di lavoro, presenta una superficie

molto piccola. La cella elettrochimica comprende un elettrodo di lavoro, un elettrodo di riferimento e un controlettrodo.

La corrente che fluisce attraverso l'elettrodo di lavoro, in funzione del potenziale ad esso applicato, permette di ottenere una curva caratteristica i/E , definita voltammogramma, che mostra delle onde di ossidazione o di riduzione a seconda che il sistema redox in esame venga ossidato o ridotto. All'aumentare del valore di potenziale applicato all'elettrodo di lavoro, le sostanze antiossidanti presenti nella matrice indagata (vino) passano dallo stato ridotto allo stato ossidato.

La voltammetria ciclica è una metodica che presenta numerosi vantaggi quali rapidità, economicità e sensibilità adeguata a determinare la fisiologica concentrazione di sostanze antiossidanti presenti (Piljac *et al.*, 2004). Essa è stata impiegata con successo per determinare il contenuto in polifenoli di alcuni vini e per correlare il risultato analitico con le capacità antiossidanti di tali vini (Petrovic, 2009). Recentemente, inoltre, tale metodica è stata impiegata per monitorare i processi di ossidazione dei vini; seguendo l'evoluzione del profilo voltammetrico durante le fasi di vinificazione ed affinamento è possibile valutare l'evoluzione del patrimonio di sostanze antiossidanti presenti nel vino, sottoposte a tutta una serie di reazioni con l'ossigeno. Questa tecnica permette di ottenere sia informazioni quantitative che qualitative infatti l'intensità di corrente è funzione della concentrazione mentre il potenziale al quale si osserva la variazione di corrente è caratteristico della specie. Quindi il voltammogramma fornisce informazioni sulla natura e sulla quantità di specie antiossidanti presenti nel vino.

Nel settore enologico, l'obiettivo della ricerca è comprendere se le informazioni che si ottengono da questa metodica di analisi, gestite con un approccio multivariato, possono essere utilizzate per monitorare e diagnosticare i processi ossidativi nei vini (Martins *et al.*, 2008).

5. Relazioni possibili tra l'analisi sensoriale e le tecniche spettrali e voltammetriche

Il vino può essere definito come una miscela idroalcolica il cui aroma, caratterizzato da una grande complessità chimica, è prodotto da molti e diversi composti volatili. Generalmente, l'analisi sensoriale, basata su un *panel* di giudici esperti, è utilizzata per la classificazione dei vini e per il controllo della qualità (Lozano *et al.*, 2007). L'analisi sensoriale, da un certo punto di vista, può essere considerata un approccio "multivariato" alla valutazione del prodotto in quanto la valutazione dell'assaggiatore si origina dalla percezione sensoriale dovuta al contributo di numerose variabili e alla relazione che tra esse intercorre (Cozzolino *et al.*, 2006).

Nel corso degli ultimi decenni sono stati fatti molti sforzi per stabilire una relazione tra gli attributi sensoriali e la composizione chimica dei vini, al fine di comprendere quali componenti influenzano le proprietà sensoriali e la qualità finale del prodotto. Si tratta di metodiche basate su misurazioni chimiche tradizionali, su misure spettrofotometriche (e in alcuni casi cromatografiche) associate ad analisi sensoriali e a tecniche chemiometriche classiche come l'analisi delle componenti principali o la regressione mediante metodo dei minimi quadrati parziali (Lozano *et al.*, 2007).

Recentemente, queste metodiche sono state impiegate non solo nel campo dell'enologia ma anche in diversi settori dell'industria alimentare al fine di individuare un metodo rapido di controllo della qualità dei prodotti.

La spettroscopia NIR, abbinata all'analisi sensoriale e ad una tecnica PLS di gestione dei dati, è stata impiegata per valutare la qualità del prosciutto in relazione a 5 attributi sensoriali (colore, colore dell'anello, marezatura, ecc.) (Ortiz *et al.*, 2006) e, in uno studio analogo, la qualità del pesce in relazione a 46 attributi sensoriali riassunti in 4 categorie (odore, aspetto, sapore, *texture*) (Warm *et al.*, 2000).

I profili spettrali ottenuti con la tecnica NIR, abbinati ad un'analisi sensoriale descrittiva, sono stati impiegati per discriminare formaggi svizzeri prodotti da aziende diverse situate negli Stati Uniti. Grazie a tecniche statistiche multivariate di elaborazione delle informazioni è stato possibile sia trovare una relazione tra la frazione solubile presente nei diversi formaggi e alcuni attributi sensoriali (quali grassezza, sapidità, amarezza, dolcezza, umami, ecc.) sia costruire un modello di classificazione (Kocaoglu-Vurma *et al.*, 2009).

La spettroscopia NIR è stata utilizzata poi per predire le differenti proprietà della

carne. In questo senso tale tecnica ha mostrato, ancora una volta, non solo le sue potenzialità nel predire la composizione chimica (proteine, grasso intramuscolare, ceneri, mioglobina, collagene, ecc.) e i parametri tecnologici (pH, capacità di ritenzione idrica, ecc.) ma anche la sua utilità nel permettere la classificazione della carne in base al suo livello di qualità. In questo caso, però, non si è dimostrata altrettanto valida nella valutazione degli attributi sensoriali e questo forse a causa della eterogeneità dei campioni di carne e della loro preparazione (Prieto *et al.*, 2009).

Tale metodica, inoltre, è stata ultimamente molto utilizzata per analisi su frutta e verdura. Un'analisi di tipo univariato ha mostrato che la concentrazione di glucosio e di fruttosio negli ibridi di cicoria (*Cichorium intybus*) è strettamente correlata con gli attributi sensoriali croccantezza e amaro (la concentrazione in termini di fruttosio, in particolare, è in stretta relazione con il punteggio di amaro dato dal *panel*) (Francois *et al.*, 2008).

E' stato dimostrato, poi, che è possibile utilizzare tale tecnica per valutare il grado di maturità delle mele, al fine di stabilire la data di raccolta, ed è stata inoltre trovata una relazione tra gli spettri ottenuti con la spettroscopia NIR e gli attributi sensoriali di mele appartenenti a diverse *cultivar*. Questa metodica, inoltre, è stata associata alla spettrofotometria nel campo del visibile e all'analisi sensoriale per seguire la maturazione dell'uva in tre diverse parcelle coltivate a Cabernet Franc fornendo importanti informazioni a proposito del contenuto in zuccheri, acqua e pigmenti. Una delle bande di assorbimento dell'acqua, ad esempio, ha permesso di spiegare i risultati sensoriali attribuiti alla *texture* dell'uva analizzata (Le Moigne *et al.*, 2008).

Anche nel settore enologico sono stati tentati approcci di questo tipo. Si è cercato di mettere in relazione il profilo sensoriale di due varietà di vini australiani con gli spettri NIR e VIS allo scopo di costruire dei modelli predittivi per la valutazione delle proprietà sensoriali di questi prodotti (Cozzolino *et al.*, 2005). Si è cercato di combinare le informazioni ottenute dagli spettri nel VIS e nel NIR con i risultati ottenuti mediante naso elettronico per valutare le proprietà sensoriali di alcuni Riesling australiani (Cozzolino *et al.*, 2006). I risultati ottenuti con la voltammetria ciclica, in termini di concentrazione di sostanze polifenoliche, sono stati invece correlati, per mezzo di un approccio multivariato, con le valutazioni sensoriali relative all'astringenza dei vini analizzati (Petrovic, 2009).

6. Scopo di questa tesi

Il vino è, dal punto di vista analitico, un complesso sistema chimico, in continua evoluzione, che tende a raggiungere un equilibrio. I fattori che influiscono su tale equilibrio sono molteplici e la ricerca lavora incessantemente allo scopo di identificarli, di capire qual è il contributo di ognuno e quali sono le relazioni che tra essi intercorrono.

A partire dalla gestione dell'uva in campo, passando per le diverse fasi della vinificazione, fino ad arrivare all'affinamento, all'imbottigliamento e alla conservazione del prodotto finale, il vino subisce tutta una serie di reazioni che ne modificano in modo sostanziale la composizione, la struttura e la qualità. Gli sforzi della ricerca volti allo studio del processo fino all'imbottigliamento del prodotto sono stati molti, mentre meno si è fatto per analizzare le modificazioni che intercorrono durante lo stoccaggio del vino in bottiglia.

Conoscere quelle che sono le proprietà ossidoriduttive di un vino è fondamentale per qualsiasi produttore perché questo permette da una parte di intervenire su di esse in fase di lavorazione e dall'altra di prevedere quale sarà la durata commerciale del prodotto finito in condizioni di conservazione adeguate (Silva Ferreira *et al.*, 2003).

Una domanda che spesso viene posta al mondo della ricerca da parte dei produttori è la seguente: si può, con la strumentazione presente ormai in molte cantine, studiare a priori l'evoluzione del prodotto?

Attualmente l'analisi sensoriale sembra essere l'unico strumento efficace, in possesso dei tecnici, per valutare la capacità di un vino di opporsi ai fenomeni ossidoriduttivi e, quindi, la sua possibile durata commerciale o, in altre parole, il tipo di evoluzione a cui esso è andato incontro. Ma questo strumento richiede personale qualificato e lunghi tempi di attesa.

Scopo di questo lavoro è stato di indagare le relazioni esistenti tra percezione sensoriale dello stato di evoluzione di un vino e i dati ricavati dalle analisi spettrali e voltammetriche al fine di individuare tecniche analitiche rapide ed economiche che permettano di ottenere informazioni sullo stato ossidoriduttivo del prodotto.

Più precisamente, l'obiettivo è di studiare la possibilità di sostituire l'analisi sensoriale con tecniche spettroscopiche (UV, VIS, MIR, NIR) e/o voltammetriche (in particolare con la voltammetria ciclica), abbinate ad un approccio multivariato di elaborazione dei dati, nella valutazione dello stato evolutivo dei vini rossi ed eventualmente nella previsione della loro vita commerciale.

Nel corso del lavoro, inoltre, sono state impiegate due schede di analisi sensoriale: una

scheda di analisi sensoriale sperimentale, di tipo non strutturato, ed una scheda strutturata di tipo tradizionale. L'obiettivo, in questo caso, è di verificare l'efficacia della scheda sperimentale nella valutazione dello stato evolutivo di un vino e della sua possibile vita commerciale.

I risultati ottenuti nel corso di questo lavoro, inoltre, sono stati confrontati con quelli di uno studio analogo a questo, ma eseguito su 60 vini bianchi (Bertoz, 2010), per meglio comprendere analogie e differenze, tenendo conto della maggiore complessità dei vini rossi e il diverso significato che il loro percorso evolutivo assume.

Considerando il numero limitato di campioni studiati (una sessantina di vini rossi in commercio), questo lavoro si configura come uno studio preliminare sulla potenzialità dell'approccio analitico multivariato nella valutazione delle proprietà di un prodotto difficilmente definibili con tecniche analitiche tradizionali. Non ha la pretesa, ovviamente, di fornire una risposta esaustiva e definitiva ad una problematica così ampia e complessa.

7. Materiali e metodi

7.1 Descrizione dei campioni

Per questo lavoro sono stati utilizzati 60 vini rossi in commercio di diversa tipologia, annata e provenienza. La maggioranza dei vini è di origine italiana (27 del nord, 11 del centro, 19 del sud) e solo 3 sono di origine francese. Per quanto riguarda l'annata, si va dal 2001 al 2009, con 3 campioni del 2001, 3 del 2002, 2 del 2003, 6 del 2004, 10 del 2005, 13 del 2006, 16 del 2007, 5 del 2008 e 2 del 2009.

A ciascun campione è stato attribuito, in modo casuale, un codice numerico identificativo compreso tra 1 e 60 (tabella 3). I vini sono stati scelti in modo casuale e il codice identificativo è stato attribuito in modo casuale. Questo “*modus operandi*” è stato adottato per individuare un *set* di campioni che permettesse di coprire il più possibile tutto il *range* dei diversi stati di evoluzione dei vini rossi e che tenesse contemporaneamente conto della variabilità compositiva e qualitativa dei vini presenti sul mercato.

Tabella 3: Lista dei vini impiegati per lo studio.

Codice	Regione	Anno	Codice	Regione	Anno	Codice	Regione	Anno
1	FVG	2006	21	VENETO	2009	41	TOSCANA	2005
2	PUGLIA	2005	22	LOMBARDIA	2002	42	BASILICATA	2004
3	SICILIA	2007	23	SICILIA	2007	43	TOSCANA	2008
4	TOSCANA	2002	24	MARCHE	2008	44	ABRUZZO	2006
5	PUGLIA	2008	25	VENETO	2001	45	PUGLIA	2007
6	TOSCANA	2004	26	VENETO	2005	46	ABRUZZO	2005
7	SICILIA	2005	27	FRANCIA	2006	47	VENETO	2003
8	TRENTINOAA	2007	28	TRENTINOAA	2008	48	TRENTINOAA	2006
9	LAZIO	2005	29	LAZIO	2005	49	VENETO	2007
10	UMBRIA	2001	30	EMILIA R	2007	50	UMBRIA	2001
11	EMILIA R	2007	31	TRENTINOAA	2007	51	V. D'AOSTA	2006
12	EMILIA R	2007	32	EMILIA R	2004	52	LOMBARDIA	2005
13	LOMBARDIA	2004	33	SICILIA	2005	53	SARDEGNA	2004
14	SICILIA	2006	34	VENETO	2009	54	CAMPANIA	2007
15	PIEMONTE	2003	35	FRANCIA	2007	55	BASILICATA	2002
16	TRENTINOAA	2006	36	FVG	2008	56	PIEMONTE	2007
17	SICILIA	2007	37	PUGLIA	2004	57	TOSCANA	2007
18	PUGLIA	2005	38	VENETO	2007	58	FRANCIA	2006
19	CALABRIA	2006	39	PIEMONTE	2006	59	TRENTINOAA	2006
20	VENETO	2006	40	TOSCANA	2006	60	SICILIA	2007

7.2 *Analisi sensoriale*

L'analisi sensoriale dei vini si è svolta presso il Dipartimento di Scienze degli Alimenti dell'Università di Udine; è stato utilizzato un test di tipo analitico descrittivo per il quale sono state impiegate due schede di tipo diverso:

- Scheda innovativa di tipo non strutturato volta alla valutazione dello stato evolutivo di un vino e concepita come ulteriore evoluzione della scheda proposta da Kobler (2008).
- Scheda strutturata con scala ordinale da 1 a 9 con cui ai giudici è stato chiesto di valutare i campioni in base a 4 descrittori scelti per evidenziare lo stato evolutivo del vino (Ossidato, Ridotto, Piacevolezza Olfatto, Piacevolezza Gusto).

I campioni sono stati assaggiati in tre distinte sedute di analisi sensoriale da esperti scelti tra gli studenti del corso di laurea in Viticoltura ed Enologia ed il personale del Dipartimento di Scienze degli Alimenti (8 esperti sia nella I che nella II che nella III seduta). I campioni sono stati presentati nell'ordine stabilito dal codice numerico attribuito in maniera casuale in fase di strutturazione del piano sperimentale secondo il seguente schema:

- campioni da 1 a 20 nel corso della prima seduta;
- campioni da 21 a 40 nel corso della seconda seduta;
- campioni da 41 a 60 nel corso della terza seduta.

Ciascun campione è stato valutato singolarmente dal *panel* utilizzando sia la scheda con la scala non strutturata sia la scheda strutturata.

La valutazione attribuita mediante la scheda non strutturata è stata convertita in numero misurando la distanza dall'origine della proiezione sull'asse orizzontale del segno apposto dal giudice (figura 11). Considerando una lunghezza complessiva del segmento di 24 cm, il punteggio è stato espresso in $\text{cm} \pm 0.1$. Per rendere più semplice la discussione dei risultati, il valore attribuito ai singoli campioni con la scheda non strutturata è stato denominato *Redox Score* (RS) in quanto fornisce un'indicazione sullo stato ossidoriduttivo (e quindi evolutivo) del campione.

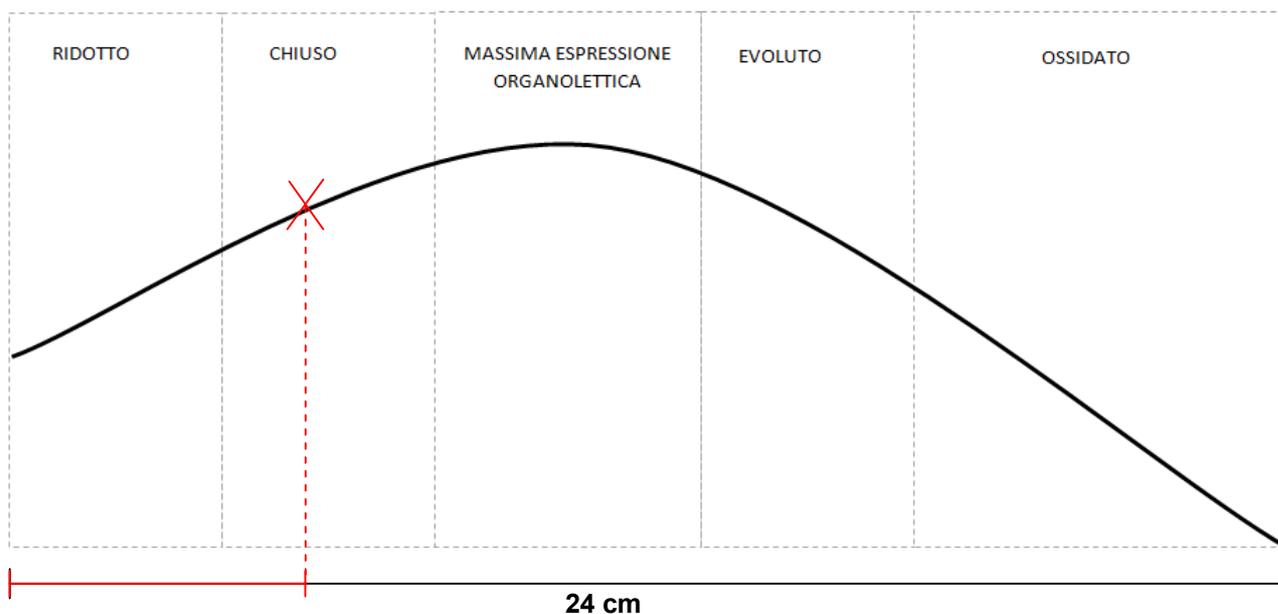


Figura 11: Scheda grafica non strutturata utilizzata per la valutazione dello stato di evoluzione dei vini.

7.3 Determinazione dell'anidride solforosa

La valutazione dell'anidride solforosa è stata effettuata mediante metodo ufficiale CEE (Reg. n. 2676/90 del 17 settembre 1990).

7.4 Acquisizione degli spettri UV-VIS

L'acquisizione degli spettri UV-VIS è stata effettuata mediante l'utilizzo di uno spettrofotometro Shimadzu modello UV 2501PC. Gli spettri sono stati acquisiti mediante il *software* UVProbe 2.31 (Shimadzu Corporation 1998-2007) nel *range* compreso tra 370 e 253 nm per lo spettro UV, utilizzando un intervallo di scansione di 1 nm, in cuvette con cammino ottico da 1 cm, e tra 700 e 350 nm per lo spettro VIS, utilizzando cuvette con cammino ottico da 1 mm. Per l'acquisizione degli spettri UV è stata effettuata una diluizione 1:100 in acqua.

Dagli spettri VIS sono stati estrapolati i valori di DO420, DO520 e DO620, con i quali è stata calcolata l'intensità colorante (DO420+DO520+DO620) e la tonalità (DO420/DO520).

7.5 *Acquisizione degli spettri FT-MIR e FT-NIR*

Per l'acquisizione degli spettri FT-MIR è stato utilizzato uno spettrometro a trasformata di Fourier nel medio infrarosso (Bruker Optics, mod. Alpha - figura 12), equipaggiato con un sistema di lettura dei campioni in riflettanza totale attenuata (ATR) con cristallo in diamante, specifico per l'analisi dei campioni liquidi e dotato di un sistema di termostatazione dei campioni (Bruker Optics, mod. Alpha-P). L'acquisizione è stata effettuata nel *range* spettrale compreso tra 4000 e 400 cm^{-1} con una risoluzione di 8 cm^{-1} . Gli spettri sono stati acquisiti mediante il *software* OPUS 6.5 (Bruker Optics 1997-2007) come media di 64 scansioni successive. Tutti i campioni sono stati termostati a 40 °C per 1 min ed ogni tre campioni è stata ripetuta l'acquisizione dello spettro di *background* in acqua, per evitare le distorsioni dei dati legate a variazioni di umidità e di pressione atmosferica nell'ambiente.

Per l'acquisizione degli spettri FT-NIR è stato utilizzato uno spettrofotometro a trasformata di Fourier nel vicino infrarosso equipaggiato con un sistema di lettura di campioni liquidi in trasmissione dotato di un sistema di termostatazione (Bruker Optics, mod. MPA, - figura 13). La lettura del campione è stata effettuata attraverso cuvette in quarzo con un cammino ottico di 1 mm (Hellma, mod. 170-QS) dopo termostatazione dello stesso a 40 °C per 90 sec. L'acquisizione è stata effettuata nel *range* spettrale compreso tra 12500 e 4000 cm^{-1} con una risoluzione di 8 cm^{-1} . Gli spettri sono stati acquisiti mediante il *software* OPUS 6.5 (Bruker Optics 1997-2007) come media di 16 scansioni successive. L'acquisizione dello spettro di *background* in aria è stata effettuata ogni due ore secondo le indicazioni fornite dalla casa produttrice.

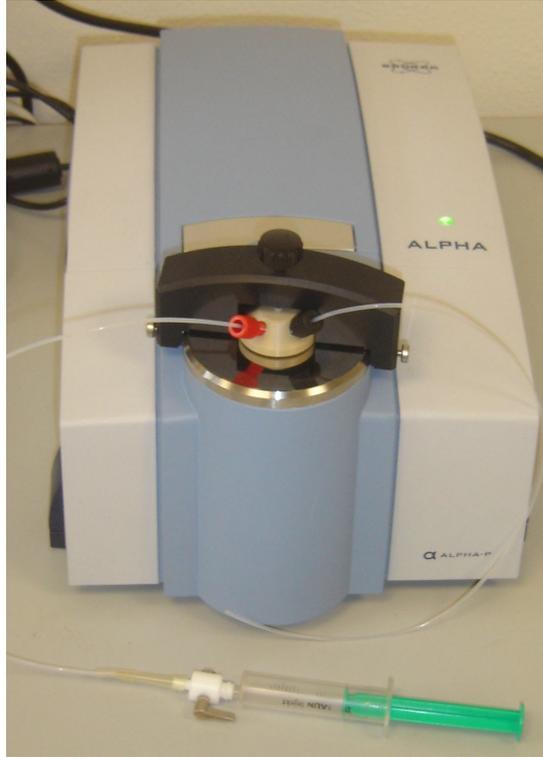


Figura 12: Spettrometro FT-MIR con sistema di lettura in riflettanza totale attenuata (ATR) Bruker Optics, mod. Alpha.



Figura 13: Spettrofotometro FT-NIR con sistema di lettura in trasmissione Bruker Optics, mod. MPA.

7.6 *Voltammetria ciclica*

L'analisi è stata effettuata su aliquote di campioni di vino pari a 20 mL termostatati a temperatura ambiente.

I tracciati voltammetrici sono stati acquisiti mediante un potenziostato Autolab PG STAT 30. La cella voltammetrica comprende 3 elettrodi:

- controelettrodo: costituito da una lamina di platino;
- elettrodo di riferimento ad Ag/AgCl, Cl^-_{sat} ;
- elettrodo di lavoro: costituito da un disco di grafite vetrosa ($\varnothing = 3$ mm).

Prima di ogni scansione il campione è stato agitato per 30 secondi tramite agitatore magnetico modello E649 Metrohm dotato di alimentatore esterno per minimizzare eventuali interferenze sul segnale analitico.

I voltammogrammi sono stati registrati nel *range* di potenziale compreso tra 0.01 e 1.3 V con una velocità di scansione di 0.1 V/s e uno *step* potenziale di 0.0135 V. La superficie dell'elettrodo, prima di ogni scansione, è stata pulita tramite azione meccanica con polvere di allumina di \varnothing medio di 0.3 μ m. Per l'acquisizione dei dati è stato utilizzato il *software* General Purpose Electrochemical System version 4.9.

Per ciascun campione sono stati registrati da 3 a 5 voltammogrammi che sono stati successivamente mediati.

7.7 *Elaborazione statistica dei dati*

Per lo studio dei dati relativi ai risultati dell'analisi sensoriale e delle analisi chimiche di base (SO₂ libera) i parametri relativi alle statistiche descrittive (media, mediana, deviazione standard) sono stati calcolati mediante il *software* Microsoft® Office Excel 2003. Per studiare le relazioni tra i campioni analizzati, e tra il punteggio attribuito con la scheda innovativa e i descrittori della scheda tradizionale, i dati sono stati sottoposti ad Analisi delle Componenti Principali (PCA) mediante il *software* STATISTICA 8 (Statsoft Inc.). L'analisi di Correlazione tra i dati sensoriali e i dati analitici dei campioni (SO₂ libera e Tonalità) è stata effettuata mediante il *software* STATISTICA 8 (Statsoft Inc.).

Per l'analisi statistica multivariata dei dati e la costruzione dei modelli di regressione

tra i dati spettroscopici (UV, VIS, MIR, NIR) o voltammetrici e i risultati dell'analisi sensoriale è stato utilizzato il pacchetto Quant 2 del *software* OPUS 6.5 (Bruker Optics 1997-2007) che sfrutta il metodo di regressione dei minimi quadrati parziali (PLS) e che si basa su:

- individuazione di eventuali *outlier* presenti nel set di campioni mediante PCA sull'intero *range* spettrale (o di potenziale);
- individuazione del *range* spettrale (o di potenziale) e del tipo di pretrattamento dei dati che permette di ottimizzare il modello di regressione per uno specifico descrittore dell'analisi sensoriale;
- costruzione del modello di calibrazione;
- costruzione del modello di validazione mediante metodo della validazione interna (*Cross Validation*).

Per quanto riguarda lo studio del comportamento dei giudici, invece, è stato utilizzato il programma Senstools ver. 2.3.20 (1995-98).

complessiva dei campioni sono stati inseriti nella scheda degli ancoraggi grafici che distinguono diverse zone di evoluzione:

- da 0.0 a 4.0 vino ridotto che presenta tale difetto in modo persistente;
- da 4.1 a 8.0 vino chiuso o con leggero difetto di ridotto che scompare in breve tempo;
- da 8.1 a 13.0 vino alla sua massima espressione evolutiva;
- da 13.1 a 17.0 vino evoluto;
- da 17.1 a 24.0 vino che presenta difetto di ossidazione.

In base alle impressioni dei giudici che l'hanno utilizzata, emerge che la nuova scheda risulta essere di immediata comprensione e permette un raffronto rapido, continuo e preciso fra i vari campioni. Analizzando il grafico di figura 15, relativo alla prima seduta di assaggio, è possibile osservare come gli otto giudici hanno dato giudizi abbastanza confrontabili fra loro nella valutazione dei diversi campioni con deviazioni standard (tabella 4) che risultano però piuttosto alte. Sempre dal grafico di figura 15 emerge infatti che i singoli giudici, per alcuni campioni, tendono a dare giudizi che si discostano anche molto dalla media del gruppo. I giudici C ed F si sono rivelati i meno concordi, ma ci sono anche altri giudici che in alcuni casi danno giudizi estremi. Per alcuni campioni, inoltre, il *panel* tende a dividersi in due gruppi distinti (campioni 5 e 10); ciò è particolarmente evidente per i campioni della seconda seduta (es. campioni 23, 28 e 29). Proprio a causa della notevole dispersione dei dati si è scelto di utilizzare oltre alla media, riportata nei grafici di figura 15, 16 e 17, anche la mediana come indice di tendenza centrale, in quanto è considerato più robusto (ovvero meno influenzato dai valori estremi).

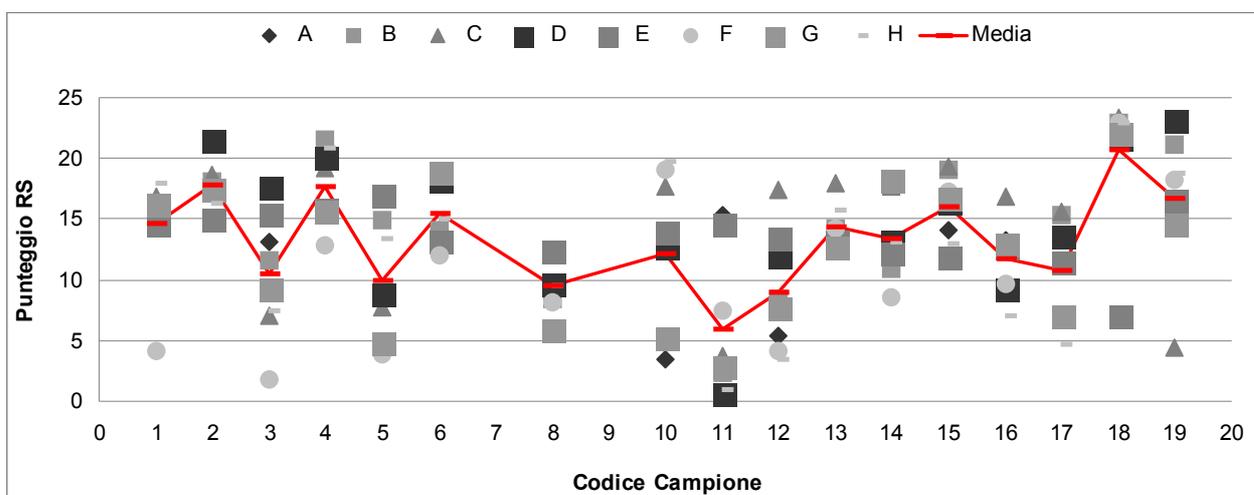


Figura 15: Punteggi attribuiti dai singoli giudici (A-H) ai diversi campioni nel corso della prima seduta di assaggio.

Tabella 4: Statistiche descrittive dei risultati dell'analisi sensoriale relativi alla prima seduta di assaggio.

Campioni	SCHEDA NON STRUTTURATA			SCHEDA STRUTTURATA			
	RS (media)	RS (mediana)	RS (STD DEV)	Ossidato	Ridotto	Piac. Olfatto	Piac. Gusto
1	14.6	16.1	4.3	4.4	1.4	5.1	4.6
2	17.8	17.6	1.9	6.1	1.4	4.0	4.1
3	10.4	10.4	5.1	3.3	2.4	5.4	5.6
4	17.7	17.6	3.2	5.4	1.0	4.6	4.6
5	9.9	8.8	4.8	2.5	2.5	4.4	4.6
6	15.5	14.6	2.6	4.4	1.8	5.3	5.6
8	9.5	9.5	2.4	1.9	1.4	6.3	6.3
10	12.1	13.3	6.7	3.1	2.9	4.0	5.3
11	6.0	3.3	5.9	2.4	4.1	3.8	4.3
12	9.0	8.1	4.9	2.3	3.3	5.5	6.6
13	14.3	14.0	1.8	3.4	1.3	5.3	5.7
14	13.3	13.0	3.2	3.4	1.5	4.9	5.6
15	16.0	16.6	2.7	4.4	1.1	4.4	5.3
16	11.8	12.6	3.0	2.1	1.4	6.1	6.0
17	10.7	11.4	4.1	2.1	2.6	5.4	5.7
18	20.8	22.9	5.5	6.8	3.0	1.6	2.1
19	16.7	17.4	5.7	5.5	2.0	2.8	3.6

Analizzando i risultati relativi alla seconda e alla terza seduta di assaggio (figura 16 e 17) si evidenzia che anche in questo caso i giudici si sono dimostrati poco concordi nella valutazione dei differenti campioni confermando quanto già evidenziato nel corso della prima seduta. Anche i valori delle deviazioni standard (tabella 5 e 6) sono piuttosto alti, ad ulteriore conferma della difficoltà, espressamente riconosciuta dai giudici nel corso dell'analisi sensoriale, di esprimere valutazioni univoche sulla qualità dei vini rossi e sulla percezione del tipo di difetto.

Confrontando, per tutte e tre le sedute di assaggio, i valori di RS con i punteggi attribuiti tramite la scheda tradizionale, si può notare come vi sia una relazione immediata ed intuitiva fra il valore assunto da RS e i punteggi di ossidato/ridotto (tabella 4, 5 e 6).

Nel corso della prima seduta il campione 7 è stato escluso per presenza di difetto evidente riconducibile all'“odore di tappo” ed i campioni 9 e 20 sono stati esclusi a causa di difetti associati a probabile rifermentazione in bottiglia. Nel corso della terza seduta i campioni 57 e 59 sono stati esclusi dopo riscontro di “odore di tappo” ed il campione 56 per problemi di rifermentazione in bottiglia. Si è scelto di escludere questi campioni in quanto la presenza di questi difetti rendeva problematica, se non impossibile, la valutazione dello stato redox del vino.

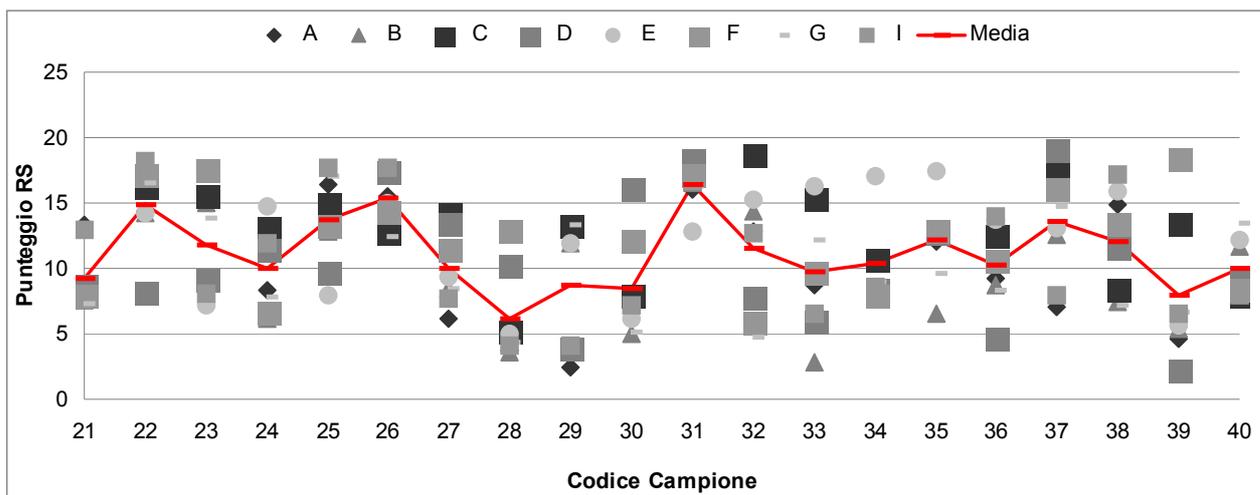


Figura 16: Punteggi attribuiti dai singoli giudici (A-I) ai diversi campioni nel corso della seconda seduta di assaggio.

Tabella 5: Statistiche descrittive dei risultati dell'analisi sensoriale relativi alla seconda seduta di assaggio.

Campioni	SCHEDA NON STRUTTURATA			SCHEDA STRUTTURATA			
	RS (media)	RS (mediana)	RS (STD DEV)	Ossidato	Ridotto	Piac. Olfatto	Piac. Gusto
21	9.3	8.3	2.4	1.9	1.6	5.9	4.6
22	14.9	15.3	3.1	4.1	1.3	5.3	5.0
23	11.7	11.6	4.2	2.8	2.1	4.9	5.5
24	10.0	9.9	3.2	1.9	2.1	5.5	5.8
25	13.7	14.2	3.5	3.3	1.5	5.0	5.6
26	15.3	15.3	2.1	3.8	1.0	5.1	5.4
27	9.9	8.9	2.9	1.9	2.1	6.1	6.6
28	6.1	4.7	3.5	2.1	4.0	4.0	4.6
29	8.7	11.9	4.9	2.1	3.4	4.5	4.8
30	8.4	7.5	3.8	2.1	2.4	4.1	4.3
31	16.4	16.7	1.6	4.0	2.1	3.5	3.9
32	11.5	12.8	4.9	2.0	2.1	5.0	5.3
33	9.7	9.2	4.7	2.0	2.8	5.5	6.0
34	10.4	9.8	2.9	1.5	1.6	5.9	5.6
35	12.1	12.8	3.1	1.9	1.6	5.5	5.9
36	10.2	9.9	3.1	1.9	2.1	5.4	5.4
37	13.6	13.9	4.3	2.9	2.0	5.3	5.5
38	12.0	12.6	3.9	2.4	1.4	5.4	5.8
39	7.9	6.1	5.4	2.8	3.1	3.8	3.5
40	10.1	9.4	2.1	1.6	1.6	4.8	4.8

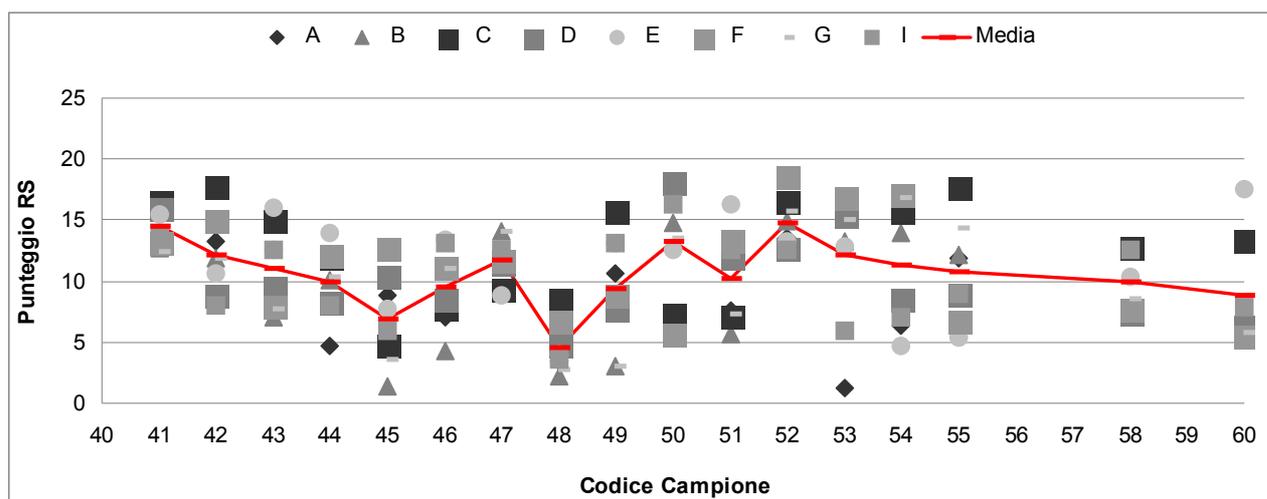


Figura 17: Punteggi attribuiti dai singoli giudici (A-I) ai diversi campioni nel corso della terza seduta di assaggio.

Tabella 6: Statistiche descrittive dei risultati dell'analisi sensoriale relativi alla terza seduta di assaggio.

Campioni	SCHEDA NON STRUTTURATA			SCHEDA STRUTTURATA			
	RS (media)	RS (mediana)	RS (STD DEV)	Ossidato	Ridotto	Piac. Olfatto	Piac. Gusto
41	14.6	14.7	1.6	3.6	1.5	5.1	5.1
42	12.2	11.9	3.2	2.5	1.5	5.5	5.5
43	11.1	11.1	3.5	2.1	1.6	5.3	5.3
44	10.0	10.2	2.9	1.8	1.9	5.9	5.9
45	7.0	6.9	3.7	1.9	4.0	4.6	4.6
46	9.6	9.8	3.1	2.1	1.9	5.3	5.3
47	11.8	11.9	1.9	2.4	1.1	5.8	5.8
48	4.5	3.8	2.1	1.4	5.4	4.6	4.6
49	9.4	9.7	4.7	1.6	3.5	5.6	5.6
50	13.2	14.2	4.6	3.8	2.1	5.0	5.0
51	10.3	9.8	3.8	2.3	2.0	5.8	5.8
52	14.8	14.3	2.2	3.4	1.5	5.6	5.6
53	12.1	14.2	5.5	2.8	2.9	4.8	4.8
54	11.3	11.3	5.2	2.6	2.5	4.0	4.0
55	10.8	10.5	4.1	2.5	2.4	4.4	4.4
58	10.0	9.5	2.4	1.8	1.9	6.3	6.3
60	8.8	6.9	4.3	2.0	3.0	4.9	4.9

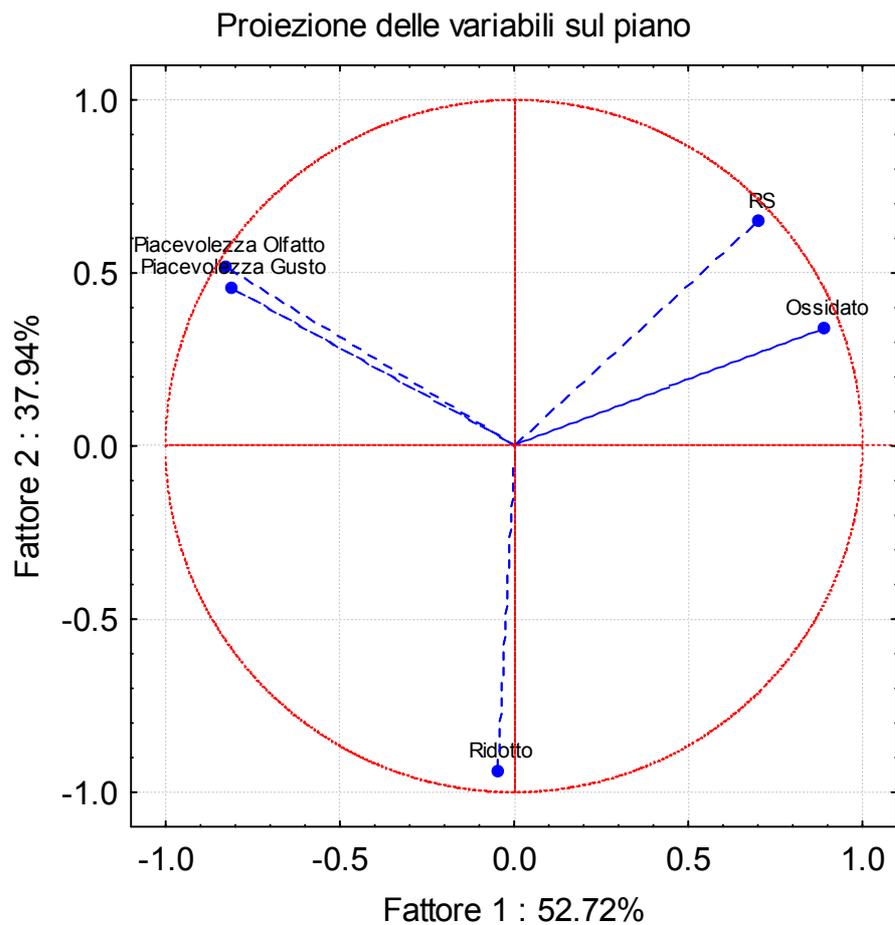
8.2 *Approccio univariato nella valutazione dello stato redox dei vini rossi*

Per verificare la validità della nuova scheda ed analizzare in maniera più approfondita la relazione tra i punteggi attribuiti sulla scala non strutturata (RS) e i punteggi assegnati con la scheda di tipo tradizionale, per i diversi descrittori considerati (Ossidato, Ridotto, Piacevolezza Olfatto, Piacevolezza Gusto), è stata applicata un'analisi delle componenti principali (PCA) a tutti i dati raccolti. Questo tipo di elaborazione permette di visualizzare in maniera immediata e intuitiva le relazioni presenti tra le variabili (proiezione delle variabili sul piano) e tra i campioni (proiezione dei casi sul piano).

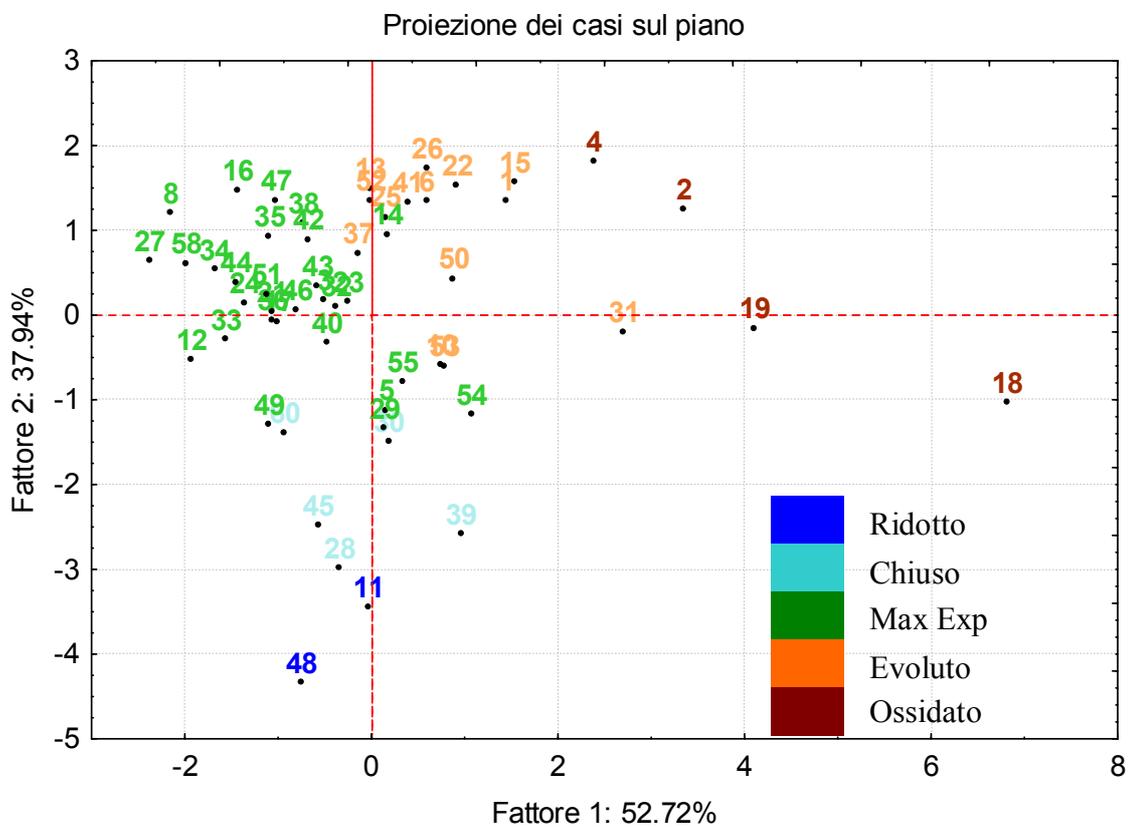
Analizzando i risultati riportati in figura 18 si può osservare come vi sia una notevole correlazione diretta tra il valore di RS e quello di “ossidato” e una correlazione inversa tra il valore di RS e quello di “ridotto”. Infatti, ad alti punteggi di RS corrispondono campioni che presentano difetti di ossidazione mentre a bassi punteggi di RS corrispondono campioni con note marcate di riduzione. Tutto questo è una conferma della capacità della scheda non strutturata di descrivere lo stato evolutivo dei vini.

Nel grafico di figura 18-B i campioni sono stati identificati con colori diversi seguendo la classificazione della scheda non strutturata, rispetto ai dati espressi come mediana. Si può notare prima di tutto come i campioni si posizionino sul grafico seguendo l'andamento della curva di evoluzione riprodotto nella scheda non strutturata e come, leggendo assieme i due grafici della figura 18, vi sia una stretta relazione tra la posizione dei campioni e la percezione dei difetti: nel quadrante in basso a sinistra si posizionano i campioni con difetti di riduzione (ad esempio i campioni 4, 11 e 28); nel quadrante in alto a destra i campioni con difetti di ossidazione (ad esempio i campioni 2, 4, 18 e 19).

In generale, dai dati riportati in figura 18-B, si può evidenziare come la maggior parte dei campioni sia stata collocata nelle zone di Massima espressione organolettica e di Evoluto, mentre difetti evidenti di riduzione od ossidazione sono stati riscontrati solo in pochi vini.



A



B

Figura 18: Analisi delle componenti principali relativa ai risultati dell'analisi sensoriale (scheda sperimentale e scheda tradizionale) per i campioni testati: proiezioni delle variabili sul piano (A); proiezioni dei casi sul piano (B).

Se confrontiamo i punteggi RS di questi campioni rispettivamente con i punteggi di Ridotto e di Ossidato della scheda strutturata possiamo evidenziare la corrispondenza dei risultati:

- campione 11: RS 6.0 ridotto 4.1
- campione 48: RS 4.5 ridotto 5.4

- campione 4: RS 17.7 ossidato 5.4
- campione 19: RS 16.7 ossidato 5.5
- campione 2: RS 17.8 ossidato 6.1
- campione 18: RS 20.8 ossidato 6.8

Nel caso dei campioni 11, 4 e 19 il valore medio più basso, rispettivamente di RS, Ridotto e Ossidato, è attribuibile alla mancanza di accordo tra i giudici nell'identificazione dei difetti (figure 15,16, 17).

Inoltre, i campioni che si posizionano nel quadrante in alto a sinistra, caratterizzati per lo più da punteggi RS corrispondenti alla massima espressione organolettica, ottengono anche i punteggi più elevati per i descrittori Piacevolezza olfatto e Piacevolezza gusto:

- campione 8: RS 9.5 piac. olfattiva 6.3 – piac. gustativa 6.3
- campione 16: RS 11.8 piac. olfattiva 6.1 – piac. gustativa 6.0
- campione 27: RS 9.9 piac. olfattiva 6.1 – piac. gustativa 6.6
- campione 47: RS 11.8 piac. olfattiva 5.8 – piac. gustativa 5.8

L'analisi delle componenti principali ci permette di fare anche tutta una serie di considerazioni interessanti sulle variabili che possono influenzare lo stato evolutivo dei vini rossi ritenuti maggiormente idonei, rispetto ai vini bianchi, all'invecchiamento. E' logico, infatti, ritenere che lo stato evolutivo di un vino sia strettamente correlato con la sua "età".

Dal grafico di figura 19, invece, dove i campioni sono stati identificati con colori diversi a seconda dell'anno di produzione, si osserva chiaramente che l'età del vino non è sempre in relazione con il suo stato di evoluzione. Alcuni campioni di annate molto vecchie sono stati valutati poco ossidati e, in alcuni casi, al massimo della loro espressione organolettica:

- campione 25 (2001): ossidato 3.3 – piac. olfattiva 5.0 – piac. gustativa 5.6
- campione 47 (2003): ossidato 2.4 – piac. olfattiva 5.8 – piac. gustativa 5.8
- campioni 42 (2004): ossidato 2.5 – piac. olfattiva 5.5 – piac. gustativa 5.5

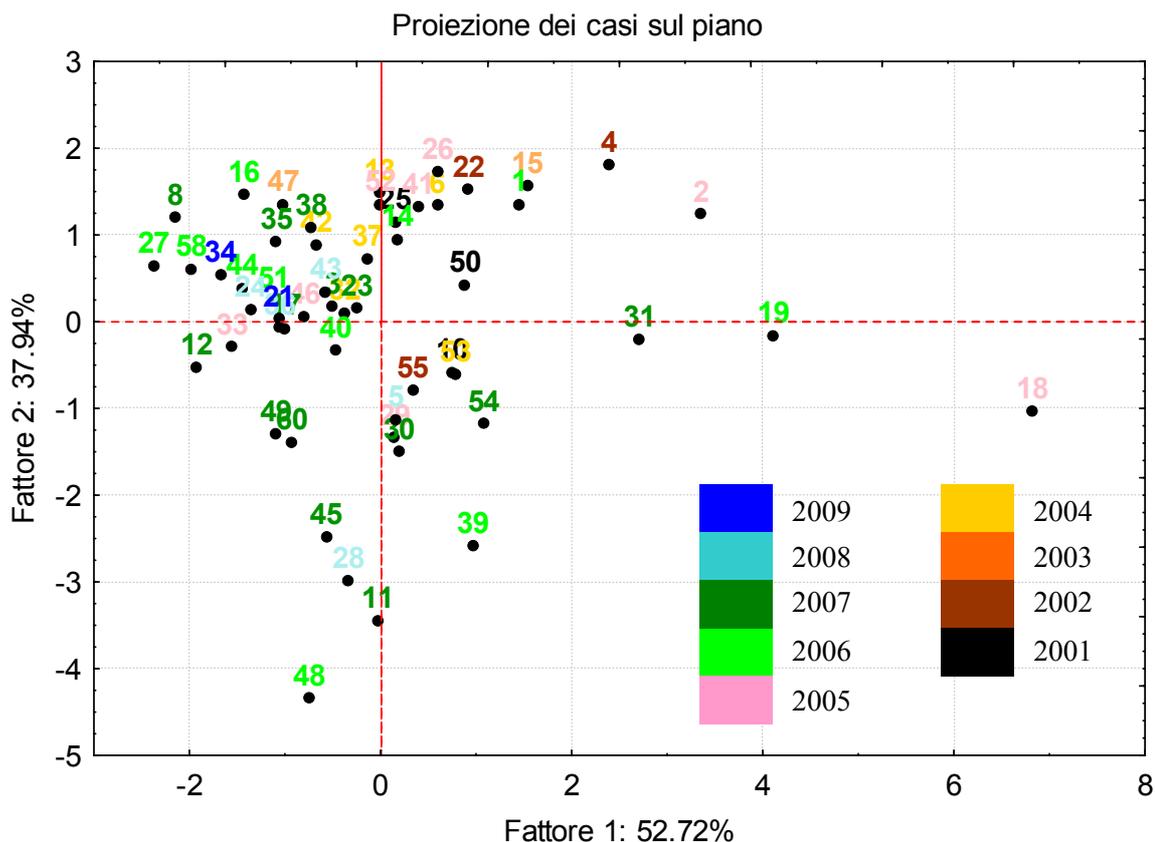


Figura 19: Analisi delle componenti principali relativa ai risultati dell'analisi sensoriale (scheda sperimentale e scheda tradizionale). Campioni evidenziati in funzione dell'anno di produzione.

Comunemente una serie di parametri compositivi di base del vino vengono utilizzati come indici per valutare lo stato ossidoriduttivo del prodotto e per tentare di prevedere la sua possibile evoluzione. Tra questi i più utilizzati sono il contenuto di anidride solforosa libera e gli indici di colore, in particolare, nel caso dei vini rossi, viene utilizzato il parametro tonalità, dato dal rapporto tra DO420 e DO520. Per verificare l'eventuale presenza di una relazione tra lo stato evolutivo di un vino e il contenuto di anidride solforosa libera in bottiglia, è stata effettuata un'analisi statistica di correlazione. Alcuni autori stimano un valore di 10 mg/L di SO₂ libera come limite al di sotto del quale si ha la comparsa di difetti di ossidazione (Godden *et al.*, 2001). Dall'analisi dei risultati dell'elaborazione statistica (figura 20) si può notare come non vi sia correlazione fra l'anidride solforosa libera e i valori di RS ($r=-0,1502$). Infatti vini con bassi livelli di SO₂ (anche inferiori a 10 mg/L) presentano difetti di riduzione (campione 11) e alcuni vini con livelli di solforosa mediamente alti presentano difetti di ossidazione o comunque sono stati valutati come evoluti (campioni 2 e 15).

Altri campioni, infine, pur presentano livelli di solforosa relativamente bassi vengono

considerati alla loro massima espressione organolettica (campioni 8, 17, 27). Da quanto emerso nel corso di questo studio si può pertanto evincere che il contenuto in SO₂ libera in bottiglia non è sufficiente a descrivere completamente lo stato redox di un vino.

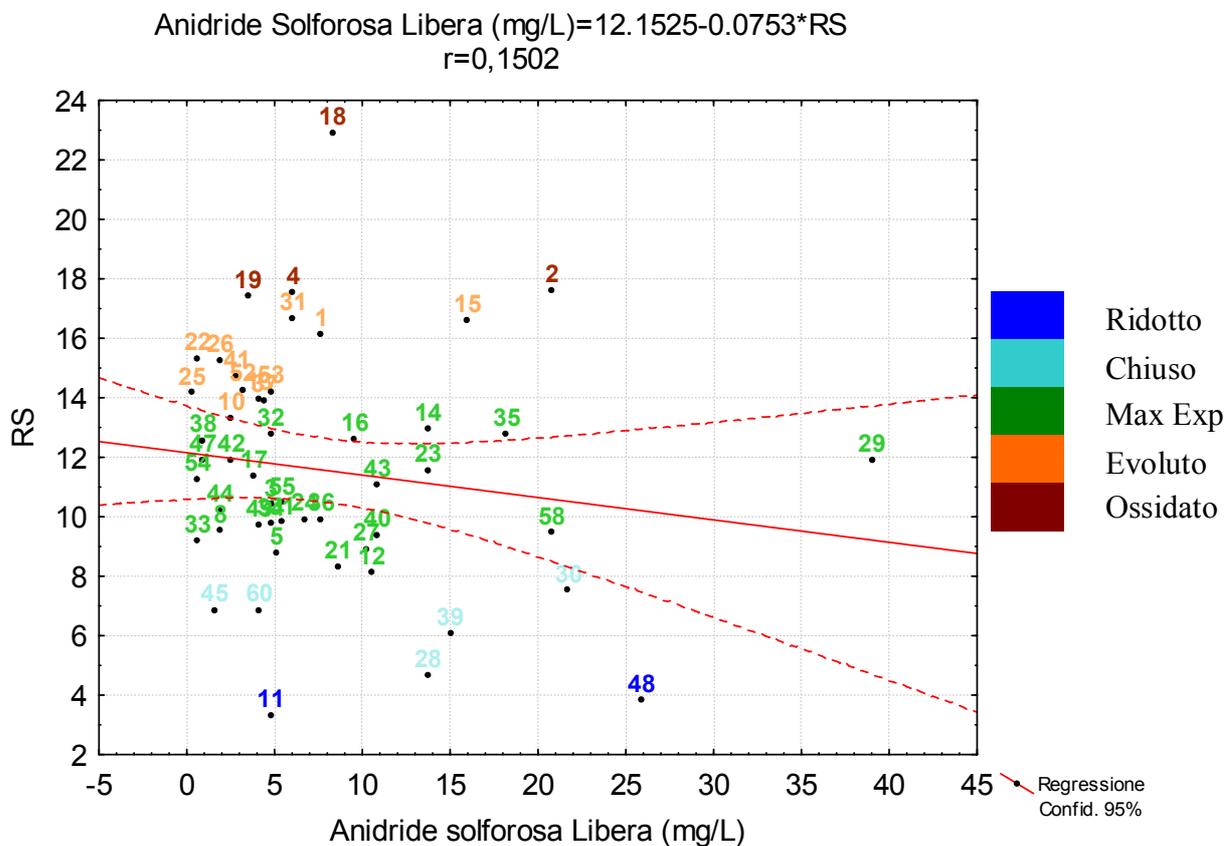


Figura 20: Risultati dell'analisi di correlazione tra il valore RS e il contenuto in anidride solforosa libera dei campioni. Campioni evidenziati in funzione degli ancoraggi verbali della scheda non strutturata.

Dal grafico di figura 21, in cui i campioni sono stati marcati in funzione dell'anno di produzione, si può inoltre osservare come il contenuto in SO₂ libera non sia legato al tempo che il vino ha trascorso in bottiglia. I campioni 2 e 29, ad esempio, sono tra quelli che hanno la maggiore concentrazione di SO₂ libera nonostante siano vini imbottigliati nel 2005 e quindi siano più vecchi di altri campioni che però presentano una minore concentrazione di SO₂ libera.

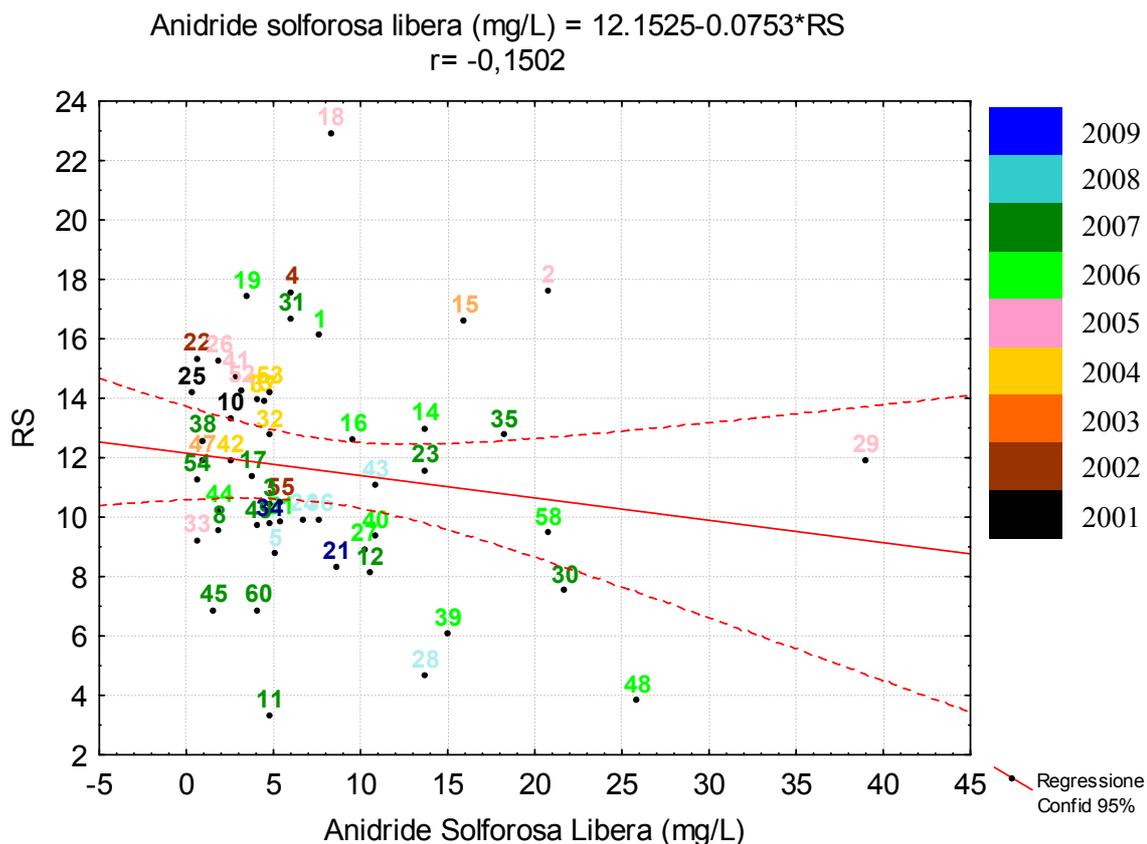


Figura 21: Risultati dell'analisi di correlazione tra il valore RS e il contenuto in anidride solforosa libera dei campioni. Campioni evidenziati in funzione dell'anno di produzione.

Infine, anche per verificare l'eventuale presenza di una relazione tra la percezione sensoriale dello stato evolutivo e la tonalità dei vini, è stata effettuata un'analisi statistica di correlazione. Dall'analisi dei risultati ottenuti (figura 22) si può notare come, pur essendoci una certa correlazione fra il valore RS e la tonalità dei vini ($r=0.6664$), per alcuni campioni il parametro Tonalità può addirittura diventare fuorviante: il campione 48, ad esempio, che presenta un valore di Tonalità di 0.89, potrebbe essere valutato come ossidato e invece ha ricevuto un valore di RS che lo colloca tra i vini giudicati ridotti.

Molto probabilmente, come precedentemente ricordato, le variabili che entrano in gioco nella definizione della qualità di un prodotto, e quindi anche del suo stato di evoluzione, sono così numerose e complesse da non poter essere interamente espresse da un parametro analitico di tipo univariato.

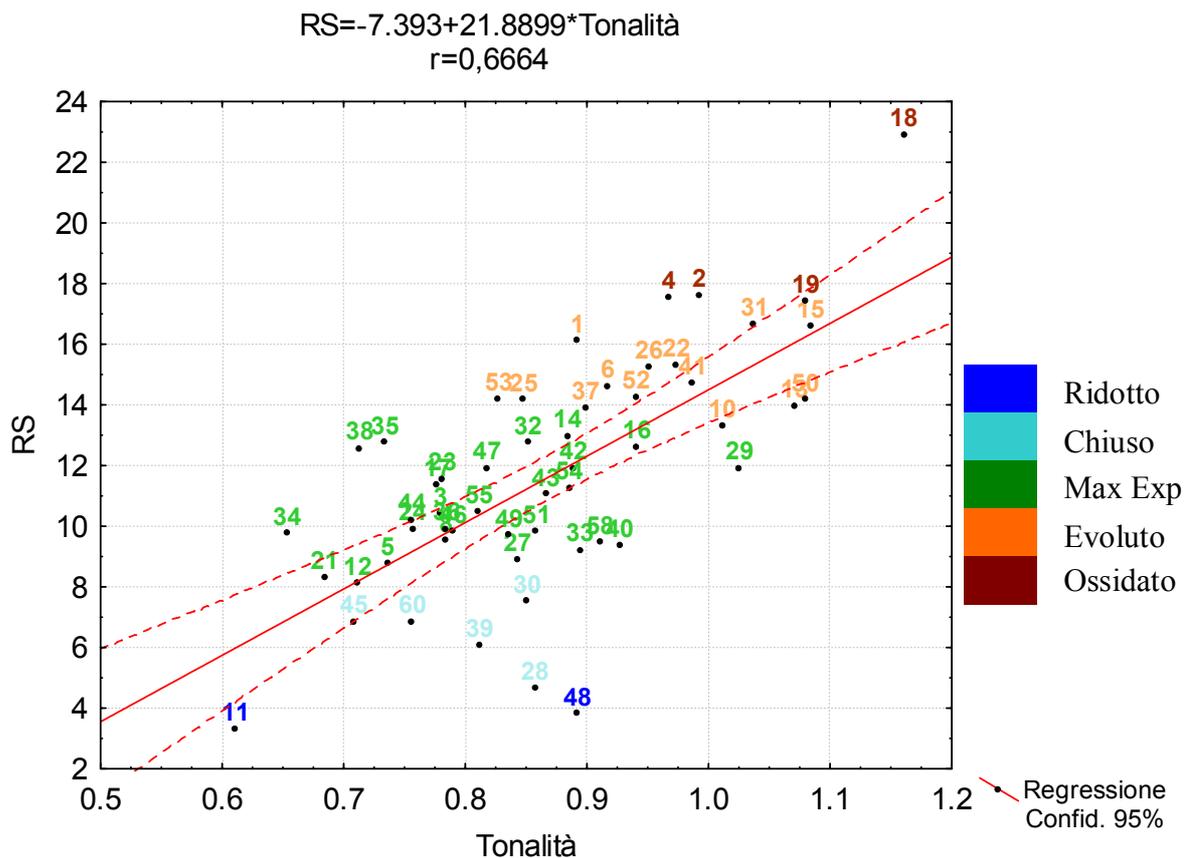


Figura 22: Risultati dell'analisi di correlazione tra il valore RS e la tonalità dei campioni. Campioni evidenziati in funzione degli ancoraggi verbali della scheda non strutturata.

8.3 *Approccio multivariato nella valutazione dello stato redox dei vini rossi*

Una volta analizzati i risultati dell'analisi sensoriale, evidenziate le relazioni tra scheda non strutturata e scheda strutturata e sottolineato come la percezione dello stato evolutivo di un vino sia il risultato dell'interazione di numerose variabili tra loro connesse, motivo per cui l'approccio univariato non è uno strumento sufficientemente esaustivo, si è passati all'utilizzo di un approccio multivariato per lo studio del problema oggetto di questo lavoro. In particolare si è cercato di costruire una serie di modelli di regressione tra la percezione sensoriale dello stato evolutivo di un vino (così come è stata valutata con la scheda non strutturata e con la scheda strutturata) e i risultati delle analisi spettroscopiche e voltammetriche effettuate sui campioni.

Per ciascuna delle tecniche analitiche utilizzate è stata effettuata un'elaborazione statistica dei dati mediante metodo PLS per verificare la possibilità di costruire dei modelli

predittivi e di individuare zone spettrali correlate a determinate percezioni sensoriali.

Considerato il ridotto numero di campioni utilizzato e la discordanza dei giudici nella valutazione di alcuni prodotti, con questo lavoro non ci si propone ancora di costruire un modello predittivo sufficientemente valido e robusto da poter essere utilizzato per la valutazione di campioni incogniti; l'obiettivo è invece quello di individuare quelle che potrebbero essere le strade e gli approcci più promettenti (sia dal punto di vista dei risultati che dal punto di vista della praticità d'uso) nell'applicazione di tecniche di tipo multivariato alla valutazione dello stato evolutivo di un vino. Proprio per questo motivo, nella costruzione dei modelli di regressione, è stato utilizzato il sistema di validazione interna (*Cross Validation*) e si è prestata maggior attenzione alla fase di calibrazione, che dà informazioni sulla capacità predittiva del modello. Inoltre, proprio perché questo lavoro si configura come uno studio preliminare, si sono fissati dei valori di R^2 minimi per l'accettazione dei modelli inferiori a quelli normalmente consigliati (Eriksson *et al.*, 2008):

- R^2 in calibrazione: 60 invece del valore consigliato di 70
- R^2 in validazione: 40 invece del valore consigliato di 50.

8.3.1 Studio della correlazione tra analisi sensoriale e spettri UV

In figura 23 sono riportati gli spettri UV di tutti i campioni analizzati.

Dalla semplice osservazione dei tracciati si può evidenziare come alcuni campioni presentino uno spettro che si discosta da quello medio del gruppo.

La prima operazione da effettuare per la costruzione del modello PLS consiste proprio nell'individuazione degli *outlier*, applicando l'analisi delle componenti principali (PCA) a tutti gli spettri. L'analisi viene effettuata su tutto lo spettro assumendo che ogni valore di lunghezza d'onda acquisito sia una variabile.

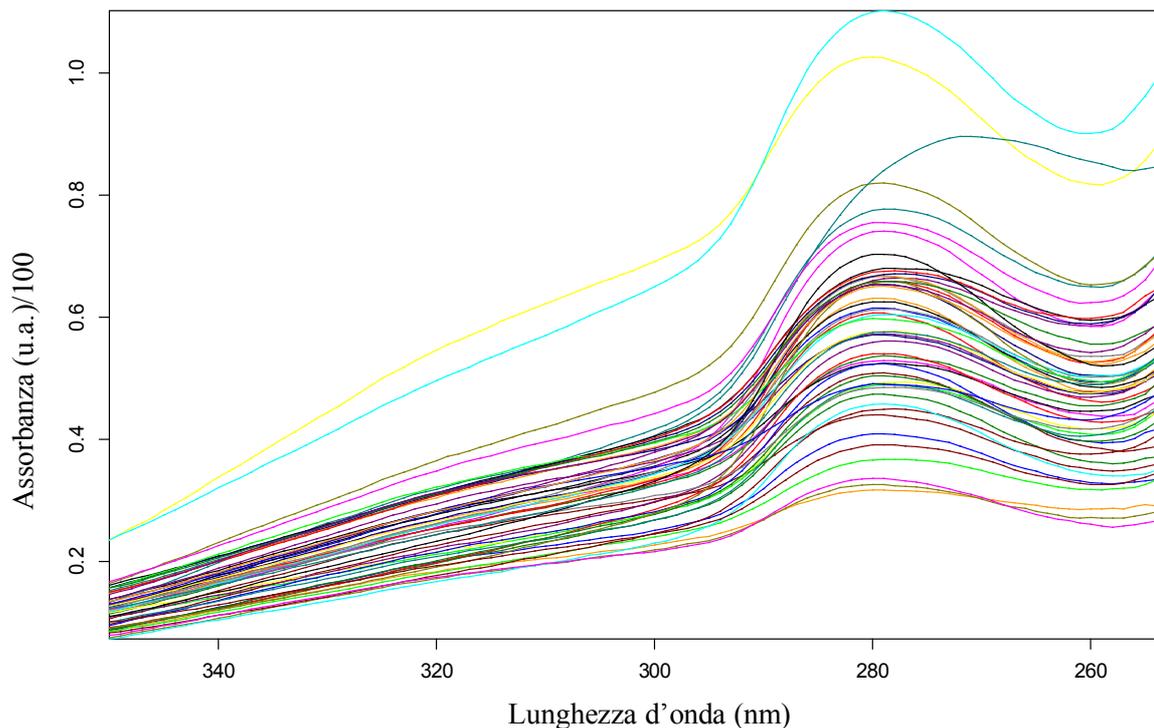


Figura 23: Spettri UV di tutti i vini rossi analizzati.

La proiezione dei campioni sul piano rispetto ai valori assunti dalle prime due componenti principali (*Score 2 vs Score 1*) permette di individuare i campioni anomali o comunque diversi dal resto del gruppo (figura 24). L'individuazione degli *outlier* costituisce una fase estremamente importante nella costruzione del modello in quanto la presenza di campioni anomali può creare distorsioni nel modello stesso e aumentare l'errore di predizione. D'altro canto, prima di eliminare un campione che presenta un comportamento anomalo, sarebbe necessario motivare la scelta basandosi sulle informazioni in proprio possesso, altrimenti il rischio è quello di non tenere conto della variabilità della popolazione del tipo di campioni in analisi e di ridurre quindi la robustezza del metodo. In questo caso, dal momento che i campioni utilizzati sono tutti vini del commercio di cui non si conoscono le caratteristiche e le problematiche, è stato possibile effettuare l'eliminazione dei campioni anomali solo sulla base dei risultati della PCA. Alla luce dei risultati riportati in figura 24 si è scelto quindi di eliminare i campioni 37, 44, 45.

In figura 25 sono riportati gli spettri dei campioni con cui è stato costruito il modello, dopo l'esclusione degli *outlier*.



Figura 24: Individuazione degli outlier negli spettri UV mediante PCA.

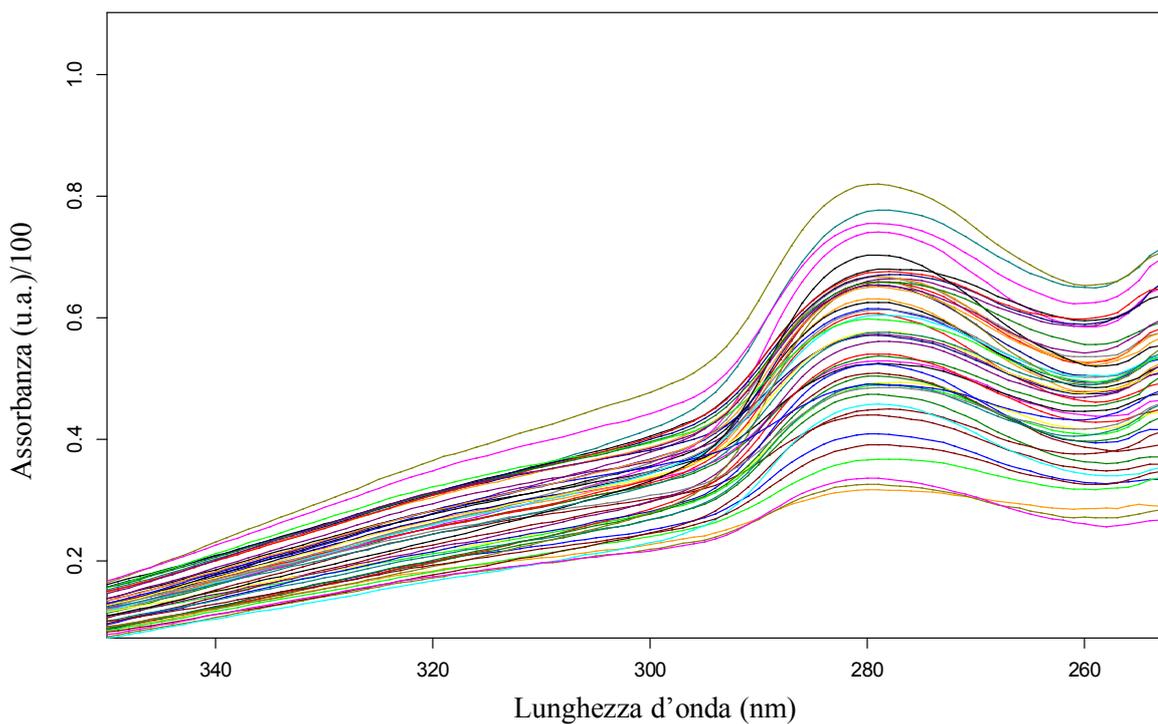


Figura 25: Spettri UV del set di campioni utilizzato per la costruzione di modelli di regressione dopo eliminazione degli outlier.

Una volta stabilito il *set* di campioni su cui lavorare (n. 51), è stata tentata la costruzione di modelli con tutti i descrittori dell'analisi sensoriale presenti nella scheda strutturata e con il valore di RS espresso sia come Mediana che come Media ma per nessuna

delle combinazioni testate è stato possibile individuare un modello di regressione sufficientemente valido (R^2 in calibrazione $<$ di 60 ed R^2 in validazione $<$ di 40) né per i descrittori della scheda strutturata né per i valori di RS della scheda non strutturata.

Per i vini rossi da noi analizzati, le informazioni contenute nello spettro UV non si sono rivelate utili a predire la qualità organolettica dei prodotti, in particolare rispetto ai parametri legati allo stato ossidoriduttivo dei campioni testati. Allo stato attuale della ricerca è difficile stabilire se questa mancanza di correlazione tra dati sensoriali e spettri UV sia legata alla notevole variabilità dei vini analizzati (diversa origine, varietà ed annata), alla difficoltà riscontrata dai giudici nel valutare in maniera univoca i campioni o ad un'effettiva scarsa correlazione tra informazioni contenute nello spettro UV e percezione sensoriale.

8.3.2 Studio della correlazione tra analisi sensoriale e spettri VIS

In figura 26 sono riportati gli spettri VIS di tutti i campioni analizzati.

Dalla semplice osservazione dei tracciati si può evidenziare come i campioni presentino spettri più simili fra loro rispetto a quelli UV, e infatti, applicando l'analisi delle componenti principali (PCA), non sono stati individuati *outlier* e quindi nessun campione è stato escluso dalla costruzione del modello PLS.

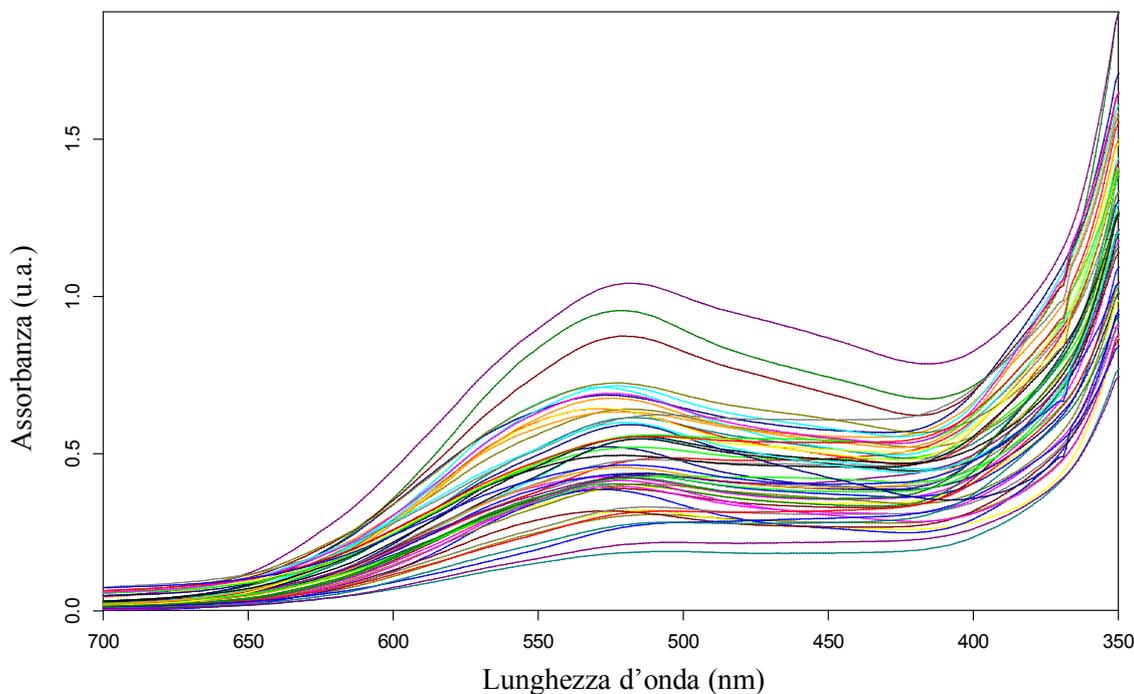


Figura 26: Spettri VIS di tutti i vini rossi analizzati.

Stabilito il *set* di campioni da utilizzare (n. 54), si è proceduto alla costruzione del modello individuando il tipo di pretrattamento dei dati e le zone spettrali che permettessero di ottimizzare i risultati. Il *software* utilizzato per l'elaborazione dei dati è fornito di un'opzione di ottimizzazione che permette l'individuazione automatica dei migliori modelli da applicare. Sono stati costruiti modelli distinti per ogni descrittore dell'analisi sensoriale utilizzato. Per quanto riguarda la scheda non strutturata, sono stati costruiti due modelli distinti utilizzando rispettivamente il valore di RS espresso come Mediana e il valore di RS espresso come Media.

I risultati relativi alla fase di ottimizzazione del modello sono riportati in tabella 7.

Tabella 7: Sistema di pretrattamento dei dati e range spettrali scelti per la costruzione dei modelli di regressione tra i diversi descrittori sensoriali e gli spettri VIS.

Descrittori		Pretrattamento dei dati	Range Spettrale
SCHEDA NON STRUTTURATA	RS Mediana	Min-Max Normalization	624-592 491-457
	RS Media	Constant Offset Elimination	687-623 491-457
SCHEDA STRUTTURATA	Ossidato	Derivata prima + Vector Normalization	687-623 593-562 491-457
	Ridotto	Nessuno modello valido	
	Piac. Olfatto	Nessuno modello valido	
	Piac. Gusto	Nessuno modello valido	

Per i descrittori di Ridotto, Piacevolezza olfatto e Piacevolezza gusto non è stato possibile costruire nessun modello di regressione valido (R^2 in calibrazione < di 60 ed R^2 in validazione < di 40), mentre per il valore RS (espresso come Mediana e come Media) e per il descrittore Ossidato, sono stati costruiti dei modelli di regressione sufficientemente buoni. Il modello elaborato per il descrittore RS Mediana si basa sul pretrattamento dei dati tramite *Min-Max Normalization* (tabella 7) che comporta una traslazione lineare dello spettro in modo che il minimo valore di Y coincida con lo zero di assorbanza e il massimo valore di Y

coincida con un valore di assorbanza pari a 2 unità (Conzen, 2006). Il modello elaborato per il descrittore RS Media, invece, si basa sul pretrattamento dei dati denominato *Constant Offset Elimination* (tabella 7) che consiste nel far traslare lo spettro in modo che il minimo valore di Y coincida, per tutti gli spettri, con lo zero di assorbanza.

In figura 27 e in figura 28 sono riportati, rispettivamente, la retta di regressione in calibrazione e i parametri di valutazione della bontà del modello in calibrazione (R^2 , RMSEE, RDP) per il valore di RS espresso come Mediana ed il valore di RS espresso come Media. Nelle tabelle 8 e 9, invece, sono riportati i corrispondenti parametri di valutazione del modello in validazione (R^2 , RMSECV, RDP). Per ogni modello viene inoltre riportato il numero di componenti principali utilizzate per la sua costruzione (*Rank*).

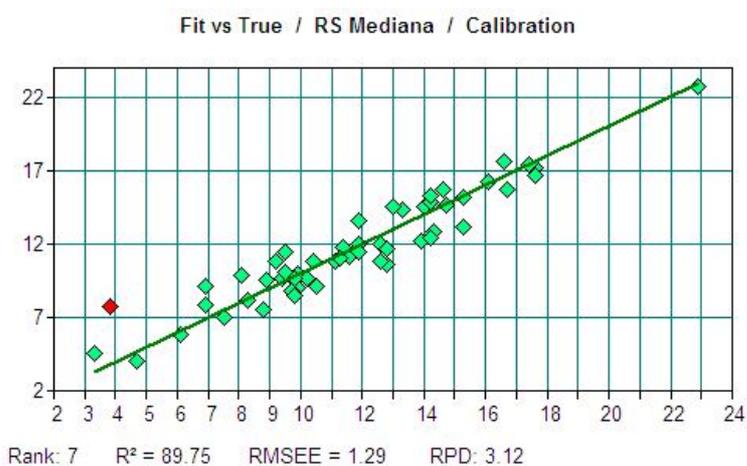


Figura 27: Modello di regressione in calibrazione (spettri VIS) per il valore di RS espresso come Mediana.

Tabella 8: Modello di regressione in validazione (spettri VIS) per il valore di RS espresso come Mediana.

Modello in Validazione (Cross validation)	
R^2	57.55
RMSECV	2.43
RPD	1.54
Rank	7

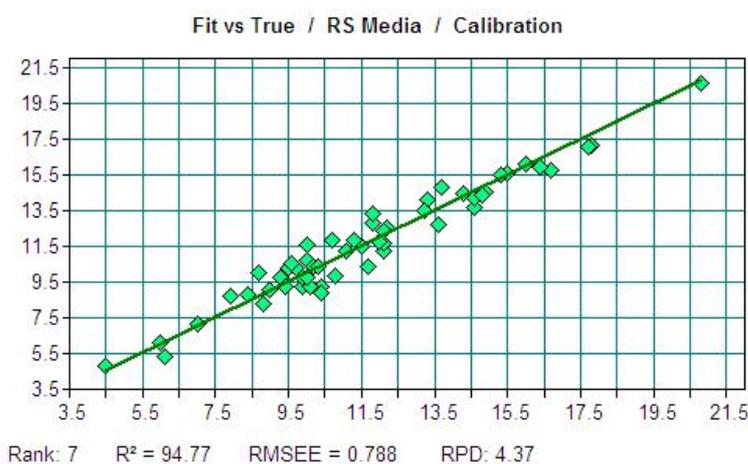


Figura 28: Modello di regressione in calibrazione (spettri VIS) per il valore di RS espresso come Media.

Tabella 9: Modello di regressione in validazione (spettri VIS) per il valore di RS espresso come Media.

Modello in Validazione (Cross validation)	
R^2	53.84
RMSECV	2.16
RPD	1.47
Rank	7

Per quanto riguarda, invece, il modello elaborato per il descrittore Ossidato, è stato possibile costruire un modello di regressione solo applicando un tipo di pretrattamento dei dati (Derivata prima con 17 punti di *Smoothing* + *Vector Normalization*) (tabella 7) che permette di amplificare molto le differenze tra i campioni ma che è anche fortemente influenzato dal rumore di fondo, portando alla costruzione di metodi poco robusti, che richiedono pertanto un numero molto elevato di campioni per la validazione. La normalizzazione vettoriale (*Vector Normalization*) è un sistema che permette di uniformare l'altezza degli spettri mantenendo la loro forma originaria.

In figura 29 è riportata la retta di regressione in calibrazione e i parametri di valutazione della bontà del modello in calibrazione (R^2 , RMSEE, RDP) per il descrittore Ossidato. Nella tabella 10, invece, sono riportati i corrispondenti parametri di valutazione del modello in validazione (R^2 , RMSECV, RDP). Per ogni modello viene inoltre riportato il numero di componenti principali utilizzate per la sua costruzione (*Rank*).

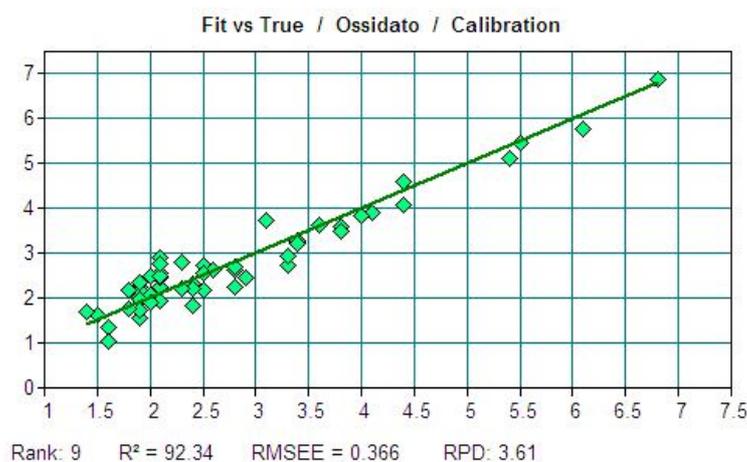


Tabella 10: Modello di regressione in validazione (spettri VIS) per il descrittore Ossidato.

Modello in Validazione (Cross validation)	
R^2	73.12
RMSECV	0.618
RPD	1.93
Rank	9

Figura 29: Modello di regressione in calibrazione (spettri VIS) per il descrittore Ossidato.

Da quanto sopra riportato, si può desumere che le informazioni latenti relative alla struttura chimico-fisica del vino contenute nello spettro VIS sono in qualche modo correlate con la percezione sensoriale dello stato ossidoriduttivo dei vini rossi (RS) e con i punteggi attribuiti al descrittore Ossidato. Rispetto alla mancanza di correlazioni con gli spettri UV sembra quindi che le informazioni contenute nello spettro VIS siano più adatte a descrivere la percezione organolettica dei vini, nonostante la variabilità dei campioni e lo scarso accordo dei giudici. La mancanza di correlazione con la percezione del difetto di riduzione porta inoltre a ritenere che le informazioni insite nello spettro VIS (fondamentalmente relative alla composizione fenolica del prodotto) non siano in grado di spiegare la presenza di difetti

prevalentemente legati alla composizione della frazione aromatica leggera (composti solforati). Appare inoltre interessante osservare come l'utilizzo di un approccio multivariato, che tiene conto di tutte le informazioni contenute nello spettro VIS, sia risultato molto più efficace nel descrivere le qualità organolettiche dei vini, rispetto ai tradizionali parametri di tipo univariato comunque legati allo spettro VIS, quali ad esempio la tonalità. A fronte di una semplice analisi di correlazione, che pur dimostra una relazione tra la tonalità e lo stato di evoluzione dei vini², ma che può diventare fuorviante per alcuni campioni, l'applicazione dell'analisi di regressione mediante PLS permette di ottenere modelli (in futuro probabilmente predittivi) molto più robusti per prevedere il tipo di evoluzione a cui può andare incontro un determinato vino ed eventualmente stimare la sua probabile vita commerciale.

8.3.3 Studio della correlazione tra analisi sensoriale e spettri FT-MIR

E' osservabile, in figura 30, la totalità dei campioni analizzati tramite l'ausilio della tecnica FT-MIR. Si è effettuata l'individuazione dell'eventuale presenza di *outlier* mediante analisi delle componenti principali (PCA), dove ogni lunghezza d'onda viene valutata come una singola variabile elaborando il *range* spettrale completo.

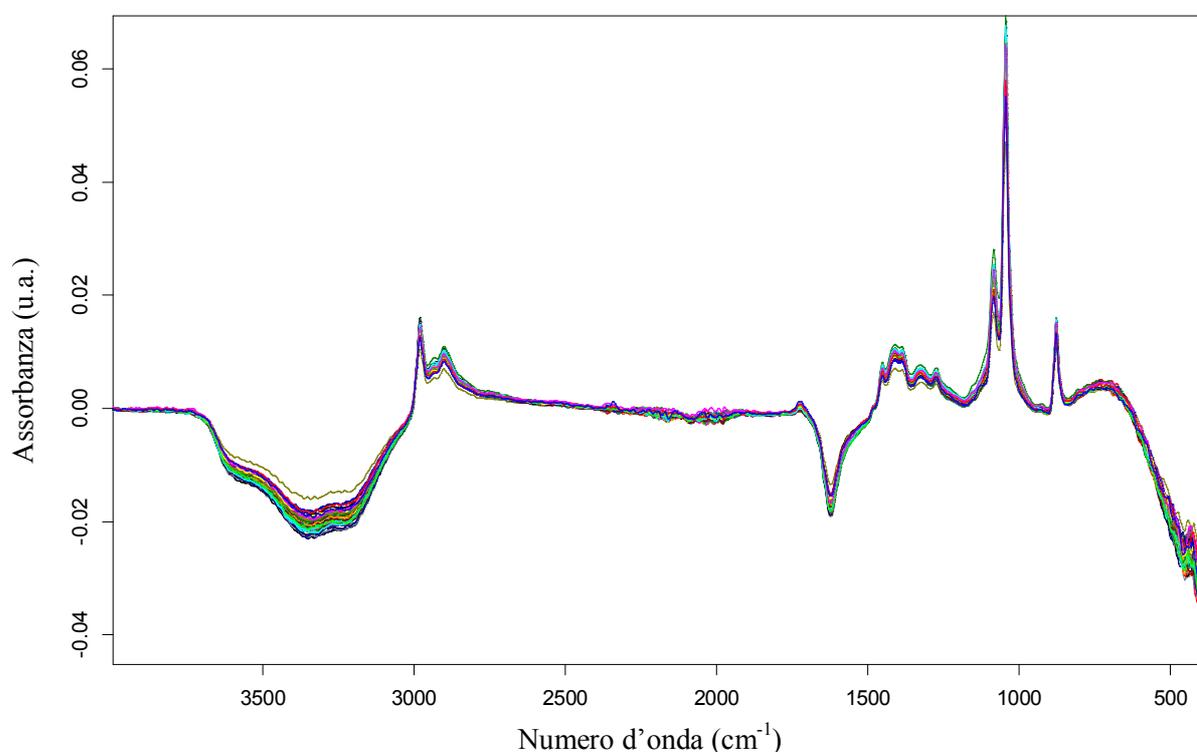


Figura 30: Spettri MIR di tutti i vini rossi analizzati.

² Cfr. pagg. 63 e 64.

La proiezione dei campioni sul piano rispetto ai valori assunti dalle prime due componenti principali (*Score 2 vs Score 1*) ha permesso di individuare i campioni anomali o comunque diversi dal resto del gruppo (figura 31) che sono stati eliminati (campioni 3, 40 e 45).

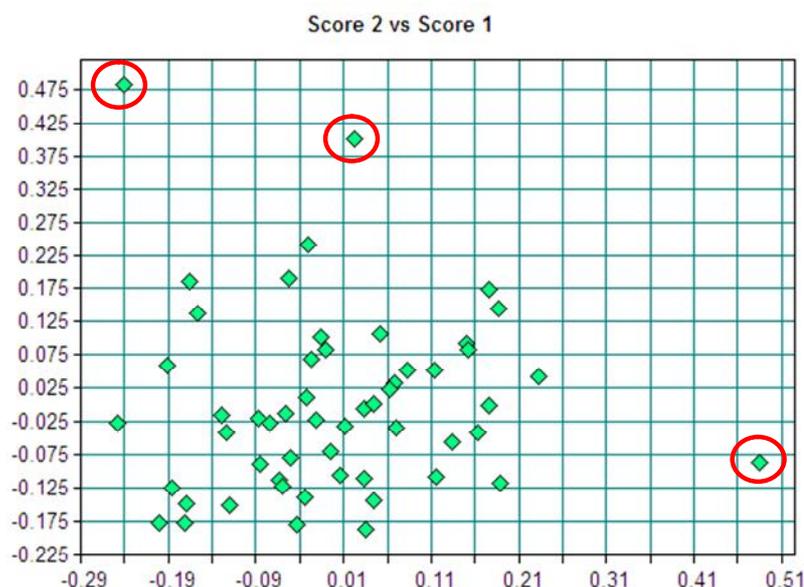


Figura 31: Individuazione degli outlier negli spettri FT-MIR mediante PCA.

Nel caso degli spettri MIR (n. 51 campioni utilizzati), non sono stati ottenuti modelli validi, né per il valore di RS, espresso sia come Mediana che come Media, né per i descrittori della scheda strutturata.

8.3.4 Studio della correlazione tra analisi sensoriale e spettri FT-NIR

In figura 32 sono raffigurati tutti gli spettri dei campioni analizzati tramite l'ausilio della tecnica FT-NIR. Anche per questa analisi si è effettuata l'individuazione dell'eventuale presenza di *outlier* tramite l'ausilio dell'analisi delle componenti principali (PCA), dove ogni lunghezza d'onda viene valutata come una singola variabile elaborando il *range* spettrale completo.

Anche per la spettroscopia NIR è stata elaborata la proiezione dei campioni sul piano rispetto ai valori assunti dalle prime due componenti principali (*Score 2 vs Score 1*) che ha permesso di individuare i campioni anomali o comunque diversi dal resto del gruppo (figura 33) che sono stati eliminati (campioni 45 e 47).

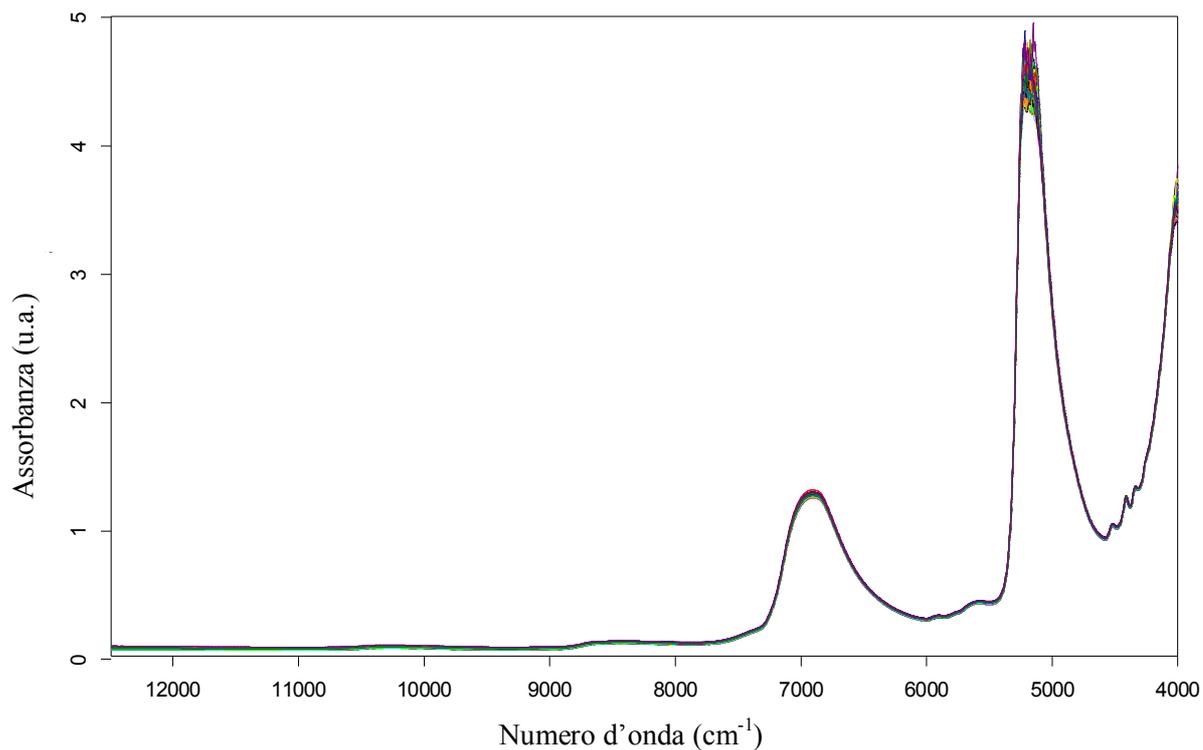


Figura 32: Spettri NIR di tutti i vini rossi analizzati.

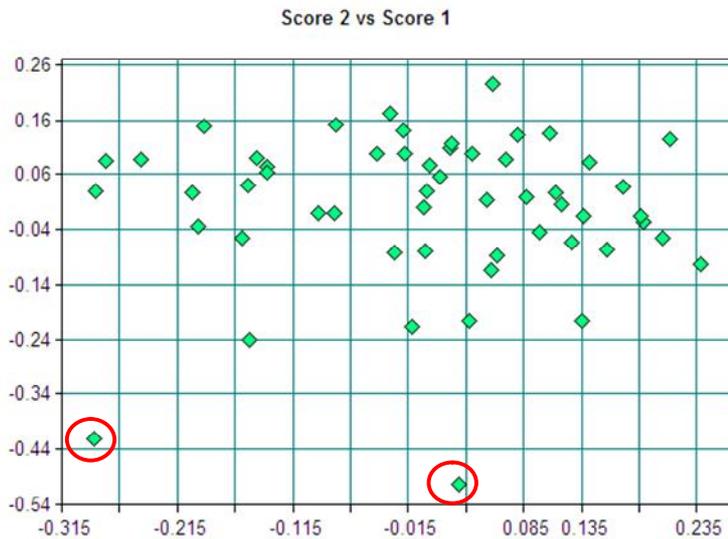


Figura 33: Individuazione degli outlier negli spettri FT-NIR mediante PCA.

Anche nel caso degli spettri NIR (n. 52 campioni utilizzati), non sono stati ottenuti modelli validi, né per il valore di RS, espresso sia come Mediana che come Media, né per i descrittori della scheda strutturata.

8.3.5 Studio della correlazione tra analisi sensoriale e tracciati voltammetrici

In figura 34 sono riportati i tracciati voltammetrici ottenuti dalla media dei voltammogrammi registrati per ciascun campione oggetto del presente studio.

Dal momento che la forma e l'altezza del tracciato voltammetrico forniscono informazioni specifiche relative al tipo e alla quantità di sostanze antiossidanti presenti nel campione, si è ipotizzato che la voltammetria ciclica potesse essere una tecnica analitica particolarmente utile ad individuare le relazioni tra percezione sensoriale dello stato evolutivo di un vino e composizione chimica del prodotto.

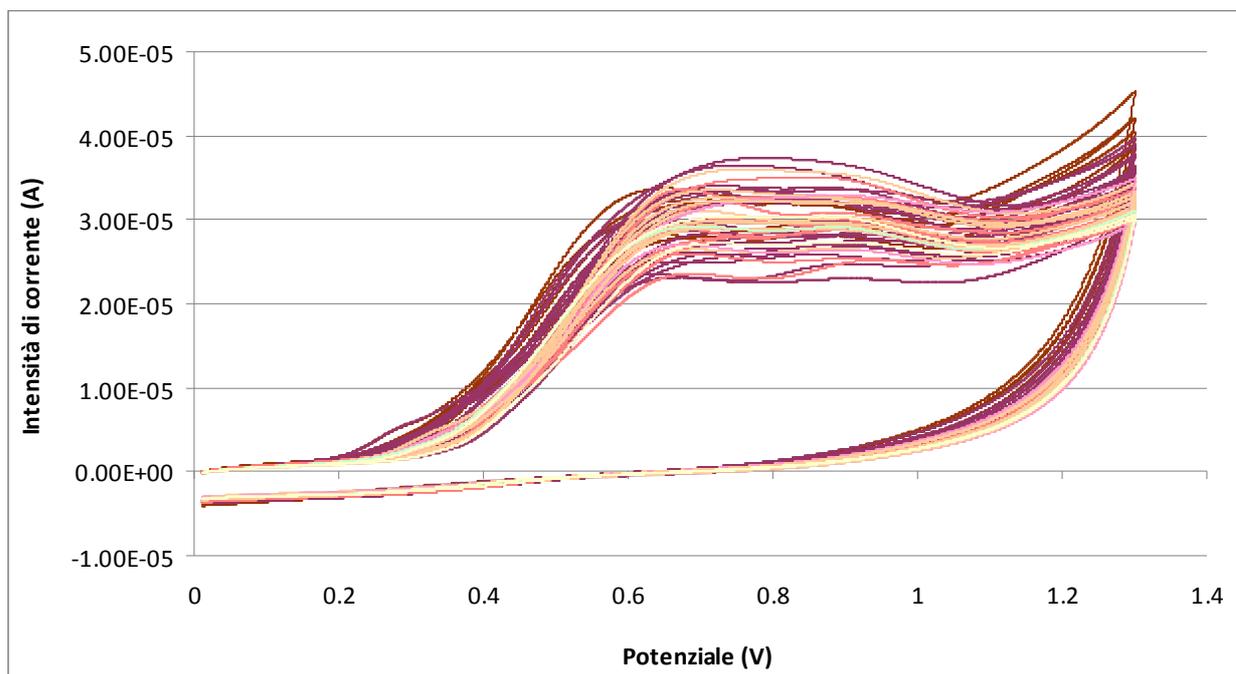


Figura 34: Voltammogrammi di tutti i campioni analizzati.

Si è cercato di costruire modelli di regressione distinti per ogni descrittore dell'analisi sensoriale utilizzato mentre per quanto riguarda la scheda non strutturata, si è cercato di costruire due modelli distinti utilizzando rispettivamente il valore di RS espresso come Mediana e il valore di RS espresso come Media e questo è stato fatto utilizzando sia la curva in andata che quella in ritorno (reversibilità delle reazioni redox). Non è stato identificato alcun *outlier* e quindi non è stata effettuata alcuna eliminazione di campioni.

I risultati relativi alla fase di ottimizzazione dei modelli relativi alla curva di andata sono riportati in tabella 11. Non sono invece stati individuati modelli validi utilizzando la parte del tracciato voltammetrico relativo alla curva di ritorno.

Tabella 11: Sistema di pretrattamento dei dati e range spettrali scelti per la costruzione dei modelli di regressione tra i diversi descrittori sensoriali e le curve voltammetriche.

Descrittori		Pretrattamento dei dati	Range di potenziale
SCHEDA NON STRUTTURATA	RS Mediana	Nessun modello valido	
	RS Media	Vector Normalization	0,6555 – 0,4674
SCHEDA STRUTTURATA	Ossidato	Vector Normalization	0,6555 – 0,4674
	Ridotto	Nessuno modello valido	
	Piac. Olfatto	Nessuno modello valido	
	Piac. Gusto	Nessuno modello valido	

Per i descrittori di Ridotto, Piacevolezza olfatto, Piacevolezza gusto, così come per il valore di RS espresso come Mediana, non è stato possibile costruire nessun modello di regressione valido (R^2 in calibrazione < di 60 ed R^2 in validazione < di 40), mentre per il valore RS espresso come Media e per il descrittore Ossidato, sono stati costruiti dei modelli di regressione sufficientemente buoni. Entrambi questi modelli sono basati sul pretrattamento dei dati tramite *Vector Normalization*.

In figura 35 è riportata la retta di regressione in calibrazione e i parametri di valutazione della bontà del modello in calibrazione (R^2 , RMSECV, RDP) per il descrittore Ossidato. Nella tabella 12, invece, sono riportati i corrispondenti parametri di valutazione del modello in validazione (R^2 , RMSECV, RDP) e il numero di componenti principali utilizzate per la sua costruzione (*Rank*).

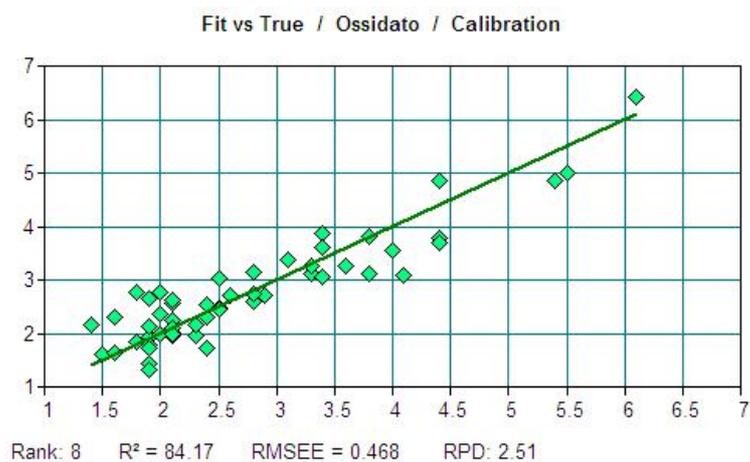


Tabella 12: Modello di regressione in validazione (voltammetria ciclica) per il descrittore Ossidato.

Modello in Validazione (Cross validation)	
R ²	54.01
RMSECV	0.727
RPD	1.48
Rank	8

Figura 35: Modello di regressione in calibrazione (voltammetria ciclica) per il descrittore Ossidato.

In figura 36, invece, è riportata la retta di regressione in calibrazione e i parametri di valutazione della bontà del modello in calibrazione (R^2 , RMSECV, RDP) per il valore di RS espresso come Media. Durante la costruzione del modello è stato individuato un altro campione (48) con caratteristiche anomale (figura 36), l'eliminazione del quale ha permesso di migliorare notevolmente le caratteristiche del metodo, ottenendo un aumento dell' R^2 ed una diminuzione dell'errore in calibrazione (figura 37). Nella tabella 13, sono riportati i corrispondenti parametri di valutazione del modello in validazione (R^2 , RMSECV, RDP) dopo l'esclusione del campione anomalo.

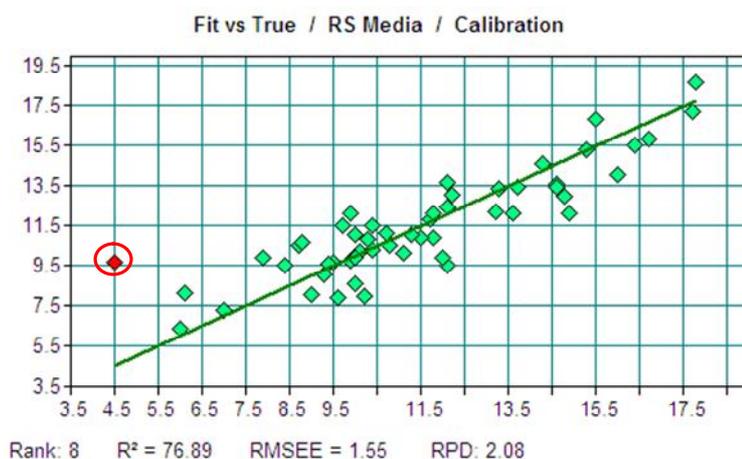


Figura 36: Modello di regressione in calibrazione (voltammetria ciclica) per il valore RS espresso come Media.

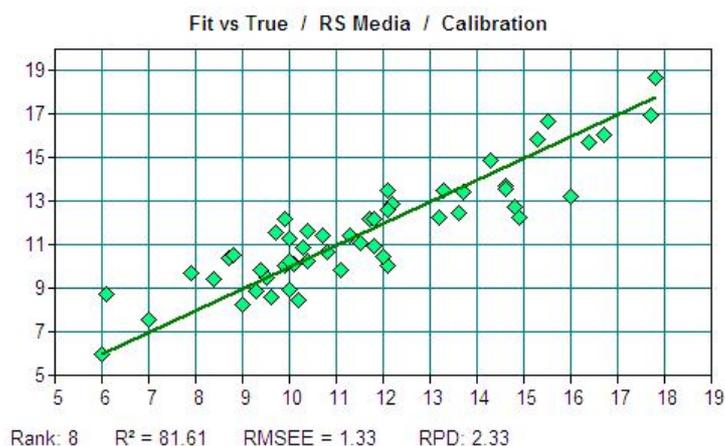


Tabella 13: Modello di regressione in validazione (voltammetria ciclica) per il valore di RS espresso come Media.

Modello in Validazione (Cross validation)	
R ²	54,17
RMSECV	1,9
RPD	1,49
Rank	8

Figura 37: Modello di regressione in calibrazione (voltammetria ciclica) per il valore RS espresso come Media dopo l'eliminazione dell'outlier.

Appare interessante osservare come, per entrambi i modelli di regressione ottenuti utilizzando le informazioni contenute nei voltammogrammi, il *range* di potenziali utilizzato per la costruzione del modello è compreso tra 0,4674 e 0,6555 V (figura 38), intervallo di potenziale nel quale è presumibile decorra l'ossidazione dei componenti polifenolici della matrice.

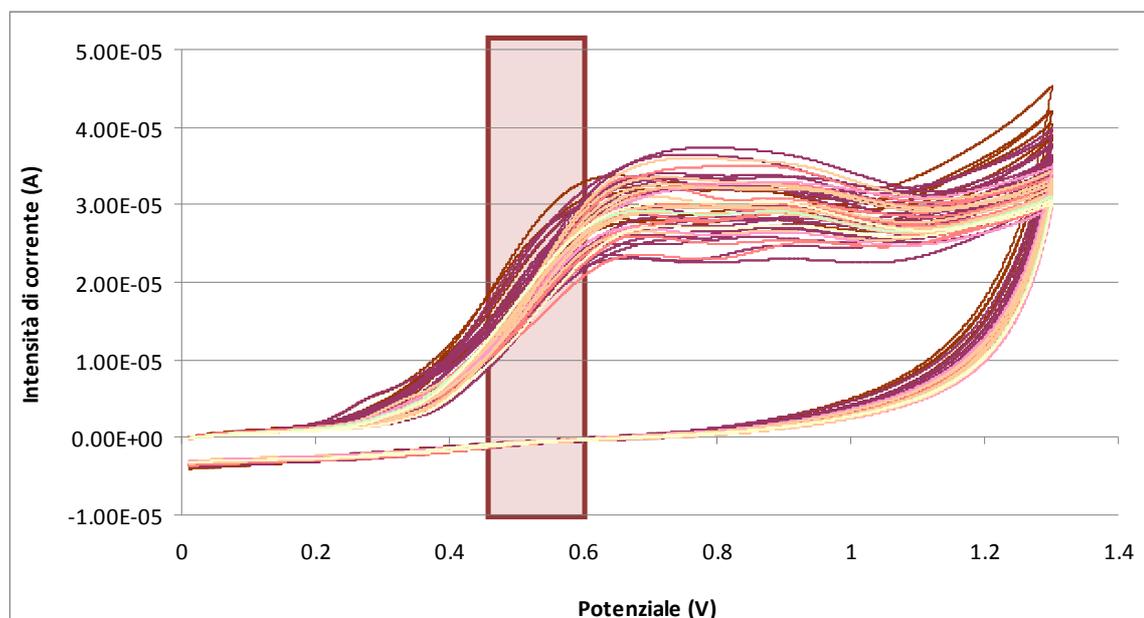


Figura 38: Area dei voltammogrammi che presenta le correlazioni con l'analisi sensoriale.

9. Vini rossi e vini bianchi: analogie e differenze

9.1 *Analisi sensoriale e spettri FT-MIR*

Analizzando i risultati ottenuti durante questo lavoro e quelli ottenuti durante lo studio della stessa problematica relativa ai vini bianchi (Bertoz, 2010), risulta evidente che sono stati ottenuti molti più modelli multivariati per i vini bianchi che per i vini rossi e questo fa sorgere inevitabilmente degli interrogativi sui motivi di tale differenza.

Osservando i risultati dell'analisi sensoriale, ci si è accorti immediatamente della minore riproducibilità dei giudici durante le sedute di analisi dei vini rossi rispetto a quella evidenziata dagli stessi durante le sedute di degustazione dei vini bianchi. Confrontando la deviazione standard calcolata sulla scheda sperimentale di tipo non strutturato, si è notato che sui vini bianchi i giudici sono stati maggiormente concordi nella valutazione dei campioni (figura 39). In tabella 14, oltre alla media delle deviazioni standard nelle singole sedute sono riportati i valori di Minimo e Massimo delle deviazioni standard dei giudici nella valutazione dei singoli campioni. Appare infatti interessante osservare come nel caso dei vini rossi i valori di minimo delle deviazioni standard sono molto più elevati di quelli dei vini bianchi, a conferma del fatto che per i primi i giudici hanno avuto maggiori problemi ad attribuire valutazioni uniformi. Questo diverso comportamento dei giudici potrebbe spiegare la maggior difficoltà ad individuare modelli potenzialmente predittivi applicando tecniche di elaborazione multivariata dei dati.

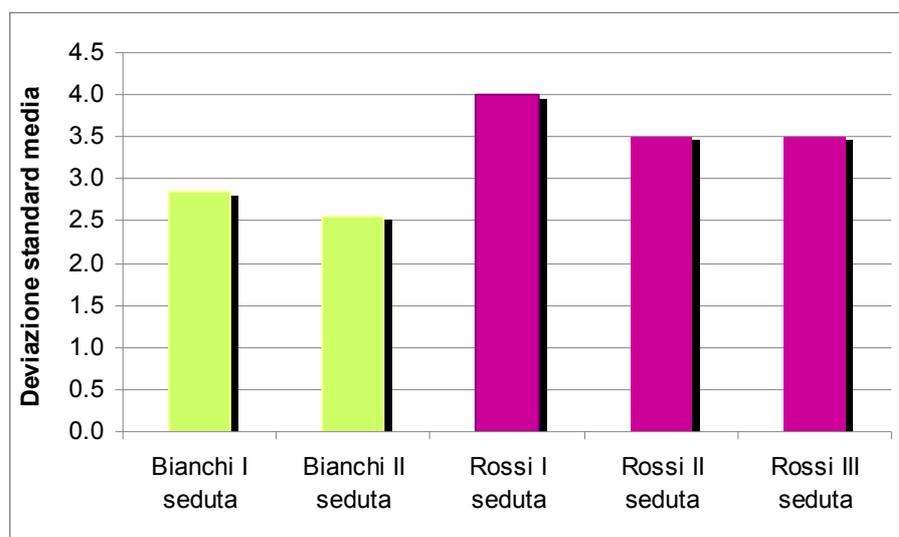


Figura 39: *Confronto delle medie delle deviazioni standard dei punteggi attribuiti dai giudici ai singoli campioni durante ciascuna seduta d'assaggio per i vini bianchi e i vini rossi.*

Tabella 14: Confronto di media, minimo e max tra le sedute di assaggio dei vini bianchi e quelle dei vini rossi.

	Media	Min	Max
Bianchi I seduta	2.9	0.6	5.6
Bianchi II seduta	2.6	0.5	7.5
Rossi I seduta	4.0	1.8	6.7
Rossi II seduta	3.5	1.6	5.4
Rossi III seduta	3.5	1.6	5.5

Per approfondire questi aspetti legati alle diverse modalità di valutazione dei vini da parte dei giudici e per capire come questo possa influenzare l'applicazione di metodi multivariati di analisi dei dati si è deciso di procedere innanzitutto ad una valutazione classica dei giudici che si basa sullo studio dell'accordo del singolo giudice con il gruppo mediante il programma Senstools. Sono stati esclusi da tale valutazione i giudici che non hanno partecipato a tutte e tre le sedute di assaggio. Di seguito vengono riportati i risultati dell'elaborazione espressi come accordo dei giudici per i singoli descrittori utilizzati (tabella 15) e come accordo medio del giudice considerando tutti i descrittori nel loro complesso (tabella 16). In tabella 15 il numero di asterischi indica il grado di accordo dei giudici (maggiore è il numero di asterischi maggiore è il grado di correlazione). In tabella 16 il grado di correlazione è espresso mediante un valore numerico. Valori negativi di questo parametro comportano l'esclusione del giudice; tanto maggiore è il valore del parametro tanto più il giudice è in accordo con il resto del gruppo. Vengono considerati buoni valori superiori a 0.20, molto buoni valori superiori a 0.4. Tutti i giudici hanno ottenuto valori superiori a 0.2 ad indicare un buon accordo dei giudici per tutti i descrittori. Si osserva inoltre che il giudice E risulta essere quello che si discosta maggiormente dalla media del gruppo soprattutto per i descrittori RS ed Ossidato. La rappresentazione grafica dei risultati mediante analisi delle componenti principali per i descrittori RS e Ossidato conferma le osservazioni fatte in precedenza ed evidenzia il diverso comportamento del giudice E (figure 40 e 41), che può essere giustificato tenendo conto del fatto che all'interno del *panel* il giudice E risultava essere il meno esperto nell'assaggio dei vini.

Tabella 15: Accordo dei singoli giudici con la media del gruppo per i singoli descrittori valutato mediante Senstools.

Giudice	RS	Ossidato	Ridotto	Piac. Olfatto	Piac. Gusto
A	**	***	*	**	**
B	***	***	***	***	***
C	**	***	**	**	**
D	***	***	**	**	**
E	*	*	**	**	**
F	**	**	*	**	**
G	***	***	***	**	**

Tabella 16: Accordo dei singoli giudici con la media del gruppo valutato mediante Senstools.

Accordo medio dei giudici con il resto del gruppo	
Giudice	Media
A	0.45
B	0.73
C	0.50
D	0.59
E	0.30
F	0.37
G	0.61

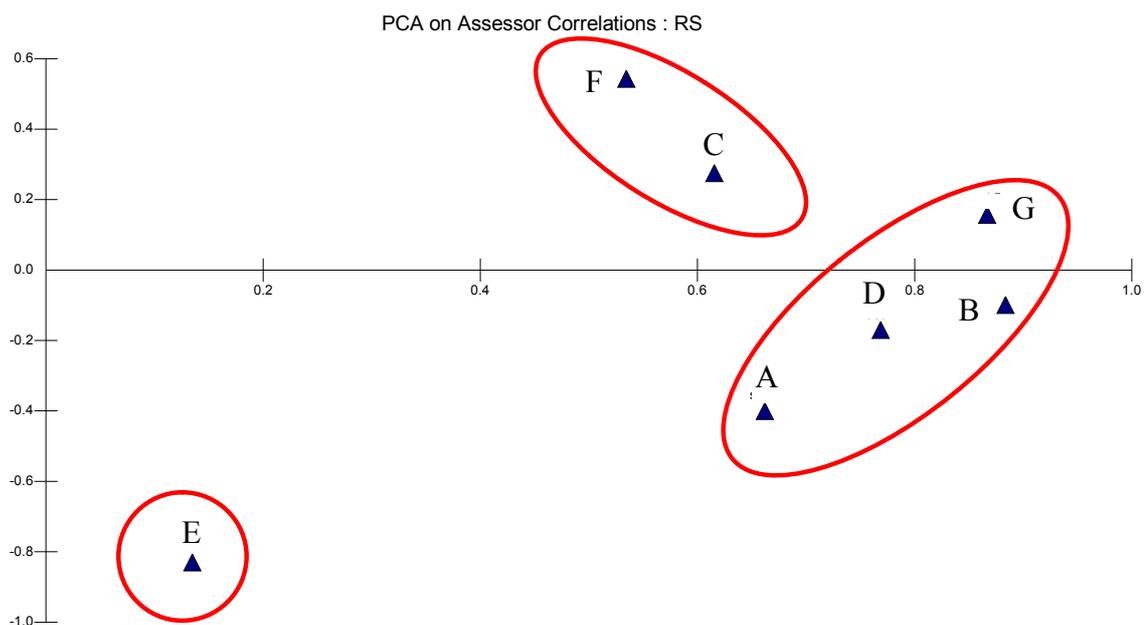


Figura 40: Valutazione dell'accordo tra i giudizi per il valore RS mediante programma Senstools.

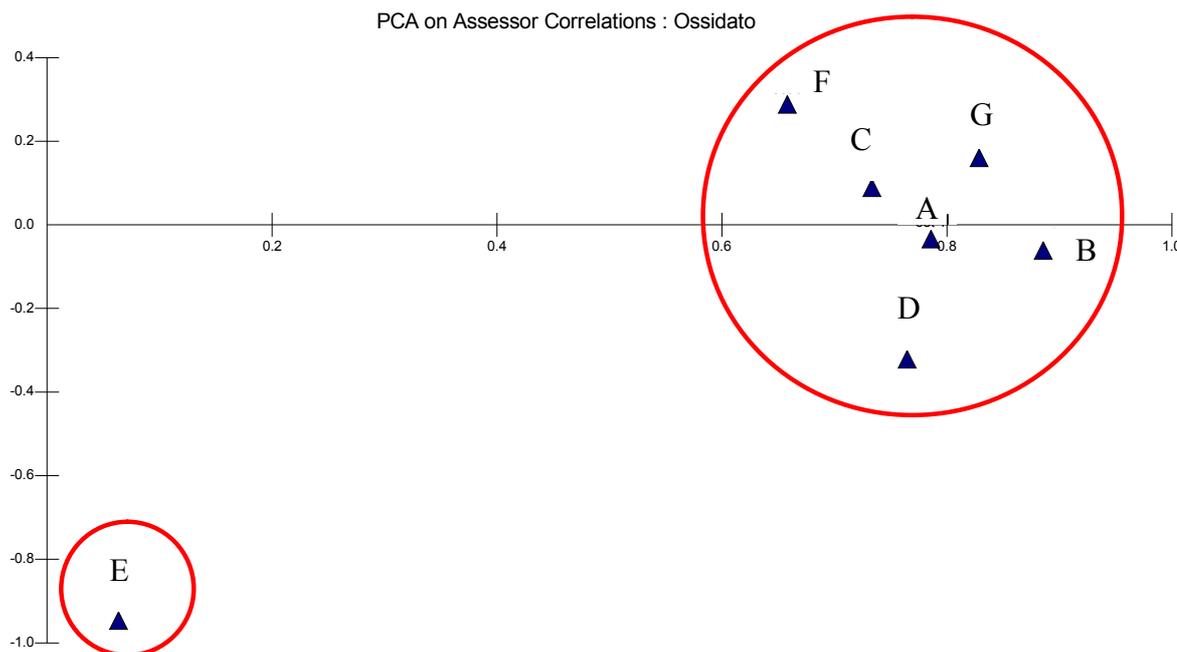


Figura 41: Valutazione dell'accordo dei giudizi per il descrittore Ossidato mediante programma Senstools.

Si è passati quindi ad indagare il comportamento dei giudici sfruttando l'analisi multivariata e studiando la correlazione tra i valori di RS attribuiti dal singolo giudice con gli spettri FT-MIR. Poiché per i vini bianchi ed i vini rossi è stato utilizzato un *panel* d'assaggio costituito, salvo qualche eccezione, dagli stessi giudici, questa elaborazione è stata effettuata sia per i vini rossi che per i vini bianchi. Si è scelto di tentare questo tipo di correlazione con lo spettro MIR in quanto, essendo l'informazione in esso contenuta legata agli stati vibrazionali e rotazionali delle molecole che compongono il prodotto, dovrebbe permettere di individuare meglio eventuali correlazioni tra la percezione sensoriale e la macrocomposizione del prodotto. Sono state tentate anche delle correlazioni tra i risultati del singolo giudice e spettri UV, VIS, NIR e il tracciato voltammetrico, senza però ottenere risultati altrettanto soddisfacenti.

Nel grafico di figura 42 sono riportati i valori di R^2 in calibrazione ottenuti dall'elaborazione multivariata di cui si è detto sopra. In generale appare evidente come, nel caso dei vini bianchi, per tutti i giudici sono stati ottenuti modelli di regressione con valori di R^2 molto elevati, ad indicare un'elevata capacità degli stessi di valutare in modo analogo campioni con una struttura macrocompositiva simile. Nel caso dei vini rossi, invece, si sono

ottenuti, soprattutto per alcuni giudici, valori di R^2 decisamente più bassi. La bassa correlazione di parte del *panel* con le informazioni contenute nello spettro può effettivamente spiegare la difficoltà riscontrata nell'individuazione di modelli di regressione validi tra risultati dell'analisi sensoriale e dati spettrali.

Diventa inoltre interessante confrontare i risultati ottenuti attraverso questo tipo di analisi multivariata con la valutazione classica dei giudici mediante lo studio dell'accordo rispetto alla media del gruppo. Da un lato si osserva che i due giudici per i quali sono stati ottenuti i valori di R^2 più bassi (C ed F), nell'analisi delle componenti principali di figura 40 si collocano nella zona più alta del grafico. Per contro, però, il giudice E, che nell'analisi delle componenti principali di figura 40 si colloca nella zona più bassa del grafico, lontano dagli altri giudici, ha ottenuto un valore di R^2 tra i più alti (96,47), secondo solo al giudice B (96,84).

Si è proceduto, allora, alla estrapolazione dagli spettri MIR dei parametri tipici di analisi dei vini (alcol, acidità totale, acido malico, zuccheri riduttori, estratto, ecc.) per verificare che le valutazioni sullo stato ossidoriduttivo dei campioni date da questo giudice non fossero in qualche modo collegabili con qualcuno di questi aspetti compositivi ma non è stata trovata alcuna correlazione, a conferma del fatto che il giudice è stato capace di valutare in modo puntuale il parametro senza relazionarlo alla macrocomposizione del prodotto.

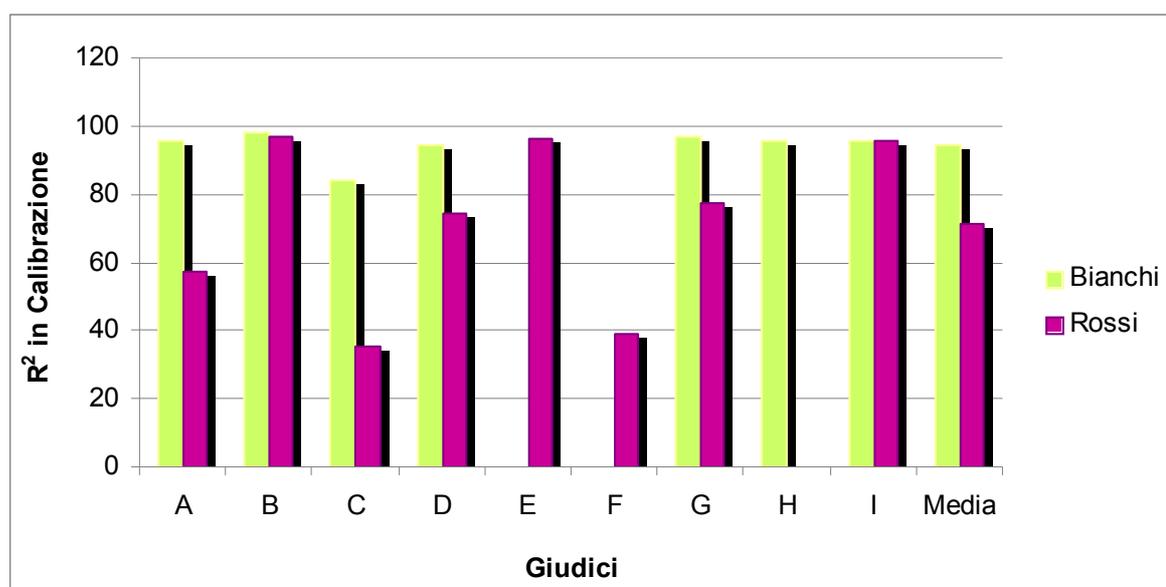


Figura 42: Valori di R^2 in calibrazione ottenuti dall'elaborazione multivariata dei valori di RS attribuiti dal singolo giudice con gli spettri FT-MIR.

Dalle considerazioni fatte emerge che l'applicazione dell'analisi multivariata, che combina i dati spettrali con quelli dell'analisi sensoriale, potrebbe diventare non solo uno strumento per studiare le caratteristiche dei vini (qualità organolettica, stato evolutivo), ma anche un sistema di valutazione delle prestazioni dei giudici che può essere affiancato alle metodiche di elaborazione statistica più tradizionali (es. accordo dei giudici). Nel corso di quest'ultima parte, infatti, sono state messe in evidenza sia le analogie che le differenze tra i sistemi di valutazione tradizionali dei giudici e il nuovo approccio multivariato, approccio quest'ultimo che, tra l'altro, permette di spiegare meglio per quale motivo nei vini rossi si sia trovato un minor numero di modelli di regressione efficaci nel prevedere l'evoluzione sensoriale dei prodotti.

9.2 Voltammetria ciclica e stato ossidoriduttivo dei vini

Nonostante si ipotizzasse che la voltammetria ciclica fosse il metodo più promettente, nel corso dello studio condotto sui vini bianchi (Berto, 2010) non è stato possibile individuare alcun modello di regressione tra i tracciati voltammetrici e la percezione sensoriale dello stato redox. Nel caso dei vini rossi, invece, sono stati costruiti due interessanti modelli di regressione rispettivamente per i descrittori RS espresso come Media ed Ossidato.

Confrontando i tracciati voltammetrici dei vini bianchi e dei vini rossi si può evidenziare sia la diversa forma della curva, soprattutto nella zona compresa tra 0.4 e 1.0 V sia la minor variabilità dei tracciati nel caso dei vini rossi. L'ipotesi che la difficoltà nell'individuare modelli validi sia legata all'elevata variabilità dei tracciati (Berto, 2010) e quindi della matrice, trova in parte conferma in questo lavoro; infatti voltammogrammi più omogenei permettono di individuare delle zone di potenziali utili a studiare lo stato redox. Rimane da capire se la maggior variabilità osservata nei vini bianchi sia legata al tipo di base campionaria utilizzata o ad una reale maggior differenziazione della composizione in sostanze antiossidanti di questa tipologia di vini.

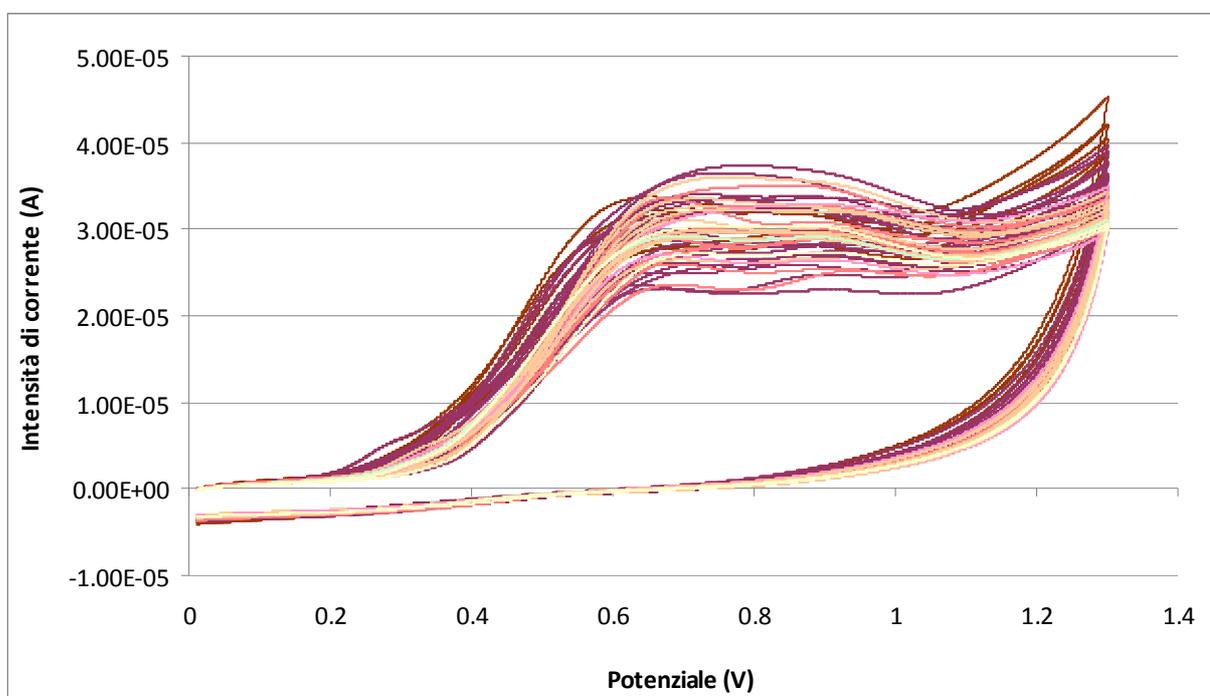
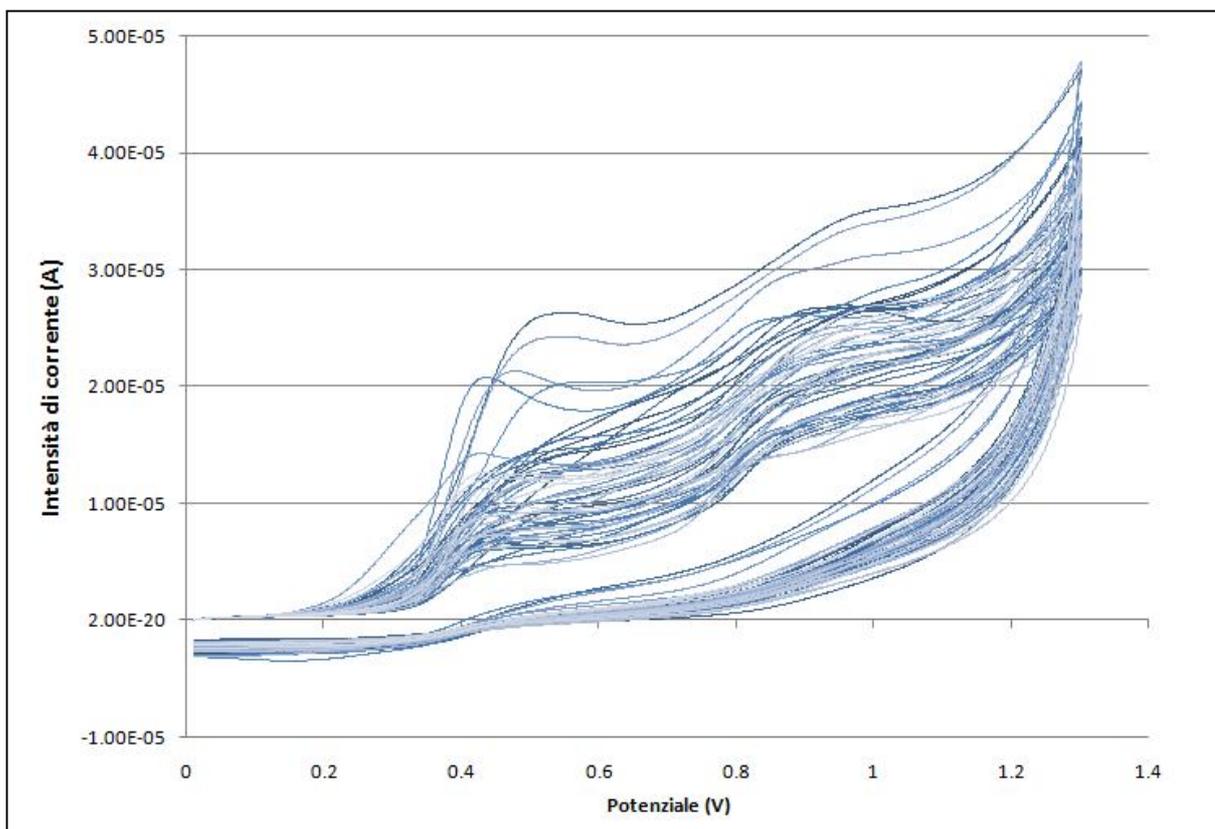


Figura 43: Confronto dei tracciati voltammetrici dei vini bianchi e dei vini rossi.

10. Conclusioni

Lo studio effettuato sull'esistenza di eventuali correlazioni fra l'analisi sensoriale e le analisi chimiche inerenti allo stato ossidoriduttivo dei vini rossi, con approccio di tipo multivariato, abbinato alla verifica della validità di una scheda sperimentale non strutturata rispetto ad una scheda strutturata tradizionale, ha portato alle seguenti considerazioni:

- La scheda di tipo non strutturato ha dato ottimi risultati confrontata alla scheda di tipo strutturato. In primo luogo è risultata essere di immediata comprensione e utilizzo. Secondariamente ha fornito una più precisa indicazione del valore assunto dal descrittore preso in considerazione perché presenta una scala molto più ampia se confrontata con il punteggio da 1 a 9 attribuibile al campione con una scheda di tipo strutturato.
- L'utilizzo della scheda di tipo non strutturato lascia il giudice più libero nella valutazione del prodotto mentre l'impiego degli ancoraggi verbali, che delimitano zone della curva corrispondenti a determinate caratteristiche organolettiche, aiuta il giudice ad individuare più facilmente la posizione del campione e semplifica il confronto fra i diversi vini.
- Il valore di RS, che definisce lo stato ossidativo e riduttivo dei vari campioni, estrapolato dalla scheda non strutturata, ha permesso la creazione di modelli di regressione con due delle tecniche analitiche multivariate utilizzate (VIS e voltammetria ciclica).
- Per quanto riguarda la scheda strutturata tradizionale, solo con il descrittore Ossidato è stata possibile la creazione di modelli di regressione validi con due delle tecniche analitiche multivariate impiegate (VIS e voltammetria ciclica). Per i descrittori Ridotto, Piacevolezza Olfatto e Piacevolezza Gusto, invece, non è stato possibile elaborare alcun modello attendibile.
- Dallo studio delle correlazioni rilevate nel caso degli spettri VIS, ed in particolare dall'analisi del buon modello di regressione che è stato possibile costruire con il descrittore RS, si può desumere che le informazioni latenti, relative alla struttura chimico-fisica dei vini, contenute nello spettro VIS siano in qualche modo correlate con la percezione sensoriale dello stato ossidoriduttivo dei vini rossi. La costruzione del modello

di regressione ottenuto con il descrittore Ossidato, invece, ha richiesto tecniche di pretrattamento dei dati che possono comportare una forte alterazione degli spettri originali. Per tale motivo la costruzione di modelli validi necessita di un numero molto elevato di campioni che tengano conto della variabilità complessiva della popolazione.

- La voltammetria ciclica ha permesso la costruzione di modelli di regressione buoni sia con il descrittore RS della scheda non strutturata, sia con il descrittore Ossidato della scheda strutturata. Appare interessante notare che, per entrambi i modelli di regressione ottenuti utilizzando le informazioni contenute nei voltammogrammi, il *range* di potenziali utilizzato per la costruzione del modello è compreso tra 0,4674 e 0,6555 V, intervallo di potenziale nel quale è presumibile decorra l'ossidazione dei componenti polifenolici della matrice.

Dal confronto tra i risultati ottenuti con questo studio e quelli ottenuti nello studio precedente effettuato sui vini bianchi (Bertoz, 2010), inoltre, si sono rilevate le seguenti differenze:

- Per i vini bianchi sono stati ottenuti modelli di regressione validi con quasi tutte le tecniche analitiche multivariate utilizzate (ad eccezione della voltammetria ciclica) mentre con i vini rossi è stato possibile costruire modelli di regressione con due sole tecniche (VIS e voltammetria ciclica).
- Osservando i risultati dell'analisi sensoriale si rileva una minore riproducibilità dei giudici durante le sedute di analisi dei vini rossi rispetto a quella evidenziata dagli stessi durante le sedute di degustazione dei vini bianchi. L'analisi della deviazione standard calcolata sulla scheda sperimentale di tipo non strutturato evidenzia che i giudici sono stati maggiormente concordi nella valutazione dei campioni durante le sedute di degustazione dei vini bianchi e questo diverso comportamento potrebbe spiegare il maggior numero di modelli multivariati ottenuti per i vini bianchi rispetto a quelli ottenuti per i vini rossi.
- Studiando la correlazione tra i valori di RS attribuiti dal singolo giudice e gli spettri FT-MIR, mediante analisi multivariata, nel caso dei vini bianchi sono stati ottenuti modelli di regressione con valori di R^2 molto elevati mentre nel caso dei vini rossi si sono ottenuti

valori di R^2 anche molto bassi. I giudici, quindi, hanno dimostrato un'elevata capacità di valutare in modo analogo campioni con una struttura macrocompositiva simile durante le sedute di assaggio dei vini bianchi mentre hanno evidenziato una grande difficoltà nel fare questo durante l'analisi dei vini rossi. La bassa correlazione di parte del *panel* con le informazioni contenute nello spettro può forse spiegare la difficoltà riscontrata nell'individuazione di modelli di regressione validi tra risultati dell'analisi sensoriale e dati spettrali.

Questo studio, quindi, ha dimostrato che l'applicazione di tecniche analitiche semplici, veloci e poco costose per la valutazione dello stato redox dei vini, tramite l'impiego di elaborazioni statistiche di tipo multivariato, è sicuramente possibile ma si dimostra più complessa nel caso dei vini rossi che dei vini bianchi. I vini rossi, infatti, presentano un patrimonio di sostanze polifenoliche e antiossidanti molto più articolato e variegato e questo li rende più difficili da valutare. E' ragionevole pensare che la maggiore ricchezza dei vini rossi, in termini di alcol, sostanze coloranti, estratto, ecc., finisca col rendere più difficoltosa l'individuazione del difetto, sia esso di riduzione o di ossidazione. Sarebbe, inoltre, dall'osservazione delle valutazioni espresse dai giudici che i concetti di "evoluto" e "ossidato" nel caso dei vini rossi assumano un significato molto diverso: la nota ossidata, in un vino bianco, viene valutata con certezza dai giudici, in modo univoco, come un difetto mentre nel vino rosso non solo non viene sempre indicata come un difetto ma, in qualche caso, viene premiata come se si trattasse di una nota caratteristica e ricercata.

In conclusione, proseguendo su questa strada, tramite l'utilizzo di strumentazioni diffuse ormai in molte cantine, sarà possibile, con ogni probabilità, delineare modelli validi e robusti, che in futuro potrebbero poi diventare predittivi, che permettano di comprendere meglio i meccanismi che stanno alla base dei processi di evoluzione del prodotto e che rendano meno empirica la valutazione della possibile vita commerciale dei vini. Ma per fare questo, ovviamente, occorrerà analizzare un numero molto elevato di campioni, sia bianchi che rossi, tale da comprendere la variabilità complessiva della popolazione.

11. Bibliografia

1. Bertoz, S., Tecniche Innovative per la valutazione dello stato ossidativo dei vini bianchi. Tesi di Laurea, Università di Udine **2010**.
2. Conzen, J.-P., *Multivariate Calibration*. 2° ed.; Bruker Optik GmbH: **2006**.
3. Cozzolino, D.; Kwiatkowski, M. J.; Parker, M.; Cynkar, W. U.; Damberg, R. G.; Gishen, M.; Herderich, M. J., Prediction of Phenolic Compounds in Red Wine Fermentations by Visible and Near Infrared Spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 513, 73-80.
4. Cozzolino, D.; Smyth, H. E.; Lattey, K. A.; Cynkar, W. U.; Janik, L.; Damberg, R. G.; Francis, I. L.; Gishen, M., Relationship Between Sensory analysis and Near Infrared Spectroscopy in Australian Riesling and Chardonnay Wines. *Analytica Chimica Acta* **2005**, 539, 341-348.
5. Cozzolino, D.; Smyth, H. E.; Lattey, K. A.; Cynkar, W.; Janik, L.; Damberg, R. G.; Francis, I. L.; Gishen, M., Combining Mass Spectrometry Based Electronic Nose, Visible-Near Infrared Spectroscopy and Chemometrics to Assess the Sensory Properties of Australian Riesling Wine. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 563, 319-324.
6. Cozzolino, D.; Cynkar, W. U.; Shah, N.; Damberg, R. G.; Smith, P. A., A brief Introduction to Multivariate Methods in Grape and Wine Analysis. *International Journal of Wine Research* **2009a**, 1, 123-130.
7. Cozzolino, D.; Holdstock, M.; Damberg, R. G.; Cynkar, W. U.; Smith, P. A., Mid Infrared Spectroscopy and Multivariate Analysis: A Tool to Discriminate Between Organic and Non-Organic Wines Grown in Australia. *Food Chemistry* **2009b**, 116, 761-765.
8. Escudero, A.; Asensio, J.; Cacho, J.; Ferreira, V., Sensory and Chemical Changes of Young White Wines Stored Under Oxygen. An Assessment of the Role Played by Aldehydes and Some Other Important Odorants. *Food Chemistry* **2002**, 77, 325-331.

9. Fernández-Navales, J.; López, M.-I.; Sánchez, M. T.; Morales, J.; Gonzáles-Caballero, V., Shortwave-Near Infrared Spectroscopy for Determination of Reducing Sugar Content During Grape Ripening, Winemaking, and Aging of White and Red Wines. *Food Research International* **2009**, *42*, 285-291.
10. Francois, I. M.; Wins, H.; Buysens, S.; Godts, C.; Van Pee, E.; Nicolai, B.; De Proft, M., Predicting Sensory Attributes of Different Chicory Hybrids Using Physico-Chemical Measurements and Visible/Near Infrared Spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology* **2008**, *49*, 366-373.
11. Godden, P.; Francis, L.; Field, J.; Gishen, M.; Coulter, A.; Valente, P.; Hoj, P.; Robinson, E., Wine bottle closures: physical characteristics and effect on composition and sensory properties of a Semillon wine. 1. Performance up to 20 months post bottling *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2001**, *7*, 64-105.
12. Janik, L. J.; Cozzolino, D.; Damberg, R.; Cynkar, W.; Gishen, M., The Prediction of Total Anthocyanin Concentration in Red-Grape Homogenates Using Visible-Near-Infrared Spectroscopy and Artificial Neural Networks. *Analytica Chimica Acta* **2007** *594*, 107-118.
13. Karbowiak, T.; Gougeon, R. D.; Aline, J. B.; Brachais, L.; Debeaufort, F.; Voilley, A.; Chassagne, D., Wine Oxidation and the Role of Cork. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2010**, *50*, 20-52.
14. Kobler, A., Limiti e Possibili Evoluzioni dell'Analisi Sensoriale Quantitativa dei Vini. *L'enologo* **2008**, *44*, (11), 71-78.
15. Kocaoglu-Vurma, N. A.; Eliardi, A.; Drake, M. A.; Rodriguez-Saona, L. E.; Harper, W. J., Rapid Profiling of Swiss Cheese by Attenuated Total Reflectance (ATR) Infrared Spectroscopy and Descriptive Sensory Analysis. *Journal of Food Science* **2009**, *74*, (6), 232-239.
16. Laurie, F. V.; Waterhouse, A. L., Oxidation of Glycerol in the Presence of Hydrogen Peroxide and Iron in Model Solutions and Wine. Potential Effects on Wine Color. *Agricultural and food chemistry* **2006**, *54*, 4668-4673.

17. Le Moigne, M.; Maury, C.; Bertrand, D.; Jourjon, F., Sensory and Instrumental Characterisation of Cabernet Franc Grapes according to Ripening Stages and Growing Location. *Food Quality and Preference* **2008**, 19, 220-231.
18. Lesica, M.; Košmerl, T., Microoxygenation of Red Wines. *Acta agriculturae Slovenica*, **september 2009**, 93, 327-336.
19. Li, H.; Guo, A.; Wang, H., Mechanisms of Oxidative Browning of Wine. *Food Chemistry* **2008**, 8, (1), 1-13.
20. Limmer, A., The Chemistry of Post-Bottling Sulfides in Wine. *Chemistry in New Zealand* **2005a**, September 2005, 2-5.
21. Limmer, A., Suggestion for Dealing with Post-Bottling Sulfides. *The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker* **2005b**, December 2005, 67-75.
22. Limmer, A., The Chemistry and Possible Ways of Mitigation of Post-Bottling Sulfides. *New Zealand WineGrower* **2005c**, Winter2005, 34-37.
23. Lin, M.; Rasco, B. A.; Cavinato, A. G.; Al-Holy, M., *Infrared (IR) Spectroscopy - Near - Infrared Spectroscopy and Mid-Infrared Spectroscopy in Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Edited by Sun D-W. Elsevier Inc.: Burlington (U.S.A.), **2009**; p 119-143.
24. Liu, L.; Cozzolino, D.; Cynkar, W. U.; Damberg, R. G.; Janik, L.; O'Neill, B. K.; Colby, C. B.; Gishen, M., Preliminary Study on the Application of Visible-Near Infrared Spectroscopy and Chemometrics to Classify Riesling Wines from Different Countries *Food Chemistry* **2008**, 106, 781-786.
25. Makhotkina, O.; Kilmartin, P. A., Uncovering the Influence of Antioxidants on Polyphenol Oxidation in Wines Using an Electrochemical Method: Cyclic Voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2009**, 633, 165-174.
26. Mangani, S.; Favilli, C.; Buscioni, G.; Vincenzini, M., Gli Antociani dei Vini Rossi: Indicatori Varietali in Pasto ai Microrganismi. *L'enologo* **2008**, 44 (1) 95-100.

27. Martins, R. C.; Oliveira, R.; Bento, F.; Geraldo, D.; Lopes, V. V.; Guedes de Pinho, P.; C.M.; O.; Silva Ferreira, A. C., Oxidation Management of White Wines Using Cyclic Voltammetry and Multivariate Process Monitoring. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, 56, 12092-12098.
28. Naes, T.; Isaksson, T.; Fearn, T.; Davies, T., *A User-Friendly Guide to Multivariate Calibration and Classification*. NIR Publications: Chichester (UK), **2002**.
29. Oliveira, C. M.; Silva Ferreira, A. C.; de Pinho, P. G.; Hogg, T. A., Development of a Potentiometric Method to Measure the Resistance to Oxidation of White Wines and the Antioxidant Power of their Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, 50, 2121-2124.
30. Ortiz, M.C.; Sarabia, L.; Garcia-Rey, R.; de Castro, M.D.L., Sensitivity and Specificity of PLS-class Modelling for Five Sensory Characteristics of Dry-Cured Ham using Visible and Near Infrared Spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* **2006**, 558, 125-131.
31. Pagliarini, E., *Valutazione sensoriale. Aspetti teorici, pratici e metodologici*. Hoepli: Milano, **2002**.
32. Patz, C.-D.; Blieke, A.; Ristow, R.; Dietrich, H., Application of FT-MIR Spectrometry in Wine Analysis. *Analytica Chimica Acta* **2004**, 513, 81-89.
33. Petrovic, S. C., Correlation of Perceived Wine Astringency to Cyclic Voltammetric Response. *American Journal of Enology and Viticulture* **2009**, 60, (3), 373-378.
34. Piljac, J.; Martinez, S.; Stipčević, T.; Petrović, Ž.; Metikoš-Huković, M., Cyclic Voltammetry Investigation of the Phenolic Content of Croatian Wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2004**, 55:4.
35. Prieto, N.; Roehe, R.; Lavín, P.; Andrés, S., Application of Near Infrared Reflectance Spectroscopy to Predict Meat and Meat Products Quality: a Review. *Meat Science* **2009**, 83, 175-186.

36. Rencher, A. C., *Methods of Multivariate Analysis*. 2° ed.; John Wiley & Sons, Inc.: New York, **2002**.
37. Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A., *Trattato di Enologia I*. 2^a ed.; Edagricole: Bologna, **2003**.
38. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D., *Trattato di Enologia II*. 2^a ed.; Edagricole: Bologna, **2003**.
39. Romía, M. B.; Bernàrdez, M. A., *Multivariate Calibration for Quantitative Analysis in Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Edited by Sun D-W. Elsevier Inc.: Burlington (U.S.A.), **2009**; p 51-82.
40. Roussel, S.; Bellon-Maurel, V.; J.-M., R.; Grenier, P., Authenticating White Grape Must Variety with Classification Models Based on Aroma Sensors, FT-IR and UV Spectrometry. *Journal of Food Engineering* **2003**, 60, 407-419.
41. Silva Ferreira, A. C.; Oliveira, C. M.; Hogg, T.; Guedes de Pinho, P., Relationship Between Potentiometric Measurements, Sensorial Analysis, and Some Substances Responsible for Aroma Degradation of White Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51, 4668-4672.
42. Urbano-Cuadrado, M.; Luque de Castro, M. D.; Pérez-Juan, P. M.; Garcia-Olmo, J.; Gómez-Nieto, M. A., Near Infrared Reflectance Spectroscopy and Multivariate Analysis in Enology Determination or Screening of Fifteen Parameters in Different Types of Wines *Analytica Chimica Acta* **2004**, 527, 81-88.
43. Ursini, F.; Tubaro, F.; Rapuzzi, P., *Vino e Salute*. Forum - Editrice Universitaria Udinese, **1997**.
44. Valitutti, G.; Fornari, G.; Gando, M. T., *Chimica Organica Biochimica e Laboratorio*. 3° ed.; Masson S.p.A.: Milano, **1998**.

45. Warm, K.; Martens, H.; Nielsen, J., Sensory Quality Criteria for Five Fish Species Predicted from Near-Infrared (NIR) Reflectance Measurement. *Journal of Food Quality* **2001**, 24, 389-403.
46. Zironi, R.; Scobioala, S.; Comuzzo, P.; Battistutta, F., Tecniche Conservative di Vinificazione. *Notiziario Ersu* **2007**, 3, 48-50.
47. Zironi, R.; Comuzzo, P.; Tat, L.; Scobioala, S., Ossigeno e Vino. *Rivista Internet di Viticoltura ed Enologia – www.infowine.com* **2010**, 4/2.

Siti internet consultati

http://it.wikibooks.org/wiki/Chimica_organica/Eterociclici

<http://www.enco-journal.com/journal/ej30/birelli.html>

www.darapri.it/immagini/nuove_mie/degustazione/app_sostanzeresponsabilicolore.htm