

DOCUMENTO  
TECNICO

**Emilio Celotti**  
**Roberto Zanzotti**

*Dipartimento di Scienze  
degli Alimenti, Università  
degli Studi di Udine - Udine*

*Da sinistra:  
E. Celotti,  
R. Zanzotti*

## NUOVI SVILUPPI NEL CONTROLLO DEI COADIUVANTI ENOLOGICI: UTILIZZO DELLA SPETTROSCOPIA IR

La tecnica analitica rapida e non distruttiva della spettroscopia infrarosso (IR) è stata applicata al controllo qualità di alcuni coadiuvanti enologici. Questi primi risultati hanno consentito di verificare la validità dell'approccio IR nel vicino (NIR) e nel medio (MIR) infrarosso per la caratterizzazione qualitativa dei coadiuvanti, per la verifica dei lotti di produzione e delle miscele di prodotti.

### Introduzione

I prodotti enologici, usati correttamente, sono un valido aiuto per rivelare le qualità dei vini; devono essere utilizzati conoscendo precisamente il loro meccanismo di azione, la corretta dose di impiego e soprattutto l'origine e la composizione. Nel settore dei tannini ad esempio, le ricerche dimostrano precisi metodi di azione degli stessi in funzione della loro natura, lo stesso per le gelatine, derivati di lievito e molti altri coadiuvanti.

Sotto l'impulso di una regolamentazione rigorosa l'OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) nel *Codex Œnologique International* prevede numerosi metodi analitici per il controllo dei coadiuvanti in particolare delle dosi limite di elementi indesiderati e per la verifica dell'origine del prodotto.

Conoscere i meccanismi di azione, le caratteristiche e la natura dei coadiuvanti permette di realizzare scelte vantaggiose dal punto di vista

tecnologico ed economico quindi far fronte all'elevata competitività del mondo enologico; per fare questo occorrono strumenti in grado di compiere analisi in tempo rapido e possibilmente senza l'ausilio di reagenti.

Allo scopo si è impiegata la spettroscopia IR per rispondere all'esigenza di caratterizzare i coadiuvanti di uso enologico in maniera rapida e non distruttiva. Le prime applicazioni su prodotti alimentari risalgono alla metà degli anni '70 con la determi-

**Tab. 1 - Regioni spettrali ed intervalli espressi come lunghezza d'onda, frequenza e numero d'onda**

Regione spettrale	$\lambda(\text{cm})$	$\nu(\text{Hz})$	$\bar{\nu}(\text{cm}^{-1})$
Visibile	$3,8 \times 10^{-5} - 7,8 \times 10^{-5}$	$7,9 \times 10^{14} - 3,8 \times 10^{14}$	26300 - 12800
Vicino infrarosso (NIR)	$7,8 \times 10^{-5} - 2,5 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{14} - 1,2 \times 10^{14}$	12800 - 4000
Medio infrarosso (MIR)	$2,5 \times 10^{-4} - 5 \times 10^{-3}$	$1,2 \times 10^{14} - 6,10 \times 10^{12}$	4000 - 200
Lontano infrarosso (FIR)	$5 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-2}$	$6,10 \times 10^{12} - 3,05 \times 10^8$	200 - 10

**Tab. 2 - Descrizione delle caratteristiche strumentali e parametri impostati per l'analisi dei coadiuvanti nel NIR e nel MIR**

Caratteristiche	MIR	NIR
Regioni spettrali	8300 - 350 $\text{cm}^{-1}$	14700 - 2000 $\text{cm}^{-1}$
Risoluzione spettrale	0,4 - 64 $\text{cm}^{-1}$	1 - 64 $\text{cm}^{-1}$
Ripetibilità lunghezza d'onda	$\pm 0,02$ a 1600 $\text{cm}^{-1}$	$\pm 0,02$ a 7200 $\text{cm}^{-1}$
Accuratezza lunghezza d'onda	$\pm 0,1$ a 1600 $\text{cm}^{-1}$	$\pm 0,1$ a 6000 $\text{cm}^{-1}$
Sorgenti	Sorgenti combinate NIR/MIR/FIR stabilizzate	
Impostazioni per le analisi dei coadiuvanti	MIR	NIR
Intervallo spettrale	4000 - 450 $\text{cm}^{-1}$	10000 - 4000 $\text{cm}^{-1}$
Numero scansioni	4	50
Risoluzione	4,0 $\text{cm}^{-1}$	16,0 $\text{cm}^{-1}$
Velocità specchio	0,20 $\text{cm}/\text{sec}$	1,00 $\text{cm}/\text{sec}$
Dimensione J-Stop	8,94 mm	8,94 mm

nazione del contenuto in proteine e grasso del mais, della soia e la determinazione dell'umidità e del contenuto in proteine di campioni di grano. Tuttavia, visto l'elevato costo della strumentazione e la difficoltà nella gestione degli spettri risultanti, questa tecnica rimase confinata ad una ristretta cerchia di utilizzatori. Lo sviluppo dell'elettronica e la conseguente disponibilità di calcolatori veloci ed economici portarono la strumentazione a livelli più accessibili.

Attualmente la tecnica IR consente di realizzare analisi veloci ed economiche in diversi settori quali ad esempio agroalimentare, farmaceutico, medico e l'industria petrolchimica.

I vantaggi della spettroscopia IR possono essere riassunti in:

- rapidità;
- riduzione o eliminazione dei reattivi chimici;
- minor costo per singola analisi;
- analisi non distruttiva;

- analisi contemporanea di più componenti.

In campo enologico le applicazioni sono numerose e costantemente in aumento e riguardano l'analisi degli antociani, la determinazione della contaminazione da oidio delle uve, il monitoraggio dei composti fenolici durante la fermentazione, la determinazione dell'acidità volatile, acido malico, tartarico, lattico e gluconico, anidride solforosa, glicerina e zuccheri riduttori dei vini, l'identificazione e la discriminazione dei tannini dei vini rossi, l'analisi rapida delle uve e la discriminazione delle varietà.

## Spettrofotometria IR (infrarosso)

La spettrofotometria IR (infrarosso) si basa sull'assorbimento, da parte di molecole o più in generale di composti, delle radiazioni con lunghezze d'onda comprese tra 12800 e 10  $\text{cm}^{-1}$  (Tab. 1). La regione più interessante dal

punto di vista dell'analisi qualitativa è il MIR (medio infrarosso), che fornisce informazioni sulla struttura dei composti (soprattutto organici).

Il NIR (vicino infrarosso) presenta insiemi di bande molto complessi che possono essere correlati con difficoltà a un numero ristretto di gruppi funzionali con l'ausilio di un computer. La tecnica ha assunto importanza solo recentemente e viene applicata per l'analisi quantitativa di prodotti alimentari e industriali in generale.

Il FIR (lontano infrarosso) presenta pochi picchi utili allo studio dei composti organici, ma è di grande interesse per la caratterizzazione di composti inorganici e metal-organici.

Un materiale irradiato da una luce infrarossa può assorbirla parzialmente e selettivamente: questa è la caratteristica dei legami chimici e fisico-chimici del materiale considerato. Lo spettro infrarosso è costituito da bande chiamate bande di assorbimento (Cozzi et al., 1998).

## Riflettanza nel MIR

**Misure in riflettanza nel MIR.** Nel 1958 Fahrenfort mise a punto un sistema di misurazione in riflettanza adatto per liquidi opachi e polveri che non prevede l'attraversamento del campione da parte delle radiazioni IR.

Esistono principalmente due versioni di tale dispositivo: *riflettanza totale attenuata (ATR)* e *riflessione interna multipla*.

Il dispositivo ATR largamente diffuso è di costruzione più semplice, costituito da un cristallo a forma di prisma di materiale con elevato indice di rifrazione (KRS-5, Ge, ZnSe o diamante). Il raggio IR viene inviato tramite uno specchio sulla superficie del campione e poi riflesso verso il rivelatore. Il raggio penetra il campione per qualche micron e viene assorbito; questo permette di registrare uno spettro IR-ATR.

**Tab. 3 - Campioni analizzati**

	Gruppi	Campioni analizzati	Regioni spettrali	Repliche
Tannini	Quercia	41	MIR + NIR	2
	Castagno	17	MIR + NIR	2
	Quebracho	16	MIR + NIR	2
	Uva buccia	12	MIR + NIR	2
	Uva vinacciolo	19	MIR + NIR	2
	Galla	19	MIR + NIR	2
	Tannini misti e tagli	50	MIR + NIR	2
Derivati di lievito	Autolisati di lievito	2	MIR + NIR	2
	Estratti di lievito	11	MIR + NIR	2
	Mannoproteine	19	MIR + NIR	2
	Scorze di lievito	17	MIR + NIR	2
	Lievito inattivo	17	MIR + NIR	2
	Derivati di lievito misti e tagli	50	MIR + NIR	2
Altri	Bentoniti Proteine Gomma arabica Perlite Cellulosa Silice PVPP Coadiuvanti composti (miscele commerciali)	137	MIR + NIR	2
	Chips	6	NIR	2

**Tab. 4 - Tabella riassuntiva dei tannini analizzati**

	Tipo	Campioni analizzati	Regioni spettrali	Repliche
Tannini	Quercia	41	MIR + NIR	2
	Castagno	17	MIR + NIR	2
	Quebracho	16	MIR + NIR	2
	Uva buccia	12	MIR + NIR	2
	Uva vinacciolo	19	MIR + NIR	2
	Galla	19	MIR + NIR	2

**Tab. 5 - Tabella riassuntiva dei derivati di lievito analizzati**

	Tipo	Campioni analizzati	Regioni spettrali	Repliche
Derivati di lievito	Autolisati di lievito	2	MIR + NIR	2
	Estratti di lievito	11	MIR + NIR	2
	Mannoproteine	19	MIR + NIR	2
	Scorze di lievito	17	MIR + NIR	2
	Lievito inattivo	17	MIR + NIR	2

Un'altra possibilità consiste nel disporre il campione sotto forma di polvere su entrambe le facce esterne di un cristallo costituito da materiale con alto indice di rifrazione. Inviando la radiazione secondo

un particolare angolo di incidenza si verificano una serie di riflessioni fra le due facce del cristallo: ad ogni riflessione il raggio penetra nel campione per qualche frazione di micron e viene assorbito.

Dopo alcuni passaggi la diminuzione dell'intensità del raggio è sufficiente per essere misurata dal rivelatore. La quantità di campione non influenza il valore di assorbimento delle bande spettra-

li quindi i dispositivi a riflessione interna multipla sono adatti all'analisi quantitativa e qualitativa rapida (Cozzi et al., 1998).

L'ATR è essenzialmente utilizzato per analizzare campioni liquidi, polverulenti o prodotti semideformabili come i formaggi in quanto è una tecnica che ben si adatta a campioni opachi o di scarso spessore quindi un dispositivo adatto alle analisi nel medio infrarosso MIR. È fondamentale rispettare la condizione di avere una buona superficie di contatto e pressione sul cristallo ATR (Bertrand e Dufour, 2006).

Complessivamente gli spettri che si registrano in ATR differiscono da quelli tradizionali ma con l'aiuto di calcolatori e specifiche funzioni matematiche si possono ottenere spettri sostanzialmente identici a quelli in trasmissione aprendo tutte le possibilità di elaborazione e confronto con banche dati (Cozzi et al., 1998).

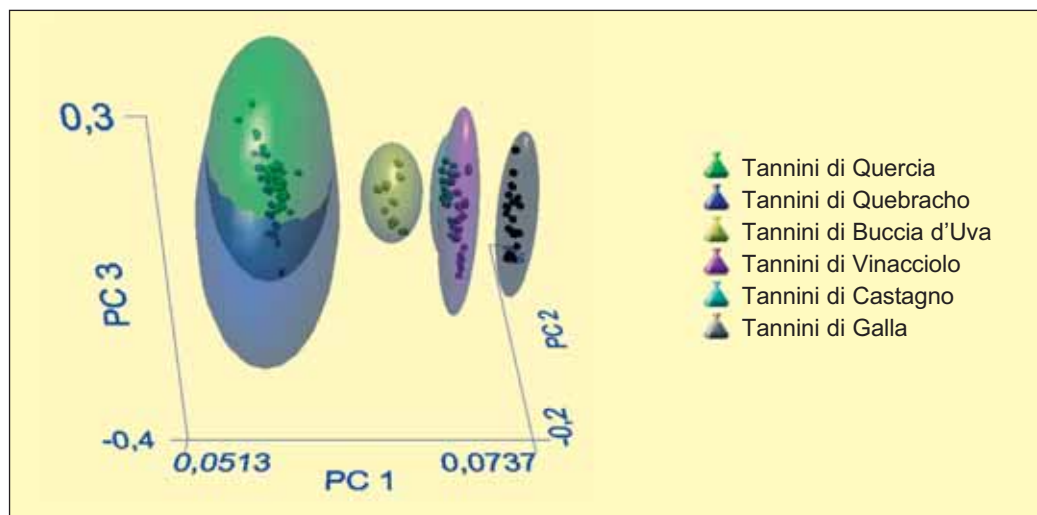
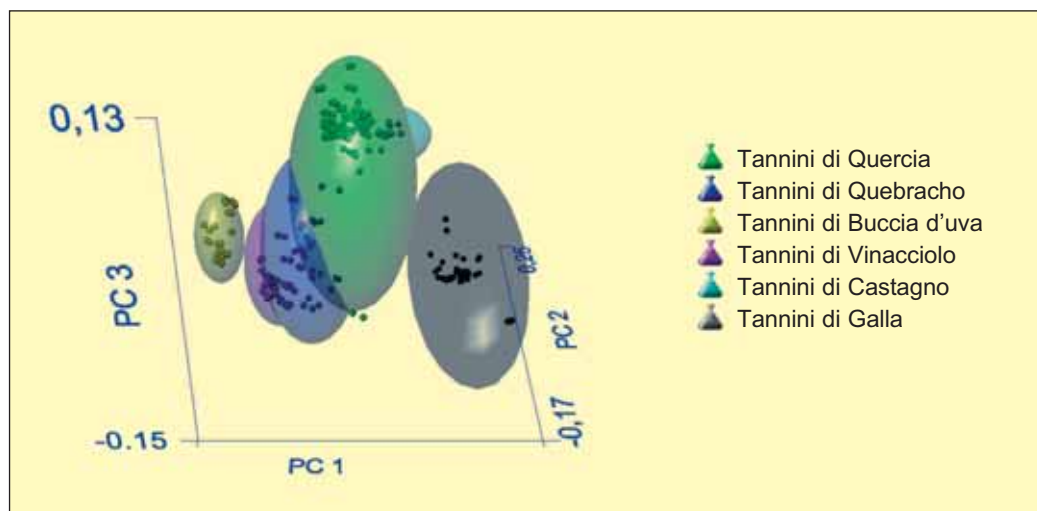
## Riflettanza nel NIR

**Misure in riflettanza nel NIR.** Le misure nel NIR possono essere eseguite sia in trasmittanza che in riflettanza, nel caso dell'acquisizione dei dati in trasmittanza ciò che viene misurato è l'intensità della luce trasmessa attraverso il campione rispetto all'intensità della luce incidente. Nel caso di acquisizione di dati in riflettanza si misura l'intensità della luce riflessa rispetto all'intensità della luce incidente:

Sperimentalmente viene misurata la *riflettanza relativa*, cioè l'intensità della luce riflessa dal campione rispetto all'intensità della luce riflessa da un materiale di riferimento che possiede una riflettanza assoluta alta e costante quale teflon, MgO o dischi di materiale ceramico ad alta purezza.

Nella pratica la riflettanza relativa è solitamente convertita in *assorbanza apparente* utilizzando una relazione empirica tra concentra-



**Fig. 1 - Risultato grafico dell'analisi multivariata dei tannini NIR elaborati in Offset****Fig. 2 - Risultato grafico dell'analisi multivariata dei tannini MIR**

zione di analita e riflettanza.

Tuttavia se la matrice è altamente assorbente o l'analita mostra bande di assorbimento piuttosto intense, la relazione lineare tra assorbanza e concentrazione viene meno; le equazioni proposte sono ricavate da situazioni ideali e sono applicabili solamente quando gli assorbimenti sono deboli.

Nel caso della spettroscopia NIR la perturbazione più intensa deriva dall'assorbimento da parte della matrice, che non è separabile dal componente di interesse e può assorbire la radiazione incidente alle medesime lunghezze d'onda (Bertrand e Dufour, 2006).

Nella misura spettroscopi-

ca possono inoltre verificarsi fenomeni di *scattering* specialmente nel caso dell'acquisizione su campioni solidi in quanto, tanto più si ha scattering della radiazione incidente, tanto meno in profondità penetra il raggio, di conseguenza minore sarà l'assorbanza.

Tali fenomeni dipendono essenzialmente dalle proprietà fisiche del campione e possono provocare spostamenti nella linea di base dello spettro e indurre fenomeni di collinearità alle diverse lunghezze d'onda (Barton, 2002).

Negli strumenti, per catturare le radiazioni riflesse dal campione, è solito l'utilizzo della *sfera integratrice*. Il fascio luminoso colpisce uno

specchio esterno alla sfera che a sua volta lo indirizza sul campione, la parte di radiazione non assorbita è riflessa verso la superficie interna della sfera per poi essere raccolta dal detector. La sfera è ricoperta solitamente in oro con un diametro di circa 15 mm e un sistema di riferimento interno; solitamente la radiazione in ingresso passa attraverso un diaframma per poterne regolare la collimazione.

Il campione viene generalmente raccolto in un contenitore con fondo trasparente alla radiazione e dotato di una geometria che permette la rotazione dello stesso, utile quando si lavora su campioni non omogenei.

## MIR e NIR a confronto

Il medio infrarosso (MIR) viene impiegato come un'alternativa ai metodi spettroscopici del vicino infrarosso (NIR) per la determinazione rapida di parametri qualitativi e quantitativi di uva e vino.

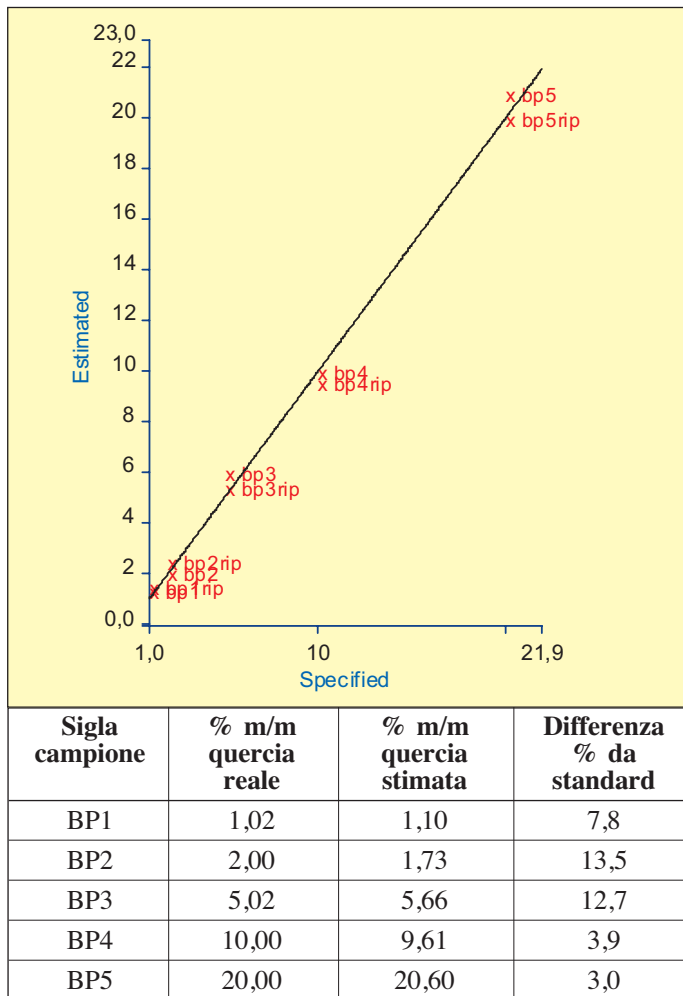
Nel MIR gli spettri che si ottengono derivano da vibrazioni molecolari molto intense di conseguenza hanno un'ottima risposta per quanto riguarda intensità e caratteristiche delle bande. Per questo motivo ci si aspetterebbero maggiori vantaggi e maggiore sensibilità nella determinazione dei parametri di uva e vino anche se è risaputa l'insensibilità alle informazioni di colore che si osservano invece nelle regioni del visibile e del vicino infrarosso.

Gli spettri NIR registrano le vibrazioni di combinazione e overtone, bande di intensità nettamente più basse rispetto a quella fondamentale, mentre gli spettri MIR registrano la capacità di assorbimento di energia alle frequenze vibratorie e di rotazione degli atomi all'interno della molecola, ovvero i picchi sono associabili ai gruppi funzionali. Per questo motivo i campioni analizzati nel range del medio infrarosso devono essere diluiti, onde evitare la saturazione del rivelatore, o analizzati in riflessione totale attenuata (ATR), metodo poco pratico per l'analisi in linea di materiali solidi.

L'assorbimento della radiazione elettromagnetica nel NIR è dovuto soprattutto agli overtone e alle loro combinazioni che derivano dagli assorbimenti delle vibrazioni fondamentali nella zona del medio infrarosso. L'intensità di tali bande decresce notevolmente al decrescere della probabilità che le transizioni corrispondenti avvengano. Poiché gli assorbimenti sono fino a 10-100 volte più deboli rispetto all'intensità delle bande fondamentali, sono osservabili solo i primi due o tre overtone per ciascuna banda.

La scarsa intensità di assorbimento nella regione NIR

**Fig. 3 - Rappresentazione grafica concentrazione standard e concentrazione predetta dal modello di analisi quantitativa dei tannini e differenze percentuali da concentrazione reale**



può inizialmente sembrare uno svantaggio poiché sembra diminuire la sensibilità della tecnica. In realtà, dal punto di vista applicativo, è un grosso vantaggio in quanto permette da un lato l'analisi diretta di un campione, senza diluirlo o disperderlo in matrici inerti come normalmente avviene nelle tradizionali tecniche spettroscopiche e dall'altro permette di ottenere spettri rappresentativi dell'intero campione, in quanto i cammini ottici utilizzati sono molto lunghi.

Anche se le bande NIR sono più allargate e tendono a sovrapporsi di più rispetto ad assorbimenti localizzati in altre regioni dello spettro, le tecniche chemiometriche a disposizione riescono ad estrarre un gran numero di informazioni anche da spettri

complessi come quelli NIR.

I campioni possono essere analizzati attraverso il vetro in quanto trasparente nel range del vicino infrarosso. Lo sviluppo di computer e strumenti sempre di più piccole dimensioni fanno del NIR una tecnica non distruttiva applicabile, ad esempio, per controlli in linea o prodotti confezionati. Paragonando le due tecniche applicate in campo enologico, vari lavori dimostrano la maggiore capacità predittiva del MIR per pH, solidi solubili totali, azoto assimilabile ma minore accuratezza per il colore rispetto al NIR (Gishen et al., 2005).

In ambito enologico numerose applicazioni hanno messo in evidenza l'interesse e la validità delle tecniche IR per il controllo qualità dell'uva e dei vini, per la verifica dello stato sanitario e per la verifica di autenticità dei vini (Munck et al., 1999; Martens et Naes, 1996; Wold, 1999; Otto, 1999; Siebert, 2001; Geladi, 2003; Shenk and Westerhaus, 1993; Damberg et al., 2003; Damberg et al., 2005; Stummer et al., 2002; Cozzolino et al. 2004; Cozzolino et al., 2006; Cuadrado et al., 2004; Bevin et al., 2008; Edelman et al., 2001; Jensen et al., 2008).

Viste le numerose applicazioni della spettroscopia infrarossa in campo enologico e nell'industria alimentare quali ad esempio le analisi rapide dei principali parametri analitici dei mosti e vini, verifica dell'autenticità dei prodotti, il controllo dello stato sanitario delle uve e controllo delle fermentazioni alcoliche, si è verificata l'applicabilità di tale tecnica per la caratterizzazione dei coadiuvanti ad uso enologico quale alternativa alle metodiche ufficiali tradizionali, alla luce delle applicazioni consolidate che si ritrovano in altri settori. La tecnica impiegata consiste nell'analisi degli spettri MIR e NIR di prodotti enologici in polvere quali tannini, derivati di lievito e altri di origine e composizione nota con lo scopo di costruire metodi specifici di caratterizzazione che servano

per l'analisi discriminante rapida in cantina o in campo industriale nella fase produttiva e di verifica della costanza dei lotti.

## Materiali e metodi

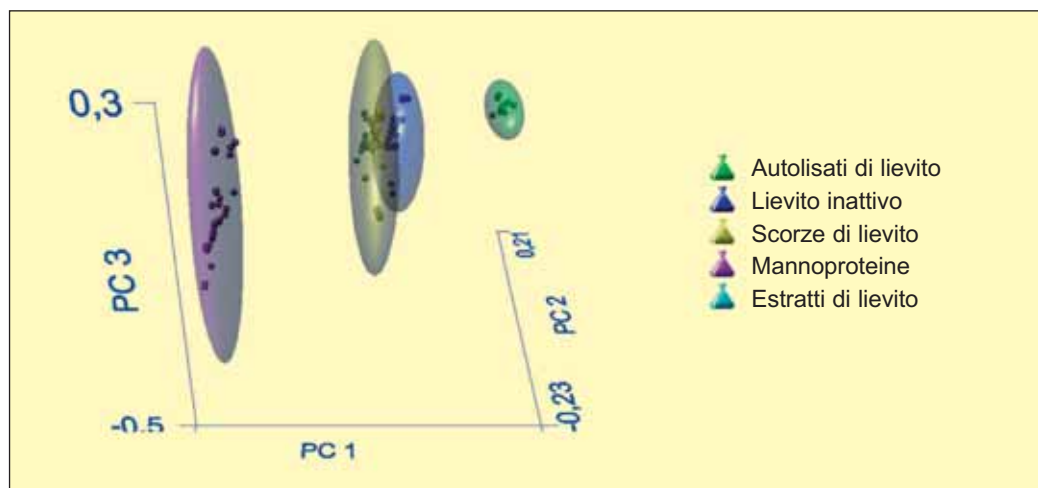
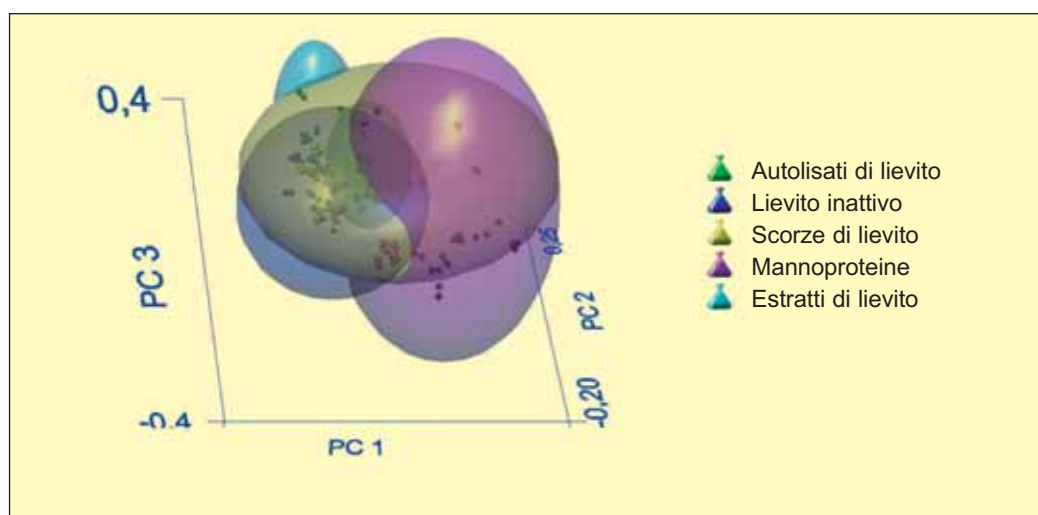
Lo strumento utilizzato per l'acquisizione degli spettri è *Spectrum 400 FT Mid-IR/ Near-IR* equipaggiato con UATR e accessorio esterno NIRA (*PerkinElmer*®).

Si tratta di un'apparecchiatura FT-IR combinata che copre completamente il medio ed il vicino infrarosso: il passaggio da MIR a NIR e viceversa avviene in pochi secondi grazie alla completa automazione del sistema.

I campioni sono stati analizzati nella regione del MIR e del NIR con le impostazioni riportate nella Tab. 2. Per l'acquisizione degli spettri si è impiegato il software *PerkinElmer Spectrum* versione 6, per l'elaborazione, la costruzione dei metodi e la simulazione delle analisi il pacchetto *PerkinElmer Assure ID e Quant +* versione 4. Per l'elaborazione statistica delle analisi sui derivati di lievito si è impiegato il software *Statistica/8*.

**Campioni.** I campioni non hanno subito nessun pretrattamento o condizionamento: sono stati analizzati esclusivamente campioni in polvere, il formato di vendita più comune per i coadiuvanti. I prodotti utilizzati sono per la maggior parte commerciali ed alcuni sperimentali.

Per il MIR, dopo aver effettuato la scansione di azzerramento (per eliminare interferenze di CO<sub>2</sub> e umidità), si deposita una piccola porzione di campione sul cristallo ATR, si applica pressione con l'apposito strumento, finita l'analisi si toglie la pressione e si passa alla pulizia del cristallo mediante acqua distillata e carta avendo cura di asciugare accuratamente la superficie per evitare l'interferenza dell'umidità negli spettri acquisiti. Il cristallo è di diamante quindi inattaccabile da qualsiasi solvente si utilizzi.

**Fig. 4 - Risultato grafico dell'analisi multivariata dei derivati di lievito NIR****Fig. 5 - Risultato grafico dell'analisi multivariata dei derivati di lievito MIR**

Per il NIR il campione è analizzato in "vial" o meglio piastre Petri di vetro messe in rotazione dall'apposito spinner di cui è dotato l'accessorio NIRA dello strumento. La rotazione del campione durante l'acquisizione dello spettro garantisce un'analisi più rappresentativa e una lettura migliore. In questo caso non è necessario registrare la linea di base in quanto viene ottenuta in automatico dal bianco interno.

Sono stati acquisiti spettri MIR e NIR con due ripetizioni per ogni analisi di 174 tannini, 116 derivati di lievito e 143 coadiuvanti vari che comprendono bentoniti, proteine animali e vegetali, gomme arabiche, perliti, cellulose, PVPP, silici e chips (Tab. 3).

La numerosità dei campio-

ni analizzati per ogni tipologia incrementa la variabilità dei materiali: più variazioni utili sono inserite, più ricca e rappresentativa sarà la famiglia costruita.

Su 28 derivati di lievito sono state effettuate alcune valutazioni di qualità e di efficacia utili per la comparazione con i risultati delle elaborazioni degli spettri (Celotti et al., 2010; Stocco, 2010):

- *Potenziale Zeta* ( $\xi$ ), misurato con lo strumento Nicomp 380/ZLS, che utilizza il principio dell'Electrophoretic Light Scattering (ELS).
- *Carica elettrica superficiale* (CES, meq/Kg), determinata per neutralizzazione della carica con polielettrolita organico (Ferrarini et al., 1996; Ferrarini et al., 1998).

- *Analisi sensoriale* dei derivati in tampone tartarico, in vino bianco e rosso da tavola neutri e polveri con panel di giudici addestrati.
- *Torbidità* (NTU), determinata per nefelometria.
- *Indice di filtrabilità* (IF), *indice di filtrabilità modificato* (IFM) e *volume massimo filtrabile* ( $V_{max}$ ) a  $0,45 \mu m$  in acqua aggiunta di prodotto (Ribéreau-Gayon, 2003).
- *Densità ottiche*, Abs 280, 420, 520 e 620 nm indicano rispettivamente il contenuto in polifenoli totali, colorazione gialla dei vini/antociani in forma calcione, colorazione rossa e colorazione blu.
- *Intensità colorante*, data dalla somma tra DO 420 nm, DO 520 nm e DO 620 nm.
- *Tonalità*, data dal rapporto DO 420 nm/DO 520 nm.
- *Indice ossidabilità antociani* (IOA) (Celotti et al., 1999; Müller-Späth, 1992).
- *Indice dei pigmenti polimerizzati* (IPP), indica il contributo al colore rosso da parte dei tannini condensati e delle forme polimerizzate degli antociani poco sensibili alla decolorazione (Glories, 1978).
- *Discriminazione per contenuto proteico mediante elettroneutralizzazione delle cariche elettriche positive* (Celotti, 2005).

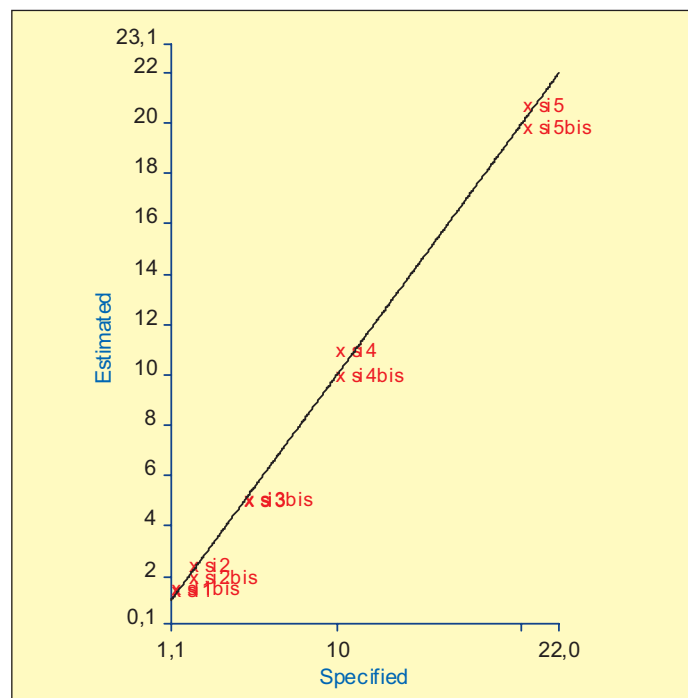
## Risultati applicativi

**Tannini.** Considerato il notevole interesse per i tannini enologici è stato scelto un gruppo di tannini come esempio di valutazione di prodotti puri. Per la costruzione dei metodi NIR e MIR per i tannini si sono impiegati gli spettri dei campioni riportati in Tab. 4.

Gli spettri NIR ( $10000 - 4000 \text{ cm}^{-1}$ ) sono stati processati con algoritmo SIMCA (grado di affidabilità del 95%), è stato applicato il filtro rumore *Noise Weighting*, correzione della linea di base *Offset* (corregge per dislocamento continuo di assorbanza, preserva la forma degli spettri



**Fig. 6 - Rappresentazione grafica concentrazione standard e concentrazione predetta dal modello di analisi quantitativa dei derivati di lievito e differenze percentuali da concentrazione reale**



Sigla campione	% m/m derivato di lievito reale	% m/m derivato di lievito stimata	Differenza % da standard
SI1	1,05	1,21	15,2
SI2	2,00	2,16	8,0
SI3	5,05	4,74	6,1
SI4	9,96	10,69	7,3
SI5	20,08	20,43	1,7

ed il rapporto segnale/rumore) e normalizzazione MSC.

L'elaborazione del metodo con le impostazioni sopra menzionate ha prodotto i risultati riportati nella Fig. 1.

Dall'analisi della % di *Recognition rate* e *Rejection rate* che indicano rispettivamente: la % di riconoscimento dei campioni nella categoria specificata e la % di campioni rifiutati quando sono testati in categorie diverse dalla propria, emerge un'ottima capacità discriminatoria tra i gruppi con valori prossimi al 100% per tutti i casi, a conferma della capacità di riconoscimento del campione di una classe e del rifiuto di un campione di una classe non nota.

Per l'elaborazione degli spettri MIR (4000 - 450 cm<sup>-1</sup>) è stato impiegato l'algoritmo SIMCA (grado di affidabilità

del 95%), è stato applicato il filtro rumore *Noise Weighting*, la correzione della linea di base *Offset* e la normalizzazione MSC.

L'elaborazione degli spettri ha prodotto i risultati riportati in Fig. 2.

Dall'analisi della % di *Recognition rate* e *Rejection rate*, emerge anche in questo caso un'ottima capacità discriminatoria tra i gruppi con valori prossimi al 100 % per tutti i casi, a conferma della capacità di riconoscimento del campione di una classe e del rifiuto di un campione di una classe non nota.

Con entrambi i modelli si ottengono buoni risultati di classificazione; la bontà di discriminazione della tecnica non dipende essenzialmente dalla regione spettrale analizzata ma piuttosto dalle impostazioni di elaborazione degli spettri.

L'elaborazione degli spettri NIR e MIR senza correzione della linea di base si dimostra più robusta con distanze inter-materiale, percentuali di riconoscimento e rifiuto superiori alle elaborazioni con altre impostazioni.

Se consideriamo che la valutazione viene fatta su campione in polvere, senza preparative analitiche, i risultati fanno ben sperare per l'applicazione di tali tecniche nel controllo dei lotti di produzione e delle miscele di prodotti puri.

Allo scopo di testare un modello per l'analisi quantitativa dei tannini sono state preparate miscele a concentrazione nota composte da tannini di quercia ed uva (Fig. 3). Si è preferito utilizzare il NIR in quanto, rispetto al MIR, il campionamento è più discreto e si ottengono risposte migliori con i coadiuvanti in polvere.

La Fig. 3 riporta il risultato della validazione in termini di concentrazione specificata per gli standard (ascissa) e la concentrazione stimata dal modello (ordinata). Più il modello è significativo più i valori saranno disposti lungo una retta a 45° che attraversa il grafico.

È stata testata la stessa se-

rie di standard (miscela tannini di uva e tannini di quercia) come campioni incogniti nel modello quantitativo: l'errore è maggiore per la stima della concentrazione della miscela nel range 1-5% mentre decresce per le miscele 10 e 20%. L'approccio quantitativo è migliorabile inserendo un numero di standard più elevato per poter diminuire l'errore di predizione, pone comunque una base interessante da approfondire con ulteriori lavori. Considerati i buoni risultati nel riconoscimento di piccole percentuali di campioni incogniti l'applicazione analitica diventa interessante per la verifica delle miscele sia a livello di lotti di produzione sia a livello di cantina per una verifica della merce acquistata.

## Derivati di lievito

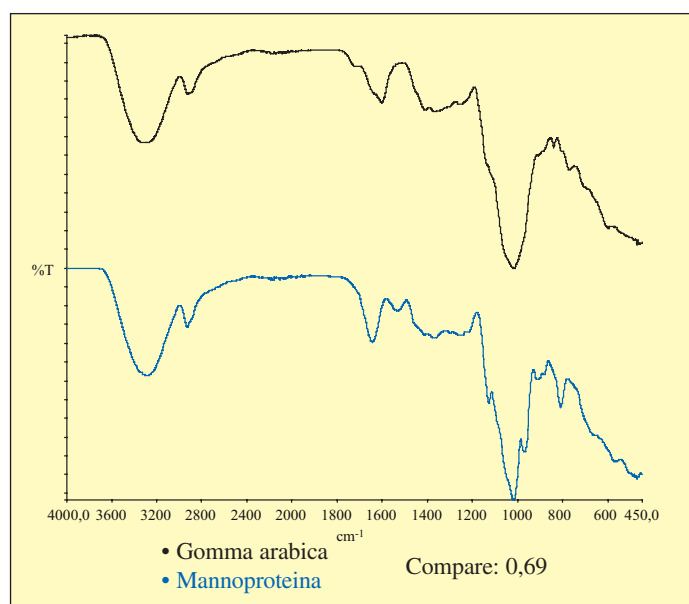
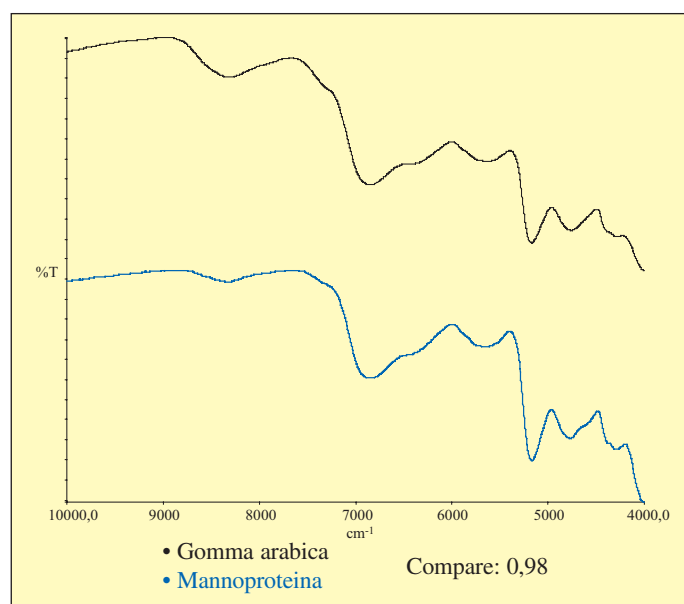
La stessa tecnica di elaborazione degli spettri dei tannini è stata applicata a prodotti più complessi ed eterogenei quali i derivati di lievito.

Per la costruzione dei metodi NIR e MIR si sono impiegati gli spettri dei campioni riportati in Tab. 5.

I prodotti scelti comprendono tutta la gamma dei possibili derivati di lievito. Dall'analisi della % di *Recognition rate* e *Rejection rate*, emerge un'ottima capacità discriminatoria della tecnica NIR tra i gruppi con valori del 100% per tutti i casi, a conferma della capacità di riconoscimento del campione di una classe e del rifiuto di un campione di una classe non nota.

Anche applicando la spettroscopia MIR, emerge un'ottima capacità discriminatoria tra i gruppi con valori prossimi al 100 % per tutti i casi, sia per il riconoscimento del campione di una classe che per il rifiuto di un campione di una classe non nota.

I due modelli si differenziano per le distanze inter-materiale mediamente più alte nell'elaborazione degli spettri NIR, in apparenza meno ca-

**Fig. 7 - Confronto diretto nel MIR tra gomma arabica e mannoproteina****Fig. 8 - Confronto diretto nel NIR tra gomma arabica e mannoproteina**

ratteristici degli spettri MIR, forniscono molte informazioni grazie alla sensibilità dei software di elaborazione impiegati e sono meno influenzati dagli assorbimenti dei gruppi funzionali del campione ma risentono della componente colore, granulometria e delle vibrazioni di combinazione e overtone (bande di intensità più basse rispetto a quella fondamentale).

Dalla valutazione complessiva dei derivati di lievito emerge un'ottima capacità discriminativa per prodotti eterogenei in composizione dove diventa interessante avere metodi di controllo rapidi soprattutto per verificare la costanza dei lotti di produzione, aspetto generalmente molto difficile da garantire per questa tipologia di prodotti.

Per comparare la capacità discriminativa della tecnica IR con altre tecniche analitiche di laboratorio sono state effettuate alcune analisi (potenziale zeta, CES, torbidità, indice di filtrabilità, stabilità proteica, IOA, IPP ecc.) ai medesimi derivati di lievito. Dall'analisi discriminante lineare applicata ai metodi tradizionali abbinati alle misure delle caratteristiche di carica elettrica, non è stato possibile discriminare nettamente le diverse classi di prodotti, a differenza di quanto succede

invece utilizzando i dati derivanti dall'elaborazione degli spettri.

Questi risultati permettono di considerare la tecnica IR una valida alternativa ai metodi più tradizionali di laboratorio, spesso molto laboriosi, per la verifica di qualità di prodotti molto complessi come i derivati di lievito ma anche miscele diverse di coadiuvanti che sempre più spesso vengono proposte agli enologi per il trattamento dei mosti e dei vini.

Analogamente a quanto fatto per i tannini anche per i derivati si è costruito un modello di analisi quantitativa di cui si riportano i risultati nella Fig. 6.

Dall'analisi dei dati si evince che l'errore è maggiore per la stima della concentrazione della miscela nel range 1-10%, mentre decresce per la miscela al 20% si evidenzia comunque maggiore difficoltà nella taratura dovuta soprattutto alla complessità della matrice analizzata. Anche se per le percentuali basse di prodotto non si ottengono ottime capacità di riconoscimento, i risultati sono comunque interessanti e, se opportunamente perfezionati con calibrizioni ulteriori, potranno fornire un valido ausilio al controllo qualità dei coadiuvanti complessi.

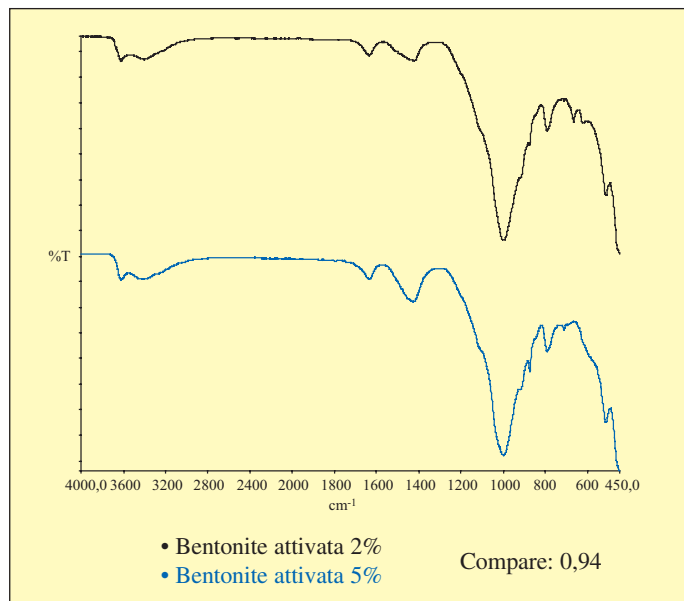
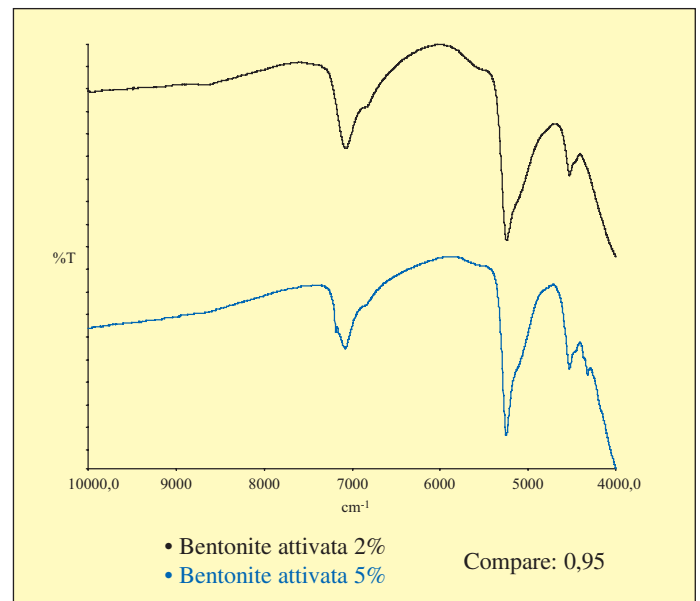
## Discriminazione dei coadiuvanti

**Discriminazione dei coadiuvanti mediante funzione Compare (confronto diretto tra due o più spettri).** Per i coadiuvanti dei quali non si disponevano sufficienti campioni per la costruzione di un metodo è stata usata la funzione Compare del software Spectrum per valutare la somiglianza tra due o più spettri. Il risultato della funzione Compare è un coefficiente di correlazione: 1 indica che esiste perfetta somiglianza tra due spettri, 0 indica che i due spettri sono completamente non correlati.

Di seguito si riportano alcuni esempi di comparazioni tra coadiuvanti effettuate utilizzando spettri MIR e NIR Figg. 7, 8, 9 e 10.

L'algoritmo mostra maggiore capacità di identificazione con gli spettri MIR in quanto, come già descritto, contengono gli assorbimenti dei vari gruppi funzionali e l'impronta digitale "fingerprint" del prodotto analizzato. Nel caso del confronto gomma arabica - mannoproteina il NIR identifica i due materiali come simili (0,98) mentre il MIR, per le ragioni spiegate sopra, discrimina nettamente (0,69). Compa-



**Fig. 9 - Confronto diretto nel MIR tra due bentoniti a diverso grado di attivazione****Fig. 10 - Confronto diretto nel NIR tra due bentoniti a diverso grado di attivazione**

rando invece nel MIR e NIR due materiali simili, quali possono essere due bentoniti a diverso grado di attivazione, non è possibile in nessuno dei due casi discriminare i prodotti.

La possibilità del confronto diretto tra spettri diventa quindi interessante in assenza di numerosità elevate di campioni e consente comunque di ricavare informazioni in tempo reale su due o più campioni; potrebbe quindi essere utile per un primo screening su campioni al fine di utilizzare al meglio altre tecniche analitiche di controllo.

## Considerazioni conclusive

Dall'impiego della spettroscopia IR per la caratterizzazione dei coadiuvanti ad uso enologico, si sono ottenuti risultati interessanti nell'analisi discriminante utilizzando sia gli spettri NIR che MIR ma con i primi si riescono ad ottenere distanze inter-materiale e percentuali di riconoscimento dei campioni generalmente maggiori. Si è evidenziata l'importanza della scelta del tipo di elaborazione e dei pretrattamenti spettrali da applicare al fine di ottenere i risultati migliori in termini di separazione dei coadiuvanti.

Gli spettri NIR, in apparenza meno caratteristici degli spettri MIR, forniscono molte informazioni grazie alla sensibilità dei software di elaborazione impiegati e sono meno influenzati dagli assorbimenti dei gruppi funzionali del campione ma risentono della componente colore, granulometria e delle vibrazioni di combinazione e overtone.

Gli spettri MIR sono influenzati dal tipo di legami e dai gruppi funzionali presenti quindi, nel caso di analisi discriminanti tra coadiuvanti con la medesima struttura molecolare (es. tannini), la separazione è influenzata dalle medesime risposte dei gruppi funzionali.

Il MIR al contrario si ritiene più adeguato per la comparazioni dei materiali con le banche dati di spettri.

Per quanto riguarda l'analisi quantitativa è preferibile utilizzare il NIR in quanto, rispetto al MIR, il campionamento è più discreto e si ottengono risposte migliori con i coadiuvanti in polvere; grazie alla sua versatilità, la spettroscopia NIR può essere considerata una tecnica dall'enorme potenziale applicativo nella valutazione rapida dei coadiuvanti enologici ed alimentari.

L'applicazione del NIR non si limita ai soli campioni

in polvere ma ben si adatta all'analisi di materiali di granulometria e pezzatura elevata senza alcun pretrattamento come ad esempio i "chips".

In definitiva, la sperimentazione condotta utilizzando la spettroscopia infrarossa per la caratterizzazione dei coadiuvanti ad uso enologico potrebbe consentire di perfezionare i metodi di analisi non distruttivi e rapidi da impiegare sia come ausilio analitico per l'utilizzatore, sia come supporto della fase produttiva per discriminare i coadiuvanti, verificare miscele, ed in futuro per definire caratteristiche funzionali direttamente correlate alle risposte spettrali.

L'analisi non distruttiva nel MIR e NIR dei diversi coadiuvanti fornisce informazioni in grado di discriminare in modo inequivocabile i diversi coadiuvanti, sostituendo così alcune analisi più tradizionali realizzabili in tempi lunghi, con preparative analitiche complesse e spesso con tecniche distruttive.

Sono stati acquisiti gli spettri dei principali coadiuvanti utilizzati in enologia ed i risultati sono interessanti e consentono di migliorare i sistemi di controllo e costanza dei lotti anche per prodotti complessi come i derivati di lievito.

## Bibliografia

- Barton F. (2002) *Theory and Principles of Near Infrared Spectroscopy*. Nir News Vol. 14 N. 1.
- Bertrand A., Canal-Llaubères R.M., Feuillat M., Hardy G., Lamadon F., Lonvaud-Funel A., Pellerin P. e Vivas N. (2003) *Prodotti di trattamento ed Ausiliari di elaborazione dei Mosti e dei Vini. Reggio Emilia, Oeno-One*.
- Bertrand D. e Dufour E. (2006) *La spectroscopie infrarouge et ses applications analytiques*. Londra, Parigi, New York, TEC&DOC.
- Bevin C., Dambergs R., Ferrusson A. e Cozzolino, D. (2008) *Varietal discrimination of Australian wines by means of mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis*. *Analytica Chimica Acta* 621, 19-23.
- Celotti E. (2005) *La valutazione del rischio di instabilità proteica nei vini*. VQ, novembre 2005, 20-26.
- Celotti E., Cacciola V., Dell'Eva M., 2010. Recent acquisitions on interactions between tannins and polysaccharides. Oral communication, 60<sup>th</sup> German Grape and Wine Congress, Stuttgart march 24th to 28th, PDF 31-41.
- Celotti E., Comuzzo P., Battistutta F., Scotti B., Poinssaut P., Zironi R. (1999) *Caratterizzazione di alcuni preparati commerciali di tannino ad uso enologico*. *Vignevini*, 26(10), 61-70.
- Cozzi R., Protti P. e Ruaro T. (1998) *Elementi di analisi chimica strumentale*. Milano, Zanichelli.
- Cozzolino D., Kwiatkowski M.J., Parker M., Cynkar W.U., Dambergs R.G., Gishen M. e Herderich M.J. (2004) *Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by near infrared spectroscopy*. *Analytica Chimica Acta* 513, 73-80.
- Cozzolino D., Parker M., Dambergs R., Herderich M. e Gishen M. (2006) *Chemometrics and Visible-Near Infrared Spectroscopic Monitoring of Red Wine Fermentation in a Pilot Scale*. Wiley InterScience, DOI: 10.1002/bit.21067.
- Cuadrado M., Luque de Castro M.D., Pérez-Juan P.M., García-Olmo J. e Gómez-Nieto M.A. (2004) *Near infrared reflectance spectroscopy and multivariate analysis in enology. Determination or screening of fifteen parameters in different types of wines*. *Analytica Chimica Acta* 527, 81-88.
- Dambergs R.G., Cozzolino D., Cynkar W.U., Kambouris A., Francis I.L., Høj P.B. e Gishen M. (2003) *The use of near infrared spectroscopy for grape quality measurement*. Australian Grapegrower and Winemaker 476, 69-76.
- Dambergs R.G., Stummer B., Zanker T., Cozzolino D., Gishen M. e Scott E. (2005) *Near infrared spectroscopy as a tool for detection of powdery mildew in homogenised grapes*. Australian Wine Industry Technical Conference Inc: Adelaide, SA p. 333.
- Dubernet, M., M. Dubernet, V. Dubernet, S. Coulomb, M. Lerch, and I. Traneau. (2001) *Analyse objective de la qualité des vendages par spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et réseaux de neurones*. *Bolletín de l'O.I.V.* 74:15-24.
- Edelmann A., Diewok J., Schuster K. e Lendl B. (2001) *Rapid Method for the Discrimination of Red Wine Cultivars Based on Mid-infrared Spectroscopy of Phenolic Wine Extracts*.
- Ferrarini R., Celotti E. e Zironi R. (1996) *Importance des charges électriques superficielles des adjuvants œnologiques, des particules et des colloïdes présents dans les moûts et les vins*. *Rev. Fr. Œ.*, 36 (158), 5-10.
- Ferrarini R., Zironi R. e Celotti E. (1998) *Verifica della Qualità applicata ai coadiuvanti di uso enologico*. *Vignevini*, 25(4), 89-104.
- Geladi P. (2003) *Chemometrics in spectroscopy. Part I. Classical chemometrics*. *Spectrochimica Acta* 58, 767-782.
- Gishen M., Dambergs R.G. e Cozzolino D. (2005) *Grape and wine analysis – enhancing the power of spectroscopy with chemometrics. A review of some applications in the Australian wine industry*. Australian Journal of Grape and Wine Research 11, 296-305.
- Glories Y. (1978) *Recherches sur la matière colorante des vins rouges*. Thèse Doctorat ès Sciences. Université de Bordeaux II.
- Jensen J., Egebo M. e Meyer A. (2008) *Identification of Spectral Regions for the Quantification of Red Wine Tannins with Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy*. *J. Agric. Food Chem.* 56, 3493-3499.
- Martens H. e Naes T. (1996) *Multivariate Calibration*. John Wiley and Sons Ltd., Co. New York.
- Müller-Späth H. (1992) *Der POM-Test*. Deutscher Weinbau No. 23:1099-1100.
- Munck L., Norgaard L., Engelsen S.B., Bro R. e Andersson C.A. (1999) *Chemometrics in food science: a demonstration of the feasibility of a highly exploratory, inductive evaluation strategy of fundamental scientific significance*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 44, 31-60.
- OIV. *Codex Œnologique International*.
- Otto M. (1999) *Chemometrics: statistics and computer application in analytical chemistry*. Wiley-VCH, Chichester, UK.
- Ribéreau-Gayon P., Glories Y., Maujean A. e Dubourdiou D. (2003) *Trattato di enologia II, Chimica del vino Stabilizzazione Trattamenti*. Bologna, Edagricole.
- Shenk J.S. e Westerhaus M.O. (1993) *Analysis of Agriculture and Food Products by Near Infrared Reflectance Spectroscopy*. Monograph. Infrasoftware International. Port Matilda, PA. USA.
- Siebert K.J. (2001) *Chemometrics in brewing: A review*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 59, 147-156.
- Stocco A. (2010). Tesi di Dottorato in Scienze degli Alimenti. Valutazione dei coadiuvanti ad uso enologico con metodologie non usuali. Università degli Studi di Udine.
- Stummer B.E. e Scott E.S. (2002) *Detection of powdery mildew in grapes, must and juice*. Australian Wine Industry Technical Conference Inc: Adelaide, SA p. 259.
- Wold S. (1999) *Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it?* *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 30, 109-115.

## Ringraziamenti

Pierluigi Raffin, dottoressa Annamaria Cavalleri.