

ANTOCIANI ED ACIDI CINNAMICI PER LA CARATTERIZZAZIONE DI VITIGNI IN ZONE DIVERSE DELLA TOSCANA

PIRACCI A., BUCELLI P., BOSSO A.¹, GIANNETTI F., FAVIERE V.

Istituto Sperimentale per l'Enologia-S.o.p. di Gaiole in Chianti (SI), 1, via di Vertine
1. Istituto sperimentale per l'Enologia-S.c. di Tecnologia enologica, Asti, 14, Via P.Micca

Summary

The phenolic compounds (catechins, cinnamic acids, anthocyanidins) in wines made from 6 vine-varieties (Sangiovese, Cabernet S., Nero d'Avola, Foglia Tonda, Pinot N., Mazzese) grown in 4 different pedoclimatic zones of Tuscany (Arezzo, Grosseto, Pisa and Lucca) have been analyzed by HPLC. The analytical data were statistically worked out by Anova, Ancova, principal components analysis ACP and linear factorial discriminant analysis. A significative differentiation in the phenolic composition of 6 vine-varieties have been found, so that an analytical key of separation has been found too. But also the 4 zones gave useful indication on the different behaviour of same vine-varieties (Sangiovese, Foglia Tonda, Nero d'Avola) in the different zones, so a positive interaction between the vine-variety and the environment was supposed. The other vine-varieties didn't show phenolic composition significantly different in the 4 zones.

Introduzione

In questi ultimi anni lo sviluppo delle tecniche di analisi per cromatografia liquida (HPLC) associate alle tecniche di elaborazione multivariata dei dati ha permesso di mettere a punto metodiche di grande efficacia discriminante e classificativa nello studio delle uve da vino.

Per utilizzare le stesse tecniche sui vini è necessaria maggiore cautela, tenuto conto del processo tecnologico e microbiologico a cui le uve sono sottoposte.

L'interesse di quanto sopra sorge da motivazioni tassonomiche e classificative, ma anche commerciale, legale e di controllo di qualità. Di norma, per quanto riguarda la composizione fenolica delle uve e dei vini rossi, si è sempre dato risalto al corredo antocianico ed eventualmente a quello dei composti cinnamici.

Nel contesto di un programma di collaborazione tra questo Istituto e l'A.R.S.I.A. (Agenzia di ricerca, sviluppo ed innovazione in agricoltura) abbiamo voluto considerare la composizione fenolica (antociani, acidi cinnamici, catechine) dei vini ottenuti dalle uve di sei vitigni allevati in quattro differenti ambienti della Toscana.

Sono stati analizzati i vini ottenuti da 6 vitigni (Sangiovese, Cabernet S., Nero d'Avola, Foglia Tonda, Pinot Nero, Mazzese) allevati in 4 campi sperimentali nelle zone di Arezzo, Grosseto,

Pisa e Lucca. Lo scopo della elaborazione dei dati era l'osservazione della variabilità dovuta al vitigno, la variabilità dovuta all'ambiente e l'interazione vitigno-ambiente.

La strategia dell'analisi statistica

L'analisi statistica della matrice delle variabili è stata condotta attraverso le seguenti fasi:

- I analisi descrittiva delle variabili in esame, sia nel complesso dei campioni, sia nei sottogruppi individuati dai 6 tipi di vino,
- II analisi delle correlazioni tra le variabili, ossia della matrice di correlazione generale e di quelle nei sottogruppi "tipo di vino";
- III modelli statistici multivariati di tipo simmetrico, ossia con le variabili esplicative, le variabili somma e le variabili indicatori (rapporti tra variabili esplicative) tutte considerate come variabili d'informazione. Sono stati utilizzati essenzialmente modelli parametrici lineari (modelli di regressione semplice e multipla, di analisi della varianza e della covarianza, utilizzando le variabili "tipo di vino" ed "ambienti" come variabili di stratificazione qualitativa;
- IV analisi fattoriale in componenti principali per individuare, utilizzando tutte le informazioni a disposizione, i fattori alla base della "struttura" della composizione fenolica. Sulla base del significato di questi tre fattori, ossia di combinazione lineare di variabili originarie, e del loro potere esplicativo in termini statistici, si è tentato infine di esaminare le differenze strutturali sia dei 6 "tipi di vino" che, se possibile, dei 4 "ambienti" di produzione;
- V l'analisi discriminante lineare è stata condotta sui risultati acquisiti con l'analisi fattoriale, utilizzando la funzione lineare del Fischer, allo scopo di ottenere una discriminazione tra i quattro "ambienti".

Non ci dilunghiamo in questa sede sui risultati dell'analisi chimico-fisica e dell'analisi statistica che saranno oggetto di una pubblicazione specifica, e ci limitiamo pertanto ad alcune semplici osservazioni.

Le analisi descrittive

Le analisi statistiche descrittive sono state condotte attraverso i seguenti indici statistici: media, variabilità, percentili, istogrammi, adattamento alla normalità, ecc. Molto succintamente possiamo dire:

- a) le distribuzioni delle variabili si presentano abbastanza regolari, vicino alla normalità nella maggioranza dei casi, comunque sempre di tipo unimodale, con bassa simmetria;
- b) la differenza tra media, moda e mediana si mantiene sempre a livelli molto bassi e ciò conferma quanto detto nel punto precedente;
- c) la variabilità è per lo più sempre contenuta a conferma sia dell'accuratezza della fase di raccolta dei dati che della buona definizione semantica delle variabili stesse;
- d) la presenza di dati anomali si mantiene a livelli molto bassi, tali comunque da non inficiare nessuna delle analisi statistiche successive;
- e) i sottogruppi dei 6 vitigni presentano delle differenze di media a volte molto elevate, ma una sostanziale uniformità di comportamento delle distribuzioni delle variabili stesse.

I modelli statistici

Abbiamo verificato come i sei vitigni ed i quattro ambienti si differenziano rispetto alle variabili esplicative, somma ed indicatori. Già l'analisi descrittiva ci ha messo in evidenza la diverda

struttura dei sei diversi tipi di vino e degli ambienti. Nella tabella 1 osserviamo i rapporti F dell'Anova su quei composti fenolici per i quali si è ricevuta una significatività di almeno il 5%. Possiamo rilevare che solo la peonidina-g e la malvina caffeato non indicano differenze significative tra i vitigni, mentre tra gli ambienti abbiamo alta significatività nella delphinidina-g e nella peonidina-g, tra gli antociani, mentre tra gli acidi cinnamici vi sono differenze significative all'1% per il caffeico, la somma dei cutarici ed il rapporto tra acido caffeico e la somma acidi cutarici.

Nella figura 1 mostriamo il confronto tra le medie di alcuni parametri dei 6 vitigni nei 4 diversi ambienti. L'osservazione ci permette solo delle indicazioni qualitative, e cioè che il campo sperimentale di Pisa sembra fornire una risposta diversa alla coltura dei 6 vitigni; la risposta è globale e non certo diversificata per ogni vitigno. A ciò concorrono essenzialmente i tenori di alcune antocianine, mentre per gli acidi cinnamici sembrano confrontabili le risposte dei campi sperimentali di Arezzo e Grosseto.

L'analisi fattoriale

Sono state condotte due elaborazioni dei dati mediante l'analisi ACP.

La prima elaborazione si riferiva ai dati analitici espressi in % della classe. I dati sono stati normalizzati (la media per ciascuna variabile è stata posta uguale a zero e la varianza ad 1) e quindi sottoposti all'analisi dei componenti principali. Si trattava di 24 oggetti (campioni di vino) suddivisi in 6 categorie (cioè i vitigni Sangiovese, Cabernet S., Nero d'Avola, Foglia Tonda, Pinot N., Mazzese) con 4 ripetizioni (le zone Arezzo, Grosseto, Pisa e Lucca). Ogni oggetto è stato considerato un vettore di 21 variabili (Tabella 2).

L'analisi ha fornito la presenza di 7 componenti, di cui le prime due spiegavano, rispettivamente, il 32.35% ed il 20.34% della variabilità. La prima componente era associata, con segno positivo, alla petunidina-3-g, delphinidina-3-g, cianidina-3-g, ac. Cis-cutarico, ac. Trans-cutarico e con segno negativo alla malvidina-3-g, alla (+)catechina ed alla (-)epicatechina.

Nella figura 2 osserviamo alle componenti sono associate le variabili testé indicate. Nella figura 3 possiamo rilevare la buona separazione delle "nuvole" dei sei vini.

La seconda elaborazione è stata condotta con i dati analitici espressi in valore assoluto (mg/L). I dati sono stati normalizzati (la media per ciascuna variabile è stata posta uguale a zero e la varianza ad 1) e quindi sottoposti all'analisi dei componenti principali. Si trattava di 24 oggetti (campioni di vino) suddivisi in questo caso in 4 categorie (le zone Arezzo, Grosseto, Pisa e Lucca) con 4 ripetizioni (cioè i vitigni Sangiovese, Cabernet S., Nero d'Avola, Foglia Tonda, Pinot N., Mazzese). Ogni oggetto è stato considerato un vettore di 12 variabili (Tabella 2).

L'analisi ha fornito la presenza di 7 componenti, di cui la prima e la terza spiegavano, rispettivamente, il 44.50% ed il 13.55% della variabilità. La prima componente era associata, con segno positivo, alla petunidina-3-g, peonina-3-g, cianidina-3-g, malvidina-3-g, ac. Cis-cutarico, ac. Trans-cutarico, la terza componente era associata, con segno positivo, all'acido caftarico ed all'acido ferarico e con segno negativo alla malvidina-3-g.

Nella figura 4 osserviamo alle componenti sono associate le variabili testé indicate. Nella figura 5 possiamo rilevare come sia accennata una separazione delle "nuvole" dei quattro ambienti.

L'analisi discriminante lineare

Sulla scorta dei risultati incoraggianti ottenuti con l'analisi fattoriale dei componenti principali ACP è stata quindi condotta una analisi discriminante lineare. Lo scopo non era quello di poter

discriminare i 6 vitigni, quanto quello molto più impegnativo di poter discriminare i quattro ambienti (Arezzo, Grosseto, Pisa e Lucca) e quindi di valutare l'interazione tra il vitigno e gli ambienti considerati. Si è utilizzata la funzione lineare discriminante di Fisher. Anche questa è stata realizzata in vari modi per confrontare poi i risultati ottenuti utilizzando vari sottogruppi di variabili. La tecnica *stepwise* per scegliere le variabili ha evidenziato la delphinidina-g, la peonidina-g, il rapporto antocianine trisostituite/antocianine disostituite, la somma degli acidi cis- e trans-cutarico, l'acido caffeico ed il rapporto tra l'acido caffeico e la somma dei cutarici come le più importanti. Si sono quindi condotti 6 confronti tra due ambienti, ed esattamente AR/LU, AR/PI, AR/GR, LU/PI, LU/GR, PI/GR.

Di ogni coppia di ambienti si sono considerate le 6 variabili selezionate per ognuno dei 6 vitigni. Si è trovata una funzione con sei variabili e sei coefficienti con la quale è stato possibile, per ognuno dei sei vitigni nei due ambienti posti a confronto, determinare:

- * le devianze dei valori discriminanti in ogni ambiente
- * la significatività della funzione discriminante;
- * i valori Λ , per ognuno degli ambienti posti a confronto, che rappresentano le "soglie discriminanti ottimali dell'ambiente"
- * la differenza D tra le due soglie Λ , che è tanto maggiore quanto più elevata è la differenza di composizione dei vitigni nei due ambienti;
- * mediante le devianze dei valori discriminanti in ogni ambiente, si è ottenuto il valore di L^0 che è la soglia discriminante ottimale tra i due ambienti;
- * i valori L_{vit} della funzione discriminante per ognuno dei vitigni nel singolo ambiente;
- * la misura degli errori di discriminazione. Cioè, per una data probabilità da noi assunta al 5%, abbiamo ottenuto gli scarti *nei due sensi* che ci consentono di individuare i valori di soglia discriminante ottimale per l'ambiente con $p < 5\%$, indicati con $L_{5\%amb}$.

Nella figura 6, a titolo di esempio, sono confrontate le soglie discriminanti tra gli ambienti di Arezzo e Lucca. Possiamo rilevare che il Nero d'Avola ed il Foglia Tonda presentano valori L della funzione discriminante ben al di sopra sia delle soglie discriminanti ottimali per i due ambienti, che delle soglie discriminanti per $p < 5\%$. Il Sangiovese è anch'esso ben discriminato tra Arezzo e Lucca, seppure non al 5%. La composizione del Cabernet S. del Pinot N. e del Mazzese non sono tali da differenziare i due ambienti di Arezzo e di Lucca.

Nella figura 7 sono riassunte le soglie discriminanti per tutti i vitigni nei quattro ambienti.

Nel caso del Sangiovese, del Nero d'Avola e della Foglia Tonda il vitigno supera le soglie discriminanti ottimali tra alcune coppie di ambienti e quindi si può ritenere che vi sia un'interazione vitigno-ambiente che renda significativamente diversa la composizione del vitigno nei diversi ambienti. Al contrario il Cabernet S., il Pinot N. ed il Mazzese non sembrano mostrare interazione con l'ambiente.

In questa breve nota abbiamo succintamente illustrato l'analisi statistica applicata a 6 vitigni in quattro zone. In effetti noi abbiamo in osservazione da due anni ben 31 vitigni (16 a bacca nera e 15 a bacca bianca) nelle quattro zone indicate.

Con la prossima vendemmia avremo i risultati di tre anni di produzione. Siamo dell'opinione che allora potremo dare una risposta importante al quesito dell'interazione vitigno-ambiente in Toscana per 31 vitigni, riferendoci alle più importanti e numerose classi di composti fenolici che sono alla base della caratterizzazione e valutazione organolettica del vino.

Bibliografia

- P. Bucelli, Faviere V., Gianneti F., Gigliotti A. (1991). Caratteristiche analitiche e valutazione dell'attitudine del Colorino a migliorare la qualità del vino "Chianti". *Vignevini*, 3,91.
- Bucelli P., Faviere V., Gianneti F., Gigliotti A. (1995). Valutazione di alcuni componenti fenolici in cultivar di vite a bacca nera in Toscana. *Riv. Vitic. Enol.*, 1,95.
- Di Stefano R. (1996). Metodi chimici nella caratterizzazione varietale. *Riv. Vitic. Enol.*, (1,96): 51-56.
- Di Stefano R., Maggiorotto G. (1995). Antociani, acidi idrossicinnamici e flavonoli del frutto, delle foglie, dei raspi e dei tralci della vite. *Riv. Vitic. Enol.*, (48,2):51-65.
- Di Stefano R., Foti S., Borsa D.(1993). Indagine sulla natura e sul contenuto di alcune classi di polifenoli di uve prodotte nella Sicilia orientale. *L'Enotecnico*, (29,11):67-83.
- Piracci A., Bucelli P. (1997). Immagine della struttura fenolica delle uve e dei vini Sangiovese in Toscana con particolare riferimento alla composizione antocianica. *Atti Conv. "Giornata di studio sul Sangiovese"*, Arezzo, 11, 4, 1997.
- Spera G., Piracci A., D'Arcangelo E. (1995). Contributo di un modello biometrico alla individuazione della tipicità di produzione del Montepulciano a d.o.c. *Atti del Convegno di Enologia e Viticoltura*, Barletta, 25, 11, 1995 (77-88).

Figura 1 - alcuni parametri analitici tra gli acidi cinnamici e gli antociani.

Confronto tra le medie dei 6 vitigni in 4 ambienti diversi

Acido caffeico	AR = GR	>	PI = LU
Somma acidi cutarici	AR	>	GR = PI = LU
Rapporto ac. caffeico/somma ac. cut.	AR = GR	>	PI = LU
Antoc. trisostituiti/antoc. disostituiti	PI	>	GR = LU = AR
peonina gl.	AR = LU	>	GR = PI
delfinina gl.	AR = LU = GR	>	PI
petunina gl.	AR = LU = GR	>	PI
cianina gl.	AR = LU = GR	>	PI

Tabella 1. Rapporti F dall'analisi della varianza su alcuni composti fenolici tra i vitigni e tra gli ambienti

	tra i vitigni		tra gli ambienti	
Delfinina glucoside	24,09	**	5,81	**
Cianina glucoside	13,93	**	3,31	*
Petunina glucoside	33,44	**	3,30	*
Peonina glucoside	1,77	n.s.	6,47	**
Malvina glucoside	13,03	**	0,86	n.s.
Totale monoglucosidi	8,21	**	2,31	n.s.
Totale acetati	39,03	**	1,21	n.s.
Totale p-cumarati	14,29	**	0,92	n.s.
Malvina caffeato	2,79	n.s.	0,89	n.s.
(delfin.+petun.+malvina)/(peonina+cianina)	3,38	*	6,58	**
Somma antocianidine	29,94	**	2,90	n.s.
acido caffeico/somma acidi cutarici	106,36	**	9,11	**
acido caffeico	12,90	**	16,77	**
somma acidi cutarici	37,02	**	7,38	**

Rapporti critici della distribuzione di F per i livelli del 5% e dell'1%:
per 5 e 15 G.L. = 2,90-4,56
per 3 e 15 G.L. = 3,29-5,42

Tabella 2 - Elaborazione n. 1 - ACP nei vitigni - dati normalizzati = % del totale

24 oggetti suddivisi in 6 categorie (=vitigni Sangiovese, Cabernet S., Nero d'Avola, Foglia Tonda, Pinot Nero, Mazzese)

Ogni oggetto è un datavector di 21 variabili:

acido gallico	ac. caftarico	delfinidina-3-g
acido protocatechino	ac. S-Gl-caftarico	cianidina-3-g
acido vanillico	ac. cis-cutarico	petunidina-3-g
acido siringico	ac. trans-cutarico	peonina
	ac. fertarico	malvina
(+)catechina	somma ac. cutarici	tot. monoglucosidi
gallo-catechina		tot. acetati
(-)epicatechina		tot p-cumarati

La prima componente spiega il 32.35% della variabilità ed è associata alle variabili:

con segno positivo:	petunidina-3-g	delfinidina-3-g	cianidina-3-g	ac. cis-cutarico	ac. Trans-cutarico
	antociani tot.				
con segno negativo:	malvidina-3-g	(+)catechina	(-)epicatechina		

La seconda componente spiega il 20.34% della variabilità ed è associata alle variabili:

con segno positivo:	somma acetati	somma cumarati
con segno negativo:	peonidina-3-g	acido gallico

Elaborazione n. 2 - ACP negli ambienti - dati normalizzati = mg/L

24 oggetti suddivisi in 4 categorie (= ambienti Arezzo, Lucca, Grosseto, Pisa)

Ogni oggetto è un datavector di 12 variabili:

ac. caftarico	ac. S-GL-caftarico	ac. cis-cutarico	ac. trans-cutarico	ac. fertarico	delfinina-3-gl
cianidina-3-gl	petunidina-3-gl	peonidina-3-gl	malvidina-3-gl	tot. acetati	tot. p-cumarati

La prima componente spiega il 44.5% della variabilità ed è associata alle variabili:

con segno positivo:	petunidina-3-g	delfinidina-3-g	cianidina-3-g	ac. cis-cutarico	ac trans-cutarico
---------------------	----------------	-----------------	---------------	------------------	-------------------

La terza componente spiega il 13.55% della variabilità ed è associata alle variabili:

con segno positivo:	ac. caftarico	ac. fertarico
---------------------	---------------	---------------

con segno negativo:	malvidina-3-g
---------------------	---------------

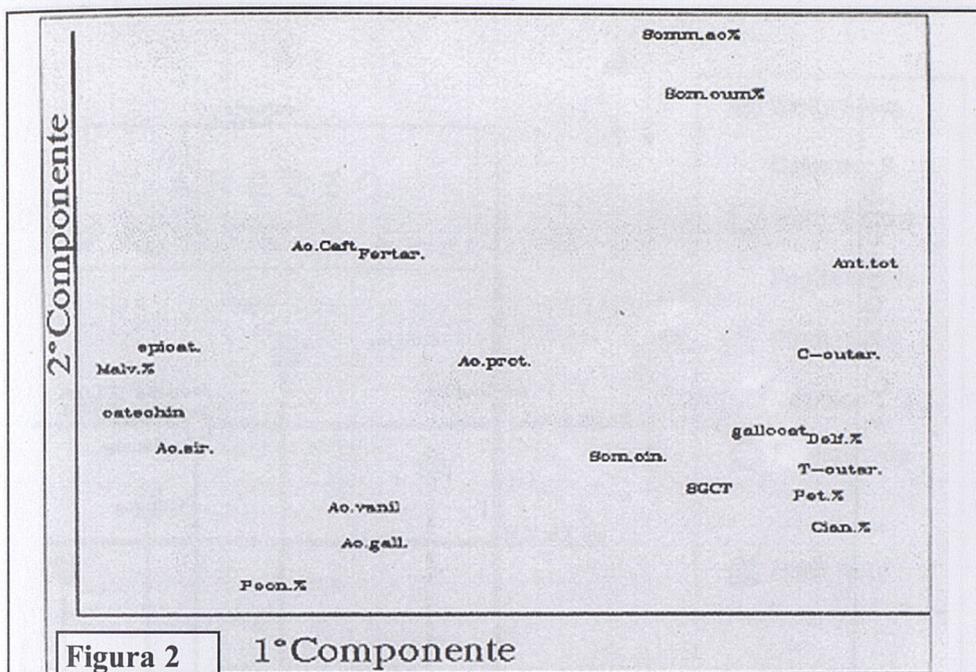


Figura 2

1° Componente

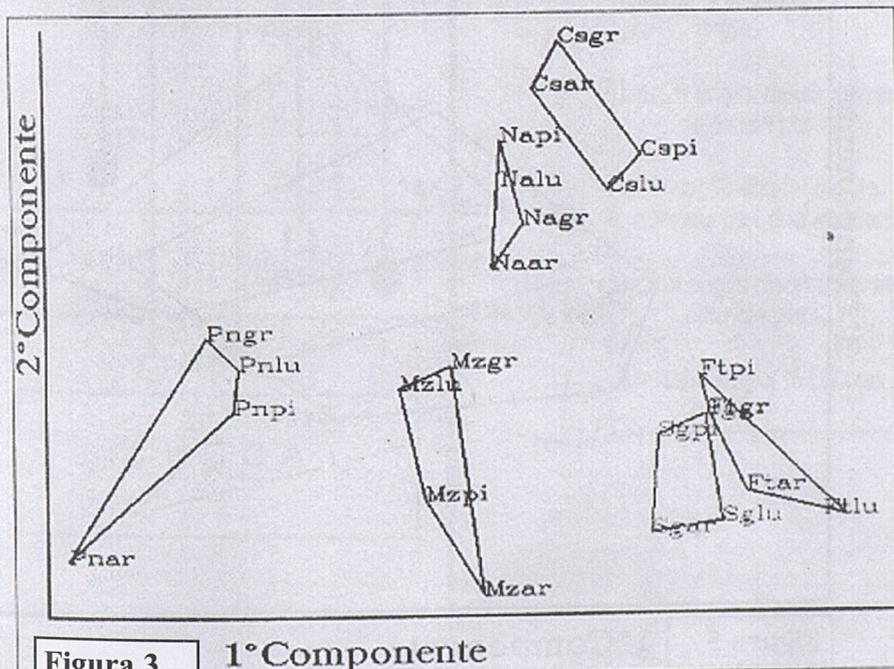


Figura 3

1° Componente

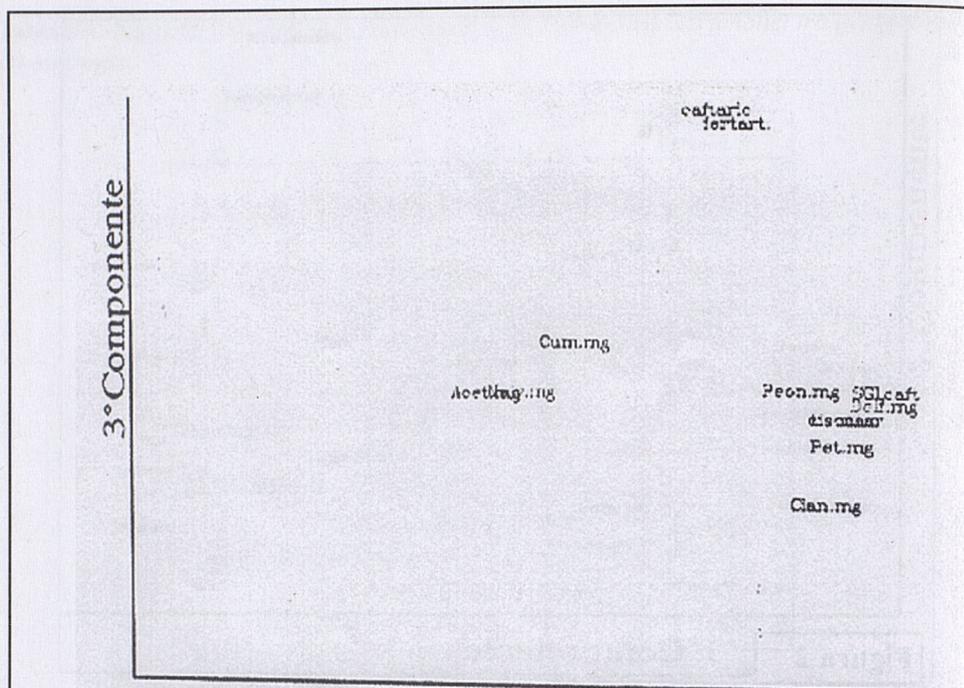


Figura 4 1° Componente

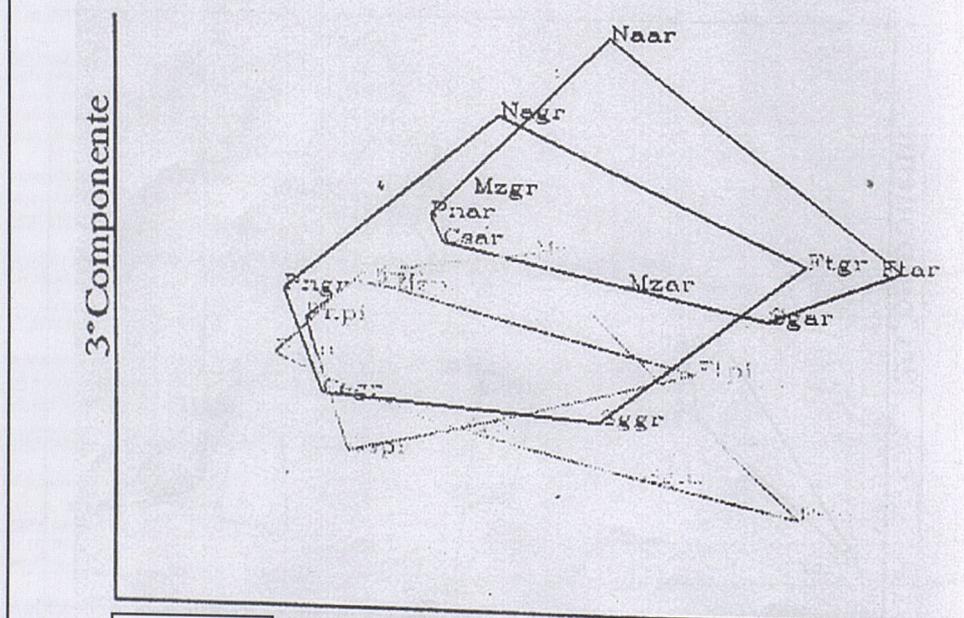


Figura 5 1° Componente

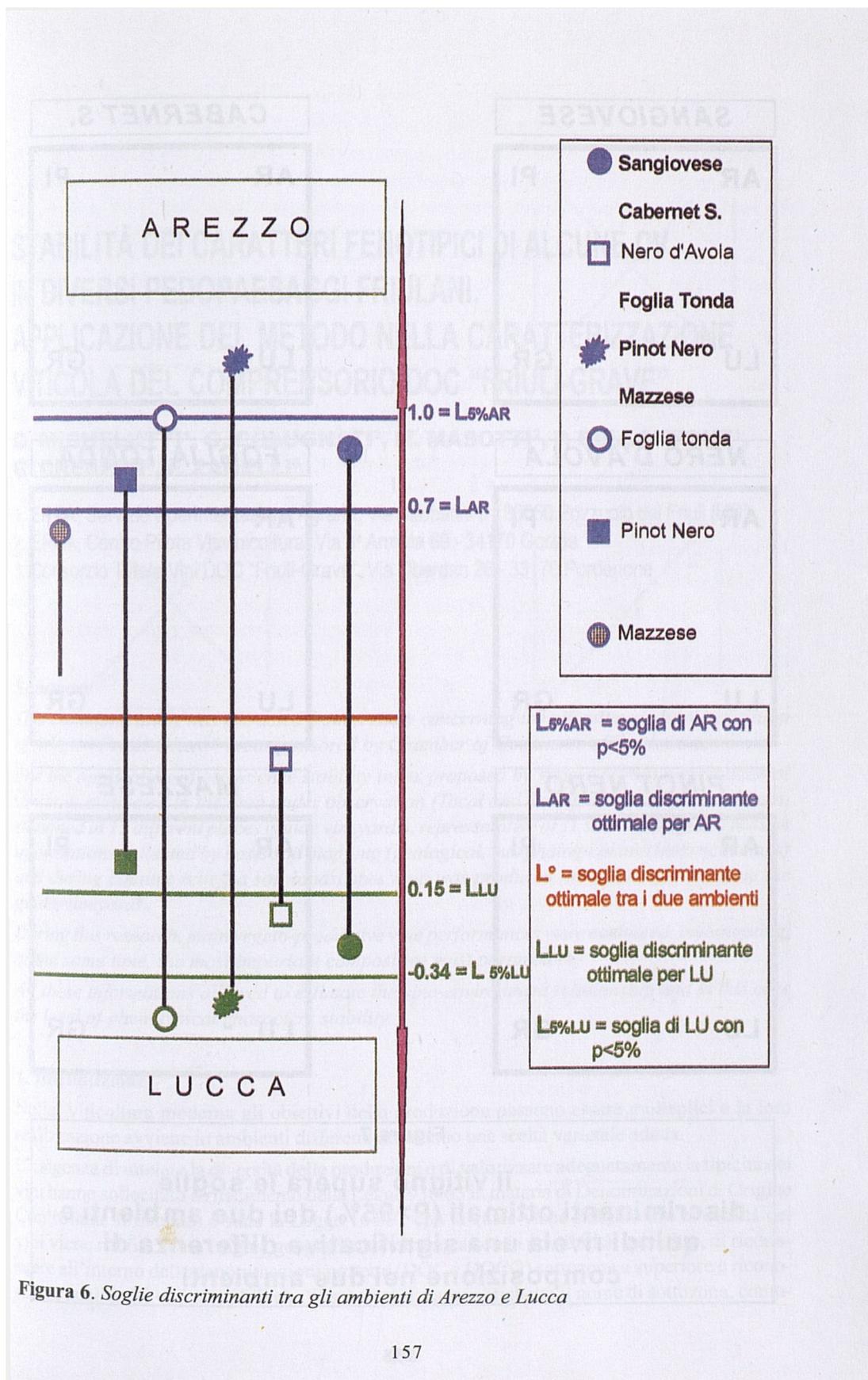
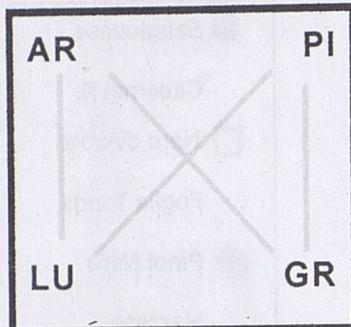
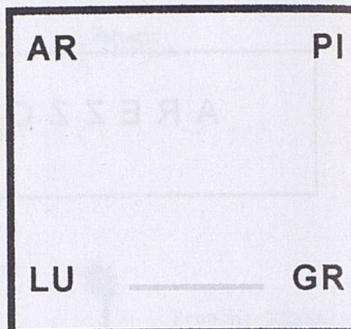


Figura 6. Soglie discriminanti tra gli ambienti di Arezzo e Lucca

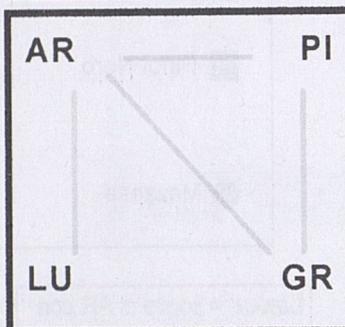
SANGIOVESE



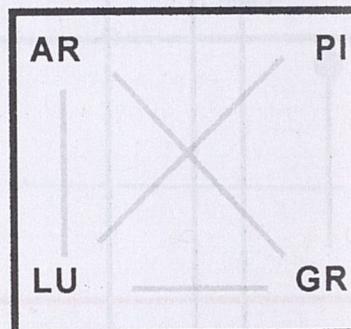
CABERNET S.



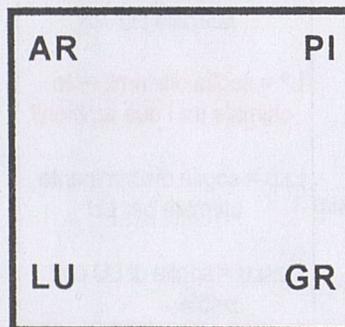
NERO D'AVOLA



FOGLIA TONDA



PINOT NERO



MAZZESE

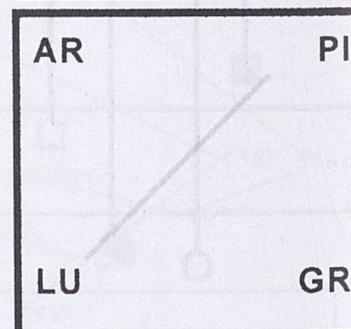


Figura 7

———— il vitigno supera le soglie discriminanti ottimali ($P > 95\%$) dei due ambienti e quindi rivela una significativa differenza di composizione nei due ambienti