



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

FACOLTA' DI ECONOMIA

DIPARTIMENTO DI MANAGEMENT

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MERCEOLOGICHE

XXVII CICLO

**Verifica della autenticità e qualità di prodotti
alimentari: metodologie e applicazioni**

RELATORE

Prof. Simone Vieri

CANDIDATA

Dr.ssa Raffaella Preti

Ai tre uomini della mia vita

INDICE

Abstract

Introduzione

CAPITOLO 1 QUADRO NORMATIVO

1.1. Qualità, Autenticità, e tracciabilità: Aspetti generali	3
1.2. Etichettatura	6
1.3. I marchi di qualità alimentare in Europa	9
1.3.1. Indicazioni geografiche e denominazione di origine	9
1.3.1.1 Procedure per la registrazione DOP, IGP, STG.	11
1.3.1.2. Protezione dell'indicazione geografica nel settore vinicolo	12
1.3.2. Istituzione di database per i prodotti agroalimentari protetti	15
1.3.3. Verifiche ufficiali sulla corrispondenza con le normative	18
1.4. Agricoltura Biologica	19
1.5. La normativa europea dei succhi di frutta	21

CAPITOLO 2 QUADRO ECONOMICO

2.1. Le aspettative e le richieste del consumatore	27
2.2. Il mercato dei prodotti alimentari DOP e IGP	29
2.3 Mercato del settore vinicolo DOP e IGP.	32
2.4. Mercato dei prodotti da agricoltura biologica	34
2.4.1. Situazione in Italia	38
2.5. Mercato dei succhi di frutta	40

CAPITOLO 3 METODOLOGIE PER LA VERIFICA DELLA AUTENTICITÀ

3.1 Le frodi a scopo di lucro	47
3.2 Verifica dei succhi di frutta	52
3.2.1. Profilo dei polifenoli	55
3.2.2. Profilo degli acidi organici	57
3.2.3 Profilo degli zuccheri	57
3.2.4. Rapporti isotopici	59

3.2.5. Metodi PCR	59
3.3. Verifica dei vini	60
3.3.1. Tecniche cromatografiche	62
3.3.2. I composti volatili del vino	64
3.3.3. Analisi dei minerali	66
3.3.4. Tecniche Isotopiche	68
3.3.4.1. Rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	68
3.3.4.2. Rapporto $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	69
3.3.4.3. L'approccio metabolomico	70
3.4. Verifica del latte da agricoltura biologica	72
3.4.1 Isotopi stabili	72
3.4.2. Acido fitanico	74
3.4.3. Acido α -Linolenic	75
3.4.4. Altri acidi grassi	76
3.4.5. Profilo dei Triacilgliceroli (TAG)	78

CAPITOLO 4 PRIMO CASO STUDIO: LE AMMINE BIOGENE COME MARKER DI AUTENTICITÀ E QUALITÀ DI VINO ROSSO E SUCCO DI FRUTTA.

4.1 Le ammine biogene	82
4.1.1. Microorganismi produttori di ammine biogene	86
4.1.2. Ammine biogene negli alimenti	86
4.1.3. Rischi per l'uomo e intossicazione da istamina	91
4.1.4. Normativa e limiti massimi proposti in materia di ammine	93
4.2. Metodi analitici per la determinazione delle ammine biogene	95
4.3. Le ammine biogene come marker di autenticità	98
4.3.1. Nei vini	98
4.3.2. Nei succhi di frutta	100
4.4. Scopo del lavoro	101
4.5. Ottimizzazione del metodo analitico	101
4.5.1. Materiali e metodi	103
4.5.1.1. Reagenti e solventi	103
4.5.1.2. Protocollo di derivatizzazione	104
4.5.1.3. Campioni e loro trattamento	104
4.5.1.4. Strumentazione	106
4.5.2. Analisi Statistiche	106

4.5.3. Condizioni cromatografiche	106
4.5.3.1 Effetto matrice	107
4.5.4. Sviluppo metodo cromatografico	107
4.5.4. Ottimizzazione della procedura di estrazione	110
4.5.5. Validazione del metodo analitico	111
4.6. Risultati analisi di campioni di succo e nettare di frutta	117
4.6.1. Profilo e livelli di ammine biogene nei nettari di frutta	118
4.6.2. Profilo e livelli di ammine biogene in succhi di frutta da concentrato	120
4.6.3. Studio di correlazione nei succhi di frutta da concentrato	123
4.6.4. Analisi multivariata dei dati	124
4.7. Risultati analisi di campioni di vino rosso italiano	129
4.7.1. Materiali e metodi	130
4.7.2. Risultati dei parametri chimico fisici	132
4.7.3. Contenuto di ammine biogene nei vini studiati e relazione con gli altri parametri	136
4.7.4. Classificazione dei vini in base al valore commerciale e al vitigno	140

CAPITOLO 5 SECONDO CASO STUDIO: VERIFICA DELL'ORIGINE DA AGRICOLTURA BIOLOGICA DEL LATTE TRAMITE IRMS.

5.1. Materiali e metodi	147
5.1.1. Protocollo di estrazione del glicerolo dal latte	147
5.2. Risultati del latte biologico vs convenzionale	153

CONCLUSIONI

Appendice A

GC-IRMS: principi e strumentazione	169
---	------------

Appendice B

Le tecniche chemiometriche	180
-----------------------------------	------------

BIBLIOGRAFIA	188
---------------------	------------

Ringraziamenti	200
-----------------------	------------

Abstract

In recent years food safety and quality have become a principal demand of the citizen, and the determination of food authenticity and geographical origin is now a crucial issue both for consumer choice and for food authorities, as demonstrated by the promulgation of several laws regarding food labeling, traceability and authenticity. Products with any labels or indications are perceived by consumers as high-quality food products, for reasons that vary from specific culinary or organoleptic qualities associated with regional products, health safety, and patriotism, to concern about animal welfare and environmentally friendly production methods. This allows producers to obtain market recognition and premium, and many suffer from piracy of their brands. In this contest, the analytical authentication of what is declared on labels is of fundamental importance to assure producers against fair competition and consumers against harmful fraudulent practices.

In this work three food sectors of relevant impact on European economy are examined: Italian wine, fruit juices and milk from organic agriculture. All these sectors are examined in relation to European regulation, market features and analytical tools for their authentication described in literature. The experimental part describes innovative methods for the authenticity assessment of these food matrices. Biogenic amines fingerprinting have been used for Italian red wines and fruit juices, while $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio for milk from organic agriculture.

The results, after being processed by chemometric techniques, are quite encouraging, in fact biogenic amines succeeded in discriminating Italian red wines for retail price segment and grape variety, while fruit juices for species of origin. This is the first research conducted on the presence of these natural contaminants in fruit juices and its data had proven to be useful both toxicological and authentication points of view. The analysis were conducted with an improved chromatographic method that allowed to shorten analysis time and save chemicals. Also the results obtained from the analysis of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ isotopic ratio of milk allowed to differentiate to conventional milk from organic milk, demonstrating to be a reliable marker for this kind of production verification.

The studies hereby described highlight the importance of pursuing greater importance and diffusion of analytical controls in food authentication, by official institutions and private firms, as a powerful tool to avoid counterfeiting in food products, to enhance consumer trust and for commercial valorization of peculiar food products' characteristics.

Keywords: Authenticity, food quality, fruit juices, wine, biogenic amines, isotopic ratio, organic milk.

Introduzione

Le frodi e le adulterazioni dei prodotti alimentari sono pratiche comuni fin dai tempi antichi. Le più frequenti risultano essere l'aggiunta di ingredienti di basso valore economico a prodotti costosi, per esempio l'acqua al vino o il gesso alla farina. Un'altra comune adulterazione è la pratica di camuffare il cattivo aspetto o sapore di un cibo avariato, con aggiunta ad esempio di coloranti o aromatizzanti. Questi inganni rudimentali venivano facilmente scoperti da un attento esame ad occhio nudo o con strumenti di base (come lenti ad ingrandimento o microscopi), che rappresentarono i primi strumenti analitici per rilevare le sofisticazioni alimentari. Nel corso dei secoli le pratiche di adulterazione sono state perfezionate e sono diventate più sofisticate, in un continuo rincorrersi con l'avanzamento delle tecniche analitiche a disposizione degli organi di controllo.

Attualmente l'autenticità di un prodotto agroalimentare, la sua qualità e la sua tracciabilità stanno emergendo come un valore importante non solo per i consumatori, ma anche per gli agricoltori, i rivenditori e le autorità amministrative. Nell'era della globalizzazione anche gli alimenti sulle nostre tavole hanno origine in Paesi esteri, a costi più bassi ma con più bassi standard qualitativi e di sicurezza. Gli avanzamenti tecnologici della produzione agricola con la predominanza di coltivazioni ed allevamenti di tipo intensivo hanno da una lato incrementato la produzione ma nel contempo hanno generato la scomparsa del piccolo coltivatore e un aumento dei costi ambientali.

La crescente complessità della filiera agroalimentare, fatta di molteplici attori, spesso sparsi nell'intero globo, ha generato nel consumatore diffidenza e smarrimento nelle scelte da operare in un campo così delicato come la propria alimentazione. Inoltre, le emergenze alimentari degli anni '90 (Encefalopatia Spongiforme Bovina, polli alla diossina, adulterazione Brunello di Montalcino etc.) non hanno che confermato la diffidenza della opinione pubblica, rendendo pressante, e non più ignorabile, la domanda di maggiore trasparenza delle informazioni sugli alimenti presenti sul mercato. La sensibilità del consumatore è di pari passo aumentata con il crescere delle

informazioni a disposizione su una corretta alimentazione e sui benefici di questa sulla salute, sensibilità che si è allargata anche a tematiche collaterali al solo aspetto nutrizionale e della sicurezza del prodotto alimentare ma anche all'impatto ambientale della loro produzione, al benessere degli animali da allevamento.

Il risultato della crescente domanda di informazioni è stato un nuovo sistema di etichettatura e il proliferare di moltissimi marchi che attestano altrettanti requisiti di garanzia di qualità. Risulta evidente come a seguito del vantaggio competitivo sul mercato derivante da questi marchi derivi la possibilità di frodi o adulterazioni, ed emerge quindi come evidente la necessità di controlli atti a verificarne la correttezza.

Le sfide analitiche per l'autenticazione dei prodotti alimentari sono quindi molteplici data la complessità della materia e della necessità di verifiche non solo sul prodotto finito ma anche lungo tutta la filiera, che nel caso dei prodotti di origine animale coincide con una catena alimentare, al fine di stabilire la natura esatta del prodotto.

Una vasta gamma di tecniche strumentali sono stati impiegate nella verifica della autenticità di molteplici matrici alimentari e molte hanno riportato un significativo successo in applicazioni specifiche. I prodotti alimentari con qualche marchio di garanzia di qualità sono in ascesa sul mercato e questo rende urgente il bisogno di metodi analitici veloci ed accurati adatti ad essere applicati all'autenticazione. Ad oggi, lo sviluppo di questo tipo di metodi è lontano dall'essere al livello richiesto dalla importanza economica e sociale di questo tema.

Lo scopo del mio percorso di dottorato di ricerca è stato quindi quello di individuare le problematiche di maggiore rilevanza in quest'ambito, per caratteristiche del mercato, di importanza per il territorio, delle potenzialità di sviluppo o della complessità della sfida analitica, per poi procedere alla pianificazione, ottimizzazione e realizzazione di ricerche su specifiche matrici e attraverso differenti tecniche analitiche, derivandone così dati sperimentali sulle loro potenzialità applicative in termini di affidabilità, semplicità e costi di utilizzo. I comparti studiati sono quelli del vino rosso italiano, dei succhi di frutta e del latte alimentare da agricoltura biologica.

Nel primo capitolo si presenta il quadro giuridico della autenticità e della qualità dei prodotti alimentari e più in specifico della normativa legata ai tre settori analizzati, mentre nel secondo ne si delinea una panoramica dei dati economici, al fine di fornire

un quadro delle caratteristiche del mercato e della importanza economica come prospettive di sviluppo di queste tematiche e dei settori considerati.

Nel terzo capitolo si descrivono invece le tecniche analitiche, sino ad ora esplorate, per la verifica della autenticità e qualità dei prodotti alimentari presi in esame, per poi affrontare nei capitoli successivi i casi studio affrontati sperimentalmente, quali:

- ✓ La potenzialità del profilo delle ammine biogene, come marker per la verifica della origine e delle caratteristiche di produzione di vini rossi italiani e per la verifica della materia prima usata nella produzione di succhi di frutta.
- ✓ La verifica della autenticità di un processo produttivo quale la produzione del latte alimentare da agricoltura biologica, per il quale si è voluto usare una tecnica strumentale innovativa e già rivelatasi risolutiva in molte problematiche relative alla autenticità dei prodotti alimentari quale la spettrometria di massa a rapporto isotopico.

I lavori sperimentali condotti durante il triennio di dottorato hanno originato 3 diversi manoscritti pubblicati, o in corso di pubblicazione su riviste scientifiche internazionali, questa tesi rappresenta quindi una loro estensione redatta con un approccio maggiormente illustrativo.

CAPITOLO 1
QUADRO NORMATIVO

1.1. Qualità, autenticità, e tracciabilità: aspetti generali

Autenticità e tracciabilità sono termini ormai entrati nel linguaggio corrente sia del consumatore, considerati caratteristiche fondamentali a garanzia della qualità di un alimento, sia del legislatore rispetto alla sicurezza lungo la catena alimentare dalla produzione alla vendita, dalla origine al punto vendita, “dalla fattoria alla tavola”, come espresso in molti documenti dell’Unione Europea.

Il significato di qualità di un alimento nella società attuale si è evoluto dalla soddisfazione di requisiti che vengono ora ritenuti imprescindibili, perché garantiti da una autorità pubblica, come quelli igienico-sanitari o le indicazioni in etichetta, verso la ricerca della soddisfazioni di altri bisogni più soggettivi, legati alle più disparate esigenze individuali, quali principi etici, tendenze della moda, preferenze per determinati territori o regioni, concetti che spesso non sono in nessun modo collegati alle qualità intrinseche del prodotto.

Sono proprio queste caratteristiche estrinseche dei prodotti alimentari che oggi contribuiscono maggiormente ad attribuire il valore finale al prodotto, sia in termini economici sia di visibilità sul mercato.

L’autenticità di un alimento, che è parte della tracciabilità alimentare, consiste nella identificazione dei suoi componenti per verificare la conformità con la sua etichettatura per evitare frodi economiche (Rodriguez- Ramirez et al. 2011).

La tracciabilità è definita nel regolamento europeo 178/2002, entrato in vigore all’inizio del 2005, come la capacità di tracciare e seguire un alimento, un mangime, o un animale da allevamento o un ingrediente di un alimento o di un mangime, attraverso tutti le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione.

La verifica della autenticità dei prodotti alimentari è importante per l’etichettatura e l’accertamento del valore al fine di evitare una competizione sleale sul mercato e assicurare il consumatore e i produttori contro pratiche fraudolente che sono comuni nella filiera alimentare.

Inoltre, le pratiche commerciali sleali nei prodotti alimentari possono essere anche dannose per la salute come ad esempio quando riguardano la presenza di contaminanti o allergeni non dichiarati. Le crisi alimentari degli anni novanta in Europa (Encefalopatia spongiforme bovina, Diossina) e in Cina (melamina), la globalizzazione del commercio dei prodotti agroalimentari hanno reso non più rimandabile la risposta alla

necessità di una corretta e chiara certificazione degli alimenti, dei mangimi e dei loro ingredienti per ragioni sia economiche che di salute pubblica. Dall'altra parte, sempre un maggior numero di consumatori mostra interesse per prodotti alimentari di alta qualità caratterizzati da proprietà e da un tipo di produzione garantite.

Per avere una panoramica sul quadro legislativo scaturito da queste emergenze a salvaguardia del settore alimentare in Europa dobbiamo iniziare dal Libro Verde del 1997 dell'Unione Europea e dal Libro Bianco sulla Sicurezza Alimentare del 10/02/2000 in cui si delineano i capisaldi delle azioni future quali:

- creazione di un'Autorità Alimentare Europea autonoma, con alto valore scientifico e alto grado di trasparenza, incaricata di elaborare pareri scientifici in completa autonomia su tutti gli aspetti inerenti alla sicurezza alimentare, alla gestione di sistemi di allarme rapido e alla comunicazione con i consumatori;
- sviluppo di un nuovo quadro normativo che copra tutta la filiera dei prodotti alimentari, "dalla fattoria alla tavola", con la applicazione del principio di precauzione alla gestione dei rischi;
- sistemi di controllo più armonizzati e integrati a livello nazionale ed europeo a tutti i livelli della catena alimentare;
- un dialogo continuo e transnazionale con i consumatori e le altre parti coinvolte, con particolare attenzione sulle norme di etichettatura.

La vera svolta nella normativa alimentare europea si ha però con l'emanazione del regolamento 178 del 28 gennaio 2002 che istituisce l'Autorità europea per la Sicurezza Alimentare (European Food Safety Authority, EFSA) e che disciplina tutte le fasi della produzione alimentare, applicandosi anche ai mangimi, definendo i principi e i requisiti generali della legislazione nonché le procedure di sicurezza alimentare. Il regolamento 178/2002 ha come obiettivi generali (articolo 5):

- livello elevato di tutela della vita e della salute umana;
- tutela degli interessi dei consumatori;
- pratiche leali nel commercio alimentare;
- tutela della salute degli animali;
- salute vegetale ed ambientale.

Si introduce inoltre il concetto di *rintracciabilità* definita come la possibilità di ricostruire il percorso di un alimento, di una sostanza destinata agli alimenti, mangime, di un animale destinato all'alimentazione, attraverso tutte le fasi di produzione trasformazione e distribuzione (articolo 3 comma 15), che viene garantita da una adeguata etichettatura di tutti gli alimenti o i mangimi immessi sul mercato della Comunità Europea, mediante documentazione o informazioni pertinenti (articolo 18).

Altro passo importante è stata l'adozione da parte della Commissione UE del cosiddetto "pacchetto qualità" dei prodotti agricoli le cui misure sono volte a garantire la qualità dei prodotti agricoli e alimentari ai consumatori e un prezzo equo agli agricoltori. Esso è costituito da:

una proposta di regolamento sulla qualità dei prodotti agricoli (COM(2010)733) approvata definitivamente il 21 novembre 2012, nel regolamento CE 2012 n. 1151) che si propone, in particolare, di adottare una procedura di registrazione comune, semplificata e abbreviata, per le indicazioni geografiche e le specialità tradizionali, nonché disposizioni più chiare sulle relazioni fra i marchi commerciali e le indicazioni geografiche, sul ruolo delle associazioni richiedenti, sulla definizione di "specialità tradizionale garantita"(STG) e sulle informazioni ai consumatori relative alle "indicazioni facoltative di qualità".

Una proposta di regolamento COM(2010)738 recante modifica del regolamento (CE) n. 1234/2007 relativo alle norme di commercializzazione, che è volta a semplificarne l'assetto normativo e ad estendere l'obbligo dell'indicazione in etichetta del luogo di produzione, in funzione delle specificità di ciascun settore agricolo. La Commissione propone inoltre di estendere le disposizioni settoriali relative all'indicazione del luogo di produzione, tenendo conto delle specificità di ciascun settore e delle esigenze dei consumatori in materia di trasparenza. Uno dei primi settori presi in esame sarà il settore lattiero-caseario.

-orientamenti sulle buone pratiche applicabili ai sistemi di certificazione volontaria dei prodotti agricoli ed alimentari (pubblicati nella Gazzetta ufficiale UE del 16 dicembre 2010, serie L, n. 341) volti ad evidenziare i migliori metodi, nell'ambito delle centinaia di sistemi di certificazione volontari sviluppatisi nel corso dell'ultimo decennio. Gli orientamenti si applicano ai regimi facoltativi di certificazione che riguardano:

- o i prodotti agricoli, destinati o meno al consumo umano (compresa l'alimentazione animale).
- o prodotti alimentari di cui all'articolo 2 del regolamento (CE) n. 178/2002 (prodotti trasformati, parzialmente trasformati o non trasformati, destinato ad essere ingerito da esseri umani, bevande, gomme da masticare, acqua incorporata negli alimenti nel corso della loro produzione, preparazione o trattamento);
- o processi e sistemi di gestione connessi alla produzione e alla trasformazione di prodotti agricoli e alimentari.
- o l'etichettatura dei prodotti alimentari che utilizzano come ingredienti prodotti a denominazione di origine protetta (DOP) o a indicazione geografica protetta (IGP), la cui applicazione è volontaria. In particolare la Commissione focalizza la propria attenzione su due aspetti: 1) le condizioni per l'impiego di denominazioni registrate come DOP o IGP nell'etichettatura, nella presentazione e nella pubblicità dei prodotti alimentari che contengono come ingredienti prodotti protetti da queste denominazioni; 2) le buone pratiche atte a garantire che le denominazioni registrate di prodotti DOP o IGP utilizzati come ingredienti di prodotti alimentari, non siano usate in modo improprio, tale da compromettere la reputazione del prodotto che beneficia di queste denominazioni, o da indurre il consumatore in errore circa la composizione del prodotto.

1.2. Etichettatura

Parola chiave della normativa atta a garantire la trasparenza e le corrette informazioni al consumatore è quindi “etichettatura”, che ha come scopo principale quello di fornire al consumatore le indicazioni necessarie ad operare una scelta consapevole nei suoi acquisti, ma che deve essere regolamentata anche per non essere un ostacolo alla libera circolazione delle merci.

Nel 1979, la direttiva europea 79/112/EEC introdusse controlli a livello europeo sulla etichettatura alimentare. Nel 2000, questa direttiva è stata sostituita nella direttiva 2000/13/EC che si concentra sulla prevenzione di pratiche fraudolente o ingannevoli e sulle adulterazioni alimentari. In questa direttiva si richiede che ogni alimento presenti una etichetta dettagliata e uniformata che includa:

- denominazione di vendita;
- elenco degli ingredienti costituito dalla loro enumerazione in ordine decrescente di peso e dall'indicazione del loro nome specifico;
- la quantità netta;
- il termine minimo di conservazione;
- condizioni particolari di conservazione e di utilizzazione;
- il nome o la ragione sociale e l'indirizzo del fabbricante o di un venditore del paese della Comunità Europea;
- il luogo di origine o di provenienza, qualora l'omissione di tale indicazione possa indurre in errore il consumatore;
- le istruzioni per l'uso devono essere indicate in modo tale da consentire un uso appropriato del prodotto alimentare;
- l'indicazione del titolo alcolometrico volumico effettivo.

per venire incontro alle problematiche connesse al consumo di determinati prodotti è stata emanata nel 2003 la direttiva 2003/89/EC che integra la 2000/13 nell'obbligo di indicazione degli allergeni e la 90/496/CEE sulla etichettatura nutrizionale dei prodotti alimentari

Ultima normativa sulla etichettatura è il recente regolamento 1169/2011 che è entrato in vigore il 13 dicembre 2011 ed armonizza la legislazione sulla etichettatura alimentare, l'articolo 53 del nuovo regolamento, a decorrere dal 13 dicembre 2014, abroga, oltre che le direttive generali sull'etichettatura (direttiva 2000/13/CE) e sull'etichettatura nutrizionale (direttiva 90/496/CEE), altre quattro direttive (87/250/CEE, 1999/10/CE, 2002/67/CE, 2008/5/CE) ed il regolamento 608/2004/CE.

Quanto ai profili di merito, il nuovo regolamento ha spostato il centro dell'attenzione dall'etichettatura in sé considerata al più generale tema dell'informazione e della comunicazione, quali strumenti per garantire al consumatore *un ruolo attivo* nelle decisioni e nelle scelte di acquisto e di consumo. Questa disciplina si propone come componente essenziale della più ampia legislazione in tema di concorrenza, regolazione del mercato, protezione dalle frodi e dalle contraffazioni, ma nel medesimo tempo costituisce elemento centrale nel processo inteso ad assicurare la qualità e la sicurezza degli alimenti, in linea con le disposizioni dell'articolo 14 del regolamento 178/2002 in tema di "Requisiti di sicurezza degli alimenti" e dell'articolo 17 in tema di "Obblighi"

(rectius: competenze e responsabilità) delle autorità pubbliche e degli operatori del settore alimentare.

Rimane aperto il problema della etichettatura della origine che ad oggi rimane obbligatoria in UE solo per carni bovine ed avicole, a seguito delle ben note crisi alimentari, per i prodotti ortofrutticoli freschi, per il pesce, il miele e l'olio di oliva. L'indicazione della origine invece è uno strumento di trasparenza per il consumatore al fine di operare scelte consapevoli e magari attuare un consumo critico privilegiando Paesi con alti standard di sicurezza alimentare, diritti umani e ambientali (da uno studio di Eurobarometro 2013 più del 60% degli europei considera l'origine importante nei propri acquisti alimentari), e per gli agricoltori, come valorizzazione del loro lavoro e delle materie prime usate.

Lo scoglio per la diffusione della etichettatura di origine obbligatoria a tutti i prodotti alimentari sembrava essere finora il Trattato istitutivo della UE in cui si vedeva l'indicazione di origine come un ostacolo alla libera concorrenza nel mercato unico europeo. Questo ostacolo è stato però superato dalla direttiva 2000/13 sulla etichettatura che consente ai singoli Stati membri di legiferare prevedendo indicazioni obbligatorie sulla origine in etichetta dei loro prodotti quando questa sia necessaria per reprimere frodi, tutelare il consumatore da errori o false interpretazioni, tutelare la salute pubblica. Queste condizioni in un mercato dei prodotti agroalimentari globalizzato non appaiono però così circoscritte a pochi prodotti, ma alla totalità della produzione agroalimentare specialmente in una realtà con forti tradizioni ed eccellenze come quella italiana.

Quello che emerge da una analisi del contesto e delle scelte legislative degli ultimi anni è come l'etichettatura di origine sia succube degli interessi degli attori con il potere contrattuale più forte nei confronti delle istituzioni, ossia i grandi gruppi alimentari e la grande distribuzione, che vedono l'etichettatura dell'origine un ostacolo alla possibilità di approvvigionamento delle materie prime in Paesi dove esse risultano più convenienti o alla delocalizzazione dei propri impianti produttivi in Paesi con regole ambientali, di sicurezza alimentari e sui diritti dei lavoratori meno stringenti e quindi economicamente più vantaggiosi (Vieri, 2012).

1.3.I marchi di qualità alimentare in Europa

1.3.1 Indicazioni geografiche e denominazioni di origine

L'Unione Europea ha riconosciuto e sostenuto la differenziazione di prodotti di qualità su una base regionale con l'introduzione di un norme comunitarie per la protezione sia della origine geografica sia delle tecniche di produzione agricola tradizionale mediante i regolamenti 2081 e 2082/1992/EC, poi sostituiti dal Regolamento 510/2006 per la protezione delle indicazioni geografiche (IGP) e denominazione di origine protetta (DOP) e il Regolamento 509/2006 per le specialità tradizionale garantita (STG). Recentemente i due regolamenti sono stati sostituiti dal Regolamento 1151/2012 entrato in vigore il 3 gennaio 2013 che riguarda i regimi di qualità dei prodotti agricoli ed alimentari ad eccezione delle produzioni vitivinicole, le cui denominazioni DOP e IGP sono oggetto del regolamento 479/2008, semplificando e velocizzando le procedure di registrazione rispetto al precedente.

I due regolamenti 509/2006 e 510/2006 prevedevano la protezione in Europa dei DOP, IGP e STG fissando definizioni per tutti i prodotti agricoli ed alimentari, indicando le specifiche di un prodotto che devono essere rispettate dai produttori ma che sono anche i punti di riferimento per le operazioni di controllo, sono illustrate, inoltre, le procedure per le domande di registrazione.

I prodotti registrati con i marchi DOP, IGP e STG appartengono ad una ampia gamma di classi di alimenti, dalla carne ai formaggi ai vegetali alla birra e altre bevande, agli oli ed altri grassi. Con l'approvazione del regolamento 1151/2012 potranno ottenere i marchi DOP e IGP anche cioccolato e prodotti derivati, sale, cotone, cuoio, pellame, piume.

DOP e IGP descrivono un prodotto che deve le proprie caratteristiche o la sua fama alla area geografica da cui originano. Questi nominativi protetti sono legati al nome della regione, o di una paese, dato che la produzione , la trasformazione e la produzione hanno luogo in una area ben definita. La legislazione evidenzia però che il legame con il territorio è più forte nel caso dei DOP. Infatti, per questo tipo di riconoscimento le qualità o le caratteristiche del prodotto sono *esclusivamente o essenzialmente* dovute ad un particolare zona geografica con i suoi propri fattori ambientali ed umani. Inoltre, nell' articolo 2 è specificato come tutti gli steps di un prodotto debbano aver luogo in una area geografica ben definita.

Mentre per il marchio IGP è sufficiente che almeno una delle fasi della produzione avvenga nell'area geografica, il legame quindi con il territorio risulta non “esclusivo o essenziale” ma è sufficiente che le caratteristiche che rendono il prodotto peculiare siano “attribuibili” all'origine geografica.

Un prodotto STG invece non si riferisce all'origine ma evidenzia una caratteristica di tradizione nel suo disciplinare di produzione, a prescindere dal luogo in cui si svolge il ciclo produttivo. Questo sistema di registrazione è stato istituito al fine di proteggere le caratteristiche qualitative e culturali uniche di alcuni alimenti tradizionali e regionali da imitazioni di qualità inferiore.

I marchi europei DOP, IGP, STG sono la risposta della Commissione Europea alla richiesta di omogeneità e semplificazione delle denominazioni dopo l'istituzione del mercato unico e alla necessità di fornire agli agricoltori e alle industrie alimentari strumenti di valorizzazione del proprio prodotto nel rispetto delle regole del commercio internazionale, che nella normativa precedente non erano rispettate in particolare nel requisito di reciprocità ed equivalenza.

La legislazione europea ha fatto molto per la protezione e la valorizzazione di alcuni prodotti. L'etichettatura, i marchi, le specifiche di prodotto e i controlli ufficiali sono gli strumenti disponibili per garantire che alcuni prodotti alimentari e agricoli sono distinguibili da altri simili, atti quindi a certificare l'aderenza del prodotto a determinate caratteristiche di qualità, di origine geografica o produzione, al fine di eliminare una competizione fuorviante e sleale con prodotti non genuini di peggior qualità. Il marchio di qualità europeo è divenuto un mezzo per aumentare la credibilità di alcuni prodotti sul mercato e per garantirne non solo la qualità ma anche l'autenticità, essendo i compratori rassicurati del fatto che non stanno acquistando una imitazione (Serra R. 2007).



Figura 1. I marchi DOP, IGP, TSG.

1.3.1.1. Procedura per la registrazione dei prodotti a DOP, IGP e STG

La Commissione Europea ha istituito e mantiene un registro delle denominazioni di origine protette e delle indicazioni geografiche protette (articolo 15 del Regolamento 1898/2006/EC), e un registro delle specialità tradizionali garantite (articolo 10 del Regolamento 509/2006/EC).

Nel registro dei DOP e IGP sono catalogati i prodotti con il loro nome, la categoria merceologica, paese di origine, e il riferimento al tipo di protezione richiesto (DOP e IGP), e rappresenta il documento di riferimento per i controlli ufficiali.

Nel registro delle STG il prodotto é identificato con il suo nome tradotto in più lingue ed è inoltre indicato:

- se la registrazione è con o senza l'uso riservato del nome;
- se il prodotto oltre al nome nella sua lingua originale può contenere sul marchio indicazioni in altre lingue;
- se la sua produzione è avvenuta in accordo con metodi tradizionali di un Paese o regione;
- la nazione di appartenenza del gruppo che ha inoltrato la richiesta di registrazione.

I regolamenti 509/2006 e 510/2006 stabiliscono uno schema di registrazione molto dettagliato e specifico a due livelli, uno nazionale, con responsabile lo Stato membro, e uno europeo, con responsabile la Commissione Europea e vengono anche illustrati gli strumenti per la sua implementazione:

specifiche di prodotto, l'esame della Commissione, e la decisione o le opposizioni alla registrazione e la registrazione.

Il Regolamento 510/2006 stabilisce anche la possibilità di certificare prodotti provenienti da paesi terzi, secondo però procedure differenti.

Primo passo nell'iter di registrazione è la redazione delle specifiche di prodotto con tutte le informazioni tecniche:

- nome del prodotto;
- lo Stato membro o il Paese terzo che richiede la registrazione;
- la descrizione del prodotto (categoria merceologica, materie prime utilizzate, etc.);
- descrizione del processo e dell'area geografica di produzione;

Per i Paesi terzi sono richieste ulteriori informazioni, come il nome e l'indirizzo del gruppo richiedente e in particolare, le prove che il nome oggetto della richiesta è protetto nel suo paese di origine. La vera differenza tra le procedure per Paesi UE e non UE è nel fatto che i primi deve prima passare l'esame di una autorità del proprio paese che vaglia attentamente i requisiti della domanda e dà un parere a livello nazionale, mentre i secondi saltano questo passaggio in quanto la richiesta di registrazione è inoltrata direttamente alla Commissione.

Una volta ottenuta la registrazione un prodotto agroalimentare è protetto da (articolo 13 del regolamento 510/2006):

- uso diretto o indiretto del nome registrato su un prodotto non registrato;
- imitazione o richiamo al nome registrato su un prodotto non registrato, divieto esteso anche ad espressioni come “tipo”, “stile”, “imitazione”, “metodo” e simili;
- divieto di apporre indicazioni false o fuorvianti riguardo la provenienza, origine, natura e qualità del prodotto sulla confezione che possano dare una falsa idea sulla sua origine.

Una volta ricevute le richieste di registrazione la Commissione Europea le pubblica sulla Gazzetta Ufficiale della Unione Europea serie C, dove restano sei mesi al fine di rendere possibile qualsiasi ricorso. Dopo 12 mesi, se l'iter si è concluso favorevolmente, la registrazione del prodotto è pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale della Unione Europea serie L.

1.3.1.2. Protezione dell'indicazione geografica nel settore vinicolo

La protezione dell'indicazione geografica dei vini è la prima ad essere stata introdotta a livello comunitario (regolamento 817/70). Nel regolamento si individuava la categoria dei vini di qualità prodotti in regioni determinate (VQPRD) demandando poi agli Stati membri la sua tutela attraverso norme proprie. Il recepimento italiano portò alla identificazione dei marchi DOC (Denominazione di Origine Controllata), DOCG (Denominazione di Origine Garantita) che rientravano nella categoria comunitaria VQPRD e un marchio per i vini da tavola IGT (Indicazione Geografica Tipica).

Nel 2008 furono promulgati i regolamenti 479/2008/EC e il 555/2008/EC, seguiti dal regolamento 607/2009/EC che dettava le regole per la loro implementazione. In questi regolamenti sono delineati i requisiti per ottenere la registrazione dei marchi DOP e IGP per i vini. Per l'etichettatura dei vini (Tabella 1) non è cambiato nulla, l'indicazione del marchio DOP e IGP è obbligatoria accanto al nome del vino DOP o IGP, tuttavia, per non indurre in confusione il consumatore, esse possono essere omesse se in etichetta figurano menzioni tradizionali in uso nel Paese di commercializzazione, ovvero espressioni che vengono comunemente utilizzate per indicare questa tipologia di prodotti.

L'elenco delle menzioni tradizionali è riportato all'all. XII del regolamento CE 607/09 e, nel nostro Paese, corrispondono alle indicazioni Denominazione di Origine Controllata, Denominazione di Origine Controllata e Garantita, Indicazione Geografica Tipica ed i relativi acronimi DOC, DOCG e IGT. Pertanto i vini che riportano in etichetta la DOC, DOCG o IGT non dovranno apportare sostanziali modifiche alla loro denominazione se non aggiungere, facoltativamente, l'espressione comunitaria DOP/IGP, in acronimo o per esteso, ed il relativo logo comunitario.

Sono inoltre stabilite le autorità preposte ai controlli ed i controlli per la conformità alle specifiche. Il nuovo regolamento del 2008 nasce per armonizzare la normativa nel settore vinicolo con i regolamenti 509/2006 e 510/2006 per gli alimenti, allo scopo di aumentare il prestigio dei vini europei e il loro mercato sia in UE che fuori, e di preservare la tradizione migliore della enologia europea esaltando il suo ruolo sociale ed ambientale nelle zone rurali. Di conseguenza, le basi del sistema di registrazione e protezione del vino è molto simile a quello dei prodotti agricoli ed alimentari. Ci sono infatti due strumenti: DOP, "vini di qualità prodotti in una regione specifica" e IGP, "Vini da tavola con indicazione geografica.

Un vino con il marchio DOP deve quindi essere prodotto in una specifica area geografica e le sue caratteristiche qualitative devono essere dovute *esclusivamente o essenzialmente* alla particolare ambiente geografico di provenienza.

La legislazione che protegge in settore vinicolo è comunque molto più specifica e articolata rispetto a quella sui prodotti alimentari.

Tabella 1- Indicazioni obbligatorie e facoltative in etichetta per i vini DOP e IGP (regolamento CE/607/2009).

INDICAZIONI OBBLIGATORIE	INDICAZIONI FACOLTATIVE
Nome del prodotto seguito dall'espressione "Denominazione di origine protetta" o "Indicazione geografica protetta" o, in sostituzione, dalla menzione tradizionale DOC/DOCG/IGT.	Categoria merceologica (vino, vino spumante, ecc.)
Titolo alcolometrico volumico.	Riferimenti (nome o marchio commerciale + indirizzo) ad altri operatori coinvolti nella filiera (es. produttore, distributore, ecc.).
Origine e provenienza	Utilizzo di termini quali abbazia, castello, rocca, ecc. riferiti all'azienda agricola ma solo se tutte le operazioni di trasformazione avvengono nell'area menzionata.
Riferimenti all'imbottigliatore (nome e/o marchio + indirizzo)	Logo comunitario relativo alla presenza di allergeni
Tenore zuccherino (solo per gli spumanti).	Annata delle uve, solo se almeno l'85% delle uve proviene dalla stessa annata
Indicazione relativa alla presenza di allergeni	Tenore zuccherino (per i vini non spumanti).
Lotto	Varietà delle uve, solo se rappresenta almeno l'85% delle varietà utilizzate
Indicazione della quantità	Indicazioni relative al metodo di invecchiamento e/o di elaborazione (es. superiore, novello, ecc.).
	Simboli comunitari della DOP/IGP
	Riferimenti al metodo di produzione (fermentato in botte, ecc.).
	Indicazioni relative ad unità geografiche più piccole della DOP/IGP, solo se almeno l'85% delle uve impiegate nella produzione del vino proviene da tali zone.

Infatti, i regolamenti 509/2006 e 510/2006 dettano regole e procedure generali in quanto riguardano categorie di prodotti molto diversi, dalla carne ai prodotti ortofrutticoli, dai formaggi alla birra etc., mentre la legislazione sui vini fornisce molti dettagli tecnici e sulle tecniche enologiche in modo molto più uniforme, dalla analisi analitica e organolettica, al contenuto di zuccheri alle regole sulle zone di coltivazione del vino.

I marchi di indicazione geografica dei vini non ne garantiscono solo la qualità e l'autenticità ma anche la corrispondenza alle specifiche tecniche, analitiche e organolettiche, regolamentando le pratiche enologiche, pur mantenendo le caratteristiche specifiche delle diverse zone vitivinicole (ad esempio lo zuccheraggio consentito nelle zone più settentrionali dell'Europa e non in quelle meridionali), in parallelo con la regolamentazione dei processi produttivi alla base delle norme sui DOP e IGP alimentari e sui prodotti STG e biologici (Vieri, 2012).

A verificare la corretta attribuzione dei marchi è attivo l'Istituto per la salute e la protezione del consumatore del Centro Comune di Ricerca con sede a Ispra (VR) attraverso analisi in laboratori specializzati.

1.3.2. Istituzione di database per i prodotti agroalimentari protetti

La Commissione Europea ha promosso la diffusione del registro delle indicazioni geografiche per quanto riguarda i prodotti agroalimentari e gli alimenti con il database on-line "DOOR, il database della origine e registrazione" e per i vini e gli alcolici con il database "E-Bacchus".

Nei due database multilingua sono presenti tutti i documenti legali inerenti le caratteristiche di autenticità dei prodotti registrati, informazioni che in questo modo sono accessibili a tutti gli interessati, aziende, produttori, amministratori e consumatori.

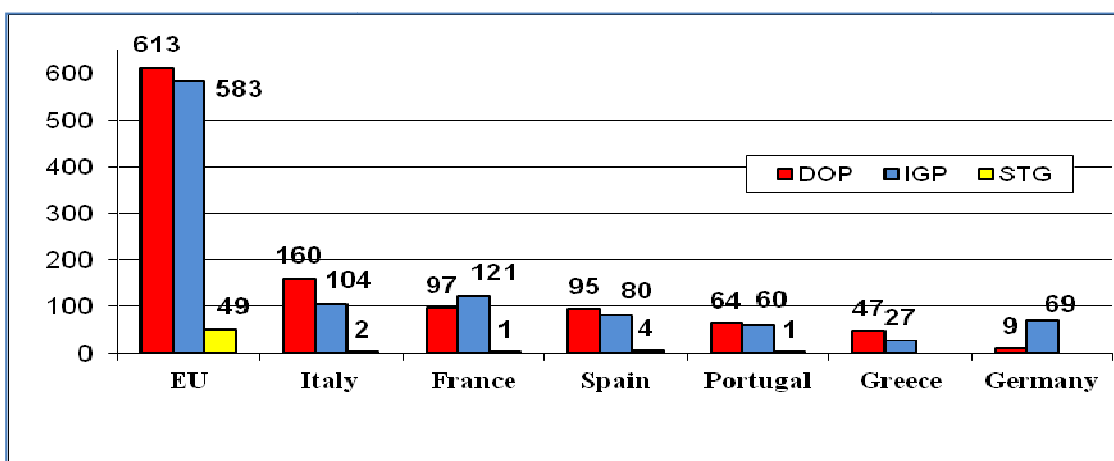


Figura 1. Prodotti alimentari con marchio DOP, IGP e STG nei principali paesi UE (Fonte:UE DOOR, 2014).

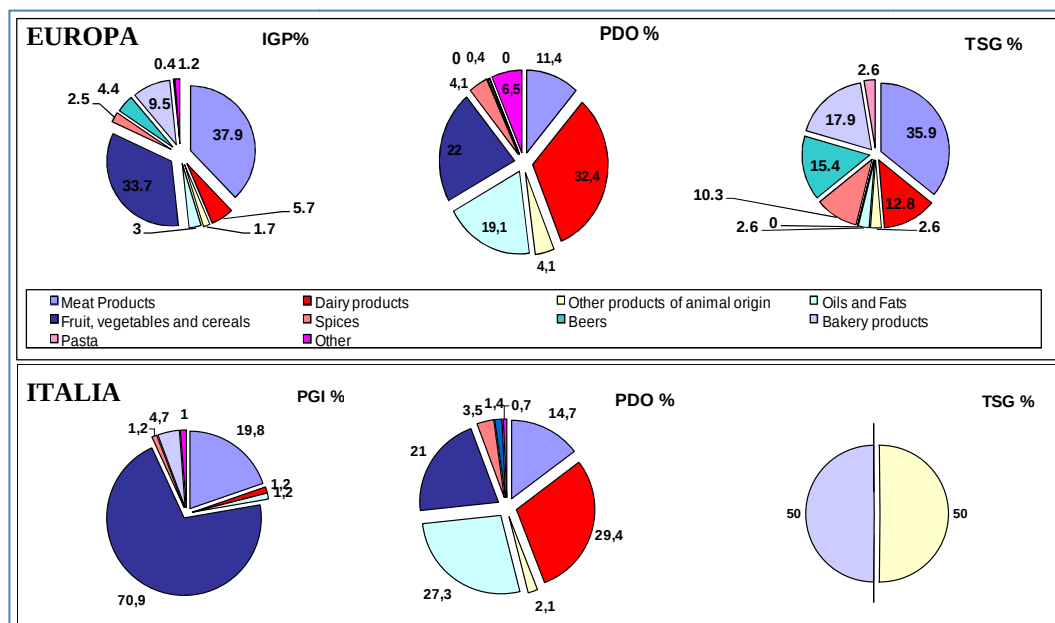


Figura 2. Prodotti DOP, IGP e STG in UE e Italia (Fonte: elaborazioni su dati EU DOOR, 2014).

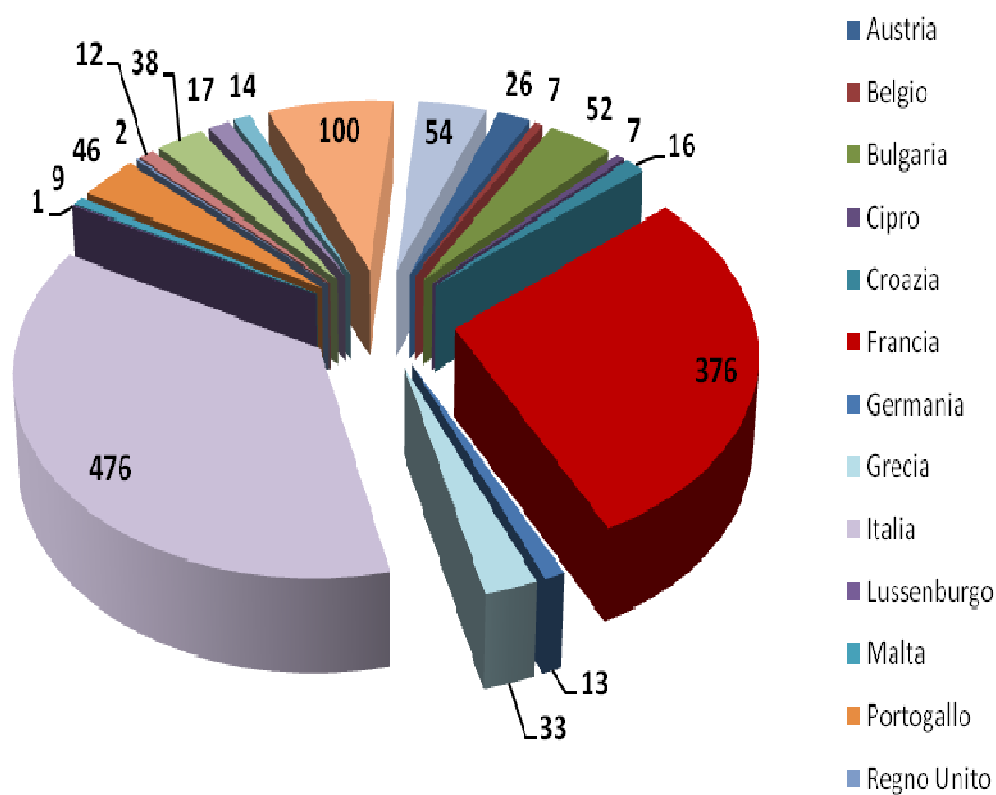


Figura 3 Distribuzione in EU dei vini DOP (Fonte E-Bacchus, 2014)

Attualmente (novembre, 2014) sul database DOOR sono presenti un totale di 1245 prodotti, 613 DOP, 583 IGP e 49 STG (Figura 1).

Per quanto riguarda i prodotti italiani, risultano 160 DOP, 104 IGP e solo 2 STG, la mozzarella e la pizza napoletana. Nell'ambito dei DOP, risultano registrati 46 nella categoria formaggi, 42 in quella oli e grassi e 34 negli ortofrutticoli. Per gli IGP la categoria degli ortofrutticoli è la più rappresentata con 69 prodotti registrati seguita da quella dei prodotti a base di carne con 16 (Figura 2).

L'Italia è il Paese con il maggior numero di registrazioni, 476 DOP e 129 IGP, seconda la Francia con 376 e 75, rispettivamente.

Il database DOOR si configura come una dichiarazione di autenticità del prodotto, fornendo al consumatore, al rivenditore, all'organismo di controllo informazioni complete e affidabili sulle caratteristiche di quel determinato prodotto.

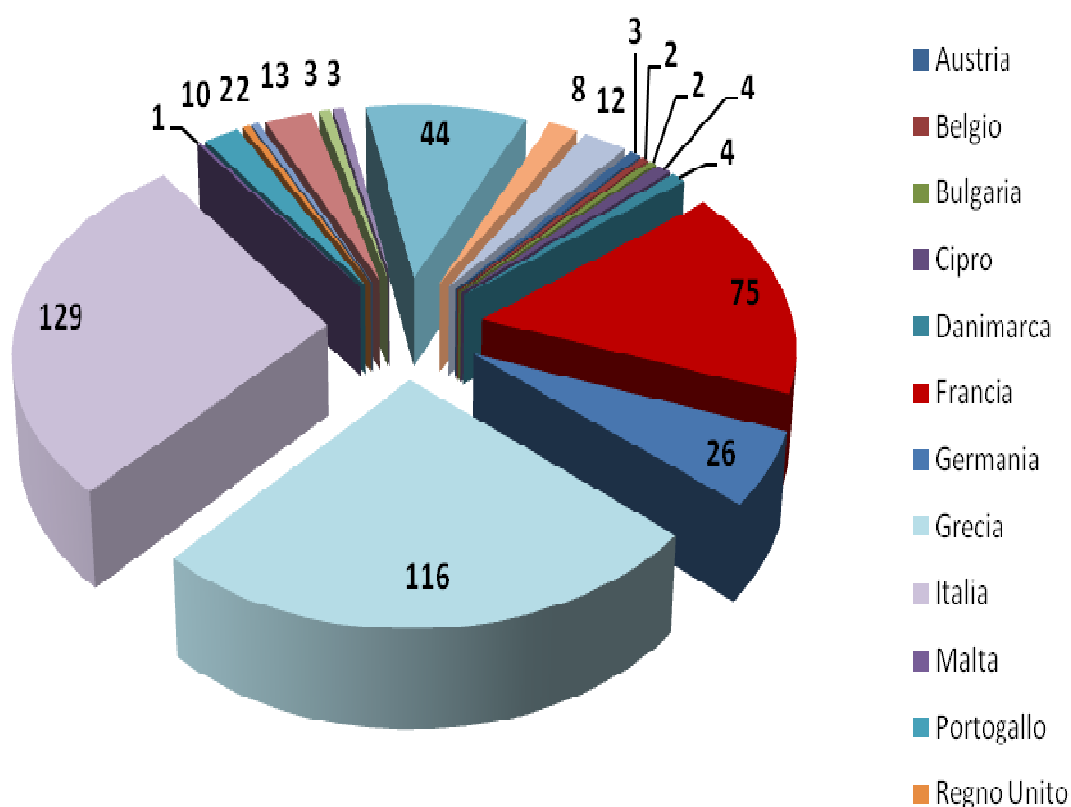


Figura 4 Distribuzione in EU dei vini IGP (Fonte E-Bacchus, 2014)

Per i vini e le bevande alcoliche lo strumento informatico analogo al DOOR è E-Bacchus, che cataloga tutto il contenuto del registro delle denominazioni di origine e delle indicazioni geografiche dei vini protetti nella UE in riferimento al Regolamento 1234/2007/EC, e raccoglie inoltre anche i nomi di origine protetta e le indicazioni geografiche di vini di paesi non UE protette in UE in base ad accordi bilaterali. Ad oggi, ci sono 1293 vini DOP e 459 IGP nel database, come mostrato nel dettaglio nelle figure 3 e 4.

1.3.3. Verifiche ufficiali sulla corrispondenza con le specifiche della protezione dei prodotti alimentari.

I marchi di qualità europei da un lato forniscono al consumatore uno strumento affidabile per la scelta alimentare, dall'altra parte danno al produttore anche un vantaggio sul mercato in termini di prezzo e di visibilità.

Di conseguenza, sia i produttori che i consumatori necessitano di controlli da parte di organi ufficiali certificati per assicurarli da frodi e adulterazioni.

Il sistema di monitoraggio di controlli ufficiali deve essere in linea col Regolamento 882/2004/EC. Gli enti certificatori devono essere accreditati secondo lo standard europeo EN 45011 o ISO/IEC Guide 65 (articolo 11 regolamento 510/2006/EC).

Inoltre nei regolamenti 509/2006 e 510/2006 si specifica che la verifica della corrispondenza con i disciplinari di prodotto debba essere condotta da una o più autorità competenti o organismi di controllo dei Paesi membri della UE. L'indicazione delle autorità competenti e/o dell'organismo di controllo è precisata nelle specifiche di prodotto.

Posto che il controllo della autenticità di un prodotto DOP, IGP e STG è la verifica della sua corrispondenza con le specifiche della normativa che regola l'attribuzione di questi marchi, i controlli dovranno provvedere a provare il legame tra il prodotto e l'area geografica, individuando le caratteristiche di una particolare regione che influenzano il prodotto in un modo che altre invece non farebbero, e il grado in cui esse "sono essenziali o esclusivamente dovuti all'ambiente geografico" nel caso dei DOP, o invece solo "attribuibili all'origine geografica" per gli IGP (articolo 6 regolamento

509/2009/EC). Dovranno provvedere, inoltre, alla identificazioni di adulterazioni o di sostituzioni con ingredienti di minor valore, stabilire l'uso di una tecnica di produzione diversa da quella stabilita per legge.

1.4. Agricoltura Biologica

L'interesse dei consumatori per i prodotti biologici deriva principalmente da considerazioni di carattere ambientale e salutistico. I consumatori sono preoccupati per la sicurezza di ciò che mangiano e sull'uso di pesticidi, fertilizzanti chimici e farmaci veterinari in agricoltura. Inoltre, sono sempre più consapevoli della necessità di privilegiare metodi di coltivazioni capaci di conservare il suolo, di preservare l'ambiente rurale, di sfruttare le risorse locali e di contribuire alla sostenibilità. L'agricoltura biologica sembra essere uno strumento importante per risolvere simultaneamente una serie di problemi legati alla produzione alimentare, all'ambiente, al benessere degli animali e allo sviluppo agricolo.

Negli ultimi decenni la domanda di prodotti da agricoltura biologica è aumentata costantemente, anche se la crescita del mercato biologico è rallentata negli ultimi due anni, probabilmente a causa della crisi economica, la tendenza a lungo periodo è rimasta positiva. Nonostante questo successo, non esistono standard a livello mondiale, a parte gli standard IFOAM, per l'agricoltura e la zootecnia biologica. La produzione biologica è regolamentata all'interno dell'Unione Europea da una serie di normative come il regolamento 1804/99/EC, il regolamento 834/2007/EC e, il più recente regolamento 889/2008/EC che illustra dettagliatamente le norme di produzione, etichettatura e controllo.

In particolare, il regolamento 834/2007/EC ha definito i seguenti obiettivi:

- (1) stabilire un sistema di gestione sostenibile per l'agricoltura attraverso l'esclusione di fertilizzanti chimici e trattamenti meccanici che rispettino i sistemi e i cicli naturali; contribuendo ad un livello elevato di diversità biologica; assicurando un impiego responsabile dell'energia e delle risorse naturali e rispettando elevati standard di benessere degli animali;
- (2) mirare a ottenere prodotti di alta qualità;

(3) mirare a produrre un'ampia varietà di alimenti e altri prodotti agricoli che rispondano alla domanda dei consumatori.

Fornisce inoltre indicazioni su sistemi ecologici si basano sulla valutazione dei rischi e sul principio di precauzione per limitare l'uso di input chimici esterni. Si impone anche il divieto dell'uso di OGM (organismi geneticamente modificati) e prodotti ottenuti da OGM, anche se la normativa sulla etichettatura degli OGM (regolamento 1829/2003) stabilisce una soglia tecnica dello 0.9% sotto la quale la presenza di OGM è da considerarsi accidentale e quindi non soggetto all'obbligo di etichettatura.

La dicitura "biologico" in etichetta è utilizzabile solo se non meno del 95% degli ingredienti proviene da agricoltura biologica ed il marchio per la agricoltura biologica europea (figura 5) è diventato obbligatorio dal 1 luglio 2012 su tutti i prodotti da agricoltura biologica confezionati prodotti nella Comunità Europea (regolamento 271/2010/EC). Questo logo, insieme ai marchi di indicazione geografica, è un'altra azione della Unione Europea per il miglioramento della comunicazione delle qualità dei prodotti agricoli allo scopo di ristabilire un legame tra agricoltori e consumatori. Infatti il logo di agricoltura biologica crea fiducia nel consumatore circa la qualità del prodotto e lo riassicura circa la corrispondenza del suo processo produttivo alla normativa sulla agricoltura biologica.

Secondo la legislazione europea, i sistemi di produzione biologica per i prodotti vegetali sono soggetti a rigorose restrizioni nell'uso fertilizzanti, pesticidi o insetticidi di sintesi. Si basa su frequenti rotazioni delle colture e estese lavorazioni del terreno, l'uso del compost o di rifiuti organici, piuttosto che di concimi minerali, e sul controllo biologico o tramite lotta integrata dei parassiti invece dell'uso di pesticidi chimici.

La zootecnia biologica prevede tecniche di alimentazione basate su almeno l'85% di mangimi biologici (100% per i bovini da carne e da latte), meglio se di produzione aziendale. Particolare attenzione è dedicata al benessere animale, e in particolare alle forme di stabulazione che devono essere, per quanto possibile, libere e tali da non causare sofferenze agli animali.

Il regolamento 271/2010 ha aperto anche alla possibilità di aprire le importazioni di prodotti da agricoltura biologica provenienti da tutti i Paesi terzi e non solo da quelli riconosciuti dalla UE come in precedenza, a condizione che le regole sul processo

produttivo siano uguali o equivalenti a quelle della UE e che siano certificati e monitorati da organismi di controllo autorizzati dalla Commissione Europea.



Fig. 5. Logo della Unione Europea per gli alimenti da agricoltura biologica.

I prodotti biologici tendono ad avere al dettaglio un prezzo superiore al loro analogo ottenuto convenzionalmente, soprattutto a causa del minor rendimento e dei costi elevati di certificazione. Sono proprio questo premium price e la crescente domanda a rendere i prodotti alimentari biologici particolarmente sensibili alla frode. Anche se il valore aggiunto di questi prodotti è garantita da un sistema di certificazione che dovrebbe assicurare la loro completa tracciabilità in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e di vendita, tali sistemi basati su una tracciabilità solo documentale possono essere facilmente falsificati.

Per aumentare la fiducia dei consumatori è quindi importante che, in aggiunta alla certificazione, le proprietà dichiarate sugli alimenti possano essere verificate in modo oggettivo e indipendente.

1.5. La normativa europea dei succhi di frutta

La norma europea di riferimento per i succhi di frutta e altri prodotti analoghi destinati all'alimentazione umana è la direttiva 2001/112/CE del Consiglio del 20 dicembre 2001, successivamente modificata prima dalla direttiva 2009/106/CE che teneva conto degli avanzamenti tecnologici avvenuti su questa materia delle norme previste dal Codex Alimentarius del 2005 e dei pareri della Associazione europea dei produttori di succhi

di frutta (AIJN) e successivamente dalla direttiva 2012/12/UE, che ha introdotto modifiche sostanziali alla normativa iniziale quali il divieto dell'aggiunta di zuccheri o edulcoranti nei succhi di frutta e l'aggiunta del pomodoro nella lista dei frutti utilizzabili.

La definizione di succo di frutta contenuta nella direttiva 2001 è la seguente:

“il prodotto fermentescibile ma non fermentato, ottenuto da frutta sana e matura, fresca o conservata al freddo, appartenente ad una o più specie e avente il colore, l'aroma e il gusto caratteristici dei succhi di frutta da cui proviene. L'aroma, la polpa e le cellule del succo che sono separati durante la lavorazione possono essere restituiti allo stesso succo”.

Mentre succo di frutta ottenuto da un succo concentrato è definito come:

“prodotto ottenuto, reinserendo nel succo di frutta concentrato l'acqua estratta dal succo al momento della concentrazione e ripristinando gli aromi e, se opportuno, la polpa e le cellule perduti dal succo ma recuperati al momento del processo produttivo del succo di frutta in questione o di succhi di frutta della stessa specie”

Il prodotto così ottenuto deve presentare le caratteristiche organolettiche e analitiche per lo meno equivalenti a quelle di un succo di tipo medio ottenuto a partire da frutta della stessa specie. All'allegato V sono indicati i livelli Brix minimi per i succhi di frutta ottenuti da succo concentrato.

Per Nettare di frutta la definizione è la seguente:

“Designa il prodotto fermentescibile ma non fermentato, ottenuto con l'aggiunta di acqua e di zuccheri e/o miele alla purea di frutta o ad un miscuglio di questi prodotti, e che è inoltre conforme a quanto disposto nell'allegato IV. L'aggiunta di zuccheri e/o miele è autorizzata in quantità non superiore al 20 % in peso rispetto al peso totale del prodotto finito. Nella fabbricazione di nettari di frutta senza zuccheri aggiunti o con debole apporto energetico, gli zuccheri sono sostituiti totalmente o parzialmente da edulcoranti, conformemente al disposto della direttiva 94/35/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 30 giugno 1994, sugli edulcoranti destinati ad essere utilizzati nei prodotti alimentari”

Nell'allegato IV della direttiva si stabiliscono il tenore minimo di succo e/o di purea, espresso in percentuale del volume del prodotto finito tipici per ogni singola specie di produzione il valore minimo consentito che varia dal 25 al 55%.

L'etichettatura dei succhi e dei nettari di frutta si deve attenere alle norme generali definite nella direttiva 2000/13/CE relativa ai prodotti alimentari, in cui nello specifico viene evidenziato l'obbligo di indicare la percentuale minima di succo di frutta utilizzato, se ottenuto anche in maniera parziale da concentrato gli additivi utilizzati (Regolamento CE 1333/2008 e successive modifiche) e la etichetta nutrizionale (Regolamento (UE) No 1169/2011).

La direttiva 2012/12/UE ha però introdotto nuovi obblighi tra cui l'indicazione nella denominazione del succo la presenza di altri frutti oltre al principale, ad esempio un succo costituito dal 90% di arancia e dal 10% da succo di mandarino (prassi consueta secondo le pratiche di produzione) dovrà essere denominato succo di arancia e mandarino, se costituito da più frutti si chiamerà "miscela di frutti". Non è più consentita la dicitura "senza zuccheri aggiunti" per i nettari contenenti dolcificanti artificiali è invece prevista la dicitura "contiene naturalmente zuccheri" al fine di evidenziare questo dato importante per i diabetici e per il crescente problema dell'obesità infantile.

CAPITOLO 2
QUADRO ECONOMICO

2.1. Le aspettative e le richieste del consumatore

Nei Paesi avanzati al crescere del reddito disponibile si assiste ad una riduzione della quota destinata all'acquisto di prodotti alimentari, questo in linea con la legge di Engel sull'evoluzione dei prodotti alimentari. La crescita dei consumi alimentari, infatti, non segue quella dei consumi generali, segnando una sostanziale stagnazione negli ultimi 40 anni, ma la sua incidenza è diminuita del 14% nello stesso periodo. D'altro canto è anche vero che un reddito più elevato ha indotto un numero sempre maggiore di consumatori ad indirizzare i propri acquisti alimentari verso prodotti di maggiore qualità, che risultano avere una elasticità della domanda superiore agli altri prodotti alimentari.

Da un recente studio dell'Eurobarometro emerge che le ragioni per cui il consumatore sceglie di comprare prodotti a con un marchio di qualità sono molte, tra cui la volontà di acquistare prodotti di alta qualità, per incoraggiare la diversificazione della produzione agricola, per avere informazioni chiare sulla origine geografica, per motivi etici o di responsabilità sociale (Figura 2.1),

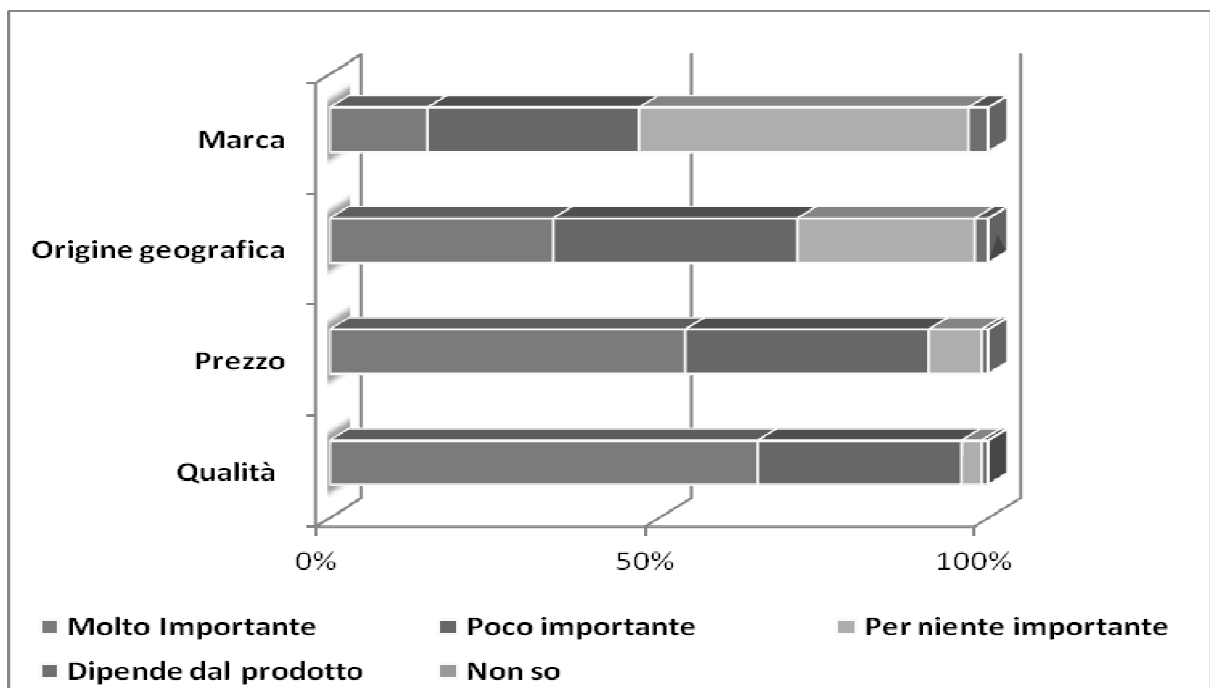


Figura 2.1. Fattori importanti nell'acquisto di cibo per i cittadini UE (Eurobarometro 2013).

e il 70% dei cittadini europei dichiara di prediligere la qualità al prezzo nelle sue scelte alimentari, dato interessante in un momento di forte crisi economica quale quello attuale.

Il 60% degli europei conosce i marchi di qualità, il 14% conosce i marchi di denominazione di origine DOP e IGP mentre un quarto dei cittadini conosce il logo della agricoltura biologica (Figura 2.2)

La conoscenza di questi marchi varia notevolmente tra i vari stati membri. Ad esempio la grande maggioranza dei consumatori Britannici (86%) conosce almeno uno dei marchi, mentre la percentuale si riduce ad un terzo (34%) degli intervistati in Bulgaria e in Polonia (Figura 2.3).

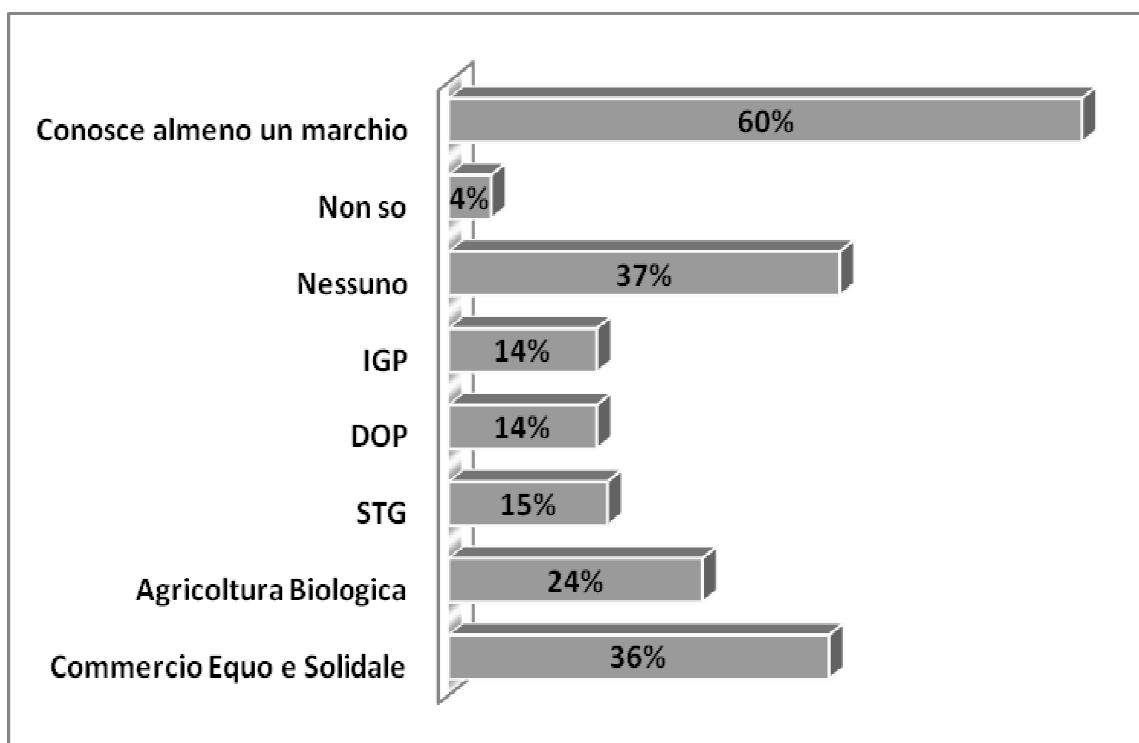


Figura 2.2. Conoscenza dei marchi di qualità alimentare da parte dei cittadini UE (Eurobarometro 2013).

Anche il grado di istruzione gioca un ruolo fondamentale nelle scelte alimentari. Meno della metà (44%) degli intervistati con meno di 15 anni di istruzione conosce uno dei cinque loghi, mentre nella fascia di popolazione con più di 20 anni di istruzione la percentuale cresce al 71%.

Questo divario diventa più evidente nel caso del marchio del biologico, solo il 16% di chi ha meno di 15 anni di istruzione lo conosce contro il 31% di della fascia a più alto livello di scolarizzazione. Interessante invece la assenza di differenze nelle due categorie sociali nel riconoscimento dei marchi DOP, IGP e STG.

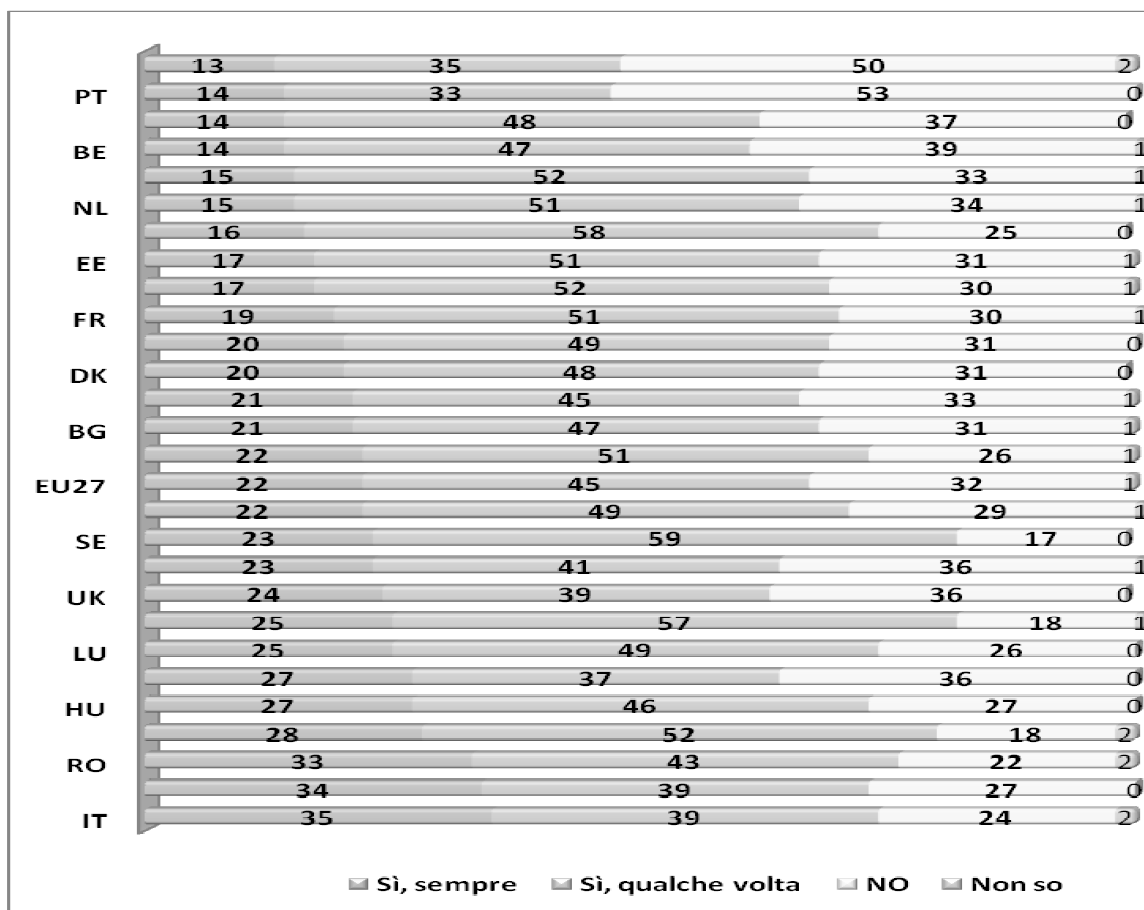


Figura 2.3. Risposte del consumatore europeo alla domanda: “Quando compra un alimento si assicura che il suo marchio di qualità abbia caratteristiche specifiche?” (Eurobarometro, 2013)

2.2. Il Mercato dei prodotti alimentari DOP e IGP

Dai dati evidenziati nelle tabelle 2.1 e 2.2 si può evincere che nel settore dei prodotti con denominazione di origine italiane un numero molto ridotto di prodotti rappresenta una importante quota di mercato. Appena 4 prodotti, Grana Padano, Parmigiano reggiano, Prosciutto di Parma e Prosciutto San Daniele, determinano, infatti, più del

65% del fatturato totale dei prodotti registrati. Ne discende che alcuni comparti presentano un evidente squilibrio tra il numero dei prodotti registrati e i risultati in termini di fatturato (es, ortofrutta e olio di oliva).

Tabella 2.1. Fatturato all'origine (milioni di €)

Comparto	2010	2011	2012	Var % 12/11
Formaggi	3665	4093	4137	0.8
Prodotti a base di carne	1971	1863	1869	0.2
Ortofrutticoli e cereali	345	376	471	25.2
Aceti Balsamici	247	266	165	-0.2
Olio di Oliva	76	83	80	-3.7
Carne fresca	42	55	68	23.1
Altri comparti	2	3	2	-28.7
Totale	6233	6850	6992	2.1

Fonte: Ismea, 2014

Tabella 2.2. Fatturato al consumo sul mercato nazionale (milioni di €)

Comparto	2010	2011	2012	Var % 12/11
Formaggi	4111	4422	4697	6.2
Prodotti a base di carne	3311	3330	3355	0.8
Ortofrutticoli e cereali	484	541	658	21.7
Carne fresca	129	160	181	12.9
Olio di Oliva	65	69	62	-9.4
Aceti balsamici	85	39	39	-1.4
Altri comparti	2	3	2	-37.6
Totale	8186	8565	8995	5.0

Fonte: Ismea, 2014

La domanda che ci si pone è quindi se i marchi di qualità siano ancora un importante strumento di valorizzazione dei propri prodotti se il loro fatturato poi non è così premiale. A riprova di questo si aggiunge infatti l'evidenza dei dati che mostrano come molte registrazioni risultino solo nominali, in quanto al marchio registrato non corrispondono nella realtà prodotti sul mercato, perché non si riesce a rispettare il disciplinare di produzione o perché manca la capacità di promuoverli adeguatamente sul mercato.

Questo rappresenta una occasione mancata per tante produzioni, anche di nicchia, che potrebbero rappresentare il volano per una piccola economia locale magari in sinergia con altre risorse territoriali come l'artigianato e il turismo.

L'incidenza in valore delle DOP e IGP sul totale agricoltura è dello 0.9% e del 5.0% sul totale industria agroalimentare, con più del 30% del valore delle denominazioni di origine che va sui mercati esteri, più del doppio della percentuale dell'export agroalimentare tradizionale (Figura 2.4).

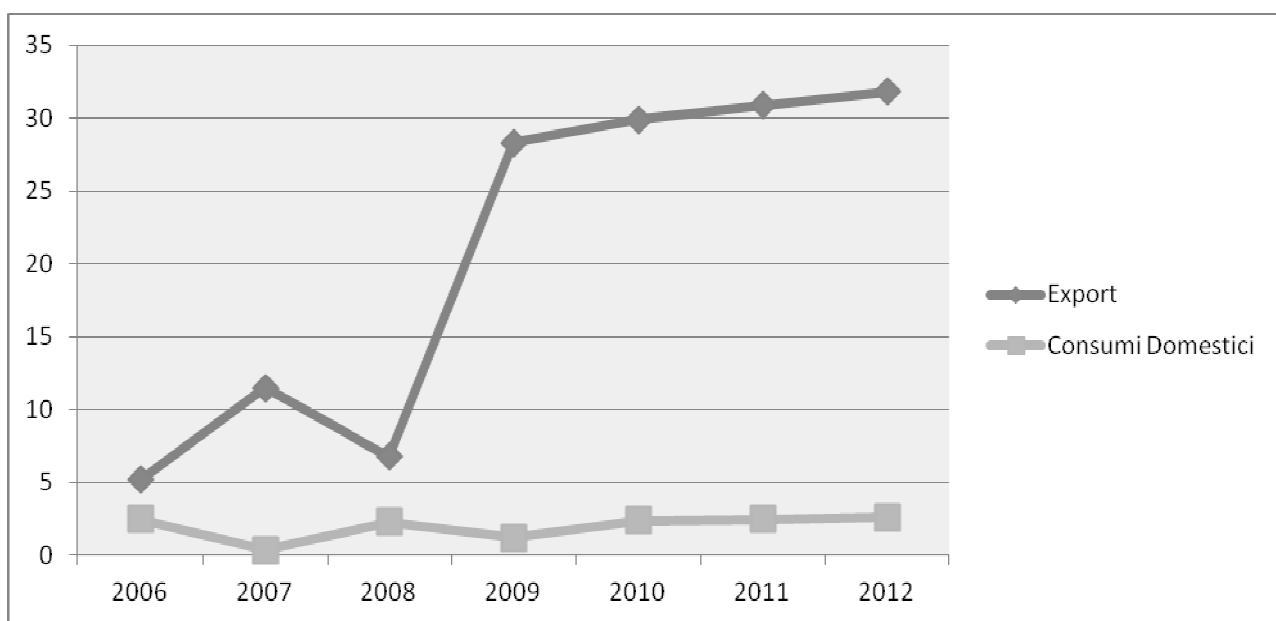


Figura 2.4. Export dei prodotti DOP e IGP in confronto ai consumi nazionali. Fonte: ISMEA, 2014

2.3. Mercato del settore vinicolo DOP e IGP

Secondo i dati ISMEA relativi al 2013, il valore all'origine del vino complessivamente prodotto in Italia è stato di 3,9 miliardi di euro, di cui 2,7 dovuti ai vini DOP e IGP (1,9 miliardi di euro i DOP; 812 milioni gli IGP). Rispetto al 2012, le superfici dedicate alla produzione di vini DOP e IGP sono diminuite di oltre il 7% e si è inoltre registrata una riduzione del 4,5% della produzione potenziale. Il maggior calo si registra per gli IGP, mentre per i DOP la produzione risulta in aumento (+3,3%) per un ammontare complessivo di 12,5 milioni di ettolitri (11,5 milioni l'imbottigliata, +0,8%) con un aumento quindi dei vini valorizzati dalla registrazione con marchio di qualità. La diminuzione dei vini IGP è dovuta prevalentemente alla mancata conversione di molti vini con denominazione IGT a IGP, dopo l'introduzione regolamento 607/2009/CE.

Tabella 2.3. I dati dei primi dieci vini DOP italiani.

	Superfici rivendicate (ha)	Produzione potenziale (hl)	Produzione certificata (hl)	Produzione certificata imbottigliata (hl)
Totale comparto vini DOP	217.731	15.088.456	12.522.058	11.569.718
di cui:				
Prosecco	15.542	1.799.732	1.822.197	1.810.654
Montepulciano d'Abruzzo	9.328	832.212	895.522	650.301
Asti e Moscato D'Asti	9.484	716.792	744.084	745.524
Chianti	14.183	676.504	772.747	760.650
Sicilia	11.964	618.402	161.266	120.250
Conegliano Valdobbiadene	6.259	570.758	545.883	544.408
Prosecco				
Soave	5.641	530.043	424.671	357.798
Trentino	6.685	520.413	290.070	255.973
Valpolicella	7.062	353.616	153.847	148.844
Romagna	4.694	299.020	130.538	114.527

Fonte: ISMEA, 2014

Come si è evidenziato nei prodotti alimentari, anche nel comparto vinicolo più del 45% della produzione DOP si concentra nelle prime 10 denominazioni (tabella 2.3). I vini DOP che nel corso del 2013 hanno fatto registrare i migliori risultati sul mercato sono il Prosecco e il Montepulciano d'Abruzzo, seguiti da l'Asti e il Conegliano Valdobbiadene Prosecco. Le regioni che vantano il maggior numero di vini DOP sono in ordine, Piemonte, Toscana, Veneto, Puglia e Lazio che coprono più del 60% della produzione (Figura 2.5)

Ugualmente, tra le IGP, le prime dieci denominazioni rappresentano il 75% della produzione potenziale; con Veneto, Emilia Romagna, Sicilia, Puglia e Toscana che coprono circa l'80% della stessa.(ISMEA, 2014).

Il settore vino nel suo complesso nel 2013 ha fatto segnare un +15% su base annua, ottenuto da un +17% dei vini comuni e IGT e da un +11% dei vini a denominazione. Questo trend al rialzo dei prezzi ha seguito quanto rilevato nell'anno precedente dove l'aumento dei prezzi era stato del 33% (14% dei vini a denominazione)

Sotto il profilo della distribuzione per aree geografiche, nel Nord Italia si concentra oltre il 41% delle denominazioni; seguono il Sud (21%), il Centro (25%) e le Isole (12%).

Rispetto all'anno precedente gli acquisti di vini a denominazione sono scesi del 5%, a fronte però di un aumento della relativa spesa (+4%), evidenziando quindi l'aumento del valore unitario medio, che rimane comunque molto basso (2.60 euro al litro), che al netto dei costi di imbottigliamento lascia veramente ben poco al valore del vino stesso.

I volumi dell'export sono scesi del 4%, pur restando in termini assoluti sopra i 20 milioni di ettolitri, che rappresenta quasi la metà della produzione nazionale. In termini di fatturato con 5 miliardi di euro il comparto del vino di qualità rappresenta il 15% del totale export agroalimentare italiano in valore, ed è quindi la voce più importante della bilancia agroalimentare nazionale.

Per i dati sull' export si può notare una grande differenza tra i DOP (4.7 milioni di hl) e gli IGP (5.5 milioni di hl), anche se i primi hanno maggiori potenzialità di produzione, si evidenzia l'apprezzamento degli IGP italiani all'estero, probabilmente per il loro costo al dettaglio inferiore. La Germania è il primo paese importatore di vino in termini di volumi, mentre Cina e Russia si stanno rivelando mercati in forte espansione anche per questo settore.

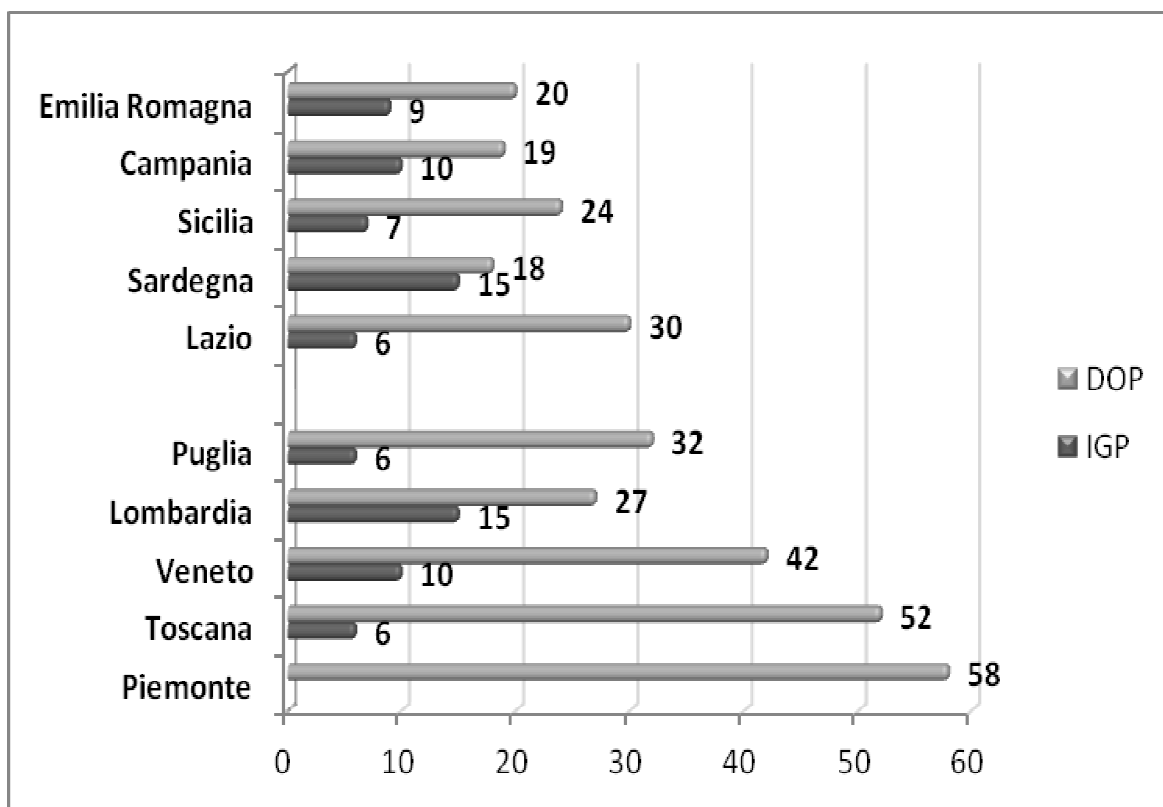


Figura 2.5. Distribuzione dei vini DOP e IGP in ITALIA Fonte: ISMEA su dati MIPAF, 2014

Per quanto riguarda la produzione imbottigliata di vini DOP, nel 2013 è cresciuta di circa l'1% sfiorando gli 11,6 milioni di ettolitri con un incidenza delle prime dieci produzioni maggiore del 50% .

2.4. Mercato dei prodotti da agricoltura biologica

L'agricoltura biologica rappresenta un tipo di produzione agricola che rispetta le regole di sostenibilità ambientale, ed ha conquistato nel tempo la preferenza di un consumatore attento alle proprietà nutrizionali e ai requisiti di sicurezza alimentare, e al contempo sensibile alle tematiche della protezione dell'ambiente e del benessere degli animali da allevamento.

Questi valori sono alla base delle scelte di acquisto di una fetta sempre più ampia della popolazione dei Paesi avanzati che privilegia il prodotto a marchio Bio ed è disposto anche a pagare un prezzo superiore rispetto a quelli da agricoltura convenzionale (Halberg, 2012).

Il continuo incremento nella produzione e nel consumo di alimenti da agricoltura biologica è una realtà del mercato mondiale già da qualche anno, e anche questo periodo di crisi mondiale non ne ha rallentato la crescita.

Globalmente, si stima che lo 0,9% delle superfici agricole mondiali sia destinato ad agricoltura biologica, ma un terzo di esse e più dell'80% degli agricoltori impiegati si trova nei Paesi in via di sviluppo, mentre è nei paesi industrializzati che il mercato dei prodotti biologici si è più concentrato con Nord America ed Europa che totalizzano il 96% della domanda.

Le vendite di questi prodotti in USA hanno superato il 4% delle vendite di alimenti (USDA, 2012), ed in Europa il mercato dei prodotti biologici è valutato in 22.7 bilioni di euro (IFOAM, 2014), con Germania e Francia i Paesi con il giro di affari maggiore, quarta l'Italia (Figura 2.6).

Come mostrato nella figura 2.7 la percentuale di terreno dedicato all'agricoltura biologica nella UE 27 è passato dal 3,1% al 5,6% nel 2013, con la percentuale dei Paesi UE N12 che è triplicata. L'Austria è il Paese con la percentuale di superficie agricola coltivata biologicamente maggiore (19%) seguita da Svezia (16%) Estonia (15%) e Italia con oltre il 12 %.

Il numero di aziende di agricoltura biologica è cresciuto di pari passo con l'area agricola ad essa dedicata, in EU 27 sono attive più di 190.000 aziende (circa il 2% di tutte le aziende agricole), le aziende italiane sono le più numerose con 45.000 unità.

Le aziende a vocazione biologica hanno di solito una superficie superiore alla media, solo il 5% di esse ha una estensione minore di 2 ettari contro invece il 50 % delle aziende agricole convenzionali.

Il 60% delle terre coltivate con metodo biologico nella UE sono prevalentemente destinate alla produzione di foraggio, il 15 % sono destinate alla produzione di cereali, per i quali questo metododi coltivazione è quello in grado di ridurre maggiormente i costi e di sfruttare al meglio gli aiuti comunitari. Le culture permanenti rappresentano invece il 13% del totale e tra queste la coltivazione di olive è la più importante come si evidenzia nel grafico 2.8, mentre il dato di incremento maggiore si registra per la viticoltura da vino.

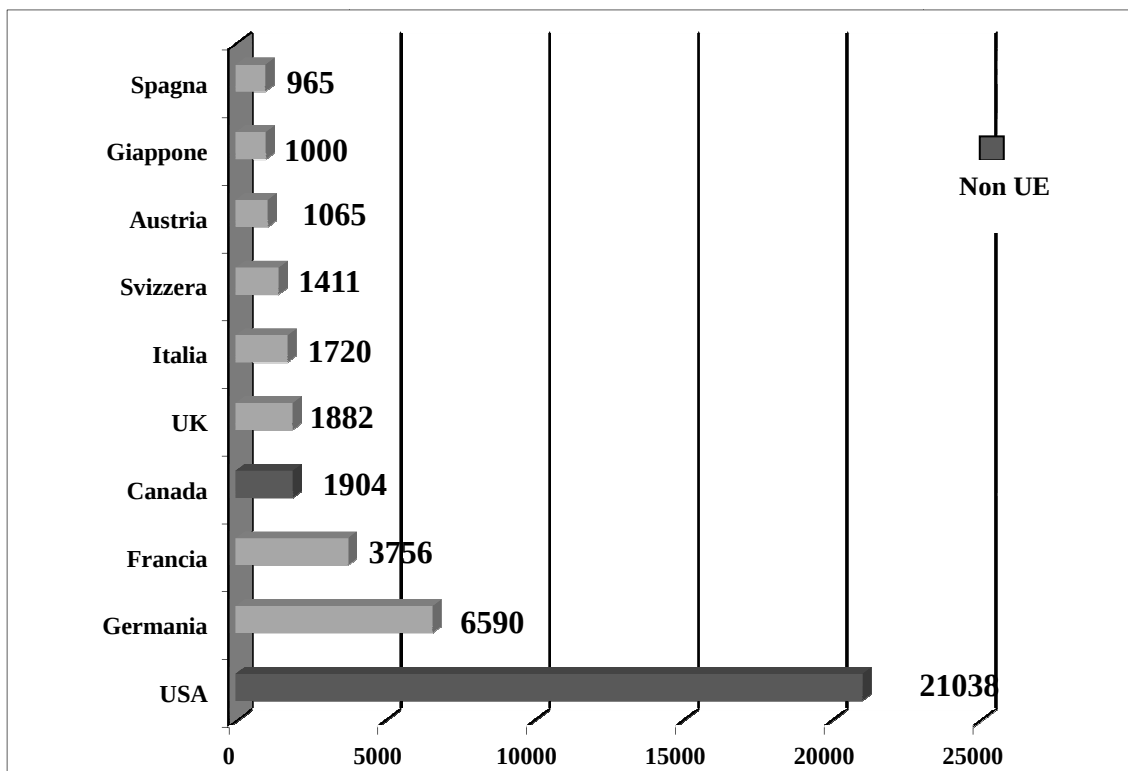


Figura 2.6. Le prime dieci nazioni per fatturato in prodotti agricoltura biologica (in milioni di euro) (ISMEA, 2014)

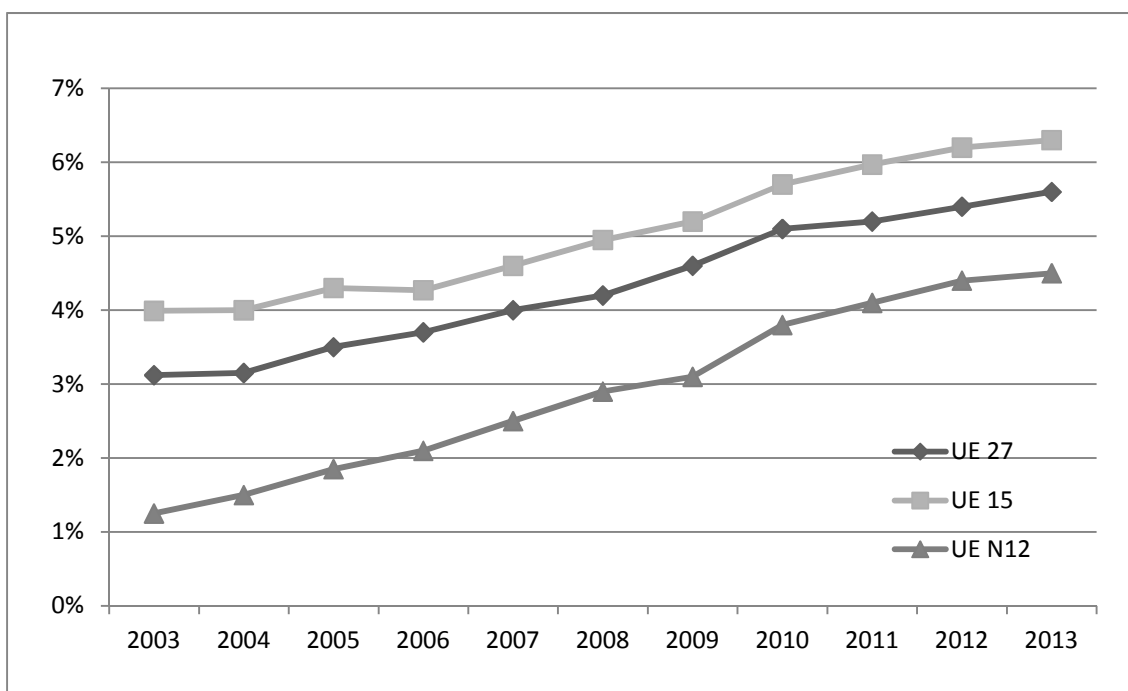


Figura 2.7. Evoluzione della percentuale di terreno agricolo coltivata in maniera biologica in UE (Commissione Europea, 2014).

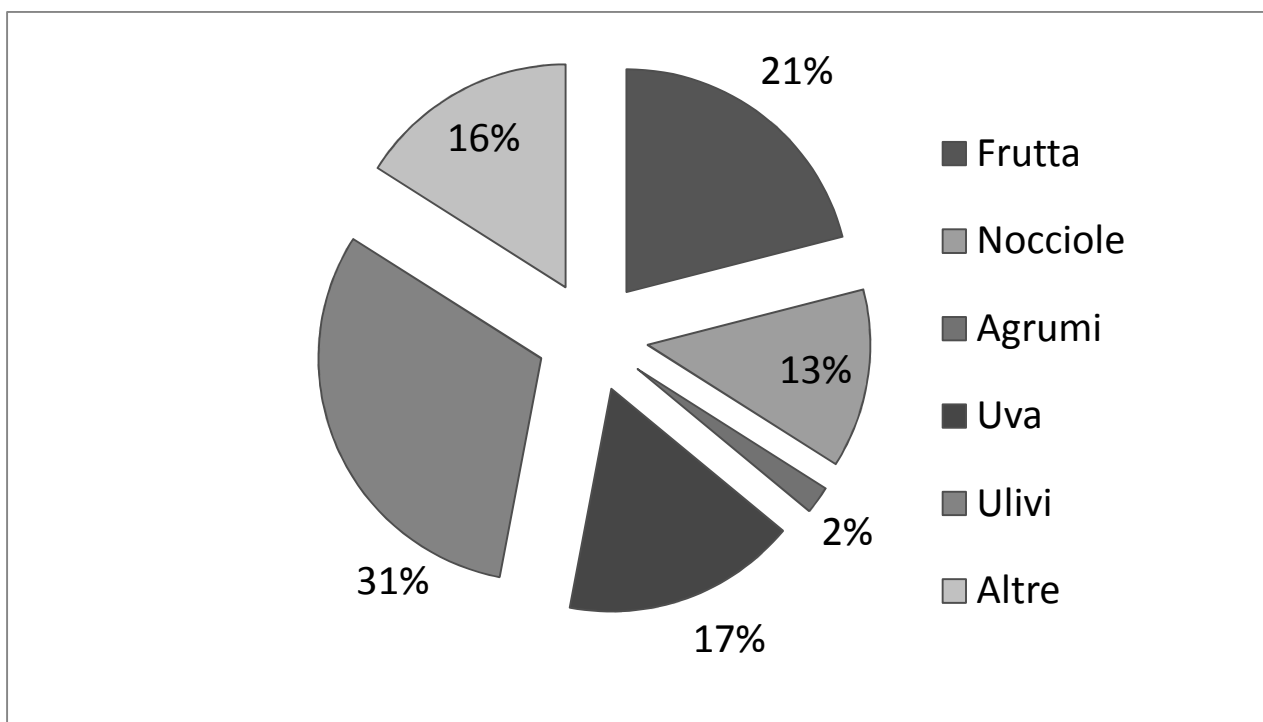


Figura 2.8. Percentuali delle culture permanenti biologiche in UE (Commissione europea, 2014)

La grande produzione di foraggio biologico è destinata alla produzione di animali allevati con metodo biologico. Gli allevamenti a vocazione biologica rappresentano 1% del totale in UE e sono in prevalenza bovini (3% del totale) e di ovini (2,8%) seguono gli avicoli (1%) e i suini (0,4%).

Nel 2013 nella UE sono stati stimati quasi 3 milioni di bovini certificati come biologici, distribuiti prevalentemente in Austria, Francia e Gran Bretagna, che rappresentano il 3% di tutti i capi presenti in UE 27 (Commissione Europea, 2014).

Le vacche da latte certificate come biologiche sono quasi 1 milione nel 2013, e sono circa il 3% di tutte le vacche da latte in UE. Nella UE 15 il biologico rappresenta quasi il 4% di tutto il settore mucche da latte mentre nella UE 12 la percentuale scende a poco più del 1%. L'Austria è il leader per quanto riguarda la quota di allevamenti biologici di mucche da latte con il 20% sul totale, seguita da Svezia (14%) e Danimarca (11,2%) (Figura 2.9.)

Nel 2012 il giro d'affari dei prodotti biologici nell'Unione Europea è stato di 21,8 miliardi di euro (fonte: BÖLW - Bund Ökologische Lebensmittelwirtschaft, 2014).

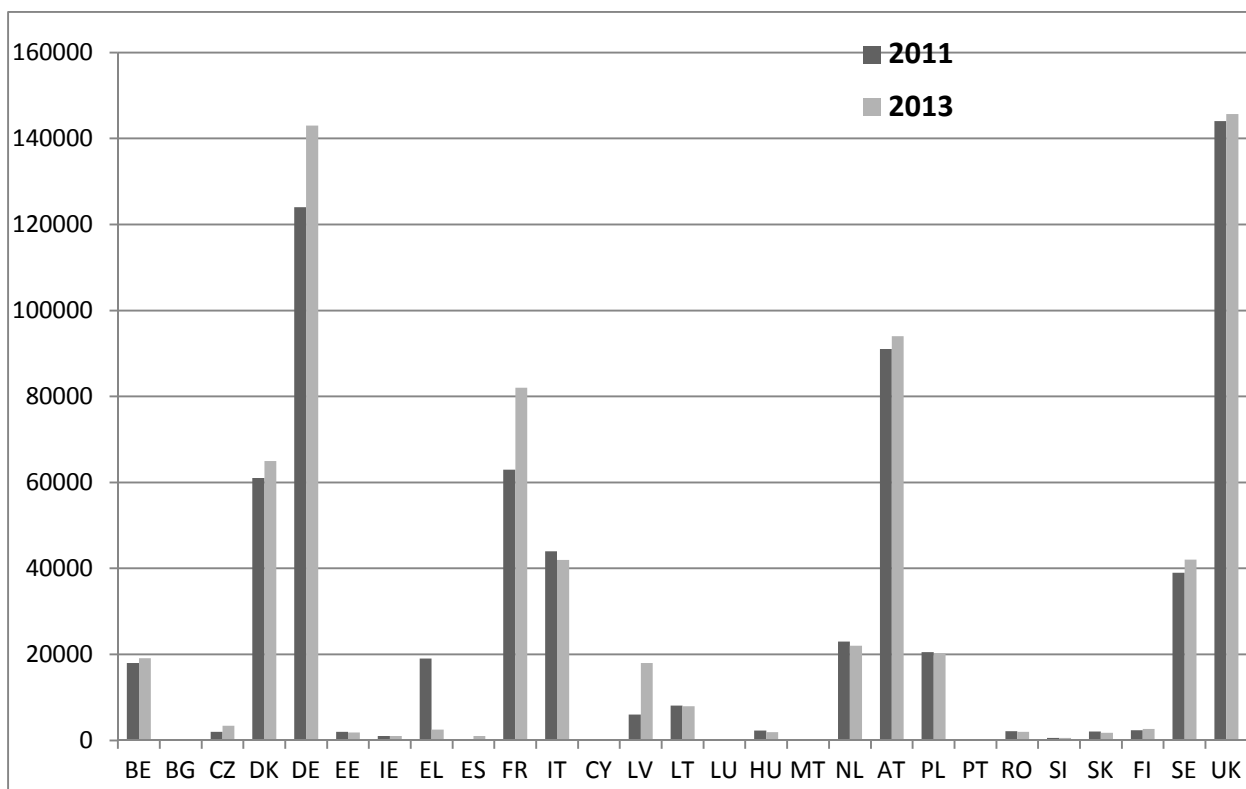


Figura 2.9. numero delle mucche da latte certificate negli stati membri UE nel 2011 e 2013
(Eurostat, 2014)

In Italia il valore delle vendite di alimenti biologici ha superato i 2 miliardi di euro (+ 7% rispetto al 2011), quarto mercato per valore dei consumi di alimenti bio all'interno dell'UE. L'Italia è però il primo esportatore mondiale di prodotti biologici, con circa un terzo del fatturato totale (3 miliardi di euro) di questo settore generato dall'export.

2.4.1. Situazione in Italia

Dai dati del Sistema d'Informazione Nazionale sull'Agricoltura Biologica (SINAB) del 2014 in Italia sono 1.317.177 gli ettari di superficie coltivata secondo il metodo biologico al 31/12/2013 (dati SINAB, 2014), con un aumento complessivo, rispetto all'anno precedente, del 12,8%. Anche gli operatori del settore sono in aumento del 5,4%.

I principali orientamenti produttivi sono i pascoli, il foraggio e i cereali, segue, per estensione, la superficie investita ad olivicoltura.

Le regioni che maggiormente investono in questo tipo di agricoltura sono la Sicilia con quasi 10.000 addetti, la Calabria (7.200) e la Puglia (6.200).

Per le produzioni animali, distinte sulla base delle principali specie allevate, i dati evidenziano rispetto al 2012 un aumento consistente, in particolare per gli equini (+38,7% del numero di capi, che tuttavia registrano in termini assoluti valori naturalmente contenuti) e per la categoria “altri animali” (+31,4% del numero di capi), nella quale rientrano ad esempio i conigli. Gli animali maggiormente allevati biologicamente sono il pollame seguito dagli ovini e dai bovini.

I consumi di prodotti agroalimentari biologici nel nostro Paese mostrano un andamento in continua ascesa, nonostante il periodo di crisi economica che ha investito sensibilmente i consumi nel comparto convenzionale. Per rendersi conto di questo basta guardare i dati dei primi 5 mesi del 2014 dove il bio è cresciuto del 17.3 % contro una diminuzione del convenzionale del 1,4%. (figura 2.10).

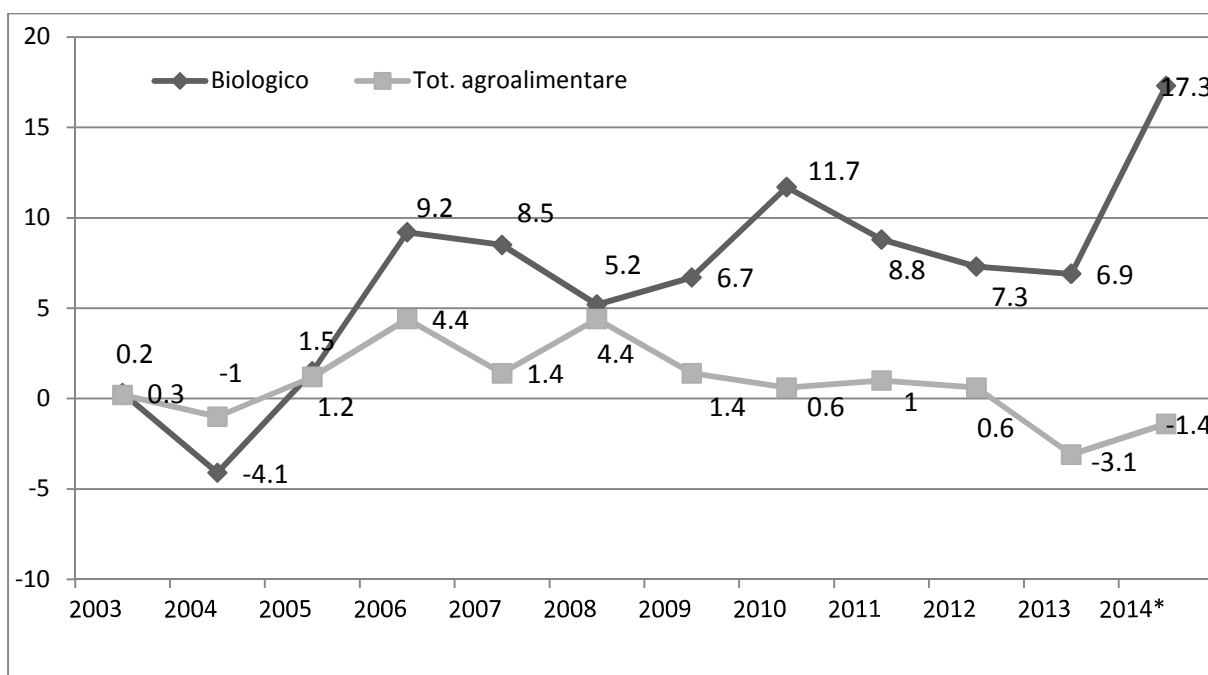


Figura 2.10. Variazione percentuale dei consumi di prodotti biologici e convenzionali dal 2003 al maggio 2014 nelle GDO italiane (fonte Ismea, 2014)

Gli alimenti bio che hanno fatto registrare i risultati migliori rispetto al 2012 sono gli ortofrutticoli freschi, i biscotti e gli snack (in media più 13%), segno della prevalenza dei prodotti industriali rispetto a quelli strettamente agricoli.

Le uova risultano il prodotto bio più acquistato rappresentando il 9,5% del totale della spesa del bio confezionato, con un 5,2% in più rispetto al 2013. Tale aumento è dovuto ad una crescita della spesa media per famiglia, mentre è in calo il numero delle famiglie acquirenti.

Le dinamiche della spesa del latte alimentare, terzo prodotto bio dopo i sostituti del pane per acquisti in valore con un peso sul totale bio del 7,3%, sono risultate altrettanto positive (+16,3%), grazie ad un incremento della spesa media per famiglia.

Nel 2013 6 famiglie italiane su 10 hanno acquistato almeno una volta un prodotto biologico, ossia poco meno di 15 milioni di nuclei familiari.

Negli ultimi due anni, oltre 2 milioni di nuclei familiari in più hanno acquistato bio in almeno una occasione, e la spesa pro capite per prodotti bio è aumentata dai 28 euro nel 2011 ai 39 euro del 2013. Il bio incide sul totale della spesa alimentare degli italiani per circa il 2%, percentuale che solo 10 anni fa raggiungeva solo qualche centesimo di punto.

2.5. Mercato dei succhi di frutta

Nei paesi avanzati la richiesta di alimenti associati a proprietà benefiche per la salute si è riflessa positivamente sul consumo di succhi e nettari di frutta, specialmente in quei paesi dove il reperimento di frutta fresca è difficile o troppo oneroso.

Dal rapporto annuale della Associazione Europea dei Produttori di Succhi di Frutta (AIJN) del 2014, il consumo di succhi e nettari di frutta nell'UE è stato pari a poco più di 10 miliardi di litri nel 2013. I succhi al 100% rappresentano il 65 % del mercato totale (tabella 2.4). Il consumo Europeo rappresenta il 25% di tutto il consumo mondiale in valore nel 2013, superato solo da quello del Nord America (34%).

Il 70% di tutto il mercato Europeo è rappresentato da soli 5 paesi. La Germania è il primo consumatore europeo per volumi, solo quinta l'Italia (tabella 2.5). Per consumo pro capite, sempre primi i Tedeschi seguiti da Finlandesi e Austriaci.

Anche nel 2013 è proseguita la flessione del mercato già evidenziata nei 5 anni precedenti, con una diminuzione nei volumi del 4.2%, più evidente nei succhi di frutta che nei nettari, probabilmente per il prezzo minore di questi ultimi.

L'andamento di questo settore segue la contrazione di tutto il mercato dei prodotti alimentari e le previsioni inducono a pensare che il declino continuerà fino al 2019.

Tabella 2.4. Volumi di succo consumati in UE (fonte AIJN, 2014)

Succo di frutta (100% succo) In volume (milioni di litri)	2009	2010	2011	2012	2013	Variazione %09/13
Totale	7320	7191	7018	6780	6470	-4.6%
Di cui da concentrato	5670	5590	5302	5008	4668	-6,8%
Nettari (25-99% di contenuto di frutta)	4042	3924	3791	3678	3547	-3,6%
Totale	11272	11116	10809	10469	10017	-4.2%

Tabella 2.5. Le nazioni con consumi maggiori in volume nel 2013 (AIJN, 2014)

Nazione	Consumo (milioni di litri)	Litri per persona
Germania	2486	30.7
Francia	1620	24.6
Regno Unito	1277	20.11
Spagna	985	20.99
Italia	726	11.71
Austria	213	25.0
Finlandia	153	28.3

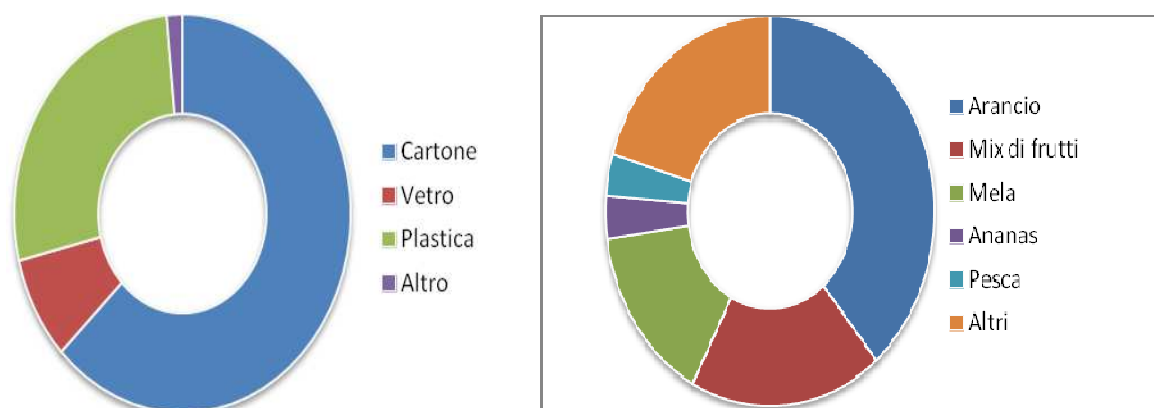


Figura 2.11 Consumi di succhi e nettari di frutta in UE per tipo di frutto (a destra) e per tipo di imballaggio (a sinistra) (AIJN, 2014)

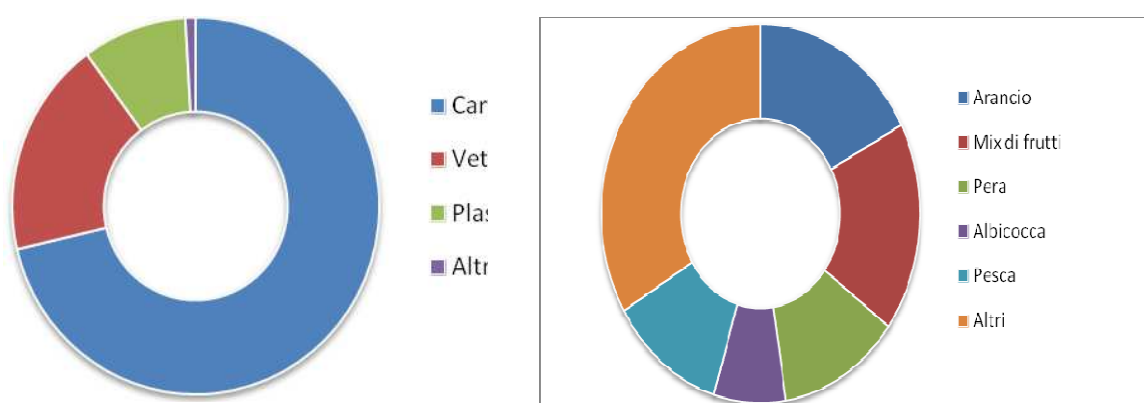


Figura 2.12. Consumo di succhi e nettari di frutta per tipo di frutto (a destra) e di imballaggio (a sinistra) in Italia (AIJN, 2014)

Il succo di frutta più apprezzato è il succo di arancia (Figura 2.11), seguito da quello di frutti misti, e da quello di mela, molto diffuso in Paesi come Austria, Polonia e Germania, mentre gli Spagnoli sono consumatori di succo di ananas e pesca.. Il tipo di confezionamento più apprezzato dagli europei è quello in tetra-pak seguito da quello in PET (Figura 2.12)

Per quanto riguarda il mercato Italiano, esso è il quinto in Europa con 726 milioni di litri di succo consumati Più del 71% degli Italiani acquista questi prodotti in confezione tetra-pak e il tipo di frutto preferito è l'arancio (Figura 2.12) , seguito da frutti misti, pera ed albicocca.

L'Italia risulta essere molto importante come Paese produttore delle materie prime dei succhi e nettari di frutta, essendo il primo produttore in Europa di pere, pesche, albicocche e uva da tavola e il secondo di arance, limoni, mele e prugne, totalizzando il 30% di tutta la produzione di frutta Europea seguita dalla Spagna con il 23%.

Emergente in questo settore è la ricerca di nuove formulazioni con diversi tipi di frutta, con l'aggiunta di latte o yogurt (gli smoothies) e l'attenzione per marchi a garanzia di origine e provenienza (agricoltura biologica, commercio equo e solidale) o atti ad enfatizzare le caratteristiche di alimenti ricchi di proprietà benefiche per la salute di queste bevande.

CAPITOLO 3
**METODOLOGIE PER LA VERIFICA
DELLA AUTENTICITÀ**

La verifica della autenticità è importante nel controllo della qualità e della sicurezza degli alimenti, oltre che un punto imprescindibile per la tutela del consumatore, specialmente nel caso di alimenti processati o di origine animale dove la possibilità di distinguere tra i vari ingredienti o modalità di produzione è più difficile.

L'autenticità è un criterio di qualità per alimenti e ingredienti alimentari, ed è richiesto sempre più universalmente, come risultato di tutela legislativa per gli alimenti a denominazione garantita o ottenuti con produzioni certificate (Gonzalvez et al, 2009). L'autenticazione di un alimento può coprire molti diversi aspetti, compresa una etichettatura falsa, affermazioni ingannevoli circa l'origine e vari tipi di frodi alimentari (Drivelos e Georgiou, 2012).



Figura 3.1. Diagramma di flusso che illustra i vari tipi di adulterazione.

Ci sono diversi tipi di frodi alimentari, la prima distinzione si può fare tra frodi commerciali e sanitarie, le prime non causano un danno reale alla salute pubblica e sono finalizzate solo alla produzione di profitti illeciti a danno del consumatore. Possiamo ulteriormente dividere le frodi in quattro classi:

Sofisticazione: E' un'operazione che consiste nell'aggiungere sostanze estranee, o sostituire uno o più elementi di qualità e valore inferiore all'alimento, alterando la

composizione naturale e simulandone la genuinità con lo scopo di migliorarne l'aspetto o di coprirne difetti

Adulterazione: Comprende tutte le operazioni che alterano la struttura originale di un alimento mediante sostituzione di elementi propri dell'alimento con altri estranei, ovvero con la sottrazione di elementi propri dell'alimento, o ancora, con l'aumento della quantità proporzionale di uno o più dei suoi componenti al fine di ottenere un tornaconto economico.

Contraffazione: Consiste nel formare ex novo un alimento con l'apparenza della genuinità in quanto prodotto, in tutto o in parte, con sostanze diverse, per qualità o quantità, da quelle che normalmente concorrono a formarlo.

Alterazione: Modifiche dello stato chimico-fisico di un alimento a seguito di fenomeni degenerativi spontanei, determinati da errate modalità o eccessivo prolungamento dei tempi di conservazione.

Le frodi sono quindi molteplici e sempre più sofisticate, alcuni esempi sono descritti in tabella 3.1.

3.1 Le frodi a scopo di lucro

Una contaminazione può avvenire in maniera accidentale o involontaria specialmente quando i contadini o i produttori non sono consapevoli che una serie di comportamenti che hanno messo in atto potrebbero portare alla contaminazione degli alimenti. Invece, quando il cibo viene intenzionalmente adulterato, entrano in campo motivazioni criminali di carattere economico.

Pratiche di contaminazione deliberata di alimenti e farmaci sono ampiamente diffuse e possono anche sfuggire i controlli in mercati poco regolamentati, in cui la sorveglianza è minima. Ad esempio, in Cina ci sono oltre 500.000 imprese di trasformazione alimentare e i sottili margini di profitto hanno spinto alcuni proprietari a tagliare i costi sostituendo cibo con ingredienti meno costosi (Zach et al., 2012). Le sostituzioni possono includere la diluizione del latte artificiale per neonati (Xiu e Klein, 2010), con dietilene glicole come sostituto glicerina (US FDA, 2008), o l'utilizzo illegale di coloranti rossi in uova di anatra (Du e Sun, 2007) e ri-etichettatura di prodotti ittici (D'Amico et al., 2014). Se la contaminazione deliberata è motivata dal lucro, le pratiche, se non scoperte, sono suscettibili ad essere ripetute (Manning e Soon, 2014).

Grazie al loro elevato valore di mercato, i prodotti a base di carne sono spesso bersagli per la sostituzione di specie e sofisticazioni (Cawthorn et al., 2013). Da studi effettuati in Sudafrica per i prodotti a base di carne trasformati ($n = 139$), è stato identificato che il 68% dei campioni conteneva specie non sono state dichiarate sull'etichetta del prodotto, con l'incidenza più alta in salsicce, polpette di hamburger e salumi, in alimenti trasformati, piuttosto che nella carne fresca. Soia e glutine sono state identificate come proteine vegetali non dichiarate in un gran numero di campioni (28%), mentre maiale (37%) e pollo (23%) erano le specie animali non dichiarate più comunemente rilevate.

Cawthorn et al. (2013) hanno anche riportato la presenza di carne di specie non convenzionali come asino, capra e bufalo in sostituzione alle carni dichiarate in etichetta. A fine del loro lavoro, gli autori concludono che la falsa etichettatura delle carni trasformate è comune in Sud Africa, e questo non solo viola le norme sulla etichettatura, ma pone anche problemi di carattere economico, religioso, etico e di impatto sulla salute.

Ogni tipo di frodi alimentari genera diversi potenziali livelli di guadagni monetari e il grado di guadagno dipende da quanto sofisticata è la truffa e se questa viene smascherata. Ad esempio, quando il caviale di storione bianco è sostituito con caviale Beluga, i consumatori pagano cinque volte più del dovuto per il prodotto (Cohen, 1997). Everstine et al. (2013) sostengono che le adulterazioni a scopo di lucro rivelano vuoti nelle metodologie di verifica a garanzia della qualità che possono essere sfruttati per produrre danno intenzionale. Infatti le lacune nei programmi o nelle interfacce tra i diversi sistemi di certificazione della tracciabilità, della garanzia di qualità saranno prontamente sfruttati nel momento in cui si verificano da persone senza scrupoli per ottenere benefici economici.

La proliferazione di nuovi adulteranti dimostra che qualsiasi approccio di controllo 'screening-based' deve essere veramente ad ampia portata e diversificato per raggiungere il suo obiettivo. I test di verifica dei prodotti possono essere costosi e introdurre ritardi, in particolare in sede di ispezione frontaliere, in una catena di approvvigionamento alimentare sempre molto sensibile sia al prezzo finale, sia alla velocità di gestione al fine di ridurre al minimo costi legati alla conservazione delle scorte.

In alcuni casi di frodi alimentari solo i truffatori sanno come il cibo è stato manipolato e in quale misura la sostituzione è un problema di etichettatura o di sicurezza alimentare e di come sia stato introdotto nella catena alimentare

Tabella 3.1 Esempi di frodi alimentari

Tipo di frode	Esempio
Sostituzione di un ingrediente con uno simile ma meno costoso	Uso del succo di mela invece che di melograno Sostituire le sarde al posto del tonno
Adulterazione con ingredienti più economici	Miscelare latte di mucca a quello di bufala nella produzione della mozzarella di bufala Aggiunta di acqua, zuccheri, acidi e coloranti ai succhi di frutta Aggiunta di oli vegetali più economici a quelli di alto valore
Ingredienti non dichiarati	Carne di cavallo o asino nel salame Aggiunta di fecola o di farina di patate o di amidi ai formaggi per aumentare il peso del prodotto
Adulterazioni per aumentare il valore	Aggiunta di glicerolo al vino per aumentare il corpo Aggiunta di succo di mandarino al succo di arancia per migliorare il colore Aggiunta di metanolo a vini di bassa gradazione per aumentarla Clorofilla e carotene aggiunti all'olio di semi per renderlo simile all'Olio di oliva
Omissione o false dichiarazioni di trattamenti	Non dichiarare che un succo è stato preparato da concentrato Dichiarare un prodotto come fresco invece è stato precedentemente congelato Latte inacidito neutralizzato con l'aggiunta di soda Aggiunta di acqua ossigenata al latte per ridurre la carica batterica Carni trattate con additivi per mascherare uno stato di alterazione o con sostanze coloranti non autorizzate
False dichiarazioni di origine geografica o di produzione	Pesce da acquacultura venduto come selvaggio Prodotti da agricoltura convenzionale etichettati come biologici Etichettare con la provenienza da una determinata regione geografica diversa dalla reale.

. Tuttavia, i truffatori possono non avere né l'interesse né le conoscenze, l'esperienza, o le risorse per determinare se la sostituzione o la manipolazione attuata ponga alcun rischio acuto o cronico per i consumatori. Quindi, i rischi per la salute pubblica a causa

di un cibo adulterato sono spesso sconosciute fino a quando è troppo tardi (Moore et al., 2012).

Spink e Moyer (2011) hanno anche evidenziato come i rischi per la salute pubblica da cibo adulterato sono più pericolosi rispetto alle minacce tradizionali alla sicurezza alimentare, perché i contaminanti sono spesso non convenzionali. Ci sono una serie non esaustiva di potenziali contaminanti usati a scopo di lucro ed è richiesto un alto grado di conoscenza o perizia per adeguatamente quantificare il loro livello di rischio. Ed è proprio la mancanza di conoscenza della loro esistenza e della loro pericolosità, accanto al beneficio economico, che fa di alcuni adulteranti la prima scelta per i truffatori.

L'uso dei test analitici non specifici nei test di routine è uno dei fattori di rischio per l'incidenza di delle adulterazioni (Everstine et al., 2013). La vasta gamma di sostanze che possono essere utilizzati nelle frodi alimentari, accoppiata con l'impossibilità di analizzarle tutte, rende i tests convenzionali non adatti per tutte le tipologie di frode alimentare.

Ad esemplificazione di questo concetto, si può portare un esempio. La adulterazione del latte con la melamina si è potuta verificare perché il metodo analitico utilizzato per determinare il contenuto proteico era non-specifico. Infatti il metodo Kjealdahl o il metodo Dumas misurano il tenore di proteine in base al contenuto di azoto totale e non distinguono tra azoto proteico o non proteico (Moore et al., 2010). Come risultato di questo, persone senza scrupoli hanno approfittato della loro conoscenza in chimica degli alimenti per migliorare il livello del contenuto proteico del latte con una pratica fraudolenta, sapendo che i test erano non specifici.

Negli Stati Uniti la Pharmacopeia (2012) sostiene un approccio proattivo in cui ingredienti alimentari sono verificati per l'autenticità, piuttosto che per l'assenza di adulteranti specifici (Moore et al., 2012). Moore et al. (2012) hanno esaminato e raccolto oltre 1000 dati su frodi alimentari e metodi analitici pubblicati nella USP Fraud Food Database nel 2012. La banca dati è utile per individuare le tendenze e gli sviluppi in questo campo e per fornire alle parti interessate le informazioni sui metodi di rilevazione delle frodi alimentari.

Secondo Primrose et al. (2010), la descrizione dei prodotti alimentari in termini di composizione totale, trasformazione od origine è impegnativo, ma ci sono una serie di

tecniche che hanno avuto successo nel verificare l'autenticità di un alimento. Questo include l'analisi degli isotopi stabili, genomica e proteomica.

La ricerca scientifica sullo sviluppo di metodi per la analisi della autenticità si è sviluppata nella direzione della verifica della conformità del prodotto con le norme alimentari e la legislazione sulla etichettatura e al fine di individuare frodi alimentari.

I metodi analitici sono stati quindi progettati per verificare i requisiti di legge in materia di denominazioni degli alimenti, il tipo e la quantità di ingredienti dichiarati, il tipo di trasformazione o di trattamento dei prodotti alimentari, i marchi di provenienza geografica.

Metodi	Costi di preparazione campione	Velocità	Costi di acquisto ed esercizio	Percentuale di successo
NMR				
IRMS				
GC/MS, LC/MS				
Spettroscopia infrarosso (NR, IR, Raman)				
Analisi elementare (CP/MS, AAS, ICP)				

Fig. 3.2. Limiti e vantaggi delle varie tecniche analitiche impiegate per la verifica della autenticità in campo agroalimentare. Rosso: Valore negativo, Verde: valore positivo.

Le difficoltà maggiormente riscontrate nello sviluppo di metodi per la verifica delle frodi alimentari sono da attribuire alla grande variabilità delle matrici considerate e alla incertezza dei metodi analitici, quindi quando si stabilisce un limite o degli standard nelle norme tecniche a cui fanno riferimento gli organi di controllo questi fattori devono essere sempre presi in considerazione.

Un'altra grande difficoltà è l'individuazione di marker specifici dell'alimento o dell'ingrediente oggetto della verifica e del problema in esame (adulterazione, origine geografica, metodo di produzione).

Gli sforzi dei vari laboratori nel mondo hanno però prodotto vari metodi affidabili, alcuni dei quali sono stati poi convertiti in procedure standard.

Il terzo, ma non meno importante, è la disponibilità di campioni certificati autentici, da usare come riferimento nello sviluppo del metodo (Primrose et al., 2010).

Le strategie utilizzate per rilevare sofisticazioni hanno fatto affidamento su varie tecniche strumentali e si sono evoluti attraverso il tempo e l'avanzamento della tecnologia, tra le tecniche più impiegate si elencano:

Cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC), gas-cromatografia (GC), risonanza magnetica nucleare (NMR), spettroscopia infrarossa (IR), spettroscopia a fluorescenza, elettroforesi capillare (CE), spettrometria di massa di reazione di trasferimento protonico (PTR-MS), naso elettronico accoppiato con MS, le tecnologie del DNA e l'analisi sensoriale se la spettrometria di massa a rapporto isotopico (IRMS). Le varie tecniche hanno rivelato ciascuna i propri vantaggi e limiti nella determinazione della autenticità dei prodotti alimentari, i principali sono schematizzati nella figura 3.2.

In questo capitolo verranno trattate in maniera estesa solo le tecniche che riguardano specificamente le matrici alimentari oggetto delle applicazioni sperimentali successivamente descritte, ovvero latte da agricoltura biologica, succhi di frutta e vino.

3.2 Verifica dei succhi di frutta

Partendo dal fatto che attualmente non ci sono succhi di frutta con certificazione geografica in Europa, anche perché le materie prime vengono da parti diverse del mondo, il problema della autenticazione dei succhi di frutta è essenzialmente un problema di verifica del mantenimento delle caratteristiche fisiche, chimiche,

organolettiche e nutrizionali tipiche del frutto da cui origina, come definito dal Codex General standard for fruit and nectars 547-2005. È questo Codex che fa da riferimento alle prove analitiche di verifica in questo settore, ed indica che i succhi e i nettari di frutta devono essere sottoposti a verifiche di autenticità, composizione e qualità, quando applicabile e quando richiesto.

Il Codex 247-2005 propone molti metodi analitici differenti a risposta alle molteplici frodi in questo settore, la tabella 3.2. ne riassume alcuni.

Il parametro di qualità per tutti i prodotti derivati dalla frutta è la percentuale in frutta, che deve essere dichiarata in etichetta e rispettata al fine di mantenere sia la qualità che l'autenticità del prodotto.

Tabella 3.2. Alcuni metodi di analisi previsti nei succhi di frutta dal Codex Stan 247-2005

Obiettivo	Metodo	Principio
Antocianine (criterio di qualità e autenticità)	IFU Method No 71 -1	HPLC-DAD
Succo di barbabietola nei succhi (criterio di qualità e autenticità)	AOAC 995.17	Deuterium NMR
Oli essenziali (criterio di qualità e autenticità)	AOAC 968.20 I FU Method no. 45	Distillazione, titolazione
Fermentescibilità (criterio di qualità e autenticità)	IFU Method no 18	Microbiologico
Aminoacidi liberi (criterio di qualità e autenticità)	EN 12742 IFU Method no 57	Cromatografia liquida
Rapporto L-Malico/Acido malico totale nel succo di mela (criterio di qualità e autenticità)	AOAC 993.05	Determinazione enzimatica e HPLC
Prolina (criterio di qualità e autenticità)	EN 1141 IFU Method no 49	Fotometria
Na, K, Ca, Mg (criterio di qualità e autenticità)	EN 1134 IFU Method no 33	Spettroscopia ad assorbimento atomico

IFU: International Federation of Fruit-Juice Producers, AOAC: Association of Official Agricultural Chemists

Il Codex 247-2005 propone molti metodi analitici differenti a risposta alle molteplici frodi in questo settore, la tabella 3.2. ne riassume alcuni.

Il parametro di qualità per tutti i prodotti derivati dalla frutta è la percentuale in frutta, che deve essere dichiarata in etichetta e rispettata al fine di mantenere sia la qualità che l'autenticità del prodotto.

I succhi di frutta per il loro alto costo rappresentano il target favorito per le adulterazioni, la più comune è quella di miscelare il succo di frutti poco costosi a quello dei più costosi, il prodotto così ottenuto non rispetta l'etichetta dichiarata.

Sono stati fatti numerosi studi per ottimizzare metodi adatti per il controllo della autenticità e della determinazione del contenuto di frutta in questi prodotti. L'approccio consiste sempre nella individuazione di componenti chimici marker di quella tipologia di frutto e nel confronto tra campioni considerati autentici e i campioni in esame, tenendo sempre in considerazione la variabilità naturale dovuta al tempo, al grado di maturazione, all'origine geografica a diversi processi produttivi. Il maggior problema analitico riscontrato è la grande complessità e variabilità dei componenti frutto-specifici.

Le tecniche analitiche per affrontare questa sfida sono altrettanto numerose quanti sono i diversi tipi di adulterazione, si va dalla classica determinazione dei parametri chimici a tecniche strumentali altamente sofisticate (Fugel et al., 2005).

La determinazione di un singolo componente del succo potrebbe essere insufficiente a fornire le informazioni necessarie, quindi si ricorre spesso alla analisi di molteplici parametri per una valutazione affidabile delle differenze tra succhi puri e adulterati. Questo approccio è ovviamente dispendioso in termini di tempo e denaro e ha come conseguenza la generazione di una notevole quantità di dati che deve essere poi soggetta a trattamento statistico, un prerequisito per l'assegnazione dei probabili limiti delle componenti rilevanti.

Ad oggi per determinare l'autenticità dei succhi e per smascherare le adulterazioni sono stati usati in combinazione una serie di analisi di parametri diversi, quali i polifenoli, gli acidi organici, gli amminoacidi e altri componenti inorganiche (Garcia Wass et al., 2000).

3.2.1. Profilo dei polifenoli

I polifenoli sono composti con proprietà antiossidanti, la cui assunzione con la dieta è associata a molti benefici sulla salute, come la prevenzione di varie malattie degenerative, malattie cardiovascolari e cancro (Manach et al., 2004). Migliaia di polifenoli sono stati descritti in letteratura nella frutta e nei vegetali, e dal momento che la composizione qualitativa e quantitativa in polifenoli nella frutta mostra differenze a seconda, della specie, della cultivar e della fase di maturazione, la determinazione della composizione fenolica è uno strumento utile per il controllo dell'autenticità di prodotti a base di frutta e per la rilevazione di additivi non permessi.

Nel Codex Stan 247-2005 non è previsto un metodo per l'analisi del profilo e la quantificazione dei polifenoli, mentre la loro analisi nei succhi di frutta commerciali è un parametro molto importante sia per la qualità che per l'autenticità.

L'HPLC, e più recentemente l'UPLC, è il metodo più usato per l'analisi di questi composti accoppiato ad rivelatore a fotodiodi (DAD) (Diaz Garcia et al., 2013) in combinazione con lo spettrometro di massa (MS), come ad esempio è stato usato per la verifica dell'autenticità del succo di melograno (Borges e Crozier, 2012) o in quella dei succhi di agrumi (Abad-García et al., 2012), dove, tramite tecniche chemiometriche il profilo di 15 composti fenolici ha permesso di costruire un modello per distinguere tra succhi di mandarino, arancia, pompelmo e limone.

Un gruppo importante di polifenoli è rappresentato dalle antocianine. Il loro profilo e il loro contenuto sono usati come *fingerprinting* per l'autenticità dei frutti rossi, dal momento che i loro patterns specifici possono consentire la classificazione delle specie da frutto e il rilevamento di miscele fraudolente con frutta di minor costo o di frutta con un colore più stabile, come è ad esempio il caso delle fragole (Fugel et al. 2005). Anche per la verifica dell'origine geografica il profilo delle antocianine è risultato avere un alto potere discriminante, come nel caso del succo di mirtillo proveniente dalla Turchia e dalla Finlandia (Primetta et al., 2013).

Il metodo ufficiale per l'analisi delle antocianine nei succhi di frutta riportato nel Codex 247-2005 è il metodo IFU no 71 con HPLC DAD. Il metodo ufficiale, che prevede il solo utilizzo del rivelatore UV/Vis a 520 nm, è però insufficiente a determinare tutta la varietà di polifenoli presenti in frutta e verdura, l'aggiunta del rivelatore a fluorescenza può aggiungere la determinazione di un numero maggiore di composti importanti per la

verifica della autenticità dei frutti rossi come è stato dimostrato nel lavoro di Obon et al. 2011. Nella figura 3.3 è mostrato il cromatogramma di un estratto di mirtillo ottenuto secondo il loro metodo cromatografico. Molti lavori analizzano all'HPLC gli estratti di succhi di frutta dopo idrolisi, come nel caso del lavoro di Mattila et al. 2006 sul ribes nero, questo tipo di trattamento però non è idoneo per le ricerche di autenticità in quanto i composti determinati non sono quelli presenti originariamente nel succo analizzato. Lo studio delle antocianidine, e in particolare quello degli agliconi delle antocianine, si è dimostrato un marker della origine geografica dei mirtilli, come descritto nel lavoro di da Akerstrom et al. 2010 in cui il profilo di questi antiossidanti si è rivelato latitudine – dipendente. Mentre l'analisi degli acidi idrossicinnamici è risultato essere un buon parametro di classificazione della varietà e della origine geografica dei succhi di arancia, con l'acido p-cumarico il fattore determinante nella discriminazione (Di Mauro et al., 2002).

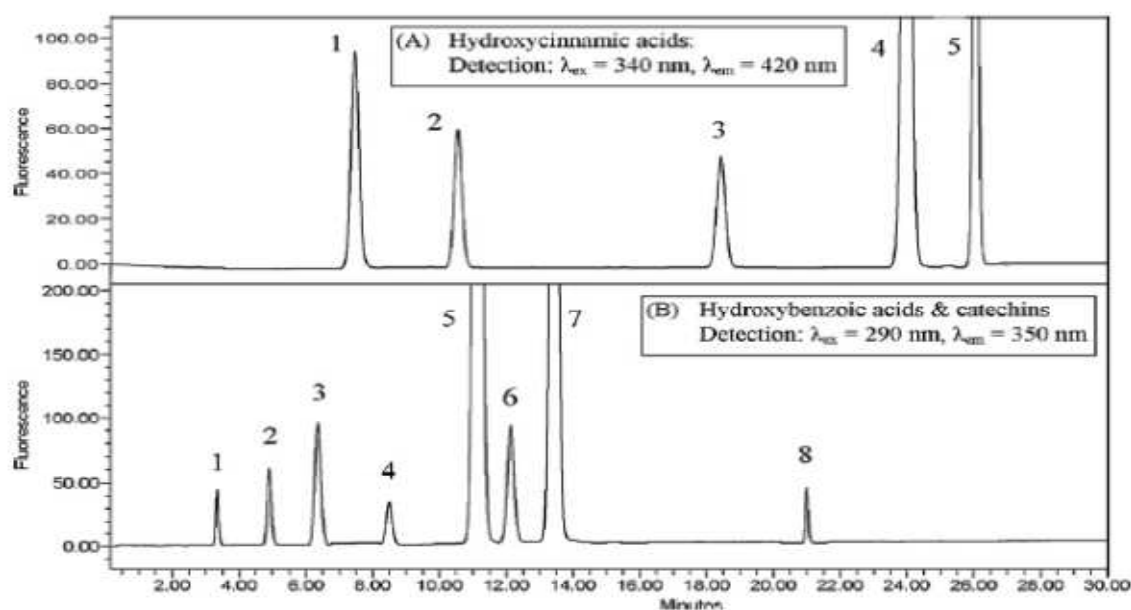


Fig. 3.3. Cromatogramma HPLC con rivelazione fluorimetrica di uno standard di acidi idrossicinnamici (A) e (B) di uno standard di acidi idrossibenzoici e catechine.

In generale sono molti i metodi proposti per la analisi dei profili delle varie classi di polifenoli: antocianine, procianidine, flavoanoni, flavonoli, falvoni e acidi phenolici, una review esauriente su questi metodi è di Ignat e co-autori, 2011.

3.2.2. Profilo degli acidi organici

Gli acidi organici sono molecole a basso peso molecolare importanti nei succhi di frutta perché ne influenzano le proprietà organolettiche come l'aroma, il colore e il sapore. Questi composti sono anche un indicatore di freschezza e di qualità del prodotto e vengono a volte aggiunti ai succhi come acidificanti, per migliorarne il sapore o come agenti antimicrobici (Dong, 1998).

Gli acidi più usati per migliorare il sapore delle bevande sono il citrico, il tartarico, il fumarico e il fosforico. Il citrico è il più usato. L'analisi di questi acidi è usata per controllare il grado di maturità del frutto, l'evoluzione della acidità, ma anche la purezza del succo di frutta. Infatti il fingerprinting degli acidi organici è stato dimostrato un valido marker di comparazione tra succhi di frutta puri e adulterati (Ehling e Cole, 2011). L'acido tartarico è considerato discriminante per il succo di uva, e l'acido malico è tipico del succo di mela, quindi un eccesso di questi acidi in altri tipi di succo di frutta costosi sono indicatori di una aggiunta di questi succhi economici come adulteranti.

Inoltre, dal momento che nella mela naturalmente si verifica solo la presenza l'acido L-malico, la determinazione di acido D-malico indica commistione di un racemo sintetico di acido malico.

I rapporti tra chinico/citrico, chinico/malico e citrico/malico sono importanti per la verifica della autenticità del succo di mirtillo rosso, mentre il rapporto citrico/isocitrico in quello di arancia dove se maggiore di 130 indica una aggiunta di acido citrico a seguito di una diluizione (Diaz-Garcia et al., 2103).

I metodi analitici maggiormente usati sono basati sulla cromatografia liquida a fase inversa o a scambio ionico accoppiata con un rivelatore UV (Shui e Leong, 2002), questa tecnica consente l'analisi simultanea di tutti gli acidi organici.

3.2.3 Profilo degli zuccheri

Gli zuccheri sono importanti nei succhi di frutta perché condizionano il gusto, l'aroma e la qualità del prodotto in generale oltre ad essere indicatori del grado di maturità del frutto e delle condizioni di conservazione.

Il loro ruolo come marker di autenticità è nella pratica di adulterazione che consiste nell'aggiunta di dolcificanti commerciali ai succhi, tramite la diluizione o la miscela di succhi poco costosi o prodotti artificialmente nei più costosi, la fonte del dolcificante

per l'adulterazione può essere il succo di un altro frutto o uno zucchero derivante da un frutto o da una vegetale. Quindi la conoscenza qualitativa e quantitativa della distribuzione degli zuccheri nei succhi di frutta, il rapporto tra i loro enantiomeri o il rapporto tra zuccheri più concentrati può dare informazioni importanti.

Lo sviluppo di prodotti derivanti dalla trasformazione del saccarosio (da canna o da barbabietola) e dell'amido (da granturco) ha cambiato il problema dell'aggiunta di zuccheri ai succhi di frutta, infatti questi sono fonti economiche di zuccheri dai quali è possibile preparare (tramite idrolisi acida o enzimatica) miscele di saccarosio:fruttosio:glucosio che sono molto simili a quelle che comunemente si trovano nei succhi. Il modo per smascherare questa frode è nella osservazione che durante la produzione di questi derivati si formano degli oligosaccaridi quali prodotti secondari, quindi la loro presenza non dipende dalla loro origine ma solo dal metodo con cui sono stati prodotti, di conseguenza la conoscenza del profilo degli oligosaccaridi presenti nel succo è possibile capire la presenza di zuccheri adulteranti (Martinez Montero et al. 2004).

Gli zuccheri sono difficili da separare tramite una cromatografia liquida a fase inversa convenzionale, inoltre mancano di cromofori e di gruppi fluorescenti per la rivelazione in UV-vis o in fluorescenza. I metodi più usati sono quindi quelli che usano colonne LC-NH₂ con rivelazione a indice di rifrazione (RI), con acetonitrile/ acqua come fase mobile. La rivelazione RI ha una bassa sensibilità quindi recentemente sono stati usati anche il rivelatore a infrarossi e l'evaporative light scattering.

La cromatografia ad alte prestazioni a scambio ionico con rivelazione amperometrica (HPAE-PAD) risulta molto utile nel controllo di questo tipo di frode, permettendo una quantificazione diretta con grande sensibilità e una veloce preparazione del campione, ed infatti questa strumentazione è nel metodo ufficiale AOAC no. 995.13, che è usato sia per la verifica di aggiunta di zuccheri adulteranti sia per la autenticità dei succhi, essendo il rapporto degli zuccheri specie-specifico. Ad esempio il succo di uva ha una alta concentrazione in glucosio e fruttosio ma bassa in saccarosio, mentre lo zucchero predominante nel succo di mela è il fruttosio.

3.2.4. Rapporti isotopici

Gli elementi idrogeno, carbonio, azoto e ossigeno hanno ciascuno due forme isotopiche stabili ($^2\text{H} / ^1\text{H}$, $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ e $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$) il cui rapporto può essere usato nella verifica della autenticità dei succhi di frutta.

Un primo esempio dell'uso dell'analisi del rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ è il rilevamento di zuccheri ed acqua aggiunti nei succhi di arancia e di mela. L'aggiunta di zucchero può essere rilevata se questo proviene da canna o da mais (piante C_4) mentre gli agrumi e la mela sono piante C_3 , e quindi seguono due pathways di fissazione della CO_2 diversi che portano a diversi frazionamenti degli isotopi. Questa discriminazione non è possibile se l'aggiunta di zucchero proviene da barbabietole, che è una pianta C_3 . Per rilevare l'aggiunta dello zucchero da barbabietola è possibile tramite la determinazione anche del rapporto $^2\text{H}/^1\text{H}$ (Kelly et al., 2003).

In uno studio condotto su mele della Slovenia con analisi di vari rapporti isotopici ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$, $^2\text{H}/^1\text{H}$), analisi multi-elementare e di parametri come la capacità antiossidante, il contenuto in vitamina C e di polifenoli totali, ha caratterizzato sia la origine botanica che geografica delle mele, sia il loro metodo di produzione (convenzionale o biologico). Per la cultivar i fattori determinanti sono stati i valori di $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ nelle proteine e $\delta^{18}\text{O}$ nell'acqua. L'origine geografica è stata ben individuata grazie ai valori di $\delta^{18}\text{O}$ e $\delta^2\text{H}$ nell'acqua e alla concentrazione di Rb e S nei succhi di frutta, mentre $\delta^{15}\text{N}$ è stato determinante per distinguere le mele coltivate con metodo biologico da quelle con metodo tradizionale, probabilmente per la diversa origine dei fertilizzanti usati (Bizjak et al. 2012).

3.2.5. Metodi PCR

La *polymerase chain reaction* (PCR) è una tecnica di biologia molecolare che consente di rilevare tratti molto piccoli di acido nucleico e di determinarne la sequenza attraverso la loro amplificazione.

L'identificazione delle specie di origine degli alimenti tramite PCR ha raggiunto un impiego consolidato per gli alimenti contenenti DNA in quantità rilevabili, in particolare carne e pesce (Mafra et al., 2008). Al contrario, relativamente pochi studi sono stati condotti sulla applicazione di delle tecniche di biologia molecolare per la verifica della autenticità e per il controllo di qualità di frutta e prodotti derivati.

Le diverse impronte genomiche di varie cultivar di mele sono stati analizzati da Morton, Adams e Barbara (1993) usando PCR ed elettroforesi su gel di agarosio. Questo metodo rapido ha richiesto solo poco DNA e ha permesso la differenziazione e l'identificazione delle cultivar di melo indipendentemente dalle caratteristiche morfologiche dei frutti. Un approccio analitico per la rilevazione della adulterazione di succo d'arancia con la PCR tecnica è stata sviluppata da Knight (2000), che ha ottenuto di poter quantificare l'aggiunta del 2,5% succo di mandarino nel succo d'arancia, mentre Scott et al., 2009 hanno applicato questa tecnica per verificare l'aggiunta di succi di mandarino e di pompelmo a quello di arancia. Nel 2012 il gruppo di Han ha proposto un metodo per la verifica degli ingredienti di 7 succhi di frutta: pera, mela, fragola, pesca, arancia, uva e mandarino.

E' opportuno sottolineare che l'applicabilità della analisi del DNA alla autenticazione dei prodotti ortofrutticoli trasformati, in particolare dopo il trattamento termico, ha dimostrato di essere limitata a causa della degradazione del DNA, soprattutto in matrici acide (Bauer et al., 2003).

3.3. La verifica dei vini

Il termine generico "adulterazione" nel vino si riferisce a diversi tipi di frode, ad esempio: (i) la diluizione dei vini con acqua, (ii) l'aggiunta di alcol, aggiunta di sostanze coloranti e aromatizzanti, (iii) la miscela o la sostituzione con vini di minore qualità, e (iv) errori di etichettatura, ossia dichiarazione fraudolenta di cultivar e provenienza geografica.

Si tratta di un argomento complesso, anche perché la normativa del vino è diversa a seconda del Paese di produzione. Ad esempio, le leggi dello stato della California consentono l'aggiunta di una percentuale di acqua minima necessaria per facilitare la normale fermentazione del vino mentre questo tipo di pratica non è consentita dalla legislazione UE.

Le norme UE si applicano alle tre aree chiave, quali:

(i) la qualità e additivi utilizzo per fare diversi tipi di vino, (ii) l'etichettatura, (iii) tenuta dei registri (CE, 2009 a; CE, 2009 b), compresa la documentazione necessario per certificare l'autenticità dei vini essere trasportate in contenitori alla rinfusa (CE, 2009c). Inoltre, la "E-Bacchus" database online (CE, 2013) viene regolarmente aggiornato con le denominazioni di origine e delle indicazioni geografiche protette nell'UE. Purtroppo, i regolamenti, le pratiche di buona fabbricazione e le procedure di tracciabilità non sempre sono sufficienti a garantire l'autenticità di un determinato prodotto, quindi una delle principali sfide della autenticità vino è la necessità di materiali di riferimento accurati e standard che possono essere utilizzati per garantire la prova di identità del vino (Versari et al., 2014).

La strada più promettente, tuttavia, sembrano essere gli avanzamenti nella tecnologia di verifica del vino. Finché le autorità hanno solo la vista, l'olfatto, il gusto come strumenti, è difficile rilevare l'adulterazione.

Secondo Penza e Cassano, il vino "è uno dei più complessi bevande alcoliche con oltre 1000 di componenti volatili identificati nel suo spazio di testa ". Questo dato rende il rilevamento delle frodi attraverso l'olfatto e il solo gusto quasi impossibile, mentre allo stesso tempo complica molto anche l'analisi scientifica. Tuttavia, un numero di diversi approcci analitici si sono rivelati molto promettenti.

La maggioranza dei metodi analitici si basano sull'analisi delle caratteristiche dei microelementi, composti fenolici, composti volatili e rapporti isotopici utilizzando diversi metodi cromatografici e spettroscopici. Generalmente, i composti volatili sono utilizzati per caratterizzare varietà, gli oligoelementi sono utilizzati per la discriminazione geografica, mentre i composti fenolici sono utilizzati per entrambi gli scopi. Oltre al classico approccio basato su una analisi mirata alla identificazione di composti caratteristici noti, è in grande sviluppo l'alternativa un approccio metabolomica non mirato, che fornisce una unica impronta digitale chimica dei campioni, e che ha recentemente trovato la sua applicazione preliminare nella valutazione dell'autenticità di vino (Václavík et al., 2011).

La composizione chimica di un qualsiasi vino dipende essenzialmente da tre fonti diverse: l'uva, il tipo di lievito usato per la fermentazione e i contenitori usati durante la produzione e la conservazione (Cozzolino e Smyth, 2013). La scelta di marker adatti alla analisi di qualità ed autenticità è quindi molto complessa, in questo paragrafo saranno

riportati esempi di applicazioni di diverse tecniche e metodi disponibili recentemente pubblicati.

In generale i metodi per l'analisi dei vini sono da un lato "targeted", ossia vanno ad individuare composti specifici e valutano la loro presenza e la loro concentrazione nei vini in oggetto.

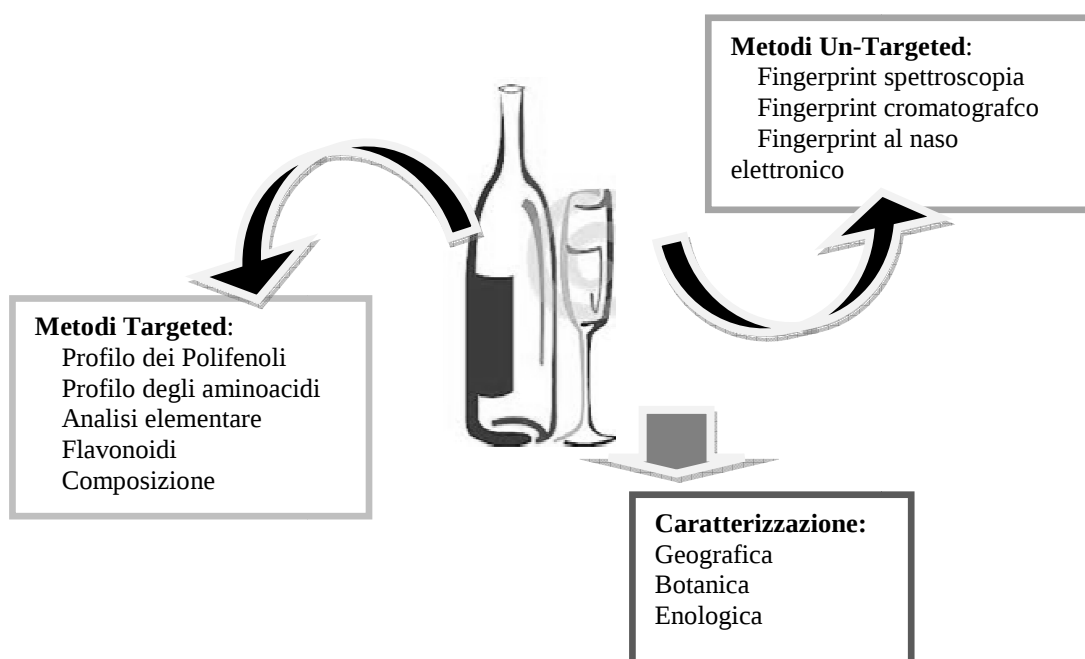


Figura 3.4. Metodi di Analisi Target e non target per il settore del vino.

L'altro approccio è quello "un-targeted", studia il segnale derivante dall'analisi del campione dopo un determinato trattamento su uno strumento analitico, senza trarre alcuna indicazione sulla sua composizione in termini di molecole e loro concentrazione, derivando quindi una sorta di impronta digitale del campione. Le tecniche coinvolte in questi due approcci sono elencate in figura 3.4 e verranno esaminate in seguito.

La combinazione di analisi strumentale con tecniche di analisi statistica multivariata, ha consentito la classificazione con successo di vari tipi di vino in base alla varietà, all'origine geografica, e ad alcuni aspetti del processo di vinificazione. I metodi statistici multivariati sono un potente strumento per lo studio e la classificazione di uva e vini, basato sull'insieme di dati chimici o sensoriali (González & Peña-Mendez, 2000). Ad esempio, l'analisi delle componenti principali (PCA) è molto spesso utilizzata

per stabilire le relazioni e la differenziazione tra le variabili, mentre l'analisi di cluster (CA) è impiegato per evidenziare il naturale raggruppamenti dei campioni. La linear discriminant analysis (LDA) è applicata per selezionare le variabili più importanti e significative, (Granato et al., 2010; Korenovska & Suhaj, 2005; Oliveri & Downey, 2012).

3.3.1. Tecniche cromatografiche

La cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) accoppiata a rivelatori UV-Vis, fluorescenza o a spettrometri di massa è abitualmente utilizzata per l'analisi di composti fenolici, acidi organici, carboidrati, aminoacidi, micotossine, ecc (Versari et al., 2014) Inoltre, i risultati di questo tipo di analisi sono stati proposti in combinazione con tecniche chemiometriche e utilizzati per la classificazione o il riconoscimento dei vini.

Il fingerprinting degli antociani di diverse varietà di uve da vino rosso sono usati per discriminare varietà di vino (Garcia Beneytez et al., 2002). In uno studio in cui sono stati analizzati vini spagnoli da sei vitigni e due zone di produzione, l'analisi HPLC-DAD di antociani, seguita da PCA, ha permesso di stabilire un buon grado di relazione tra alcune di queste variabili e le varietà di uva analizzate (Arozarena et al., 2000). In un 'altro studio le varietà Tannat, Cabernet Sauvignon e Merlot sono state correttamente classificate in base al loro profilo di antocianine (Gonzalez-Neves et al., 2007). Anche i flavonoli analizzati su 34 genotipi di uva coltivate e raccolte nelle medesime condizioni sono stati buoni discriminanti tra le diverse cultivar una volta analizzati con la PCA (Ferrandino et al., 2012).

Quando i dati di più composti fenolici sono analizzati insieme con tecniche chemiometriche il loro potere discriminante aumenta fino ad arrivare alla corretta classificazione geografica tramite LDA del 100% dei vini Chardonnay e del 91% dei vini Cabernet Sauvignon provenienti da due regioni dell'Australia (Bellomarinno et al., 2009), mentre l'analisi sensibile e selettiva con LC/MS ha permesso la discriminazione di vini australiani in base a origine, cultivar e annata di produzione (Jaitz et al., 2010).

Per quanto riguarda invece l'analisi un-targeted dei profili cromatografici usata per scopi di classificazione, oltre all'unico caso in cui è stata applicata l'analisi un-targeted dei cromatogrammi HPLC-UV/Vis, originariamente destinati alla identificazione di composti fenolici nei vini cileni e poi utilizzati anche con scopi di classificazione

(Beltrán et al., 2006), la maggior parte degli studi riportati in letteratura coinvolge la rivelazione con spettrometria di massa, questi strumenti sono progettati per misurare le masse di atomi o molecole, e possono essere usati per tracciare il profilo dei metaboliti presenti in un campione complesso come il vino.

In uno studio condotto su campioni commerciali di tre varietà di vino rosso, lo spettro MS un-targeted dei campioni analizzati con il LC-QTOF-MS sono stati elaborati automaticamente con un software commerciale che ha sviluppato un modello predittivo consentendo la corretta classificazione di quasi il 96% dei campioni (Vaclavik et al., 2011). In un altro studio in cui si propone un metodo UHPLC-QTOF-MS per profili metabolomici, due ioni caratteristici con rapporti m/z di 479.0831 e 781.1985 sono stati selezionati arbitrariamente come marcatori discriminanti per tre varietà di vino rosso (Merlot, Syrah e Pinot Noir). Il rapporto di 479/781 era significativamente diverso per i tre insiemi di campioni analizzati da un ANOVA convenzionale (Delcambre & Saucier, 2013). Analogamente, il FT-ICR-MS da solo o in combinazione con un cromatografo liquido è stato usato per discriminare tra le specie di legno di quercia in cui il vino era stato invecchiato (Gougeon et al., 2009).

Un possibile inconveniente sull'impiego di composti fenolici per la autenticazione del vino è la notevole variazione della loro composizione e concentrazione a seconda delle tecniche di vinificazione e di invecchiamento (ad esempio a seguito di reazioni di ossidazione). Inoltre, considerando che il contenuto e la composizione di composti fenolici nelle uve può essere fortemente influenzate da fattori climatici, ambientali e viticoli di un dato anno, risulta fondamentale l'uso dei dati da annate diverse.

3.3.2. I composti volatili del vino

E' ben noto che l'aroma dei vini può essere influenzato da molti fattori, tra i quali vitigno, clima, condizioni di fermentazione, ceppi di lievito, processo di vinificazione e le condizioni di invecchiamento e di stoccaggio (Cordente et al., 2012; Styger et al., 2011), pertanto per convalidare l'autenticità di vini sulla base di composti volatili vi è la necessità di una adeguata numerosità del campione.

I composti volatili sono solitamente analizzati mediante gascromatografia (GC) e naso elettronico accoppiato con MS o altri rivelatori. La capacità del naso elettronico di discriminare l'origine geografica, la varietà di vite e diverse percentuali di diluizione

con acqua di quattro vini rossi (*V. vinifera* L. : Cabernet Sauvignon e Merlot, e due di varietà ibride: Dornfeldere e Rondo), è stato riportato da Antoce & Namolosanu, 2011. Un altro interessante studio è stato pubblicato nel 2011 (Weldegergis, 2011). L'estrazione stir bar sorptive (SBSE) accoppiato con gas cromatografia- spettrometria di massa a quadrupolo (GC-QMS) è stato utilizzato per discriminare 334 campioni di vini sudafricani di 6 vitigni di Sauvignon Blanc (fromsix, Chardonnay, Pinotage, Shiraz, Cabernet Sauvignon, Merlot) e sei diverse regioni di provenienza, tutti della stessa annata 2005. La LDA è stata utilizzata per discriminare questi vini secondo la cultivar di uva. Sono stati individuati alcuni composti volatili come potenziali predittori di cultivar di vino bianco. In particolare, i vini Sauvignon Blanc e Chardonnay sono stati classificati correttamente (100%), a causa del loro elevato contenuto di acido propanoico, o-cresolo (Sauvignon Blanc), acido acetico e vanillina (Chardonnay), l'alto livello di vanillina è probabilmente a causa di trattamenti di rovere che sono il più frequenti nello Chardonnay. La percentuale di previsione per le cultivar di vino rosso era abbastanza scarsa, ad eccezione dei vini Pinotage (capacità di previsione del 97%), per i quali tre composti volatili furono identificati come predittori accurati.

Oltre la differenziazione in base alla varietà di uve utilizzate i composti volatili sono stati usati per la classificazione sulla base della origine geografica.

Robinson et al. (2012) hanno usato la HS-SPME e la cromatografia bidimensionale con analizzatore di massa a tempo di volo (GC $\times$ GCTOFMS) per la differenziazione di vini Cabernet Sauvignon (30 campioni) provenienti da dieci diverse regioni australiane applicando poi tecniche chemiometriche.

La capacità di classificare l'origine geografica dei vini del naso elettronico è stata esplorata in uno studio sui vini Tempranillo prodotti in Australia (35 campioni) e Spagna (25 campioni) su sei annate (1999-2004), in cui il tasso di previsione è stata ottenuta con LDA (86%) (Cynkar et al., 2010).

I composti volatili del vino sono stati inoltre impiegati per distinguere tra annate diverse (Kruzlicova et al., 2009) e tra durate diverse dell'invecchiamento (Perestrelo et al., 2011). Le applicazioni più interessanti si trovano senz'altro nei studi in cui essi sono stati utilizzati come markers del legno.

In UE è consentito l'uso di trucioli di quercia per la produzione di vini e questo dovrebbe essere riportato in etichetta, per evitare frodi (CE, 2006). In Italia, l'uso dei

trucioli è limitato per i vini DOP, per preservare l'alta qualità dei vini invecchiati in botti. Pertanto, i vini etichettati con invecchiamento in botte non possono essere trattati con trucioli di quercia. A questo scopo i composti volatili, di cui 2-furaldeide, 5-methylfuraldéhyde, 2-metossifenolo (cioè gaiacol), 2,6-dimetossifenolo, eugenolo, Vanillina, isoeugenolo, acetovanillone, bis 1- (4-idrossi-3-metossifenil) -2-propanone, siringaldeide e desaspidinol ha permesso di discriminare con successo fino al 94% dei vini (1617 campioni) invecchiati in botti da quelli trattati con trucioli di quercia (Traccia et al., 2013).

3.3.3. Analisi dei minerali

Il fingerprinting del contenuto di metalli in tracce nei vini è un metodo utilissimo per autenticare l'origine geografica degli stessi. Le analisi dei microelementi nei vini sono di solito eseguite tramite spettroscopia di assorbimento atomico (AAS), spettrometria di emissione ad atomica con plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-AES) o spettrometria di massa ICP-(ICP-MS), una tecnica che ha reso le analisi di elementi multipli più economica e veloce (Pyrzynska, 2004).

La presenza e la concentrazione di oligoelementi riflette sia la geochimica del suolo nel quale le viti sono cresciute, sia l'influenza dell'intervento umano ((i) la mobilità gli elementi dalle rocce al suolo e dal suolo all'uva, (ii) le pratiche agricole, (iii) l'assorbimento della pianta che può variare con il vitigno e l'innesto, (iv) i processi di vinificazione e (iv) l'imballaggio e le condizioni di conservazione (Hopfer et al., 2013).

Un recente tentativo di discriminare suoli, uve e vini (56 campioni) provenienti da sette regioni produttrici di vino cinesi (Shihezi, Qilian, Helanshan, Huailai, Changli, Penglai, e Deqin) utilizzando la LDA ha rivelato che 10 parametri (Sc, V, Cr, Ga, SE, Sr, Pd, Sn, Tl, e U) erano necessari per distinguere la provenienza geografica dei vini con il 100% di precisione. Interessante notare che una buona correlazione si è verificato tra gli elementi descrittivi solo tra suolo vs uva e uva vs vino (cioè con una mancanza di correlazione tra vino e suolo) (Zou et al., 2012).

Galgano e collaboratori (2008) hanno applicato l'analisi delle variabili canoniche (CVA) e la CA alla caratterizzazione di 120 vini rossi commerciali prodotti in tre regioni dell'Italia meridionale (Basilicata, Calabria e Campania) in base al loro contenuto di macro e microelementi, e lantanidi. Su un totale di 61 analiti, solo 29

elementi sono risultati utili a discriminare i vini provenienti da queste regioni (9 macroelementi: Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Rb, Zn; 12 micro-elementi: Ag, Ba, Cd, Ga, I, Li, Sc, Th, Ti, Tl, V, Zr; e 8 lantanidi: Eu, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tm, Yb). Inoltre, l'ANOVA ha dimostrato che composizione elemento non dipendeva l'anno di produzione del vino: 2000-2002.

Da segnalare il progetto WINES-DB, finanziato dalla Commissione Europea nel 2002 per la costruzione di una banca dati di parametri analitici di vini provenienti da paesi terzi. Un totale di 1.188 campioni di vino (50% autentici e 50% commerciali) furono raccolti per tre anni consecutivi, poi analizzati per 58 sostanze chimiche. Il set di dati è stato analizzato con particolare attenzione al controllo di frodi utilizzando diverse tecniche di modellazione di classe, tra cui SIMCA e UNEQ. Gli elementi selezionati al fine di migliorare la classificazione dei vini rossi sono stati: V, Mn, Cd, S, As, Pb, Zn, Ni e Cs; mentre per i vini bianchi, i marcatori scelti sono stati: Y, Rb, U, Pb, As, Cd, Er, V, Mn, Ba, Fe, Cl e Ca.

Per la separazione dei vini provenienti dalla Repubblica Ungherese e dalla Romania la tecnica chemiometrica UNEQ ha dato il modello migliore in termini di efficienza per vini rossi (96,48%) rispetto ai bianchi (86,65%). In questo studio, i vini sudafricani erano modellati separatamente (Forina et al., 2009), questi vini possono essere facilmente discriminati da quelli degli altri Paesi sulla base di un singolo rapporto isotopico Etanolo (D/H) (Römisches et al., 2009). Al termine del progetto WINES-DB sono stati studiati più di 1800 vini provenienti da tre annate (2002-2004 per i paesi UE; 2003-2005 per gli altri) (Schlesier et al., 2009) e analizzati con tecniche statistiche univariate (Smeyers-Verbeke et al., 2009) e multivariate (Römisches et al., 2009).

La distinzione di autentici vini bianchi e rossi Ungheresi, Rumeni e Cechi è stata possibile utilizzando vari minerali come variabili oggetto poi di una PLS-DA che ha portato ad una corretta classificazione (tra 88 e 100%) dei vini commerciali provenienti dai paesi dell'Europa orientale. Gli elementi che contribuiscono maggiormente alla costruzione del modello discriminante sono stati Li, Si, Mn, Na, Y, V, U, Cd per vini bianchi e Cd, S, Cr, La, V, Cl, Pb per i vini rossi (Römisches et al., 2009).

Giova evidenziare che il contenuto di alcuni elementi delle terre rare nei vini, come La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb e Lu, può essere notevolmente influenzato dai trattamenti con bentonite, infatti possono aumentare anche di 1-2 ordini

di grandezza dopo questo trattamento e di quasi 1 ordine di grandezza durante l'invecchiamento, rappresentando quindi un valido marker per i processi enologici (Del Mar et al., 2004).

3.3.4. Tecniche Isotopiche

La distribuzione di isotopi stabili in biomolecole è controllata da processi di frazionamento biotici e abiotici che vengono utilizzati per rivelare adulterazioni di vino, come lo zuccheraggio o l'aggiunta di acqua, o può essere usato per trarre informazioni sulla sua origine geografica.

Le analisi sul rapporto $(D/H)_1$ sono effettuate attraverso NMR Site-specific Natural Isotopic Fractionation (SNIF®), mentre i rapporti $^{18}O/^{16}O$ e $^{13}C/^{12}C$ sono misurati con lo spettrometro di massa a rapporto isotopico (IRMS) (Rossmann et al., 1996). La corrispondenza delle caratteristiche del vino con la sua etichetta viene poi valutata mediante comparazioni univariate con una banca dati di campioni autentici, ufficialmente istituito dall'UE dal 1991 (CE, 1991a, b). Tuttavia, il confronto mediante analisi multivariata è stato dimostrato di essere superiore agli approcci univariati a causa della sua maggiore sensibilità e specificità (Dordevic et al., 2012).

3.3.4.1. Rapporto $^{13}C/^{12}C$

Il più importante frazionamento biotico è quello di carbonio e idrogeno che si svolge durante la fotosintesi e la biosintesi di zucchero e il relativo etanolo.

Il $^{13}C/^{12}C$ dell'etanolo è influenzato dalla origine botanica dello zucchero fermentato, ed è più alto per le piante a ciclo C_4 (ad esempio la canna e mais) che per quelle a ciclo C_3 (ad esempio uva e barbabietole) (Dordevic et al., 2013).

Le normative europee (CE, 1990 1997, 2003) stabiliscono che il rapporto D/H nel gruppo metile dell' etanolo (identificato con la notazione $(D/H)_1$) è il metodo di elezione per ottenere informazioni circa l'origine botanica dello zucchero fermentato. Valori tipici del rapporto $(D/H)_1$ per le barbabietole, il vino e zuccheri di canna sono 91,5-93,5 ppm, 98-104 e 109-112 ppm, rispettivamente.

Il rapporto $^{13}C/^{12}C$, spesso espressa come $\delta^{13}C$ dal riferimento Pee Dee Belemnite (standard PDB che per definizione avere un valore $\delta^{13}C$ di 0), è fondamentale in caso

di adulterazioni di vino con zuccheri o di etanolo da mais e canna, perché fortemente influenzato solo da piante C_4 .

Riguardo all'uso di $\delta^{13}C$ per identificare l'origine geografica del vino Dordevic e coautori (2013), hanno analizzato 5220 campioni di vino italiano raccolti per la costruzione del database di vino dell'UE nel periodo 2000-2010. I modelli di classificazione univariata sono stati caratterizzati da una sensibilità del 97,9%, ma solo il 35,2% di specificità, che è stato migliorato del 20% tramite la costruzione di modelli multivariati.

Un esempio recente della caratterizzazione dell'origine geografica con isotopi viene dal gruppo argentino di Di Paola-Naranjo et al., (2011) i quali hanno studiato 51 vini rossi autentici provenienti dalle regioni di Mendoza, San Juan e Cordoba i prodotti nel 2007 e nel 2008. Il $\delta^{13}C$ ha mostrato i valori più bassi per la regione con più alta media di precipitazioni annuale, ma sono stati collegati anche ad altri diversi inputs sul suolo (es. il contenuto di sostanze organiche da piante C_4 e C_3).

3.3.4.2. Rapporto $^{18}O/^{16}O$

Il razionale della applicazione di questo rapporto come marker di autenticità del vino è nel fatto che durante la maturazione delle uve il differente frazionamento dell'acqua nelle uve rende il rapporto $^{18}O/^{16}O$ dell'acqua dell'uva superiore a quella dell'acqua della terra trasportata attraverso le radici nei frutti.

L'applicazione principale del rapporto $^{18}O/^{16}O$ è l'identificazione di aggiunte di acqua di rubinetto o di pozzo nel mosto d'uva. Ad esempio per i campioni del Vino Italiano raccolti per la banca dati dell'UE nel periodo 2000-2010, l' intervallo di confidenza al 95% per $\delta^{18}O$ aveva come limiti -1.3 e 8.9, mentre l'acqua di falda -5 per le regioni meridionali e -9 per le settentrionali (Dordevic et al., 2013).

Il rapporto $^{18}O/^{16}O$ insieme al rapporto D/H del gruppo etilenico dell' etanolo, identificato con la notazione $(D/H)_2$ sono legati alle condizioni climatiche durante la maturazione delle uve e, a sua volta, all'anno della vendemmia. La ragione di questa osservazione è nel più alto tasso di evaporazione dell'acqua nei climi caldi, che causa un arricchimento di ^{18}O durante la maturazione delle uve. Il valore $\delta^{18}O$ dell'acqua nel vino, che riflette il rapporto rispetto ad uno standard internazionale, Vienna standard Media Ocean Water (VSMOW), è particolarmente indicativa per l'origine geografica

del vino. In climi caldi e secchi, come l'Australia, il Sud Africa e il sud della Spagna, si osservano valori elevati di $\delta^{18}\text{O}$ (7.5, 8.5 e 6.0, rispettivamente), considerando che il Cile è mitigato dal clima costiero ($\delta^{18}\text{O} = 3.5$), e che l'Argentina è influenzata dal freddo clima continentale delle Ande che non favorisce tale arricchimento ($\delta^{18}\text{O} = -1.0$), rispetto all'Europa ($\delta^{18}\text{O} = -0.5 / + 3.0$) (Fauhl-Hassek, 2009).

Poiché la posizione della vigna gioca un ruolo importante nel determinare le condizioni climatiche durante la maturazione delle uve, i rapporti $(\text{D}/\text{H})_2$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e, in misura minore, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ possono determinare l'origine geografica dei vini.

A tale proposito va notato che la determinazione con questi parametri dell'anno di produzione di una data denominazione risulti più affidabile della distinzione tra denominazioni diverse ed inoltre l'effetti dell'annata di raccolta sul frazionamento isotopico rendono difficile l'uso di questo parametro per la distinzione tra denominazioni a lungo termine (Charlton et al., 2010).

L'introduzione del regolamento europeo 606/2009 (CE, 2009a), che permette la riduzione della concentrazione di etanolo fino al 2% vol/vol ha creato un problema nell'uso di questa tecnica. Infatti le procedure che consentono di ottenere tale scopo possono alterare i rapporti isotopici stabili nel vino, compromettendo la loro relazione con annata, provenienza geografica e verifica di adulterazioni. Recentemente, Fedrizzi et al. (2013) hanno studiato il problema, e una riduzione del 2% di etanolo ha causato una diminuzione di 0,9 ‰ nel $\delta^{18}\text{O}$ nel vino Sangiovese, rispetto a una riduzione di solo 0,3 ‰ nei vini Chianti.

3.3.4.3. L'approccio metabolomico

A partire dagli anni Novanta, l'applicazione diffusa di tecniche per la ricerca metabolomica ha aperto una serie di possibilità per l'autenticazione di uva, mosto e vino. Questo approccio si concentra sulla serie completa dei metaboliti che pesano meno di 1500 Da nell'uva, nel mosto o nel vino.

La grande maggioranza dei lavori in questo campo sono concentrati su caratteristiche come vitigno, origine e annata, e si basano su un pool di molecole coinvolte nello stesso ciclo metabolico, dando origine ad una indagine di profiling metabolico, la cui analisi non può che essere poi effettuata tramite tecniche multivariate. Questo approccio

appare particolarmente utile per la comprensione profonda del processo di vinificazione e per individuarne i punti di miglioramento.

Laghi et al., 2014 hanno osservato il profilo metabolomico tramite ^1H NMR di vini Sangiovese da agricoltura biologica della regione Emilia-Romagna nel 2010-2012. L'annata è risultata avere l'effetto maggiore sul profilo metabolomico con l'acido idrossifenil-piruvico e l'alcool feniletlico caratterizzati dalla maggiore variabilità.

Un'alternativa alle indagini sui profili metabolici sono rappresentati dall'approccio con il fingerprint metabolico per l'intero spettro NMR con l'applicazione di tecniche statistiche multivariata, che rientra nei metodi un-targeted.

Il vantaggio principale di questo approccio è, oltre alla mancanza di una fase di quantificazione intermedia, la possibilità di sfruttare le informazioni proposte da tutte le molecole che danno una segnale NMR, compresi quelli che non possono essere quantificati o neanche identificati. Un'applicazione interessante di ^1H NMR per indagini con fingerprinting è la possibilità di discriminare vini monovarietali da miscele e, in questa ultima situazione, identificare la loro composizione. In un lavoro su quattro vini italiani: Montepulciano d'Abruzzo, Sangiovese, Cabernet e Merlot, mescolati in percentuali dal 10 al 70%, la LDA ha permesso la distinzione tra vini puri e miscelati, mentre la ANN l'identificazione della percentuale presente nelle miscele, con un 10% di precisione (Imparato et al., 2011).

In un altro studio campioni di Lambrusco dolce e secco sono stati analizzati con ^1H NMR, accoppiato con PLS-DA, attraverso un approccio fingerprinting, al fine di individuare le peculiarità di tre fonti varietali (Sorbara, Salamino di Santa Croce e Grasparossa di Castelvetro) con una specificità superiore al 72,3% (Papotti et al., 2013).

Il limite principale del NMR è rappresentato dalla scarsa sensibilità rispetto alle altre tecniche spettrometriche. Quando si studia il vino tramite ^1H NMR è pratica abbastanza comune includere uno step di una liofilizzazione, in modo da ridurre l'influenza delle due molecole prevalentemente presenti nel vino, cioè acqua ed etanolo. Questo porta ad un aumento del numero di molecole quantificabili (Hong, 2011), ma questa procedura favorisce la evaporazione o la precipitazione anche di molte molecole.

3.4. Verifica del latte da agricoltura biologica

Da un punto di vista analitico, l'autenticazione dei prodotti alimentari da agricoltura biologica è un problema difficile che è stato al centro della attenzione della comunità scientifica mondiale, come testimoniano le attività del gruppo di lavoro sulla autenticità finanziato dalla UE del progetto “AuthenticFood Core Organics”, e numerosi studi scientifici che si sono succeduti negli anni passati.

Revisioni molto dettagliate della letteratura sono disponibili sulle differenze tra prodotti biologici e convenzionali da un punto di vista nutrizionale (Lairon, 2010; Dangour et al., 2009; Brandt et al., 2011; Hunter et al., 2011)

Mentre la sola revisione delle strategie di analisi che possono essere impiegate per l'autenticazione dei prodotti biologici è quella di Capuano et al., 2013. Nel dettaglio sono riportate solo le tecniche utili per la verifica della autenticità del latte e dei prodotti caseari prodotti da allevamenti con metodo biologico.

3.4.1 Isotopi stabili

Negli animali, rapporti isotopici stabili sono determinati principalmente dalla dieta, anche se un ulteriore arricchimento degli isotopi pesanti può verificarsi durante il metabolismo. E' stato dimostrato che il latte riflette in modo molto rapido i cambiamenti degli isotopi dei mangimi. Il $\delta^{13}\text{C}$ nei mangimi dipende fortemente dal contributo relativo delle piante C_3 , C_4 e CAM.

Dato che il pascolo è composto quasi esclusivamente da piante C_3 , i livelli di $\delta^{13}\text{C}$ dovrebbero essere inferiori per il latte prodotto da mucche allocate al pascolo-o alleviate con metodo biologico.

Infatti, è stato dimostrato che i valori $\delta^{13}\text{C}$ nel latte di vacche nutrite con erba sono sensibilmente inferiori a quelli del latte di mucche alimentate con mais o grano. Molkentin e Giesemann (2007, 2009) hanno riportato una differenza sostanziale dei valori di $\delta^{13}\text{C}$ nella parte grassa del latte tra campioni di latte biologico (-28 ‰) e convenzionale (-26.6 ‰) durante tutto l'anno. Questa differenza potrebbe essere spiegata dalla diversa percentuale di mais nei mangimi. L'alimentazione di base nella fattoria tradizionale era infatti composta dal 60% di insilato di mais durante tutto l'anno,

mentre l'azienda agricola biologica utilizzava solo piccole quantità di insilato di mais durante il periodo di pascolo.

I rapporti isotopici sono però condizionati da molteplici fattori tali da rendere difficile una generalizzazione dei risultati. Gli stessi autori sopramenzionati evidenziavano nei loro articoli come i risultati dello studio erano applicabili solamente a campioni di latte puro e di origine tedesca.

Nel loro lavoro più recente, Molkentin e Giesemann (2010) segnalano una variazione stagionale dei valori $\delta^{13}\text{C}$ nelle proteine del latte biologico e nei campioni di latte tradizionali. Una netta differenza si evidenziava per tutto l'anno tra latte biologico e convenzionale, senza sovrapposizioni, e si concludeva che i valori $\delta^{13}\text{C}$ nelle proteine e nel grasso del latte sono ugualmente adatti per l'autenticazione di latte biologico, in quanto entrambi dipendono dalla percentuale di mais nella alimentazione delle vacche. Inoltre, a causa del costante frazionamento di carbonio isotopi tra proteine e grassi del latte, la determinazione simultanea dei valori $\delta^{13}\text{C}$ nelle proteine e nel grasso del latte può essere utilizzata per svelare l'aggiunta fraudolenta di grasso non biologico al latte biologico.

Per quanto riguarda gli isotopi dell'azoto, il più pesante ^{15}N è arricchito nelle proteine lungo la catena alimentare. Secondo le norme per l'agricoltura biologica, tutti i mangimi devono essere ottenuti da agricoltura biologica, preferibilmente dalla stessa azienda agricola.

Dal momento che i fertilizzanti artificiali sono vietati nella agricoltura biologica, e il concime biologico contiene relativamente più ^{15}N dei concimi chimici, che sono comunemente prodotti dalla fissazione di N_2 atmosferico, il $\delta^{15}\text{N}$ dovrebbe essere più elevato nella produzione biologica.

Al contrario, Molkentin e Giesemann (2009,2010) e Molkentin 2009 hanno osservato un più alto livello di $\delta^{15}\text{N}$ nel latte convenzionale.

Gli autori hanno ipotizzato che le mucche allevate convenzionalmente potrebbero essere state alimentate con una quantità elevata di legumi (che fissano direttamente N_2 atmosferico e quindi hanno minore $\delta^{15}\text{N}$) e / o che una quantità significativa di liquame da animali di allevamento (che ha significativamente più alto $\delta^{15}\text{N}$) sarebbe stato utilizzato in aziende agricole convenzionali

3.4.2. Acido fitanico

Acido fitanico (acido 3,7,11,15-tetrametil esadecanoico) è un acido grasso a catena ramificata che viene prodotto mediante ossidazione batterica e bioidrogenazione della catena laterale della clorofilla nel rumine. L'acido fitanico non può essere sintetizzato de novo dai mammiferi e quindi è derivato esclusivamente dall'alimentazione(Capuano et al., 2013). Per questa ragione, l'acido fitanico e il suo metabolita principale l'acido pristanico sono stati proposti come potenziali marcatori per i prodotti lattiero caseari ottenuti da allevamenti alimentati a pascolo, o allevati biologicamente dove la percentuale di erba nella dieta è più elevata.

Schoder et al. 2010 hanno studiato la variazione giornaliera dell'acido fitanico e dell'acido pristanico in campioni di latte vaccino da allevamenti biologici e convenzionali. Nel latte biologico, l'acido fitanico ha raggiunto in media il valore di 3.14 g per kg di grasso, con un livello minimo di 2,48 g per kg di grasso, mentre la concentrazione di acido fitanico più alta nel latte convenzionale era 1,77 g per kg di grasso.

Allo stesso modo, Vetter e Schroder (2010) hanno osservato che i livelli di acido fitanico nel latte e nei formaggi biologici superavano quelli dei prodotti convenzionali del 50% e che le concentrazioni di acido pristanico erano significativamente più elevate nei prodotti biologici.

I ranges di concentrazione dei due acidi grassi nelle due categorie presentavano però dei punti di sovrapposizione, rendendo così impossibile una discriminazione completa tramite la sola determinazione di questi due acidi.

Per esplorare ulteriormente l'utilità di acido fitanico come marcatore per il latte biologico, Schroder e Vetter (2011) hanno studiato la distribuzione dei due stereoisomeri dell'acido fitanico, RRR e SRR. Gli autori hanno scoperto che la quantità dello stereoisomero SRR dell'acido fitanico non superava mai il 50% in tutti i campioni di latte biologico, mentre tale valore era compreso tra 60 e 85% per i campioni prelevati da vacche allevate convenzionalmente.

Gli autori suggeriscono che il rapporto degli stereoisomeri può essere usato come uno strumento per l'autenticazione di latte biologico. È noto che la popolazione microbica nel rumine cambia a seconda della dieta dell'animale, è probabile che i batteri del rumine dominanti in condizioni alimentari caratterizzate da una grande quantità di erba

favorirebbero la produzione di acido RRR-fitanico, mentre i batteri dominanti a seguito di una dieta ricca di concentrato favorirebbero la produzione di acido fitanico SRR.

È interessante notare che la composizione in stereoisomeri di acido fitanico non è un marcatore affidabile per l'autenticazione del formaggio biologico. Infatti, anche se la percentuale dello stereoisomero SRR era generalmente superiore in campioni convenzionali, la differenza tra e formaggio convenzionale e biologico è stata meno pronunciata rispetto a quella riscontrata nel latte e i due gruppi non possono essere differenziati con metodi statistici. Gli autori hanno suggerito che potrebbero essere coinvolti dei cambiamenti post-mungitura, con i due diastereomeri di acido fitanico che potrebbero essere degradati a diversi tassi, probabilmente a causa di differenti tipi di microflora formaggio-specifiche.

Questo sottolinea la necessità di controllare l'affidabilità e la riproducibilità del biomcatore quando sono presi in considerazione alimenti trasformati

3.4.3. Acido α -Linolenic

Diversi studi riportano livelli più elevati di acido α -linolenico nel latte da allevamenti biologici, sia in campioni del mercato (Bergamo et al., 2003; Butler et al., 2011; Molkentin e Giesemann et al., 2007.) che in campioni da fattoria (Adler et al., 2010; Butler et al., 2008; Ellis et al., 2006; Prandini et al., 2009) in confronto con campioni di latte convenzionali.

Questo porta alla conclusione che una maggiore quantità di erba fresco rispetto ai mangimi da concentrati aumenta il livello di acido α -linolenico nel latte e nei prodotti lattiero-caseari.

L'effetto del regime alimentare su l'acido α -linolenico è evidente anche dal significativo effetto stagione, infatti l'acido α -linolenico ha livelli più bassi in inverno che in estate quando la maggior parte delle mucche passa da una dieta a base di pascolo ad una dieta basata principalmente su foraggi / insilati / concentrati.

Sulla base dei risultati di una vasta indagine su campioni di latte tedesco al dettaglio e di fattoria, Molkentin e Giesemann 2010 hanno proposto un valore soglia in acido α -linolenico nel latte dello 0,56% degli acidi grassi totali che consentirebbe la differenziazione completa tra latte biologico e convenzionale per tutto l'anno

Per dimostrare ulteriormente la fattibilità dell'uso dell' acido α -linolenico per l'autenticazione del latte biologico, Molkentin 2009 ha analizzato 268 campioni di latte

al dettaglio tedesche da marchi sia biologici che convenzionali. Se è considerata la variazione in l'acido α -linolenico nel corso di un intero anno, i ranges per il latte biologico e per il convenzionale si sovrappongono in una certa misura.

Sulla base di questi risultati, l'autore ha proposto un nuovo valore di soglia dello 0,50% che era stato superato da tutti i campioni di latte organici, ma anche da un significativo numero di campioni convenzionali.

Anche in questo caso l'autore ha sottolineato che i risultati sono applicabili solo al latte tedesco. Tuttavia, dati analoghi per contenuto di acido α -linolenico in latte biologico e convenzionale sono stati segnalati anche per campioni di latte al dettaglio nel UK (Butler et al., 2011; O'Donnell et al., 2010). Vale la pena sottolineare che l'aggiunta di quantità piuttosto piccole di oli vegetali ricchi di ω -3 (ad esempio olio di lino) per l'alimentazione di vacche allevate convenzionalmente aumenterebbe la concentrazione di acido α -linolenico nel latte, che andrebbe quindi a eguagliare il contenuto in latte biologico.

3.4.4. Altri acidi grassi

Molti studi hanno riportato che il contenuto di diversi acidi grassi sono significativamente diversi tra latte biologico e convenzionale.

Per esempio, il latte biologico è spesso più ricco in acido vaccenico (C18: 1 t11) (Bergamo et al., 2003; Butler et al., 2011) e in acidi grassi a catena ramificata. Il latte biologico viene anche segnalato per essere significativamente più ricco di acido linoleico coniugato (CLA) rispetto al convenzionale.

Butler et al., (2009) hanno riportato che i livelli di CLA totali e di sette isomeri di CLA (compresi C18: 2 C9, T11) erano significativamente maggiori nel latte da agricoltura biologica rispetto a quello da agricoltura convenzionale e i loro valori mostravano una forte correlazione con la percentuale di erba fresca nella dieta.

I CLA sono una miscela di isomeri posizionali e geometrici dell'acido linoleico (C18: 2) con doppi legami coniugati insaturi. Il CLA predominante negli alimenti di origine ruminante è l'isomero c9, t11, normalmente pari a circa il 80% del totale CLA. Diversi effetti benefici sulla salute sono attribuiti al CLA, come proprietà antitumorali, antidiabetiche, antiadipogeniche e antiaterogeniche.

Il contenuto di CLA ha anche dimostrato di reagire abbastanza rapidamente ai cambiamenti della dieta, tuttavia, un aumento del contenuto di CLA del latte è stato osservato anche dopo l'aggiunta alla dieta di miscele di pesce e olio di girasole, in modo che in determinate condizioni di alimentazione anche i campioni di latte convenzionali possono presentare alti livelli di CLA.

Anche il contenuto di acidi grassi ω -3 si è dimostrato significativamente più alto nel latte biologico rispetto al latte convenzionale. Il maggior contenuto acidi grassi ω -3 è ascrivibile alla maggiore percentuale di erba da foraggio nella dieta, che è ricca di acidi grassi ω -3. Tra i singoli acidi grassi ω -3, l'acido eicosapentaenoico (EPA) è spesso segnalato come significativamente più alto nel latte biologico (Schroder et al., 2010; Bergamo et al., 2003), ed è stato quindi proposto come marker per il latte biologico da Molkentin e Giesemann, (2009) che hanno dimostrato che una differenziazione completa è possibile per campioni di latte tedeschi.

Queste differenze nella composizione in acidi grassi dipendono dai differenti regimi di alimentazione che sono tipici di aziende a metodo biologico o convenzionali. Nelle aziende biologiche una dieta più ricca di erba fresca e crusca ad alto contenuto di PUFA porta allo sviluppo di specifiche popolazioni batteriche con attività più intensa e quindi si osserva l'aumento del contenuto di acido α -linolenico e degli altri acidi grassi nel grasso del latte

Tuttavia, le differenze nelle concentrazioni di acidi grassi tra i campioni biologici e convenzionali risultano meno marcate in quei Paesi in cui le aziende biologiche e convenzionali adottano regimi alimentari molto simili, come riportato da Collomb et al. (2008) negli altipiani Svizzeri e da Fall e Emanuelson (2011) in Svezia durante i periodi invernali di stabulazione al coperto quando le tipologie di alimentazione sono molto più simili.

Dato il forte effetto che la dieta esercita sul profilo degli acidi grassi e le notevoli differenze evidenziate tra latte biologico e convenzionale, un approccio multivariato che tenga conto dell'intero profilo degli acidi grassi o del contenuto di alcuni acidi grassi selezionati, potrebbe essere una strategia migliore per la discriminazione tra latte biologico e convenzionale.

3.4.5. Profilo dei Triacilgliceroli (TAG)

Capuano et al. (2013), hanno condotto uno studio sulla autenticazione del latte biologico nella primavera del 2008. Sono stati raccolti 150 campioni di latte dei Paesi Bassi, 75 da allevamenti biologici e 75 da aziende convenzionali. I campioni sono stati sottoposto ad analisi per tracciare i profili dei TAG e sono state osservate differenze significative tra i due gruppi (Test t di Student, $P < 0,05$).

Tabella 3.3. Recenti pubblicazioni su metodi per la autenticazione del latte da allevamenti biologici rispetto a convenzionale.

Composto marker	Origine del latte	Tecnica analitica	Risultati	Riferimento
$\delta^{13}\text{C}$ nel grasso del latte	Campioni di latte Tedesco da fattoria e al dettaglio	IRMS	Differenziazione quasi totale	Knobbe , et al. 2006. Kornexl et al. 1997
$\delta^{13}\text{C}$ nelle proteine del latte	Campioni di latte Tedesco al dettaglio	IRMS	Completa differenziazione	Molkentin e Giesemann 2007
$\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$	Campioni di latte Coreano al dettaglio	IRMS	Buona differenziazione	Chung et al. 2014
$\delta^{13}\text{N}$	Campioni di latte Tedesco da fattoria e al dettaglio	IRMS	Differenziazione solo parziale	Molkentin e Giesemann 2007
Acido ftannico	Prodotti casari Tedeschi	GC-MS	Buona differenziazione	Vetter e Schoreder. 2010.
Acido linoleico	Campioni di latte Tedesco da fattoria e al dettaglio	GC-FID	Buona differenziazione anche se non completa	Knobbe et al. 2006. Kornexl et al. 1997
EPA	Campioni di latte Tedesco da fattoria e al dettaglio	GC-FID	Buona differenziazione	Knobbe et al. 2006.
Profilo dei Trigliceridi	Campioni di latte Olandese da fattoria	GC-FID	Classificato correttamente 85% del latte biologico e 89% del convenzionale tramite PLS.	Capuano et al., 2013

Il latte biologico è caratterizzato da alti livelli di TAG C₄₂, C₅₂ e C₅₄ e bassi livelli di C₃₄, C₃₆ e C₃₈. Tramite il modello costruito con tecnica PLS-DA, 64 campioni dei 75 di latte biologico (85%) e 67 dei 75 campioni di latte convenzionali (89%) sono stati classificati correttamente. I risultati mostrano che le impronte digitali di questi lipidi sono un potenziale marker per l'autenticazione di latte biologico.

CAPITOLO 4

**PRIMO CASO STUDIO:LE AMMINE BIOGENE
COME MARKER DI AUTENTICITÀ E QUALITÀ
DI VINO ROSSO E SUCCO DI FRUTTA.**

4.1. Le ammine biogene

Le ammine sono derivati organici dell'ammoniaca formati per sostituzione di uno, due o tutti e tre gli atomi di idrogeno con gruppi alchilici o arilici; il doppietto non condiviso dell'atomo di azoto le rende reattive verso le altre sostanze. Le ammine biogene appartengono ad una classe di composti con struttura alquanto eterogenea e comportamenti chimico-fisici diversi. Possono essere classificate in base alla loro struttura chimica in alifatiche (putrescina, cadaverina, spermina, spermidina), aromatiche (tiramina e feniletilamina) ed eterocicliche (istamina e triptamina).

Tab 4.1. Nomi I.U.P.A.C. delle principali ammine biogene.

<i>Nome Comune</i>	<i>Abbreviazione</i>	<i>Nome I.U.P.A.C.</i>
AGMATINA	AGM	N-(4-aminobutyl)guanidine
CADaverina	CAD	1,5-Diaminoeptane
ISTAMINA	HIS	2-(4-Imidazolyl)ethylamine
PUTRESCINA	PUT	1,4-Diaminobutane
SEROTONINA	SER	5-Hydroxytryptamine
SPERMIDINA	SPD	N-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane
SPERMINA	SPM	N,N ¹ -bis(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutane
TIRAMINA	TYR	2-(4-Hydroxyphenil)ethylamine
TRIPTAMINA	TRP	3-(2-Aminoethyl)indole
ETILAMMINA	ETA	Etanamina
METILAMMINA	MEA	Metilamina
β -FENILETILAMINA	β -PEA	2-feniletilamina

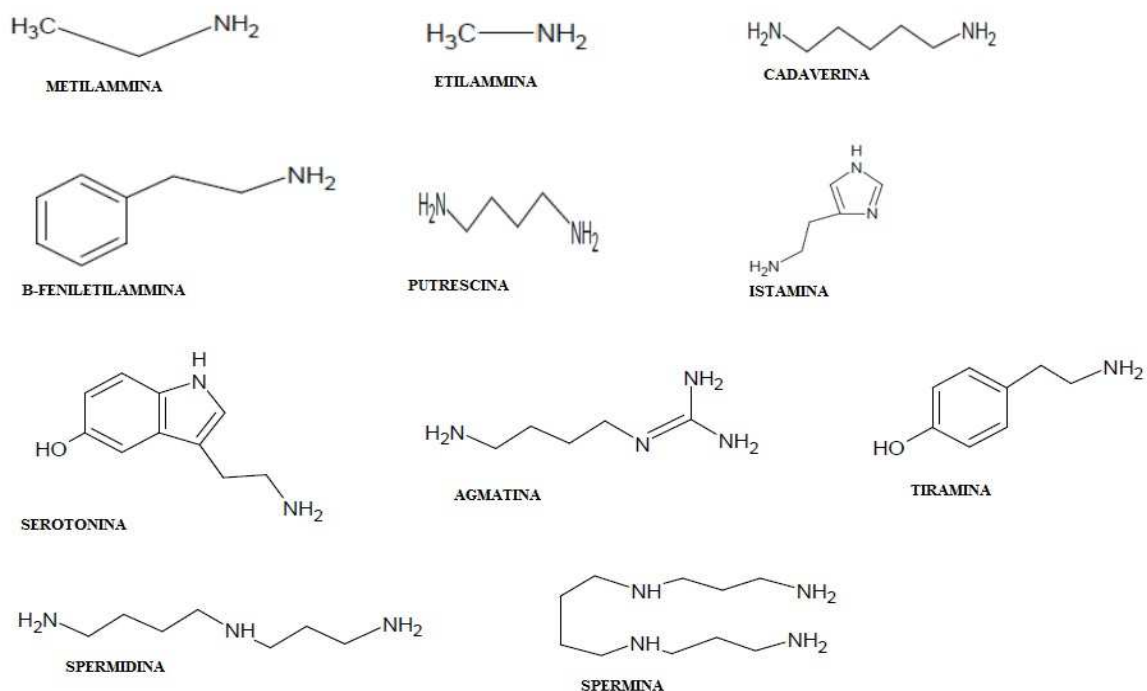


Fig.4.1. Struttura delle principali ammine biogene.

Le ammine biogene si trovano in alimenti di origine animale o vegetale nei quali si è verificata una decarbossilazione degli aminoacidi ad opera di microorganismi (Silla Santos, 1996). I percorsi metabolici hanno inizio con processi proteolitici che rendono disponibili grandi quantitativi di aminoacidi, substrati ideali per le reazioni di decarbossilazione enzimatica. Queste reazioni sono sostenute in maniera limitata da enzimi di origine endogena e in misura maggiore da sistemi enzimatici di origine microbica. Quando si verifica questa seconda evenienza la ammine assumono la denominazione di biogene. La reazione di formazione delle ammine biogene e la sua velocità dipende quindi dalla compresenza di tre fattori: disponibilità di substrato (amminoacido specifico per ogni specifica ammina), presenza di microflora decarbossilante ed infine condizioni ambientali favorevoli (temperatura e pH ottimali per la crescita dei batteri). Le ammine biogene inoltre possono derivare dalla aminazione e transaminazione di aldeidi e chetoni ad opera delle transaminasi amino acetiche. Se ingerite in elevate quantità possono risultare dannose a causa della loro azione tossica di tipo vasoattivo, psicoattivo ed ipertensivo (Onal, 2007).

Le poliammine naturali, invece, sono composti molto stabili, resistenti al calore e ad ambienti acidi o basici. Grazie alla loro struttura eseguono funzioni di controllo e

iniziazione della traslazione del mRNA per formare proteine, di stabilizzazione della struttura del tRNA , di sintesi del RNA e DNA, di regolazione della rigidità e stabilità delle membrane cellulari e agiscono come messaggeri secondari

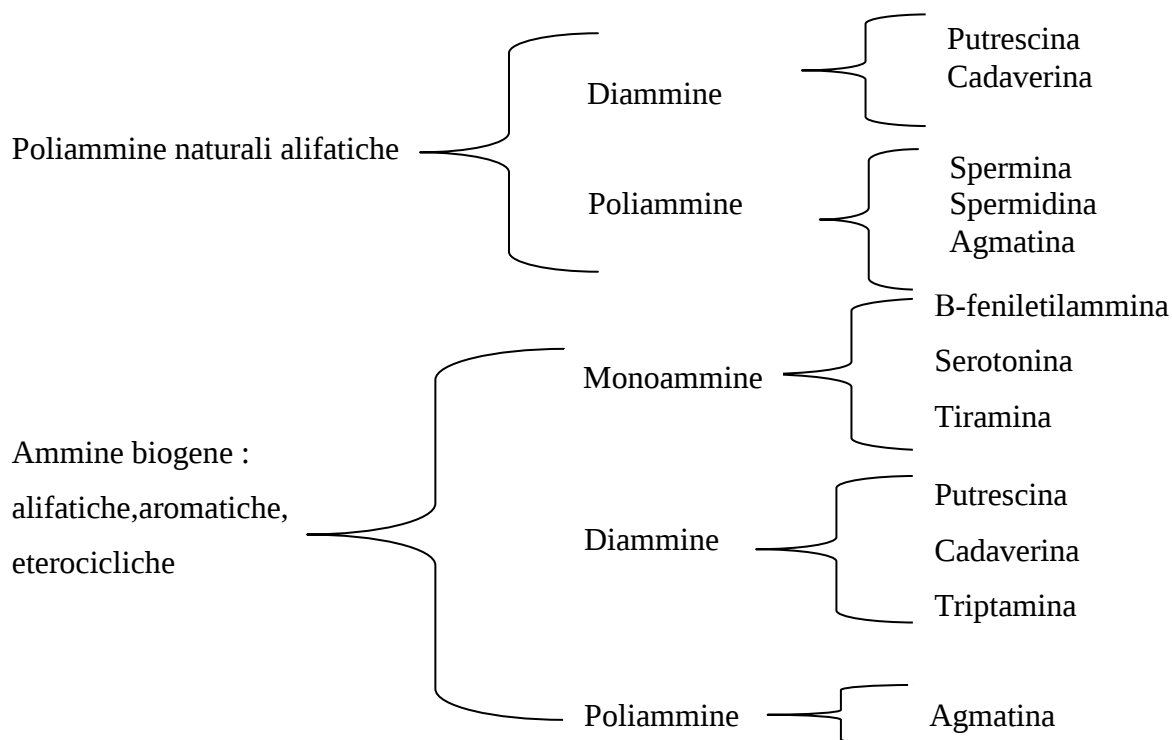


Fig. 4.2. Classificazione delle ammine.

Poliammine come putrescina, spermidina e spermina, ad esempio, sono ampiamente distribuite negli organismi viventi, sono coinvolte in molti processi di proliferazione cellulare e di mantenimento dell'omeostasi.

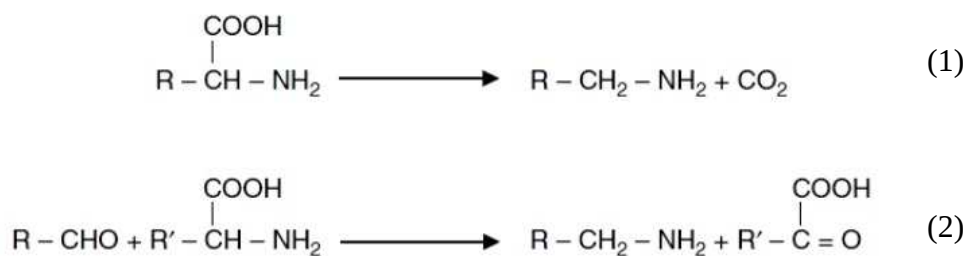
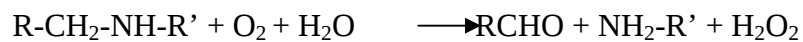


Fig.4.3. Sintesi di ammine. Decarbossilazione di amminoacidi (1) e amminazione di aldeidi (2).

Le diverse poliammine possono formarsi per biosintesi de novo dagli amminoacidi, per sintesi dalla flora batterica presente nel tratto gastro-intestinale ma la sorgente principale è rappresentata dall'alimentazione (Kalac, et al, 2005).

Nella degradazione delle ammine si verifica sempre una reazione di ossidoriduzione catalizzata dalla *ammino-ossidasi* (MAO) e dalla *aldeide-deidrogenasi* (ALDH). Le ammino-ossidasi sono enzimi molto complessi, la cui funzione consiste nell'ossidare le ammine trasferendo elettroni all'ossigeno molecolare:



L'individuo sano è in grado di ossidare le ammine biogene e le poliammine naturali tramite reazioni di acetilazione e ossidazione catalizzate da diversi enzimi come le *ammino*, *diammino* e *poliammino ossidasi*.

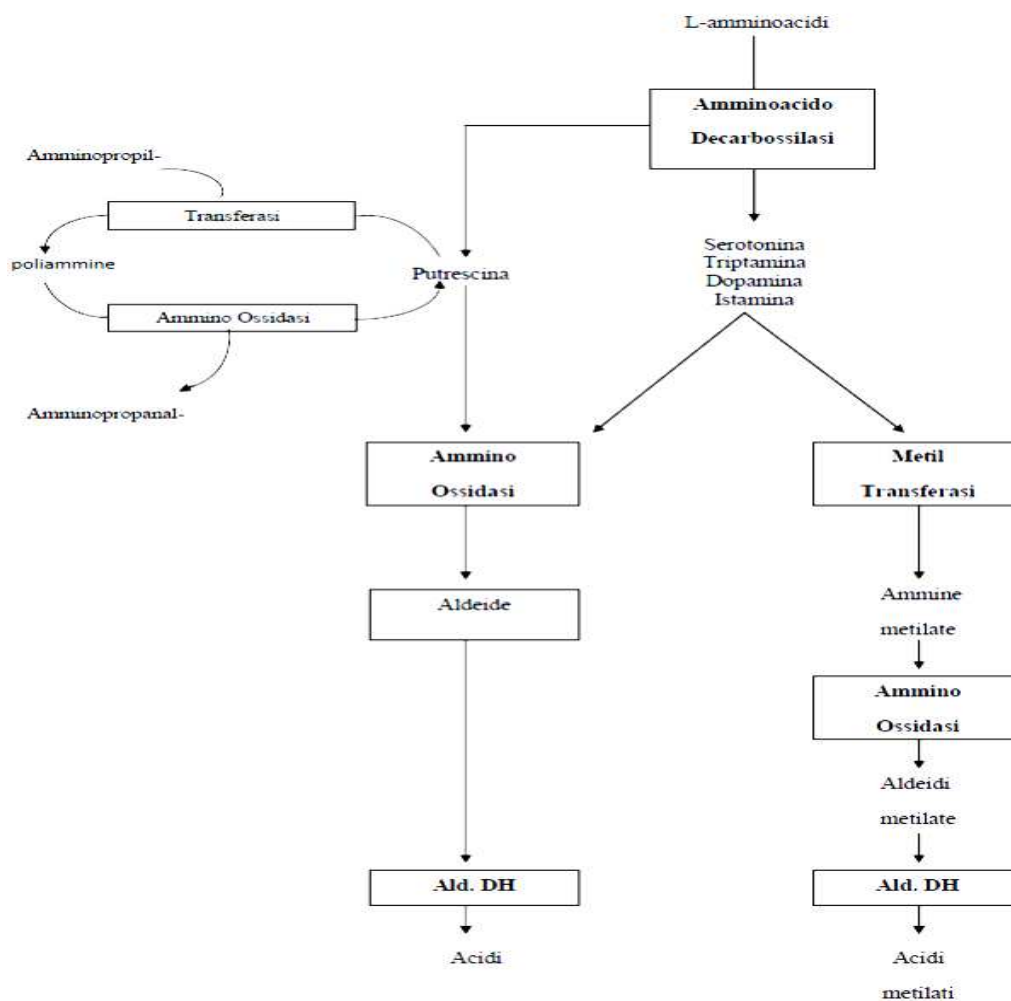


Fig. 4.4. Metabolismo delle ammine biogene e delle poliammine nei mammiferi.

Se introdotte in elevate quantità con gli alimenti o in casi di inattivazione della diammino ossidasi (predisposizione genetica, malattie gatro-intestinali, medicinali, alcool, farmaci per trattamenti anti-depressivi) il processo di disintossicazione non è in grado di eliminare tutto il contenuto di ammine biogene, che vengono così assorbite nel sistema circolatorio provocando diversi effetti.

4.1.1. Microorganismi produttori di ammine biogene

La produzione di alcune ammine biogene è stata associata a specifici gruppi di microrganismi. Ad esempio, la produzione di putrescina e cadaverina avviene in presenza di *enterobatteri*, mentre nel caso della tiramina i microrganismi maggiormente implicati sono *enterococchi* e *lattobacilli*. Alcuni ceppi sono in grado di produrre contemporaneamente più di una ammina a causa della presenza di più decarbossilasi oppure per l'azione di un singolo enzima che decarbossila diversi amminoacidi. Molti batteri Gram-negativi che comunemente contaminano gli alimenti sono in grado di produrre istamina: ad esempio *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Photobacterium phosphoreum* e *Photobacterium psychrotolerans* sono stati isolati da pesce implicato in episodi di intossicazione da istamina.

Negli alimenti fermentati, diverse specie lattiche tra cui *Oenococcus oeni*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus damnosus*, *Tetragenococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus hilgardii*, *Lactobacillus buchnerii* e *Lactobacillus curvatus* sono note per la produzione di istamina.

Nei formaggi e nei salumi fermentati i principali produttori di tiramina sono batteri Gram-positivi appartenenti al genere *Enterococcus* (ad esempio *E. faecalis* ed *E. faecium*), *Lactobacillus* (*L. curvatus* e *L. brevis*), *Leuconostoc*, *Lactococcus* e *Carnobacterium*. Anche gli stafilococchi possono avere un ruolo nella produzione di tiramina. La produzione di putrescina e cadaverina è legata, invece, principalmente alla presenza di batteri Gram-negativi, soprattutto *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Shewanellaceae* (Suzzi, 2003).

4.1.2. Ammine biogene negli alimenti

Negli alimenti si possono riscontrare diverse classi di ammine strutturalmente differenti: le ammine eterocicliche (cancerogene), che hanno origine da fenomeni di pirolisi delle

proteine e degli amminoacidi in seguito a processi di cottura; le nitrosammine (cancerogene), che derivano dal legame di ammine secondarie e terziarie con i nitrati (Jakszyn, 2004); le ammine naturali (contaminanti naturali), che sono sostanze vasoattive presenti naturalmente in alcuni vegetali e infine le ammine biogene, che vengono prodotte ad opera dei microrganismi a seguito di decarbossilazione degli amminoacidi liberi prodotti a loro volta dai processi di proteolisi che si verificano naturalmente in alcuni alimenti e bevande.

Alimenti freschi esposti a microbi contaminanti o alimenti fermentati possono sviluppare, durante la loro conservazione, un elevato quantitativo di ammine biogene che dipende principalmente dalla natura dell'alimento e dal tipo di microrganismi presenti. Per questo motivo il contenuto di ammine biogene viene correlato allo stato di conservazione e/o di freschezza dell'alimento stesso (Mardiana, 2009).

Gli alimenti in cui le ammine biogene sono più frequentemente presenti sono:

- Prodotti a base di pesce
- Prodotti a base di carne
- Prodotti caseari
- Vino
- Birra
- Vegetali
- Frutta
- Cioccolato
- Prodotti a base di soia.

Negli alimenti *non fermentati* la presenza di ammine biogene, al di sopra di certi livelli, è indicativa di una attività microbica indesiderata e quindi la loro determinazione può essere utilizzata per rilevare un deterioramento microbico. Tuttavia la presenza di ammine biogene negli alimenti non è necessariamente correlata con la presenza di microrganismi contaminanti perché non tutti hanno proprietà decarbossilasica positiva. (Silla Santos, 1996)

Pesce : differenti tipi di ammine biogene sono state trovate in diversi tipi di pesce. Gli sgombri sono spesso associati a incidenti di intossicazione da istamina. La formazione dell'istamina negli sgombri e in altri pesci contenenti grandi quantità di istidina endogena, è attribuita all'azione microbica piuttosto che all'istidina decarbossilasi

(Stute, 2002). Nel tonno, le ammine presenti in maggiore concentrazione sono spermina ($22,4 \text{ mgKg}^{-1}$) e spermidina ($6,8 \text{ mgKg}^{-1}$), nelle aringhe prevale la cadaverina ($8,5 \text{ mgKg}^{-1}$), mentre nelle sardine istamina ($19,5 \text{ mgKg}^{-1}$) e putrescina ($13,1 \text{ mgKg}^{-1}$) (Visciano et al., 2012).

Frutta, e vegetali : frutta come limone, uva, lamponi, mandarini, fragole e pompelmo contengono varie ammine biogene in differenti concentrazioni (Moret, 2005). In generale la putrescina è quella presente in concentrazione maggiore ($0,2\text{-}0,5 \text{ mg}$ su 100g di prodotto fresco). Le concentrazioni più elevate di ammine si riscontrano nel pomodoro (tiramina $14,3 \text{ mg Kg}^{-1}$, triptamina $9,3 \text{ mg Kg}^{-1}$, spermidina $9,5 \text{ mgKg}^{-1}$) (Chiacchierini et al., 2006), nella banana (tiramina $0,7\text{mg}$ su 100 g di polpa) e negli spinaci (istamina da $9,5$ a $69,7 \text{ mgKg}^{-1}$) (Lavizzari, 2007).

Succhi di frutta : lo studio delle ammine biogene nei succhi di frutta, ad oggi, è un campo non del tutto esplorato. Esistono infatti pochi studi in letteratura a riguardo incentrati su un solo tipo di succo di frutta: il succo di arancia. In generale, nel succo di arancia, la putrescina risulta l'ammina predominante ($33,6 \text{ mgL}^{-1}$) seguita dalla spermidina ($2,7 \text{ mgL}^{-1}$) (Silvia, 2007). Si possono inoltre riscontrare differenze tra i succhi di diverse marche commerciali riguardo i livelli di spermidina e spermina, in base ai valori di pH del prodotto.

Carne : la carne suina, fresca e lavorata, contiene spermidina ($0\text{-}102 \text{ mgKg}^{-1}$), spermina ($20\text{-}500 \text{ mgKg}^{-1}$) e in quantità più basse putrescina ($0\text{-}16 \text{ mgKg}^{-1}$), istamina ($1\text{-}10 \text{ mgKg}^{-1}$), cadaverina ($0\text{-}8 \text{ mgKg}^{-1}$) e tiramina ($2\text{-}15 \text{ mgKg}^{-1}$) (Capillas, 2005). Il contenuto di cadaverina può essere utilizzato per monitorare il grado di conservazione della carne bianca (pollo e tacchino) e della carne rossa (vitello) mentre la tiramina soltanto per la carne rossa (Vinci, 2002).

Latte : nel latte sono state riscontrate spermidina ($0,16\text{-}0,18 \text{ mgKg}^{-1}$) e agmatina ($0\text{-}0,18 \text{ mg Kg}^{-1}$) (Novella-Rodriguez, 2000).

Durante la preparazione dei cibi *fermentati*, la presenza di molti tipi di microorganismi facilita la formazione delle ammine biogene. La maggior parte di prodotti in cui sono presenti batteri lattici, responsabili della produzione delle ammine biogene, contengono in prevalenza grandi quantitativi di putrescina, cadaverina, istamina e tiramina (Spano, G 2010).

Formaggio e prodotti lattiero-caseari : il formaggio, dopo il pesce, è il secondo alimento implicato comunemente nell'intossicazione da istamina. Altre ammine come tiramina (1-48 mg su 100 g di prodotto), cadaverina (0,2-35,9 mg su 100g di prodotto), putrescina (0,2-18,5 mg su 100 g di prodotto), triptamina (0,9-31,2 mg su 100 g di prodotto) e feniletilammina (0,6-2,1 mg su 100 g prodotto) sono presenti in diversi tipi di formaggio. Durante la maturazione del formaggio, la caseina viene degradata lentamente dall'enzima proteolitico aumentando così il contributo di amminoacidi liberi che poi sono soggetti all'azione dei batteri decarbossilasici formando CO₂ e ammine biogene che aumentano quindi al crescere del tempo di maturazione (Innocente, 2007).

Vegetali : nei crauti sono state determinate alte concentrazioni di putrescina (5-370 mgKg⁻¹), istamina (55 mgKg⁻¹), tiramina (5-79 mg Kg⁻¹) e cadaverina (5-32 mgKg⁻¹) (Kalac, 2001).

Carne : Nelle salsicce semisecche e secche, che si differenziano per la diversa durata della fermentazione, è stato notato un incremento della concentrazione di istamina di almeno 10 volte durante i primi 3 giorni di maturazione. Le ammine presenti in quantità maggiore sono tiramina (150-320 mgKg⁻¹), putrescina (1-580 mgKg⁻¹) e cadaverina (1-790 mgKg⁻¹) , ma la presenza delle diammine può essere variabile (Latorre-Moratalla, 2008). Nei prosciutti crudi e cotti le ammine maggiormente presenti, al primo giorno di conservazione sono spermidina (2,3 mgKg⁻¹) , tiramina (1,46 mgKg⁻¹) e spermina (27,40 mgKg⁻¹); esse aumentano notevolmente durante il periodo di conservazione (Ruiz-Capillas, 2007).

Vino e birra : Le ammine biogene più comunemente trovate in diverse qualità di vino rosso sono putrescina (0,2-72,0 mgL⁻¹), metilammina (0,06-3,2 mgL⁻¹), etilammina (0,1-28.5 mgL⁻¹), cadaverina (0,4-4 mgL⁻¹) e istamina (0,02-16,5 mgL⁻¹). Altre ammine presenti in minori concentrazioni come la spermina (0,1-1,7 mgL⁻¹) la spermidina (0,1-2.0 mgL⁻¹) sono costituenti della materia prima (Soufleros et al, 2007). Agmatina, cadaverina, etanolammina, istamina, putrescina e tiramina, sono prodotte durante la fermentazione alcolica. Queste insieme a 2-feniletilammina, triptamina, iso e n-amilina, pirrolidina, iso e n-butilamina, iso e n-propilamina sono presenti sia nel vino rosso che in quello bianco. Le ammine volatili diminuiscono durante la fermentazione e, in alcuni casi, vengono rilasciate dal vino durante l'autolisi dei lieviti oppure si formano durante lo stoccaggio. Istamina, tiramina e putrescina si possono sviluppare invece durante la

fermentazione malo-lattica del vino, successiva alla fermentazione alcolica, ad opera dalla microflora della fermentazione secondaria che porta il vino a maturazione (Bauza et al.,1995). Le ammine non volatili si formano dalla decarbossilazione degli amminoacidi, mentre le altre volatili (metilammina, etilammina , isoamilammina) derivano da composti non azotati come aldeidi e chetoni tramite processi di riduzione.

La concentrazione di ammine nel vino dipende da diversi fattori come il tipo di lieviti responsabili della fermentazione, la durata della macerazione e le condizioni di fermentazione. Infatti studi recenti (Charlton, 2010) prevedono che la presenza delle ammine biogene nel vino dipenda dalla composizione del mosto d'uva, la quale dipende a sua volta dalla varietà degli acini, dalla nutrizione della vite e dal metabolismo dei fermenti. I processi di produzione del vino che prevedono il contatto con le fecce di lievito portano ad un più alto contenuto di ammine dovute al rilascio delle ammine cellulari in seguito all'autolisi dei lieviti. Inoltre anche condizioni igieniche non soddisfacenti durante la produzione comportano alte concentrazioni di ammine. Il pH è un fattore molto importante che influenza l'attività biologica dei batteri e agisce come selezionatore dei microrganismi nel vino. A pH alti le ammine biogene vengono prodotte in elevate quantità, come conseguenza di una crescita più facile e di una grande diversità di specie batteriche. I vini bianchi, infatti, generalmente più acidi dei rossi, contengono quantitativi di ammine biogene inferiori. Differenti batteri acido-lattici sono coinvolti nella formazione delle ammine biogene, ad esempio il *Lactobacillus* è considerato il responsabile per la produzione di tiramina nel vino. Lo stoccaggio del vino influisce sul contenuto di ammine in maniera non uniforme, ma in particolare l'invecchiamento in botti di quercia, favorisce l'incremento di putrescina e cadaverina in piccole entità.

Nella birra invece sono state rilevate tiramina ($0-20 \text{ mgL}^{-1}$), spermina ($0-2 \text{ mgL}^{-1}$) e istamina ($0-20 \text{ mgL}^{-1}$), quest'ultima in concentrazioni elevate nelle birre svedesi, danesi e belghe. Le quantità di ammine biogene presenti possono essere utilizzate per valutare la qualità del processo di produzione della birra (Loret, S., 2005).

La produzione di ammine biogene negli alimenti richiede la disponibilità di precursori (aminoacidi), la presenza di batteri in grado di sintetizzare le aminoacido-decarbossilasi e condizioni favorevoli alla loro crescita. La quantità e il tipo di ammine biogene presenti negli alimenti sono fortemente influenzati dalle caratteristiche intrinseche degli

alimenti tra cui il pH, la composizione e la tipologia di microflora presente, nonché da parametri estrinseci, quali tempo di conservazione e temperatura, che permettono la crescita batterica durante la lavorazione e lo stoccaggio.

4.1.3. Rischi per l'uomo e intossicazione da istamina

Il consumo di cibo contenente alte concentrazioni di ammine biogene può avere effetti tossici, anche se alcune di tali ammine sono necessarie per molte delle funzioni umane.

In generale, per tutte le ammine biogene tossiche, i sintomi sono simili: nausea, disturbi gastrici, sofferenza respiratoria, vampate di calore, sudorazione, palpitazioni cardiache, mal di testa, capogiro, arrossamenti cutanei o sfoghi di vario genere, prurito, infiammazione orale, ipotensione, ipertensione, influenza sull'attività vascolare (vasodilatazione, vasocostrizione) e quindi rischio di collasso e effetti psicoattivi (sull'umore) attraverso l'azione sui neurotrasmettitori.

Nel tratto intestinale dei mammiferi, esiste un efficientissimo sistema di disintossicazione basato su enzimi che ossidano i gruppi amminici delle ammine biogene : monoamminossidasi (MAO), diamminossidasi (DAO) e Istamina-N-metiltransferasi (HMT).

Essi sono perfettamente in grado di sostenere la detossificazione di una concentrazione di ammine media dovuta al normale consumo di cibo, ma risulta praticamente impossibile calcolare per la maggior parte delle ammine una dose giornaliera accettabile (ADI, Admissible Daily Intake) per l'uomo, così come non ci sono sufficienti dati tossicologici per individuare dosi prive di effetti tossici (NOAEL, No Observed Adverse Effect Level) negli animali da laboratorio, poiché inoltre questi effetti si potenziano in corrispondenza dell'azione combinata di più ammine biogene differenti.

Quando alte concentrazioni di ammine biogene vengono ingerite, i sintomi si manifestano all'incirca entro 5 minuti. Questa rapidità suggerisce che l'assorbimento di una piccola parte delle ammine avvenga attraverso la membrana delle mucose orali, non interessando quindi le amminossidasi intestinali.

La dose considerevole dannosa dipende fortemente dall'efficienza della disintossicazione, che può essere di per sé bassa o assente in soggetti immunodeficienti (per esempio coloro che soffrono di patologie gastrointestinali) o nei neonati, o in presenza di sostanze inibitrici dell'azione degli enzimi ossidasi. L'uso di sostanze quali

l'alcol o alcuni tipi di medicine (come antimalarici o antidepressivi) o di droghe, comporta l'inibizione dell'ossidazione delle ammine e quindi gli effetti tossici sopra descritti si verificano, anche in presenza di piccole dosi di ammine biogene. Anche le ammine che agiscono da "potenziatori" dell'effetto tossico dell'istamina producono lo stesso effetto, perchè inibiscono irreversibilmente l'azione delle ossidasi (tiramina per il MAO, triptamina per il DAO, feniletilamina per l'HMT).

L'istamina è un composto azotato coinvolto nei meccanismi digestivi, nella risposta infiammatoria e come neurotrasmettitore in diverse funzioni cerebrali. Nel corpo umano, l'istamina si forma per decarbossilazione dell'amminoacido L-istidina, attraverso una reazione catalizzata dall'enzima istidina decarbossilasi; la sua degradazione è invece affidata all'istaminasi (Shalaby, 1996).

Tab. 4.2. Effetti delle principali ammine biogene e amminoacidi precursori

<i>Precursori</i>	<i>Ammine</i>	<i>Effetti farmacologici</i>
Istidina	Istamina	Liberazione di adrenalina e noradrenalina; eccitazione nella muscolatura liscia dell'utero, dell'intestino e dell'apparato respiratorio; stimolazione del sistema nervoso motorio sensoriale; controllo della secrezione gastrica
Tirosina	Tiramina	Vasocostrizione; incremento del battito cardiaco; emicrania; salivazione; lacrimazione; rilascio di noradrenalina dal sistema nervoso simpatico
Ornitina e lisina	Putrescina e cadaverina	Ipotensione, ipertensione bradicardica, paresi delle estremità, tossicità sinergica con altre ammine
Fenilalanina	β -feniletilamina	Rilascio di noradrenalina dal sistema nervoso simpatico; aumento pressione sanguigna; emicrania
Triptofano	Triptamina	Incremento pressione sanguigna
	Agmatina	Incremento tossicità dell'istamina
Idrossitriptofano	Serotonina	Depressione, schizofrenia, emicrania, ansietà, panico, encefalopatia

Le contrazioni causate dall'istamina nei muscoli lisci dell'intestino, mediate dai recettori H_1 , conducono a crampi addominali, diarrea e vomito. I recettori H_2 , situati

sulle cellule parietali dello stomaco, mediano la stimolazione della secrezione gastrica. Causano inoltre la dilatazione dei vasi sanguigni periferici, dei capillari e delle arterie; stimolano il cuore liberando adrenalina e noradrenalina dalle ghiandole surrenali (palpitazioni), i muscoli lisci dell'utero, del tratto respiratorio (affanno, broncospasmi, soffocamento), i neuroni sensoriali e motori. I recettori H_3 e H_4 invece inibiscono il rilascio dei neurotrasmettitori e svolgono azione di immunomodulazione.

I casi di intossicazione da istamina sono noti come “Avvelenamenti da sgombro”, in riferimento al cibo in cui si riscontra in maggiori quantità. Altre ammine, quali ad esempio feniletilamina, triptamina, putrescina e cadaverina sembrano agire da potenziatrici dell'istamina aumentandone l'assorbimento a livello gastro-intestinale e rallentandone la degradazione.

E' stato verificato che gli effetti tossici dell'istamina si moltiplicano per 10 se essa viene somministrata anche solo 40 minuti dopo putrescina o cadaverina, oppure dopo spermina o spermidina, le quali incrementano la velocità del trasporto di istamina attraverso la parete gastrointestinale (*Alini, 2006*).

Nell'organismo umano l'istamina viene degradata per azione di metiltransferasi, monoamino (MAO) e di aminoossidasi (DAO). Nelle persone con insufficienza primaria di MAO o che assumono farmaci anti-MAO (antidepressivi), l'istamina non viene degradata correttamente e pertanto questi soggetti sono più facilmente esposti al rischio d'intossicazione.

4.1.4. Normativa vigente e limiti massimi proposti in materia di ammine

I noti fenomeni di sinergismo tra ammine biogene, alcool e acetaldeide delle bevande, gli stili alimentari che possono favorire esposizione multipla al pericolo, hanno sollecitato negli ultimi anni la UE e la FDA (Food and Drug Administration) ad emanare normative che intervengano sul controllo della filiera produttiva, ma ancora non si è raggiunta una normativa pienamente valida sull'emanazione/armonizzazione dei limiti delle ammine biogene negli alimenti e nelle bevande alcoliche.

È difficile infatti poter stabilire il livello di tossicità di una determinata ammina biogena negli alimenti in quanto questo dipende da :

1. Sensibilità dell'uomo;

2. Composizione dell'alimento;
3. Compresenza di altre ammine con azione sinergica.

Per quanto riguarda i limiti di legge, solo la Svizzera ha introdotto un limite di legge per l'istamina di 10 mg/L per i vini, poi eliminato nel 2008 per adeguare le proprie normative agli standards europei. Un limite di 2 mg/L è stato suggerito in molti studi e dal programma di ricerca europeo COST. Se questo criterio trovasse applicazione, la maggior parte dei vini rossi europei si troverebbe fuori mercato.

Tab. 4.3. Limiti regolamentati e proposte di regolamentazione dei livelli di ammine biogene negli alimenti (Vinci, 2009)

<i>Ammine</i>	<i>Alimento</i>	<i>Paese proponente</i>	<i>Livello di accettabilità (mg/Kg)</i>
Ammine totali	Generico		100
	Farine		40
istamina	Pesce fresco	Svizzera, U.E. ▼	<100
	Pesce	Germania, U.E. ▼	<200
	Pesce fermentato	Usa-FDA ▼	<500
	Vegetali		50÷100
Tiramina	crauti		10
	Alimenti vari		100
b-feniletilammina	crauti		20
	Alimenti vari		30
putrescina	crauti		5
	Pesce		300
cadaverina	crauti		50
	Pesce		300
	crauti		25

▼= limiti regolamentati

Nel caso degli alimenti ittici la concentrazione massima consentita è di 200 mg/kg (Regolamento CE 2073/2005), e di 400 mg/kg per la salsa di pesce prodotta mediante fermentazione di prodotti della pesca (Regolamento UE 1019/2013). Negli USA il livello corrispondente definito dalla USFDA è di 500 mg/ kg per i prodotti ittici freschi.

Una valutazione recente ha proposto per i formaggi una soglia limite per i formaggi di 500 mg/kg e di 400 mg/kg per le salsicce fermentate (Rauscher-Gabernig et al., 2009)

In generale, si può affermare che una quantità di istamina pari a 8-40 mg per Kg di alimento può causare una leggera intossicazione, mentre quantitativi da 20 a 1000 mg per Kg di alimento comportano una moderata intossicazione e livelli superiori a 1000 mg/Kg di alimento una grave intossicazione; valori superiori a 100 mg per Kg di alimento di tiramina possono provocare emicrania, mentre 1080 mg/Kg di alimento potrebbero causare effetti tossici di gonfiore e una quantità maggiore di 40 mg di ammine biogene per pasto è considerata potenzialmente tossica (Cattaneo,2011).

4.2. Metodi analitici per la determinazione delle ammine biogene

Vari metodi sono stati sviluppati per la determinazione qualitativa e quantitativa delle ammine biogene in varie matrici alimentari. Tutti questi metodi constano di tre fasi:

1. estrazione;
2. purificazione e concentrazione dell'estratto;
3. identificazione e determinazione degli analiti.

L'estrazione delle ammine, generalmente acida, rappresenta la fase critica del processo in quanto influisce negativamente sui recuperi analitici. Essa è necessaria a causa della complessità delle matrici, della presenza di composti interferenti e della presenza simultanea di più ammine biogene nella stessa matrice. La fase di estrazione deve essere il più selettiva e quantitativa possibile, riducendo al minimo le sostanze interferenti co-estratte. A partire da una matrice solida, l'estrazione prevede solitamente una omogeneizzazione in presenza di un acido diluito come l'acido perclorico, l'acido tricloroacetico, l'acido cloridrico, il metanolo e altri solventi organici.

Lo step di purificazione si esegue, di seguito, per ridurre gli interferenti estratti e per ottenere un arricchimento della concentrazione dell'estratto. Questo processo è influenzato da diversi fattori come la natura della matrice, il pH dell'estratto, tipo di solventi usati nell'estrazione liquido-liquido e tipo di sale usato per la saturazione. I due processi di purificazione più utilizzati sono la ripartizione liquido-liquido e la ripartizione solido-liquido. La ripartizione liquido-liquido, che si effettua scegliendo diverse miscele di solventi organici, permette di allontanare gli interferenti idrofilici e trasferisce gli analiti in un solvente basso bollente facilmente eliminabile per evaporazione. Presenta però alcuni svantaggi come l'uso elevato di solvente organico, la possibile formazione di emulsioni e la difficile automatizzazione del processo.

La ripartizione solido-liquido (SPE : Solid-Phase-Extraction) si effettua scegliendo opportuni solidi adsorbenti che permettono di intrappolare gli interferenti dalla soluzione da analizzare. La scelta del materiale adsorbente è funzione del solvente in cui sono disciolte le ammine e dal tipo di sostanze interferenti da eliminare. Questa tecnica presenta diversi vantaggi come una ridotta manipolazione del campione e una notevole diminuzione dei volumi di solvente. I tipi di adsorbenti più utilizzati per le ammine biogene sono la silice chimicamente modificata con gruppi alchilici idrofobici a 8 o 18 atomi di Carbonio (C8 e C18 rispettivamente) o cartucce a scambio ionico.

Dopo aver concentrato il campione si passa alla fase di rivelazione che prevede l'uso di sistemi sensibili e selettivi.

I metodi di determinazione più utilizzati sono quelli cromatografici tra cui la cromatografia su strato sottile (TLC), la cromatografia a scambio ionico, la cromatografia gassosa (GC) e la cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) (Onal, 2013). Per quanto riguarda la cromatografia liquida si possono impiegare diversi tipi di rivelatori come l'UV-visibile, lo spettrofluorimetro e un rivelatore elettrochimico che richiedono una preventiva fase di derivatizzazione. La derivatizzazione pre- o post-colonna è necessaria nel caso vengano utilizzati rivelatori spettrofotometrici poiché non tutte le ammine hanno a disposizione gruppi cromofori. I più comuni derivatizzanti sono il dansil-cloruro (DNSCl), il dabsil-cloruro (DABSCl) e l'orto-ftalaldeide (OPA). Tra i diversi agenti derivatizzanti il dansil-cloruro viene utilizzato più frequentemente in quanto a differenza degli altri reagisce con tutti i tipi di ammine (primarie, secondarie e terziarie) formando derivati stabili (Charalampous 2008).

Più recentemente, per eliminare la derivatizzazione, sono stati proposti metodi come l'elettroforesi capillare e tecniche ifenate come LC-MS (cromatografia liquida – spettrometria di massa) per la determinazione delle ammine biogene tramite iniezione diretta. La LC-MS permette di riconoscere la struttura chimica degli analiti, ha un'alta risoluzione ma richiede una strumentazione molto costosa e personale altamente specializzato.

Le tecniche GC e HPLC sono maggiormente utilizzate quando nella stessa matrice sono presenti più ammine biogene e quindi è necessario disporre di procedure analitiche che permettano la loro separazione ed identificazione nella stessa aliquota di estratto.

Tab. 4.4. Alcuni metodi HPLC per la determinazione delle ammine biogene

Ammine biogene	Matrice	Fase stazionaria	Fase mobile	Derivatizzante/ Rivelatore	Reference
CAD PUT HIST TYR TRYP AGM ISO MET ETA	Vino rosso	C 18	Acqua/ acetonitrile	Cloruro di Dansile/ Fluorimetro	Charalampos et al. 2007
CAD PUT HIST TYR 2-PHE ISO ETA SPD	Vino rosso	C 18	Acqua/ acetonitrile	Cloruro di Dansile/ DAD	Martuscelli et al. 2013
AGM, HIS, PEA, PUT, TRP, TYR	Tonno in scatola	HILIC UHPLC	Formiato d'ammonio/ Acetonitrile	MS	Self et al. 2011
SPD, SPM, PUT, HIS, TYR, PEA	formaggi o	C 18	Acqua/ acetonitrile	Cloruro di Dansile/ UV λ = 254nm	Restuccia et al (2011)
PUT, HIS, TYR, PEA, SPM, SPD, TRP	Birra	C18	Tampone acetato / acetonitrile	4-Chloro-3,5- dinitrobenzotri- fluoride (CNBF) UV λ = 254nm	Tang et al., 2009
PUT, CAD, HIS, TYR, SPD, SPM	Prosciutt o crudo	C18	Acqua/acetornitr ile	Cloruro di Dansile UV λ = 254nm	Alfaia et al. (2004)
PUT, HIS, TYR, SPM, SPD, AGM, SYN, OCT	succo di arancia	C18	tampone acetato/acetonitr ile	o-Phthalaldeide (OPA) fluorimetro	Veira et l., 2007

In particolare, il metodo HPLC accoppiato con rivelatore UV è adatto per la separazione di composti non abbastanza volatili e termolabili, che quindi non possono essere separati con la GC. Importante è la scelta del rivelatore quando si utilizza il sistema HPLC. Il rivelatore UV è maggiormente utilizzato in quanto soddisfa esigenze di

selettività, applicabilità e affidabilità, mentre il rivelatore fluorimetrico viene utilizzato principalmente nelle determinazioni delle singole ammine biogene essendo selettivo e sensibile a livello delle parti per bilione (ppb, $\mu\text{g L}^{-1}$). (Onal, 2013)

Un altro metodo che può essere utilizzato per la determinazione delle ammine biogene è la cromatografia su strato sottile (TLC). Si tratta di un metodo rapido, economico che presenta diversi vantaggi come la semplicità, la versatilità e l'applicabilità a un largo numero di campioni in poco tempo e bassi costi in termini di reagenti, ma non presenta una elevata sensibilità (Lapa-Guimaraes, 2004).

Recentemente, ottimi risultati nella determinazione delle ammine biogene vengono raggiunti tramite la tecnica UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography, che lavora con gli stessi principi della tecnica HPLC avendo però maggiore sensibilità, più alta risoluzione e permettendo analisi più veloci. Tuttavia questa è una strumentazione molto costosa quindi non disponibile per tutti i laboratori di analisi (Dadakova, 2009).

4.3. Le ammine biogene come marker di autenticità

4.3.1 Nei vini

La presenza di ammine biogene nei vini è stata studiata ampiamente per 30 anni e in particolare negli ultimi 10 anni, come conseguenza della crescente attenzione alla tutela dei consumatori. Lo studio di ammine biogene nei vini è interessante per due motivi: il rischio tossicologico associato con il contenuto di ammine biogene e la valutazione di condizioni igienico-sanitarie che si verificano durante il processo di vinificazione (Galgano et al., 2009).

Le ammine biogene sono naturalmente presenti nel vino ed è molto difficile, se non impossibile, ottenere un vino che non le contenga. La concentrazione di ammine biogene nel vino varia da pochi a circa 50 mg / L e il tipo e la concentrazione delle ammine dipende da diversi fattori: il tempo di contatto con le bucce del mosto d'uva, gli aminoacidi contenuti nelle fasi iniziali e finali della fermentazione alcolica, il tempo di contatto del vino con i lieviti, ma anche il tipo e il grado di maturazione dell'uva, il clima e il terreno della zona di viticoltura, e le tecniche di vinificazione potrebbero contribuire per il vino ammine biogene contenuto (Arvanitoyannis et al., 1999).

In particolare, sono stati osservati da vari autori aumenti nella concentrazione di BA durante la fermentazione malolattica, specialmente per la putrescina e durante l'invecchiamento (Bover-Cid et al., 2006; Bauza et al., 1995; Bauza et al., 2007). Particolare attenzione deve essere rivolta ad alcune pratiche enologiche frequentemente utilizzati per migliorare la complessità del vino (sapore e aroma), ma che possono anche aumentare la concentrazione degli acidi precursori aminoacidi, come ad esempio l'invecchiamento dei vini con fecce con tempi di macerazione più lunghi. Lieviti, batteri e fecce possono indirettamente svolgere un ruolo importante nella produzione di ammine biogene, poiché incidono sulla composizione aminoacidica durante la fermentazione alcolica o durante l'autolisi e possono anche essere una fonte di enzimi decarbossilasi che potrebbero essere coinvolti nella produzione di ammine. Inoltre, anche il tipo di contenitore impiegato durante la fermentazione malolattica (acciaio inossidabile o botte di rovere) sembra influenzare il contenuto di ammine biogene di vini, infatti si osserva un'aumento della presenza di putrescina e cadaverina nei vini rossi invecchiati in botti di rovere (Galgano et al., 2009).

Un altro parametro che è importante per la presenza di questi contaminanti naturali è pH, che risulta significativamente correlato con putrescina, cadaverina e tiramina. Molti studi correlano la formazione di BA con elevati valori di pH nel vino che influenza la crescita delle specie di batteri che partecipano al micro biota dei vini, e quindi la loro attività malolattica. Un pH sotto 3.3 potrebbe causare un difficile fermentazione malolattica, ma un pH elevato può aumentare la suscettibilità del vino a deterioramento microbico. Alcuni autori hanno stabilito un livello critico tra pH 3,5 e 3,6, sopra il quale è più difficile controllare la popolazione di microrganismi, con la possibilità di problemi derivanti a causa della produzione di BA (Faustini et al., 2005; Martín-Alvarez et al., 2008; Villamiel et al., 2008).

Per quanto riguarda la relazione tra BA e grado alcolico, esso è considerato uno dei parametri che influenzano le attività di decarbossilazione degli aminoacidi da parte dei batteri coinvolti nella fermentazione malolattica. La correlazione positiva tra grado alcolico e presenza di ammine biogene nel vino dovrebbe essere evidenziata a causa del possibile effetto sinergico delle ammine biogene con l'etanolo, che può rappresentare un rischio significativo per alcuni consumatori.

A seguito di queste evidenze, il contenuto di ammine biogene è stato proposto come criterio per discriminare diversi tipi di vini provenienti da paesi o regioni differenti (Héberger Ket al., 2003; Herbert et al., 2005).

La caratterizzazione chimica dei vini rossi da diverse regioni geografiche basata sia sul contenuto in polifenoli totali che su quello in ammine biogene, è stato riportato in letteratura per vini brasiliani, ungheresi (Mota et al., 2009; Csomós et al., 2002) e del Sud Italia (Galgano et al., 2011).

4.3.2. Nei succhi di frutta

Le ammine biogene formate dalla decarbossilazione microbica dei corrispondenti amminoacidi, sono naturalmente presenti negli alimenti. Alcune di loro sono riportate come specifiche di alcune specie vegetali, dove esercitano essenziali funzioni metaboliche, e che quindi può essere utilizzato come indice chemotassonomico al fine di attestare l'autenticità del cibo (Wheaton & Steward, 1965;. Vieira et al, 2007, Santiago -Silva et al., 2011).

La loro presenza in cibi diversi può essere anche legata alle condizioni igienico-sanitario e di deterioramento in modo tale da essere considerato un indicatore di qualità alimentare (Lima e Gloria, 1999; Silla Santos, 1996).

Le informazioni sui tipi e livelli di amine bioattive in frutta e prodotti è scarsa. Finora, nella letteratura internazionale, solo due opere descrivono la presenza di ammine biogene nei succhi di frutta, in particolare nei succhi di arancia. Vieira et al. 2007, hanno analizzato il profilo e il livello di ammine biogene in succhi d'arancia e bevande analcoliche a base di arancia; tra le nove ammine determinate la putrescina risultava essere la predominante, seguita da sinefrina e spermidina.

Risultati simili sono stati ottenuti Basheer et al. 2011 nella analisi di succhi d'arancia di marche diverse. Nessun altro lavoro è stato pubblicato ad oggi in letteratura sul profilo di ammine biogene in succhi di frutta di altri frutti, ad eccezione di due articoli che riguardano però solo le poliammine (Cipolla et al, 2007; Ali et al 2011.),

Inoltre ad oggi non sono presenti in letteratura ricerche che esplorino la possibilità di utilizzare questi composti come indicatori di autenticità di queste matrici.

4.4. Scopo del lavoro

Scopo di questa primo caso studio è stato quello di determinare 11 ammine biogene in campioni di vino rosso italiano appartenenti a diversi vitigni e provenienti da diverse regioni di origine, al fine di valutare se la distribuzione delle ammine fosse differente e caratterizzante il vitigno e/o della zona di origine.

Per i succhi e nettari di frutta il primo obbiettivo è stato di una valutare il profilo e il contenuto di ammine in queste bevande per la prima volta in letteratura. Il contributo di queste bevande all'intake giornaliero di ammine può essere importante al fine di una corretta valutazione dell'assunzione giornaliera totale e dei suoi effetti sulla salute, oltre ad essere un importante parametro di controllo della qualità delle materie prime e del processo produttivo.

Come secondo obbiettivo nei succhi e nettari di frutta è stato quello di verificare le potenzialità di uso del fingerprinting di questi composti come marker capaci di differenziare i rispettivi tipi di frutta al fine di verificare adulterazioni di queste bevande tramite tecniche chemiometriche. L'analisi delle componenti principali (PCA) e cluster analysis (CA) sono stati scelti come i metodi più frequentemente impiegati per l'esplorazione iniziale dei dati il clustering dei campioni di (Berrueta et al., 2007), poi la analisi linear discriminant è stata applicata per verificare il modello.

4.5. Ottimizzazione del metodo analitico

Le analisi di autenticità dei prodotti alimentari sono caratterizzate, come evidenziato in precedenza, dalla necessità dell'analisi di un grande numero di campioni, al fine di ottenere un modello rappresentativo della realtà produttiva presa in esame.

Questo comporta quindi grandi investimenti in termini economici e di tempo per avere dei risultati affidabili.

Il primo obbiettivo della nostra ricerca è stato quindi quello di sviluppare e ottimizzare un metodo analitico più veloce e con consumo di solventi ridotto al fine di rispondere ai requisiti di una chimica sostenibile, oltre a quello di avere risultati in minor tempo.

A questo scopo è stata utilizzata un colonna cromatografia per HPLC caratterizzata da un impaccamento con particelle core-shell che hanno un 1,7 micron nucleo solido avvolto in uno strato poroso o guscio di una silice adsorbente 0,5 micron, con una

dimensione finale delle particelle di 2,6 micron. (Figura 4.5). Questa combinazione di materiali fa sì che la colonna cromatografica abbia una velocità ed una efficienza simili alle colonne impaccate con sub-2µm particelle totalmente porose ma al contempo riesce a mantenere bassa la pressione tale da poter essere utilizzato su uno strumento HPLC convenzionale (Gritti, et al., 2010; Guiochon and Gritti, 2012; Gritti and Guiochon, 2013; Fekete et al., 2012).

Ciò è particolarmente vero per le particelle core-shell sub-3µm perché offrono una molto ridotta altezza del piatto teorico e minore contropressione rispetto al sub-2µm particelle totalmente porose (Wang et al., 2012). Per questi motivi, le colonne con questa tecnologia innovativa sono state già applicate con successo all'analisi di vari composti in diversi alimenti (Kaufmann & Widmer, 2013; Chocholou et al., 2013) e matrici ambientali (Vinci et al., 2013).

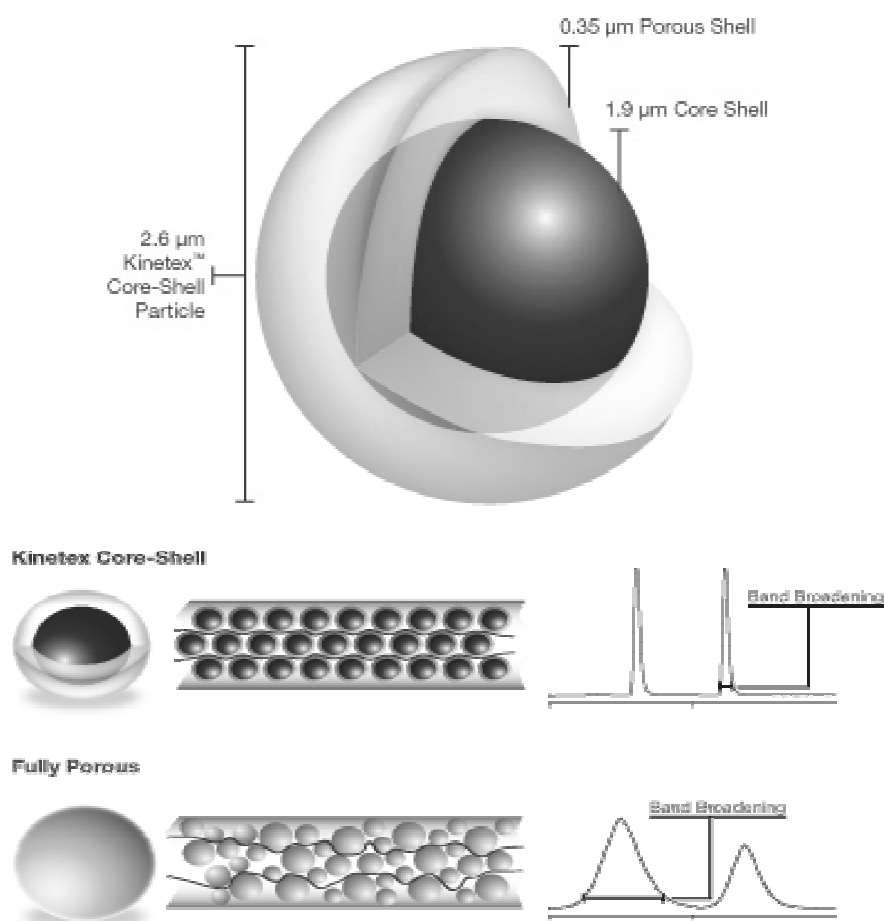


Fig.4.5. Caratteristiche della colonna pinete core shell con particelle 2.6 um

Le caratteristiche di questa colonna consentono di aver prestazioni in termini di velocità della corsa cromatografica (ridotta anche di 10 volte rispetto alle colonne convenzionali) , di risoluzione e la riproducibilità dei picchi paragonabili a quelli ottenute con colonne sub 2 μm totalmente porose per UHPLC, senza però costringere il laboratorio di analisi all'oneroso acquisto di questo tipo di apparecchiatura, in quanto le pressioni di esercizio delle colonne core shell possono essere compatibili con un classico strumento HPLC (< 400 bar).

4.5.1. Materiali e metodi

4.5.1.1. Reagenti e solventi

Acido perclorico, etere di petrolio, acetone (analitico-grade) e acetonitrile (HPLC), nonché gli altri reagenti sono stati acquistati da Sigma-Aldrich (Milano - Italia). L'acqua Ultrapura (18,2 MW cm resistività a 25 ° C), è stata ottenuta da un Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Le undici ammine biogene studiate erano: etilamina (ETA), metilamina (MEA), istamina (HIS), serotonina (SER), spermina (SPM), spermidina (SPD), agmatina (AGM), putrescina (PUT), β -feniletilamina (β -PEA), cadaverina (CAD), tiramina (TYM) che sono stati tutti fornite da Supelco, Bellefonte, PA, USA così come l'agente derivatizzante cloruro di dansile e lo standard interno (IS) 1,7-diamminoheptano.

Le soluzioni standard ad una concentrazione di 2000 mg / L sono state preparate in acqua purificata per ogni ammina biogena studiata e per lo standard interno. Le soluzioni standard sono state protette dalla luce e conservate a 4 ° C fino al momento dell'uso.

Per costruire le curve di calibrazione, sei soluzioni standard contenenti tutte le ammine sono stati ottenuti con differenti aliquote di ciascuna soluzione acquosa, tutte diluiti a 25 ml e aggiunti con HClO_4 10,3 M a raggiungere una concentrazione di acido finale di 0,2 M o 0,4 M, a seconda del cibo campione da analizzare.

Dopo la procedura di derivatizzazione, la concentrazione finale di ammina dansilata iniettata era nell'intervallo tra 0,01 e 8,0 mg / L. La curva di calibrazione è stato costruito tracciando i rapporti dell'area di picco di analiti di standard interno contro sei concentrazioni di analiti.

Le soluzioni standard per le prove di recupero sono state preparate mescolando aliquote individuali di ciascuna ammina in acqua i (ammina e IS) e diluiti a 25 ml (concentrazione 160 mg / L) con acqua acidificata con HClO₄ in modo tale da ottenere una concentrazione di acido di 0,2 M o 0,4 M, a seconda della bevanda da analizzare.

4.5.1.2. Protocollo di derivatizzazione

La reazione derivatizzazione è stata effettuata seguendo la procedura descritta in Chiacchierini et al., 2006, modificato per la temperatura e il tempo di reazione. In breve, 1,0 ml di estratto acido del campione o di soluzione standard è stato aggiunto a 200 µl di NaOH 2M (per regolare il pH a 11), 300 µl di soluzione di NaHCO₃ satura, e 2 ml di soluzione di cloruro di dansile (10 mg / ml in acetone).

Soluzioni di cloruro di dansile stati preparati ogni volta immediatamente prima dell'uso. Dopo aver agitato, i campioni sono stati lasciati al buio a 45 ° C per 60 min (Henríquez-Aedo et al., 2012), e l'eccesso di dansil cloruro è stato rimosso con l'aggiunta di 100 µl di NH₄OH 25% (v / v). Il volume finale è stato portato a 5 mL aggiungendo acetonitrile. La soluzione di ammine dansilate ottenuta è stata filtrata 0,22 micron (Polypro Acrodisc, Pall Gelmann Laboratory) e iniettato nel cromatografo.

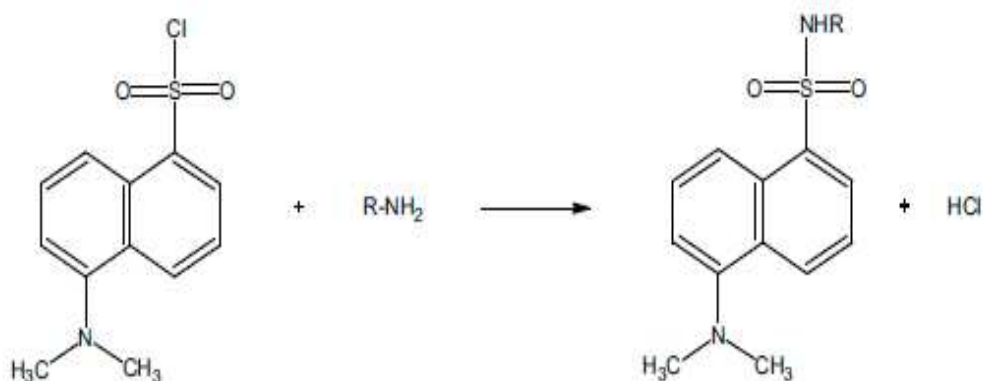


Fig. 4.6. Reazione di dansilazione tra il dansil-cloruro e le ammine primarie.

4.5.1.3. Campioni e loro trattamento

Campioni di vino rosso italiano e di succhi e nettare frutta sono stati selezionati per controllare il recupero e la precisione del metodo. Tutti i campioni sono stati acquistati nei mercati locali. Le procedure per l'estrazione delle diverse matrici alimentari sono stati le seguenti:

Vino. 25 ml di vino con IS aggiunto in precedenza (0,5 ml), sono stato acidificati con HClO_4 10,3 M al fine di raggiungere una concentrazione di acido finale di 0,2 M e poi procedere alla dansilazione come descritto (Vinci et al., 2011). Per le prove di recupero a due livelli di concentrazione, 0,3 e 1,5 ml di soluzione standard sono stati aggiunti a 25 ml di vino acidificato fino ad ottenere, dopo la fase di derivatizzazione, una concentrazione finale nel vino di 0,384 e 1,92 mg / L per ogni ammina, rispettivamente.

Nettare di frutta. Nettare di frutta a base di albicocca, pera e pesca, quale definiti nell'allegato IV della Direttiva Europea del Consiglio 2001/112 / CE (Unione Europea, 2002), sono stati analizzati.

Il contenuto in ammine biogene di questa matrice non è mai stato studiato prima, di conseguenza il metodo di estrazione è stato testato per la concentrazione di acido diversa e volume e le condizioni finali ottimizzate sono riportate di seguito.

2,5 mL di frutta nettare aggiunti in precedenza con IS (0,5 mL) sono stati estratti con 7,5 mL di HClO_4 0.4M, centrifugato a 2000 rpm per 5 minuti. Il surnatante è stato poi filtrato attraverso un filtro a membrana di 0.20 micron Millipore e ai sedimenti è stato aggiunto 1,5 ml di HClO_4 0.4M e centrifugato di nuovo per 3 min. Il secondo estratto è stato poi filtrato e aggiunto al primo. Il volume finale è stato portato a 10 ml con HClO_4 0.4M. Un'aliquota di 1 mL dell'estratto finale è stato poi utilizzato per l'analisi dopo derivatizzazione mentre il volume rimanente è stato conservato a 4 ° C per non più di una settimana. Per le prove di recupero a due livelli di concentrazione, 1 e 2 mL di soluzione standard sono stati aggiunti a 25 ml di succo di pesca in modo da ottenere, dopo la fase di derivatizzazione, una concentrazione finale nel nettare di frutta 0,32 e 0,48 mg / L per ciascuna ammina rispettivamente. Per l'agmatina che necessitava rivelazione UV, i recuperi sono stati considerati solo a livello più alto.

Succo di frutta da concentrato. Un metodo per la determinazione di ammine biogene nei succhi di frutta da concentrato è stato sviluppato a partire dalla procedura descritta per il vino nel lavoro precedente (Preti et al., 2015). 25 mL di succo di frutta, aggiunti in precedenza con IS (0,5 mL), è stato acidificato mediante HClO_4 10,3 per raggiungere una concentrazione finale di acido 0,2 M e poi dansilato e quantificati come descritto sopra. Accuratezza (recupero > 93%) e la precisione (RSD <8%) sono stati valutati in triplicato con succhi di frutta aggiuntati a due livelli di concentrazione di ammine

biogene. La quantificazione è stata effettuata utilizzando il metodo di calibrazione con standard interno utilizzando l'analisi di regressione lineare ($r \geq 0,999$).

4.5.1.4. Strumentazione

Le separazioni cromatografiche in HPLC sono state ottimizzate in un sistema costituito da una pompa HPLC binaria LC-10 ATVP con rivelatore UV-Vis AVP SP-10 e un rivelatore a fluorescenza RF-10AXL (Shimadzu, Kyoto, Giappone) in serie. L'iniettore è dotato di un loop di 20 microlitri. I dati cromatografici sono stati raccolti e trattati con software di Classe-VP (Shimadzu).

La colonna analitica era 100 x 4,6 millimetri diametro interno Kinetex C18 colonna (granulometria 2.6 μ m), con filtro KrudKatcher C18 (tutto fornito da Phenomenex, Torrance, CA, USA). Temperatura della colonna analitica è stata mantenuta a T 50 ° C da un forno a CT 10AS. La pressione massima del sistema era 400 bar.

4.5.2 Analisi Statistiche

Le determinazioni quantitative delle ammine biogene nelle matrici studiate sono state effettuate in triplicato e sono stati calcolati i range, le medie e le deviazioni standard (SD). L'analisi della varianza (ANOVA) e il confronto delle medie con il test Tuckey Honest Significant Differences (HSD) per numero disuguale di campioni a livello 5% sono stati effettuati utilizzando Statgraphics Centurion XV 15.2.06 (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). L'analisi dei dati chemiometrica (PCA, CA e LDA) sono state effettuate con VPARVUS (Forina et al., 2004).

4.5.3. Condizioni cromatografiche

Le condizioni finali ottimizzate sono state le seguenti: un gradiente lineare partiva dal 65% acetonitrile e raggiungeva il 75% acetonitrile in 3,5 min e successivamente portato a 100% acetonitrile in 9 min, e poi mantenuto per 2 min per un tempo di eluizione totale di 11 min ad una flusso costante di 0,6 ml / min (tabella 4.5). Due minuti sono stati necessari per la equilibrizzazione della colonna alla condizione iniziale, per un tempo totale di analisi di 13 min. La lunghezza d'onda per il rivelatore UV è stato impostato a 254 nm.

Tab. 4.5. Gradiente di eluizione ottimizzato

Tempo (min)	ACN %	H₂O %
0	65	35
3.5	75	25
9	100	0
10	100	0
12	65	35

Per il rivelatore a fluorescenza 320 nm per l'eccitazione e 523 nm per l'emissione. Sono stati applicati il tasso di acquisizione più veloce (10 Hz) e il tasso di tempo di risposta minimo (0,1 s) per FLD e UV e a tutte le corse per assicurare anche il picco più stretto fosse registrato completamente.

4.5.3.1 Effetto matrice

L'effetto matrice è stata valutata con il metodo del confronto delle slope come descritto in Jia et al., 2012 e Taverniers et al., 2004. Aggiunte standard per ogni matrice sono state eseguite come descritto nella sezione precedente agli stessi livelli di concentrazione degli standards acquosi puri, per costruire curve di calibrazione con il metodo delle aggiunte aggiuntive standard. Poi sono stati confrontati le slope delle due curve di calibrazione per ogni amine biogene studiata.

4.5.4. Sviluppo metodo cromatografico

Le condizioni cromatografiche sono state ottimizzate in modo da ottenere la separazione degli 11 componenti in una singola corsa cromatografica eseguito su un programma di eluizione di 13 min, mantenendo buona risoluzione e sensibilità nelle tre matrici alimentari considerati (Fig.1 per FLD). I tempi di ritenzione dei cromatogrammi UV sono ritardate di 0,05 min a causa del volume morto del tubo di collegamento tra i due rivelatori.

Le nuove condizioni hanno ridotto di almeno 3 volte il tempo di eluizione e il consumo di solventi rispetto a quello riportata da altri precedenti metodi HPLC per la

determinazione di un numero simile di ammine biogene nel vino e altri prodotti alimentari, con risultati comparabili ai metodi implicano l'uso di sub particelle 2µm colonne (Tabella 4.6).

Tab. 4.6. Confronto dei metodi proposti in letteratura per la determinazione di ammine biogene.

Apparatus Derivatization agent	Biogenic amines	Analytical column Flow	Run Time (min)	Time per analyte (min)	Solvent consume (mL)	Matrix	Ref.
HPLC-RF Dansyl-Cl	MEA, ETA, AGM, β- PEA, PUT, CAD, HIS, IS, SER, TYM, SPD, SPM.	Kinetex C18 100 x 4.6mm 2.6µm Φ = 0.6 ml/min	13	1.1	7.8	Wine, fruit nectar	This study
HPLC-UV Dansyl-Cl	AGM, β-PEA, PUT, CAD, HIS, IS, TRYP, TYM, SPD, SPM.	Chrompack Hypersil C18 250 x 3.0 mm 5µm Φ = 1 ml/min	29	2.9	29	Fish	Simad, e Dalgaard, 2011
HPLC-UV Dansyl-Cl	CAD, PUT, HIS, TYR, TRYP, PHE, IS, SPD, SPM, MEA, ETA.	C18 Supelco Discovery 150 x 2.1 mm 5µm Φ = 0.4 ml/min	30	2.7	12	Wine	Soufleros et al. 2007
HPLC-RF Dansyl-Cl	CAD, PUT, HIS, TYR, TRYP, AGM, ISO, MEA, ETA.	C18. Luna 5 lm 250 x 4.6 mm 5µm Φ = 1 ml/min	35	3.9	35	Wine	Proestos et al., 2008
Ion pair HPLC OPA	SPD, SPM, PUT, AGM, SYN, TYM, OCT, HIS, SER, CAD, TRYP, β-PEA.	Bondapak C18 300 x 3.9 mm 10 µm Φ = 0.7 ml/min	71	5.9	50	Orange juice	Vieira et al., 2007
HPLC-UV Dansyl-Cl	AGM, β-PEA, PUT, CAD, HIS, IS, TRYP, TYM, SPD, SPM.	Zorbax Eclipse C18 50 x 4.6 mm 1.8 µm Φ = 1 ml/min	12	1.2	12	Fish	Simad, e Dalgaard, 2011
UHPLC-UV Dansyl-Cl	TRYP, β-PEA, PUT, CAD, HIS, IS, TYM, SPD, SPM.	Zorbax Eclipse C18 50 x 4.6 mm 1.8 µm Φ = 1 ml/min	12	1.3	12	Meat, Cheese mush- rooms	Dadakova et al., 2009
UHPLC RF OPA	OC, DO, TYR, PUT, SER, CAD, HIS, AGM, β-PEA, SPD, TRYP, SPM.	Acquity UPLC BEH 50 x 4.6 mm 1.7 µm Φ = 0.8 ml/min	7	0.6	5.6	Wine, fish, cheese, dry sausages	Latorre- Moratalla et al., 2009

OPA, o-phthalaldehyde; SPD, spermidine; SPM, spermine; PUT, putrescine; AGM, agmatine; SYN, synephrine; TYM, tyramine; OCT, octopamine; CAD, cadaverine; HIS, histamine; SER, serotonin; TRYP, tryptamine; ETA, ethylamine; MEA, methylamine; HIS, histamine; β-PEA, β-phenylethylamine; DO, dopamine; ISO, isopropylamine, IS, internal standard.

Come risultato della riduzione tempo, il consumo di solventi si riduce drasticamente rendendo il presente metodo HPLC da reagente inferiore e minore impatto ambientale.

Questo lavoro è anche la prima sulla determinazione di ammine biogene in nettari e succhi di frutta.

L'alta efficienza della colonna con particelle non porose per molecole di peso molecolare ai 1000 Da inferiore è dovuta alla combinazione della riduzione del parametro diffusione longitudinale e del coefficiente di diffusione Eddy dell'equazione di Van Deemter (Gritti & Guiochon, 2013), questa caratteristica rende queste colonne ottimale per la separazione di ammine biogene.

Tuttavia, dato che la cromatografia liquida ad alte prestazioni non erano inizialmente progettati per le colonne ad alta efficienza imballati, sono stati necessari aggiustamenti dell' apparato HPLC. Innanzitutto la sostituzione dei tubi di collegamento convenzionali e della cella dei rivelatori con parti simili avente un volume più piccolo per migliorare le prestazioni colonna e portarla ad un livello paragonabile a quello osservato per la stessa colonna usata con strumenti nuovi ad ultra-alta pressione (Gritti & Guiochon, 2013). Anche alcune modifiche del metodo sono state necessarie soprattutto al fine di mantenere la contropressione dello strumento sotto 300 bar.

La fase mobile scelta è stata acetonitrile (A) / acqua (B). Il passo iniziale era gradiente (A) = 65%, questo era indispensabile per ottenere una buona separazione delle prime due ammine eluito, metilammina e etilammina, e di istamina e cadaverina, per il quale è stato anche necessario un passo intermedio gradiente del 75% (a) a 3,5 min

Il flusso è stato mantenuto costante a 0,6 ml / min, che è inferiore al limite del campo di portata raccomandata dal produttore colonna (0,7-3,0 ml / min). Con una tale portata un tempo di 13 min analisi è stato raggiunto. La temperatura della colonna mantenuti a 50 ° C ha dato un aiuto importante mantenere la pressione sotto i limiti richiesti e per abbreviare il tempo di ritenzione, senza perdita di efficienza di separazione. Infatti, la temperatura influenza impiegato l'efficienza cromatografia quanto riguarda la viscosità di fase mobile, il coefficiente di conservazione analita, e il coefficiente di diffusione (Alexander et al., 2011).

4.5.4. Ottimizzazione della procedura di estrazione

Per la estrazione delle ammine biogene dal vino ci si è riferiti al metodo ottimizzato dal nostro gruppo (Vinci et al., 2011). Essendo però il nettare e il succo di frutta matrici inesplorate, la nostra ottimizzazione della procedura di estrazione è partita dal lavoro di Chiacchierini et al., che considerava i derivati del pomodoro.

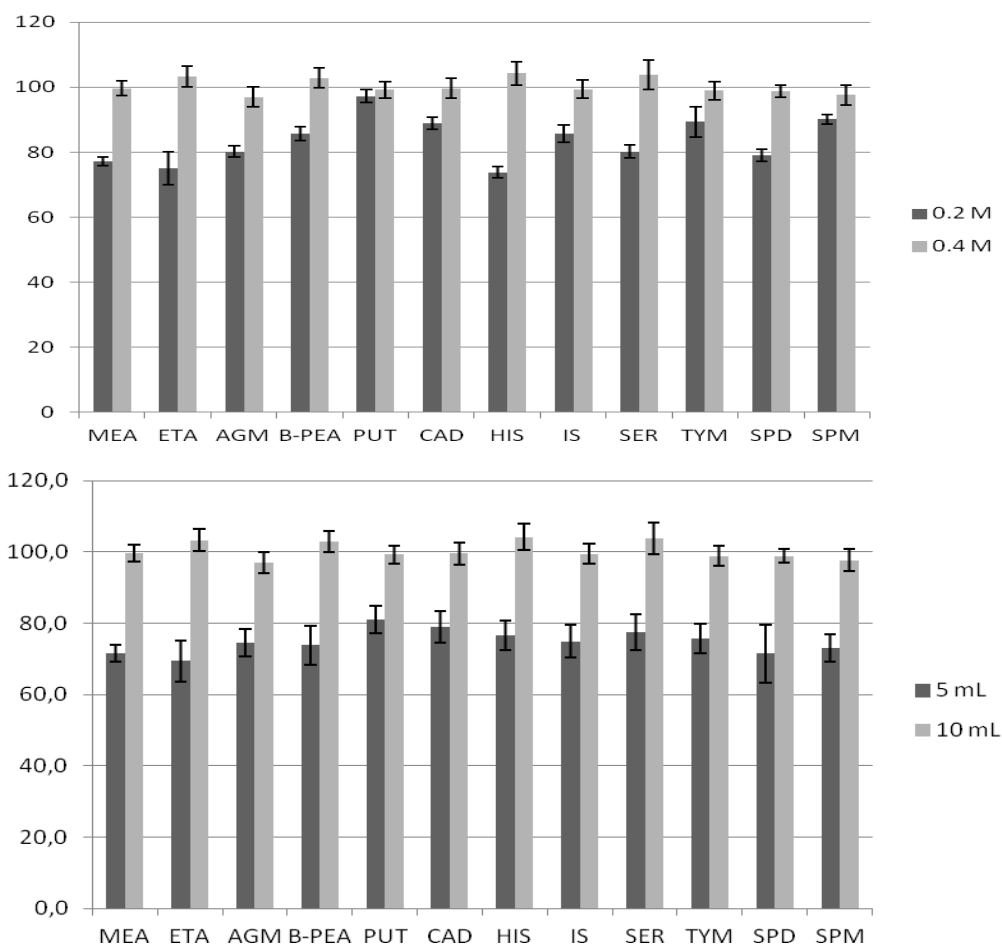


Fig. 4.6. Influenza della concentrazione di HClO_4 (0.2 M o 0.4 M) (A), e del suo volume finale (5 o 10 mL) (B) sulla percentuale di recupero di ammine biogene nel nettare di frutta. I dati sono la media $\pm$ SD di tre analisi indipendenti di un nettare di pesca aggiuntato come descritto nel testo.

Come precedentemente dimostrato, l'acido perclorico è stato scelto per il trattamento del campione ed è stato testato a due concentrazioni differenti (0,2 e 0,4 M).

Le prove di recupero sono state eseguite come descritto precedentemente. Come mostrato in figura 4.6, la concentrazione di acido di 0,4 M conseguiva per il nettare di frutta recuperi superiori a quelli ottenuti con l'acido a 0,2 M ($p < 0.05$).

Poiché i recuperi con concentrazione 0.4 M non erano significative diversi da 100%, questa concentrazione è stata applicata senza ulteriori prove con diverse concentrazioni di acido.

Per migliorare la sensibilità del metodo, in particolare per la rivelazione UV, è stato testato un volume finale di acidità di 5 mL (0,4 M). Come si può vedere dalla figura, un volume di acido finale di 10 ml si è rivelato essere più adatto per una completa estrazione di tutte le ammine.

4.5.5. Validazione del metodo analitico

L'effetto matrice è stata valutato con il metodo del confronto delle slope come riportato da Jia et al., 2012. Per ciascun analita, la pendenza delle curve di taratura preparate con standard acquosi sono state confrontate con quelle ottenute con l'estratto del campione e se il rapporto delle due pendenze non risultava significativamente diverso da 1,0 ($p > 0.05$) questo indicava nessun effetto matrice, sia nel vino rosso che nel succo e nel nettare di frutta (Tabella 4.7).

Gli stessi risultati sono stati riportati da Jia et al. nella determinazione degli amminoacidi e ammine biogene negli alimenti fermentati da / spettrometria cromatografia liquida quadrupolo a tempo di volo di massa. A differenza di rivelatori UV e FL, diverse matrici nella rivelazione in spettrometria di massa possono provocare grandi variazioni del segnale e quindi la valutazione dell'effetto matrice è un punto di grande interesse. La spiegazione che gli autori hanno nel loro articolo può essere adattato anche al nostro lavoro. In sintesi, l'effetto matrice è stato efficacemente risolto migliore separazione cromatografica, utilizzando una colonna alta risoluzione e l'applicazione di uno standard interno analogo strutturale.

Questi risultati hanno permesso l' iniezione diretta dell'estratto acido derivatizzato con il vantaggio di recuperi quantitativi di tutte le ammine ricercate. Questa procedura semplice e rapida è stato già riportato per matrici alimentari con relativamente basso contenuto di amminoacidi liberi come carne, pesce e verdure. Infatti, la presenza di un elevato contenuto di aminoacidi liberi può causare problemi di interferenze per i picchi di ammine prima eluite (Innocente et al., 2007).

I parametri di validazione del metodo cromatografico sono riportati in Tabella 4.8. La linearità è stata testata a sei diverse concentrazioni tra 0,01-8 mg / L su FLD e tra 0,06-8

mg / L per la rivelazione UV, eseguendo tre misurazioni ad ogni livello. La linearità dei dati è stata valutata mediante analisi della varianza della regressione. L'analisi dei minimi quadrati è risultata in un coefficiente di correlazione di $r \geq 0,999$ per tutte le ammine biogene studiate con entrambi i rivelatori ($p \leq 0,001$). Le curve di calibrazione per ogni BA avevano un R^2 superiore al 0,997 per la rivelazione FL e sopra 0.995 per l'UV.

Tab. 4.7. Confronto delle slope per la valutazione dell'effetto matrice.

	VINO						NETTARE DI FRUTTA					
	FLD			UV			FLD			UV		
BA	S	M	M/S	S	M	M/S	S	M	M/S	S	M	M/S
MEA	0.267	0.200	0.749	0.411	0.300	0.730	3.100	2.394	0.773	2.790	2.014	0.722
ETA	0.269	0.202	0.752	0.352	0.253	0.719	2.787	2.201	0.790	2.372	1.702	0.717
AGM	0.123	0.101	0.817	0.171	0.135	0.787	1.050	0.775	0.737	1.073	0.795	0.740
β-												
PEA	0.186	0.170	0.917	0.218	0.197	0.898	2.671	2.462	0.922	2.321	2.022	0.871
PUT	0.548	0.509	0.929	0.691	0.632	0.914	5.600	5.089	0.909	5.112	4.635	0.907
CAD	0.250	0.248	0.990	0.265	0.248	0.932	3.275	3.021	0.923	3.025	2.721	0.900
HIS	0.013	0.010	0.744	0.259	0.191	0.737	0.856	0.703	0.821	0.709	0.517	0.728
IS	0.254	0.251	0.987	0.252	0.234	0.925	1.993	1.895	0.951	1.265	1.155	0.913
SER	0.017	0.014	0.776	0.189	0.143	0.752	0.276	0.209	0.757	0.196	0.142	0.724
TYM	0.054	0.050	0.938	0.284	0.256	0.899	0.660	0.586	0.888	0.468	0.400	0.853
SPD	0.363	0.334	0.920	0.417	0.361	0.866	3.812	3.265	0.857	3.102	2.640	0.851
SPM	0.308	0.275	0.893	0.324	0.282	0.870	3.787	3.301	0.872	3.422	2.955	0.864

S, slope neat solution; M, slope matrix solution; M/S, slope ratio of matrix/neat

a: IS concentration at 4 mg/L . HClO₄ concentration at 0.2M

b: IS concentration at 0.4 mg/L . HClO₄ concentration at 0.4M

Il limite cromatografico di rilevazione (LOD) e il limite di quantificazione (LOQ) per ciascun analita sono stati ottenuti da una diluizione seriale della soluzione fino a quando le altezze erano rispettivamente 3σ e 10σ (σ essendo tre volte e dieci volte la deviazione standard della segnale in bianco calcolato oltre dieci iniezioni del vuoto) l'acido derivatizzato perclorico (0,2 e 0,4 M) è stato usato come bianco.

LOQ per ogni ammine biogeniche (Tabella 4.9) in diverse matrici sono stati determinati su campioni spiked e tenendo conto del fattore di diluizione di estrazione in modo che LOQ sono stati espressi in mg / L.

I valori del LOD per FLD erano tra 0,002 (PUT) e 0,023 mg / L (AGM). I corrispondente limiti di quantificazione (LOQ) erano 0,006 e 0,077 mg / L .Per la rivelazione UV il LOD e I LOQ variavano tra 0,013-0,112 mg / L, e 0,043-,373 mg / L, rispettivamente. Le precisioni strumentali intraday e interday sono stati determinate analizzando una soluzione standard di ammine biogene a 1 mg / L, cinque volte in un giorno e per cinque volte in cinque giorni consecutivi, rispettivamente. I valori di RSD sono stati calcolati per le undici amine biogene studiate e per lo standard interno. I valori della RSD ottenuti con FLD sono inferiori al quelli ottenuti quando è impiegato l'UV.

Tab. 4.8. Performances del metodo con rivelazione UV e FL per soluzioni standard di ammine biogene dansilate.

BAs	FLD						UV					
	Linear range	R ²	LOD	LOQ	Intra day	Inter day	Linear range	R ²	LOD	LOQ	Intra day	Inter day
MEA	0.03-6	0.999	0.008	0.027	2.12	3.03	0.20-6	0.997	0.050	0.167	3.07	3.72
ETA	0.02-8	1	0.006	0.020	1.64	2.24	0.14-8	0.997	0.038	0.127	1.75	2.77
AGM	0.09-6	0.999	0.023	0.077	1.75	2.83	0.40-6	0.996	0.112	0.373	2.64	3.70
B-PEA	0.03-6	0.999	0.007	0.023	1.67	2.58	0.15-6	0.999	0.041	0.137	2.32	3.02
PUT	0.01-8	1	0.002	0.006	1.05	1.32	0.06-8	1	0.013	0.043	1.44	1.73
CAD	0.02-8	1	0.005	0.017	1.22	2.04	0.15-8	0.999	0.033	0.110	1.36	1.97
HIS	0.06-6	0.998	0.012	0.040	1.07	2.10	0.50-6	0.998	0.057	0.190	1.91	2.62
IS	0.04-4	1	0.007	0.024	0.79	1.01	0.30-4	0.999	0.051	0.170	0.90	1.14
SER	0.08-4	0.997	0.022	0.074	2.04	2.41	0.40-4	0.995	0.095	0.317	3.05	3.28
TYM	0.06-6	0.999	0.016	0.053	1.08	2.19	0.40-6	1	0.089	0.297	1.68	2.05
SPD	0.02-8	0.999	0.006	0.020	1.28	2.28	0.15-8	0.999	0.038	0.128	1.59	1.94
SPM	0.03-8	0.999	0.007	0.023	0.94	1.32	0.20-8	0.999	0.050	0.166	1.16	1.67

R², square regression coefficient.

Intra-day and inter-day precisions are expressed as RSD (%): relative standard deviation for five determinations in one day and five times over five consecutive days, respectively

LOD: limit of detection, Signal/Noise ratio=3; LOQ, limit of quantification Signal/Noise =10; and linear range are in mg/L.

Tuttavia, entrambi i valori intraday e ripetibilità interday di UV e FL erano sempre inferiore al 4%, garantendo un livello soddisfacente di precisione del metodo proposto. Le precisioni intraday erano nel range di 0,94-2,12%, e le precisioni interday variavano tra 1,32e 3,03% per FLD, mentre per l'UV erano tra 1.16 e 3.07% e tra 1.67 e 3,72%. Per valutare la accuratezza e la precisione del metodo, è stato aggiunta una soluzione

standard ammine biogeniche di 160 mg / l a ciascun tipo di alimento descritto nella sezione precedente.

Tab. 4.9. Percentuali di recupero e LOQ delle ammine biogene nel vino e in succhi e nettari di frutta spiked al livello più alto come descritto nel testo.

Ammine	VINO				NETTARE DI FRUTTA				SUCCO DI FRUTTA			
	REC A	REC B	LOQ A mg/L	LOQ B mg/L	REC A	REC B	LOQ A mg/L	LOQ B mg/L	REC A	REC B	LOQ A mg/L	LOQ B mg/L
MEA	97.5 (3.4)	95.8 (3.6)	0.12	0.84	99.6 (2.3)	99.2 (3.1)	0.52	3.42	97.4 (2.0)	99.7 (3.8)	0.14	0.88
ETA	101.6 (2.9)	99.8 (3.7)	0.10	0.65	103.3 (3.1)	99.8 (3.4)	0.39	2.64	99.1 (2.8)	100.8 (4.2)	0.13	0.71
AGM	104.3 (3.7)	99.9 (3.9)	0.40	1.88	97.0 (3.0)	96.3 (2.7)	1.65	7.56	97.9 (3.9)	95.9 (3.5)	0.45	1.92
B-PEA	100.5 (3.1)	103.4 (3.3)	0.10	0.69	102.8 (3.0)	104.1 (3.5)	0.42	2.84	98.8 (2.7)	99.2 (3.3)	0.13	0.71
PUT	99.5 (2.2)	99.6 (2.5)	0.03	0.21	99.2 (2.6)	100.2 (2.8)	0.11	0.92	96.7 (2.3)	97.8 (3.1)	0.05	0.23
CAD	98.8 (3.6)	98.4 (3.3)	0.07	0.61	99.6 (3.1)	100.8 (3.2)	0.32	2.44	101.3 (2.5)	98.9 (3.0)	0.09	0.64
HIS	98.7 (3.1)	97.9 (3.6)	0.17	0.98	104.2 (3.7)	101.7 (4.0)	0.79	4.02	100.7 (3.0)	102.9 (3.8)	0.19	0.99
IS	99.8 (2.8)	100.8 (3.3)	0.11	0.90	99.4 (2.8)	99.8 (3.1)	0.46	3.52	99.8 (2.4)	100.2 (2.5)	0.13	0.93
SER	99.2 (3.7)	95.9 (4.6)	0.33	1.60	103.8 (4.5)	102.9 (4.8)	1.42	6.46	97.9 (3.0)	104.0 (4.1)	0.37	1.62
TYM	98.2 (2.1)	98.2 (3.0)	0.28	1.53	98.9 (2.8)	98.8 (3.0)	1.12	6.09	99.3 (3.1)	97.9 (2.9)	0.32	1.57
SPD	97.4 (2.7)	96.3 (3.7)	0.10	0.68	98.8 (1.9)	99.4 (2.6)	0.36	2.70	99.6 (2.3)	98.7 (2.8)	0.14	0.72
SPM	96.2 (3.2)	95.5 (3.7)	0.11	0.85	97.6 (3.1)	98.0 (2.7)	0.42	3.48	98.2 (3.4)	99.5 (2.2)	0.14	0.88

Rec: mean recovery percentages and standard deviation in parentheses. A: fluorimetric detection; B: UV detection

Cinque determinazioni sono state effettuate ad ogni livello di aggiunta. I recuperi medi erano superiori al 95%, che non era statisticamente differente dal valore teorico del 100% ($p > 0.05$ secondo il test t di Student), per tutte le ammine biogene in tutte le tre matrici considerate (RSD inferiore 5,0%) sia per fluorescenza e rivelazione UV (Tabella 4.9).

Per valutare la precisione è stato applicato il criterio di accettabilità di Horwitz per lo studio intra-laboratorio (Horwitz, 1982). I valori sperimentali di precisione RSD strumentale e la precisione del metodo erano tutti sotto i due terzi del limite superiore del campo accettabile per RSD calcolato dalla formula (5,7-7,0), questo indica che il metodo può essere effettuato con un livello soddisfacente di precisione.

L'assunzione di omogeneità delle varianze tra i due livelli di spiking è stata testata utilizzando il test di Cochran C. Tutti i valori sperimentali sono rimasti al di sotto del valore tabulato di Cochran [Cochran C limite massimo di prova (4, 2, 0.05) = 0.9392], confermando che la varianza dei valori di recupero non è dipendente dal contenuto in ammine.

I risultati hanno mostrato che il presente metodo è affidabile per l'analisi delle ammine biogene in campioni alimentari.

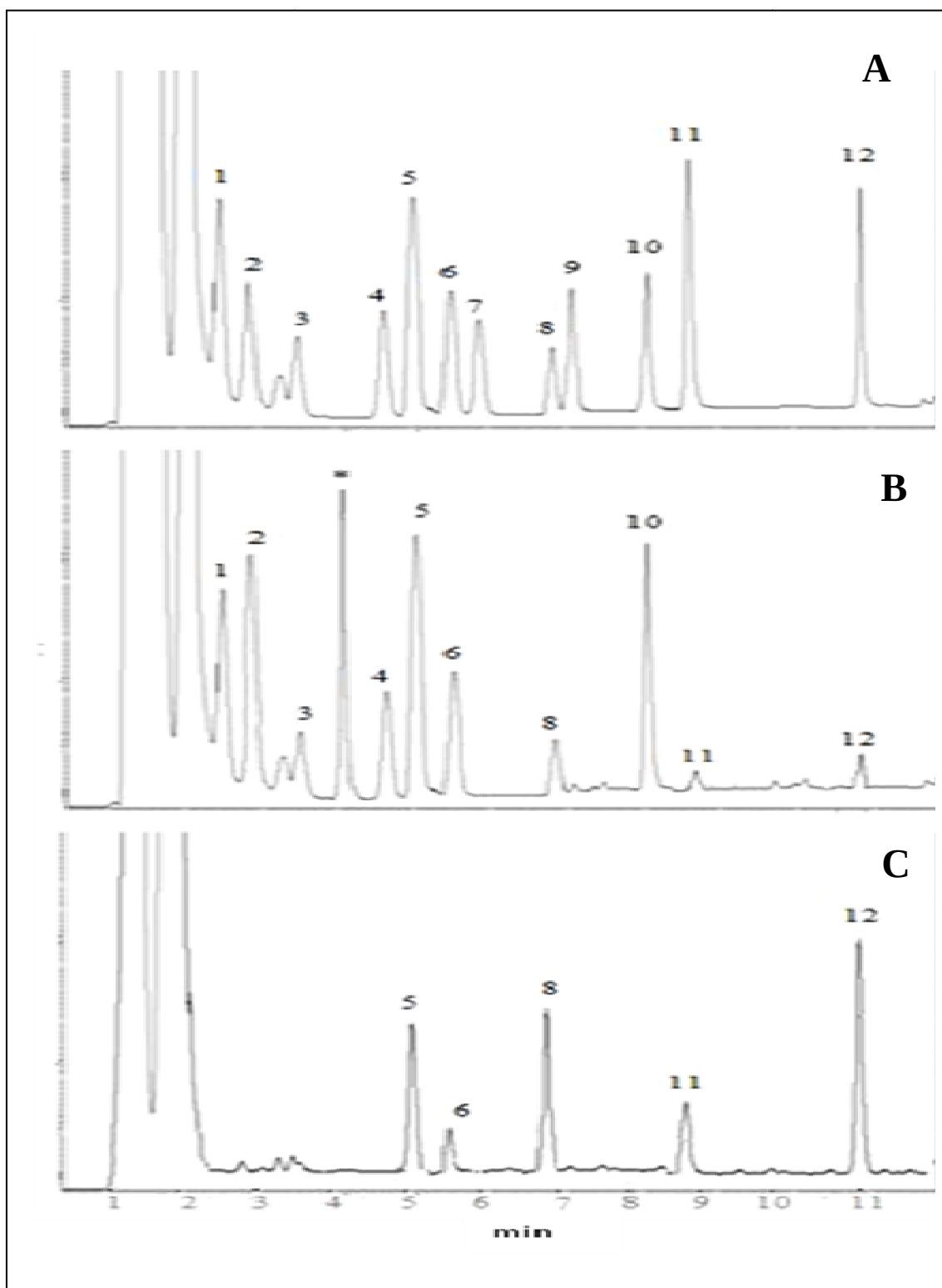


Fig. 4.7. Cromatogrammi HPLC/FLD di una soluzione standard di ammine biogene di 1 mg/L (A), vino (B) e di un nettare di albicocca (C). Picchi: (1) methylamine, (2) ethylamine, (3) agmatine, (4) β -phenylethylamine, (5) putrescine, (6) cadaverine, (7) histamine, (8) standard interno, (9) serotonin, (10) tyramine; (11) spermidine, (12) spermine.

*Picco dell'etanolo dansilato.

4.6. Risultati analisi di campioni di succo e nettare di frutta

I campioni commerciali di nettare (32) e succo di frutta concentrato (43) sono stati acquistati da mercati locali e conservati a temperatura ambiente prima dell'analisi. I campioni sono stati prodotti da grandi marchi di aziende di succhi di frutta italiani (Tabella 4.10).

Tab.4.10. I tipi di nettari e succhi di frutta considerati.

	Minima % di				
	Frutto	frutta dichiarata	Marchi	Familia	Specie
Fruit Nectar	Albicocca	50%	7		
	Pesca	50%	6		<i>Prunus</i>
	Pesca	70%	6	Rosaceae	
	Pera	50%	6		<i>Pyrus</i>
	Pera	70%	6		
Fruit juices	Mela	100%	10	Rosaceae	<i>Malus</i>
	Pompelmo	100%	10	Rutaceae	<i>Citrus</i>
	Arancia	100%	11		
	Ananas	100%	12	Bromeliacea	<i>Ananas</i>

I prodotti sono stati scelti per essere i più rappresentativi del mercato, per i nettare di frutta le varietà scelte sono state albicocca, pesca e pera, mentre per il succo di frutta concentrato, mela, ananas pompelmo e arancia. Come descritto nella direttiva UE 2001/112 / CE, i nettari di frutta sono stati etichettati con il contenuto minimo di frutta in percentuale richiesta per ogni nettare di frutta, solo i nettari pesche e pere sono presenti sul mercato con due diverse percentuali del 50% e 70%, e in questo studio sono stati valutati separatamente.

I campioni erano abbastanza eterogenei, in quanto sono stati scelti tra tutte le categorie di bevande a base frutta del mercato al fine di ricercare eventuali differenze nel contenuto e nel profilo di ammine biogene tra i campioni in relazione alla loro origine botanica o di categoria merceologica.

Tab. 4.11. Medie (SD) di pH, acidità titolabile e zuccheri totali dei campioni analizzati.

	Fruit	Declared Minimum Fruit Concentration	pH	Titrateable acidity*	Total sugars (g 100g⁻¹)	° Brix
Fruit nectars	Apricot	50%	3.44 (0.23)	0.69 (0.13)	13.72 (0.22)	11.20 (0.10)
	Peach	50%	3.86 (0.27)	0.37 (0.10)	12.03 (0.10)	12.30 (0.21)
	Peach	70%	3.73 (0.22)	0.51 (0.14)	12.32 (0.28)	12.70 (0.15)
	Pear	50%	3.91 (0.20)	0.29 (0.12)	12.11 (0.11)	12.20 (0.10)
Fruit juices	Apple	100%	3.64 (0.16)	0.55 (0.15)	11.25 (0.20)	11.51 (0.22)
	Grapefruit	100%	3.32 (0.14)	1.16 (0.22)	9.83 (0.18)	10.60 (0.30)
	Orange	100%	3.79 (0.20)	0.86 (0.18)	10.15 (0.15)	11.40 (0.21)
	Pineapple	100%	3.76 (0.18)	0.65 (0.16)	10.40 (0.14)	13.01 (0.20)

*Percent of citric acid

Pertanto nell'analisi dei dati e nella presentazione dei campioni sono divisi in due gruppi, i succhi di frutta da concentrati e i nettari di frutta.

Il pH, valori di acidità, zuccheri totali e solidi solubili sono stati misurati per tutti i campioni e i risultati sono riportati in Tabella 4.11. Il loro confronto con i dati riportati in letteratura (Camara et al., 1995; Vieira et al., 2007) conferma la buona qualità dei prodotti commerciali considerati.

4.6.1. Profilo e livelli di ammine biogene nei nettari di frutta

Tra le 11 ammine biogene analizzati solo cinque sono stati rilevate nei 32 campioni analizzati (tabella 4.12). Spermidina, spermina, putrescina e cadaverina sono stati trovati in ogni tipo di nettare di frutta studiati, mentre l'etilamina è stata determinata solo in tre campioni di nettare di pera con un contenuto di frutta sopra il 70%.

Table 4.12. Concentrations (mg/L) of biogenic amines in fruit nectars.

Fruit juices	Mean levels* (SD)					
	SPD	SPM	PUT	ETA	CAD	BA tot
Apricot 50%	2.31 ^a (0.21)	1.89 ^a (0.51)	2.76 ^a (2.22)	nd	10.97 ^a (6.45)	17.90 ^a (7.99)
<i>Range</i>	1.97-2.52	1.22-2.51	1.39-7.10	-	3.96-17.93	10.45-28.74
Peach 50%	1.58 ^b (0.25)	1.74 ^a (0.58)	2.35 ^a (0.75)	nd	5.80 ^b (2.92)	11.50 ^b (3.62)
<i>Range</i>	1.34-2.01	1.22-2.72	1.41-3.19	-	1.95-10.06	7.74-17.47
Peach 70%	3.06 ^c (0.89)	1.58 ^a (0.20)	3.13 ^a (0.52)	nd	4.95 ^b (0.70)	12.70 ^{ab} (1.36)
<i>Range</i>	2.02-4.44	1.37-1.89	2.25-3.59	-	4.11-6.05	11.04-14.57
Pear 50%	1.52 ^b (0.27)	1.87 ^a (0.95)	1.68 ^a (0.60)	nd	5.06 ^b (3.16)	10.10 ^b (3.88)
<i>Range</i>	1.16-1.77	1.17-3.53	1.11-2.68	-	1.91-8.31	4.23-13.21
Pear 70%	2.17 ^a (0.34)	1.32 ^a (0.11)	2.83 ^a (1.38)	1.17 (0.07)	4.68 ^b (1.29)	12.21 ^{ab} (2.30)
<i>Range</i>	1.90-2.65	1.22-1.41	1.42-4.44	1.12-1.23	3.75-6.15	7.61-13.22

*Means are calculated using nd (not detected) equal to 0. Mean values with different letters in the same column are significantly different (Tukey test, $p < 0.05$)

Metilammina, serotonina, tiramina, agmatina e istamina non sono mai stati determinati. Le poliammine spermidina e spermina si trovano ubiquitariamente nel regno vegetale, insieme al loro precursore putrescina (Walters, 2003), e quindi la loro presenza è stata prevista anche in derivati di frutta.

La cadaverina è formata dalla decarbossilazione della lisina ed è stata precedentemente riportata in altri prodotti vegetali, come i derivati del pomodoro (Chiacchierini et al., 2006). Questa diammine è risultata essere l'ammina predominante in tutti i nettari di frutta. In particolare nel nettare di albicocca la cadaverina aveva livelli significativamente superiore ($p < 0,05$), contribuendo al livello totale di ammine con il 61% seguita dalla putrescina con il 15%.

Interessante è la variabilità di questa ammina con intervalli di concentrazione che vanno dai 3,96 -17,93 mg/L nelle diverse marche di nettari di albicocca. In questo tipo di nettare di frutta si riscontra un'ampia variabilità anche per la putrescina (1,39-7,10 mg / L).

L'analisi statistica dei dati non ha evidenziato differenze significative ($p > 0,05$) tra i frutti per spermina e putrescina, mentre la spermidina risulta essere significativamente più bassa nel nettare di pesca con frutta al 50% e in quello di pera 50% più alto in quello di pesca 70%.

La media totale di livelli di ammine variava dai 10,1 mg / l nel nettare di pera al 50% ai 17,9 mg / l in quello di albicocca, senza differenze significative ($p > 0,05$) tra i livelli totali medi dei campioni di nettare di pesca e pera, e tra quello di albicocca, di pesca al 70% e di pera al 70%.

In assenza di studi precedenti sul contenuto di ammine biogene nei frutti freschi che sono la materia prima delle bevande studiate, possono essere postulate alcune ipotesi sull'origine della predominanza di cadaverina in nettari albicocca e sulla sua ampia variabilità, nonché per putrescina. Questi dati possono essere correlati alla presenza in concentrazioni più alte degli aminoacidi precursori tipiche di questo tipo di frutta, all'estrema variabilità della qualità delle materie prime e dei processi tecnologici utilizzati nella produzione. Infatti frutta di diverse cultivar e con diversi gradi di maturazione, origine geografica, condizioni climatiche o da diverse pratiche colturali può essere utilizzata per la produzione di nettari di albicocca (Versari et al., 2008). Inoltre, negli alimenti non fermentati, la presenza di ammine biogene sopra un certo livello può essere considerato un indice di attività microbica indesiderata (Onal, 2007). Sorprendentemente, confrontando il contenuto di ammine biogene in nettari di frutta fatti con lo stesso frutto (pesca o pera), ma con contenuti diversi di frutta (50% o 70%) non sono state evidenziate differenze significative in tutte le ammine determinate tranne per la spermidina, la cui concentrazione nei nettari appartenenti alla categoria 70% era significativamente superiore a quelli del 50%. Questa relazione tra il contenuto di frutta e livello di spermidina può essere attribuita principalmente alla origine di questa ammina direttamente nella frutta fresca e non dalle attività di decarbossilazione in seguito al processo di trasformazione.

4.6.2. Profilo e livelli di ammine biogene in succhi di frutta da concentrato

Il profilo e i livelli di ammine biogene nei 43 campioni di succhi di frutta da concentrato analizzati erano molto diverse da quelli in nettari di frutta, sia per la frutta che per la diversa tecnologia utilizzata per la loro produzione (Tabella 4.13).

I nettari di frutta derivano da frutti appartenenti tutte alla stessa famiglia botanica (Rosaceae), mentre i succhi di frutta ottenuti da concentrati erano tassonomicamente diversi tranne pompelmo e arancia che erano dello stesso genere.

In questo tipo di prodotti ortofrutticoli sono stati rilevati 9 delle 11 ammine studiate. Spermina, spermidina e putrescina sono state determinate in ogni campione analizzato, come ammine tipiche dei prodotti di origine vegetale, mentre agmatina e β -feniletilamina non sono mai state rilevate.

La putrescina si è dimostrata come l'ammina più abbondante nei succhi di frutta, con una concentrazione media significativamente ($p < 0.05$) superiore rispetto alle altre tipologie nei succhi di arancia (45,5 mg/L), e la più bassa nei succhi di mela (1.02 mg / L).

L'etilamina è stata determinata in ogni campione, eccetto 4 brand di succhi di mela, con nuovamente i succhi di arancia e mela con il livello massimo e minimo. Al contrario, la cadaverina non è mai stata determinata nei succhi di arancia, mentre la concentrazione media rinvenuta nei succhi di mela (2,30 mg/L) è stata significativamente la più alta.

La tiramina è stata rilevata solo in alcuni campioni, nel 80% dei campioni di succo di mela, nel 45% di quelli di ananas ma mai in quelli di agrumi.

La metilamina è stata determinata in ogni campione di succo di arancia e ananas, con il succo d'arancia con una concentrazione media superiore ($p < 0,05$), mentre queste ammine volatili sono state determinate solo nel 50% dei campioni di succo di pompelmo e mai nei succhi di mela. La serotonina era presente in tutti i succhi di ananas e anche il suo livello medio in questo tipo di succo era superiore agli altri campioni dello studio ($p < 0.05$).

La serotonina è stata rilevata anche nel 20% dei succhi di agrumi ma in nessun succo di mela. L'ammina considerata più pericolosa per la salute, l'istamina, ha raggiunto la sua concentrazione media più elevata ($p < 0.05$) nei campioni di succo di ananas (2.44 mg/L) in cui è stata inoltre rilevata in ogni campione, e nei campioni di succo d'arancia, ma ad una concentrazione minore (0,46 mg/L).

Tab. 4.13. Concentrazione (mg/L) delle ammine biogene nei succhi di frutta da concentrato.

Fruit juices	Mean levels* (SD)									BA Tot
	SPD	SPM	PUT	ETA	CAD	TYM	MEA	SER	HIS	
Apple	0.46 ^a (0.15)	0.43 ^a (0.22)	1.02 ^a (0.35)	0.15 ^a (0.15)	2.30 ^a (1.53)	0.67 ^a (0.50)	nd	nd	nd	5.35 ^a (1.01)
<i>Range</i>	0.24- 0.67	0.24- 0.99	0.59- 1.68	nd- 0.41	0.55- 4.27	nd-1.6	nd	nd	nd	3.67- 6.54
Pineapple	4.25 ^b (0.91)	2.50 ^b (0.38)	4.85 ^{ab} (10.56)	3.31 ^a (9.71)	1.21 ^b (1.21)	0.80 ^a (0.86)	1.03 ^a (0.48)	4.68 ^a (1.98)	2.44 ^a (1.59)	17.43 ^b (25.06)
<i>Range</i>	2.55- 5.41	1.53 - 3.17	1.53- 38.38	0.22- 34.13	nd- 3.14	nd- 1.93	nd- 1.88	1.54- 7.17	nd- 4.61	17.17- 16.81
Grapefruit	1.41 ^c (0.45)	0.38 ^a (0.06)	10.08 ^b (4.11)	9.85 ^b (2.58)	1.00 ^b (0.64)	nd	0.28 ^b (0.46)	0.50 ^b (1.03)	0.31 ^b (0.58)	23.87 ^b (5.02)
<i>Range</i>	1.03- 2.11	0.32- 0.50	7.17- 20.80	6.21- 12.98	0.38- 2.28	-	nd- 1.17	nd- 2.82	nd- 1.74	17.88- 35.79
Orange	2.76 ^d (0.50)	0.68 ^a (0.32)	45.51 ^c (8.35)	32.23 ^c (4.73)	nd	nd	1.87 ^c (0.85)	0.18 ^b (0.44)	0.46 ^b (0.41)	83.98 ^c (10.29)
<i>Range</i>	2.04- 3.66	0.37- 1.37	34.70- 60.97	24.06- 38.64	-	-	nd- 2.72	nd- 1.35	nd- 1.32	67.90- 98.23

*Means are calculated using nd (not detected) equal to 0. Mean values with different letters in the same column are significantly different (Tukey test, $p < 0.05$)

Anche per il 30% dei campioni di succo di pompelmo si è avuta una concentrazione di istamina sopra il LOQ.

I risultati per i succhi d'arancia sono conformi ai dati riportati in precedenza (Vieira et al., 2007, Basheer et al. 2011), che sono i soli riferimenti presenti nella letteratura recente per l'analisi di ammine biogene nei succhi di frutta. Cipolla et al. 2007, hanno infatti analizzato alcuni succhi di frutta e alcuni tipi di frutta fresca solo per il contenuto delle poliammine, trovando risultati comparabili ad eccezione che per la spermina che non è stata rilevata in nessun campione e la cadaverina che è stata trovata solo nei succhi di agrumi, mentre succhi di ananas non erano stati presi in considerazione. Per quanto riguarda l'analisi delle materie prime, Nishibori et al., 2007 hanno analizzato solo mela e arancia e solo per il contenuto in poliammine. Per i dati su succhi di ananas

possiamo fare riferimento solo al lavoro di Santiago-Silva et al., 2011 sulle ammine biogene nei frutti tropicali, in cui viene riportata la presenza di serotonina come l'ammina prevalente, mentre istamina, tiramina e cadaverina non sono stati rilevate nell'ananas fresca. Questo può suggerire la conclusione che queste tre ultime ammine siano prodotte durante il processo di trasformazione o conservazione e che quindi possano essere un indice della qualità del prodotto, essendo inoltre l'istamina e la tiramina le ammine più tossiche per la salute umana.

I livelli totali di ammine variavano da 5,35 (succhi di mela) a 83,98 mg/L (succhi d'arancia), questi dati rendono i succhi di frutta e nettari di frutta buone contributori al totale di ammine biogene assunte quotidianamente con la dieta, considerando anche le grandi quantità di queste bevande che possono essere consumate, in quanto considerate salutari.

E' stato riportato che un'assunzione di ammine biogene superiore ai 40 mg per pasto può essere considerata potenzialmente tossica (Ayres et al, 1980), tuttavia, non tutte le ammine sono ugualmente tossiche e i rischi supplementari quali i farmaci che inibiscono le ammino-ossidasi, l'alcool e le malattie gastrointestinali possono svolgere un ruolo importante nel re-determinare la soglia di tossicità delle ammine bioattive.

4.6.3. Studio di correlazione nei succhi di frutta da concentrato

Uno studio della correlazione di Pearson è stato effettuato per verificare l'esistenza di relazioni tra le ammine biogene nei diversi succhi di frutta da concentrato. Questo studio è stato eseguito anche nei nettari di frutta, ma non sono emerse correlazioni significative.

I risultati sono riportati nella tabella 4.14 (sono riportati solo parametri con valori significativi).

Le correlazioni più interessanti sono state trovate nei succhi di ananas, dove due gruppi di ammine hanno dimostrato di avere coefficienti significativi di correlazione. Il primo gruppo è costituito da istamina, spermina, spermidina e serotonina, che sono stati correlati positivamente l'una con l'altra. Il secondo gruppo, putrescina, etilammina e metilammina, ha mostrato una correlazione positiva all'interno del gruppo ma ha mostrato una correlazione negativa con la cadaverina.

Questa forte correlazione di questi due gruppi di ammine può indicare che la loro presenza in questo tipo di succo di frutta sia influenzata dagli stessi parametri.

Table 4.14. Pearson correlation between biogenic amines in pineapple and apple juices

Parameters	Correlation coefficient*
<i>Pineapple</i>	
SPM X SPD	0.8755
SPM X SER	0.9835
SPM X HIS	0.9909
SPD X SER	0.8305
SPD X HIS	0.9024
SER X HIS	0.9892
PUT X ETA	0.9947
PUT X CAD	- 0.8820
PUT X MEA	0.8573
ETA X CAD	- 0.9071
ETA X MEA	0.8307
CAD X MEA	- 0.8681
<i>Apple</i>	
SPD X CAD	0.8684

*Significant $p < 0.01$

Negli altri campioni di succo esaminati non è stata trovata alcuna correlazione significativa, solo la correlazione positiva tra spermidina e cadaverina nel succo di mela. Nessuna correlazione è stata trovata tra il contenuto in ammine biogene e gli altri parametri considerati.

4.6.4. Analisi multivariata dei dati

Il diverso profilo di ammine biogene nelle differenti tipologie di succo di frutta da concentrato ha suggerito l'ipotesi che alcune delle ammine determinate potessero essere tipiche di una specifica famiglia botanica e che pertanto potrebbero rappresentare potenziali markers di autenticità dell'origine tassonomica.

A tal fine, le tecniche di pattern recognition non supervisionate, cluster analysis (CA) e analisi dei componenti principali (PCA), sono stati utilizzati per valutare il contenuto

informativo dei dati, e per evidenziare un raggruppamento naturale tra i campioni. Queste tecniche sono state applicate a tutti i campioni oggetto di questo studio, ma risultati apprezzabili sono stati ottenuti solo per i succhi di frutta ottenuti da concentrati. A partire da questi risultati, la LDA è stata applicata per fornire un modello matematico per classificare i campioni di succo in base alla loro composizione di frutta.

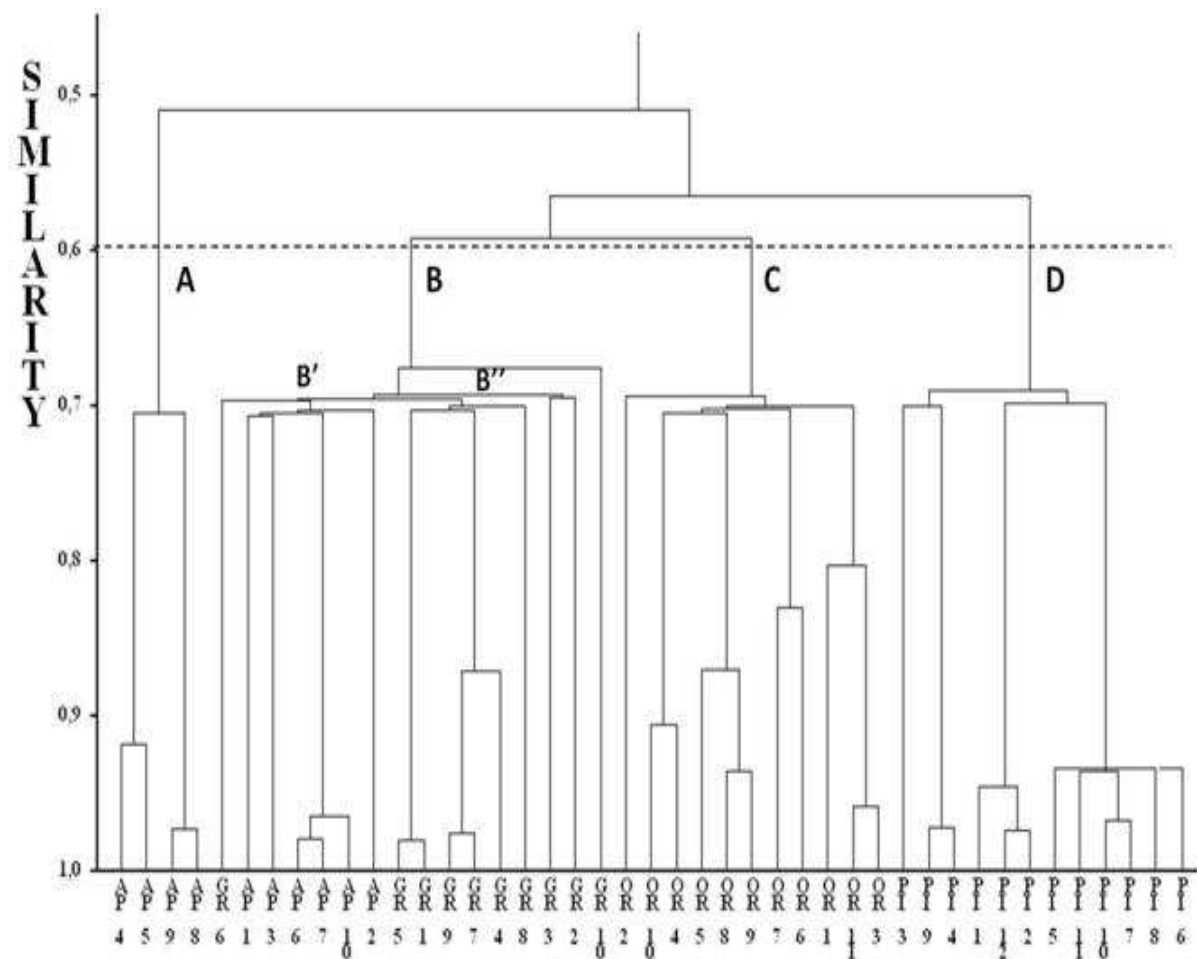


Fig.4.7. Dendrogramma dell'analisi cluster sul contenuto di ammine biogene in succhi di frutta da concentrato: AP, mela; GR, pompelmo; OR,arancia; PI, ananas.

CA e PCA sono stati effettuati dopo autoscaling sulla matrice di dati delle biogene ammine nei succhi di frutta da concentrato. Per la CA, sono state calcolate le somiglianze tra i campioni sulla base della distanza euclidea quadratica e per stabilire i

cluster è stato usato il metodo agglomerante gerarchico di Ward. I risultati sono visualizzati come un dendrogramma in Fig. 4.7 e come un grafico bidimensionale degli scores e dei loadings dei campioni nello spazio definito dai primi due componenti principali in Fig.4.8.

È interessante evidenziare il comportamento dei succhi di pompelmo e arancia che appartengono alla stessa famiglia botanica Citrus, ma sono classificati in due cluster diversi, con i succhi di pompelmo che mostrano una similarità più alta nei confronti dei succhi di mela, con conseguenti profili di ammine biogene inaspettatamente simili.

Il dendrogramma mostra quattro gruppi a livello similitudine di 0,6: gruppo A contiene solo qualche campione di succo di mela, il gruppo B contiene sia i restanti succhi di mela e di succhi di pompelmo, il gruppo C contiene solo succhi di arancia e il cluster D solo succhi di ananas. Aumentando il livello di somiglianza a 0,6-0,7, all'interno del cluster B si possono distinguere due sub-cluster B' e B'' che sono composti da succhi di mela e succhi di pompelmo, rispettivamente.

Nella analisi PCA (Fig. 4.8.A), le prime due componenti principali (PC1 e PC2) rappresentano il 74% della variabilità totale. Le variabili (Fig. 4.8.B), che hanno contribuito di più alla PC1 (47,2%) sono state spermina, serotonina, spermidina, istamina. La PC2 (26,8%) è stata invece associata con cadaverina, metilammina, putrescina e etilammina.

In accordo con i risultati delle analisi di cluster, nella PCA (Fig. 4.8.A), i succhi di ananas e i succhi d'arancia risultano nettamente separate tra di loro e dagli altri gruppi (succhi di pompelmo e mela). Quest'ultimi due tipi di succo di frutta sono riuniti in due diversi gruppi ma non sono separati completamente e quindi non possono essere chiaramente classificati.

Nessuna ulteriore analisi è stata effettuata per cercare di separare meglio i gruppi di mele e di succo di pompelmo, in quanto la più probabile sofisticazione in questo tipo di bevande è l'aggiunta di questi due succhi, più economici, agli altri.

Pertanto la separazione ottenuta dall'applicazione di queste due tecniche chemiometriche ai dati delle ammine biogene, ha permesso una buona classificazione dei campioni di succhi di frutta tale da fornire un promettente punto di inizio per lo sviluppo futuro di metodi per la verifica di adulterazioni.

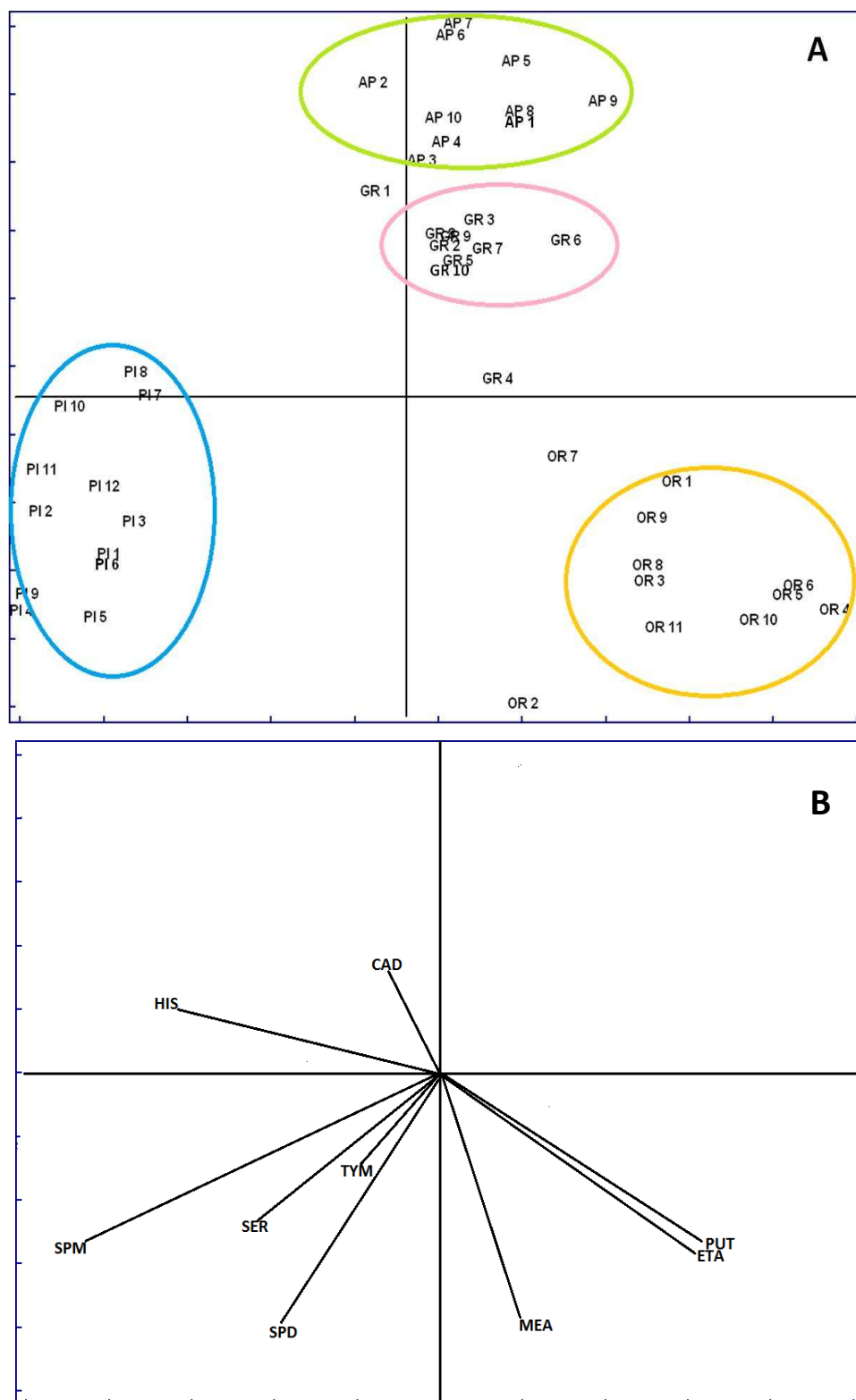


Fig. 4.8. Plots dalla analisi delle component principali dei dati delle ammine biogene sui succhi da concentrato: scores (A) e loadings (B). PI, ananas; OR arancia; GR, pompelmo; AP, mela.

Per classificare i succhi in base alla composizione di frutta, un modello LDA è stato costruito. LDA è stata eseguita su campioni originali utilizzando gli scores dei campioni sulle prime quattro PCs come variabili.

I risultati di classificazione del modello LDA sono stati presentati in termini di abilità di riconoscimento e previsione. La capacità di riconoscimento rappresenta la percentuale di successo di classificazione dei campioni nel training set.

La abilità di previsione è la percentuale di campioni classificati correttamente nel set di campioni usati come controllo utilizzando il modello sviluppato nella fase precedente.

La validazione del modello LDA è stata effettuata con il metodo di convalida incrociata Leave one out (LOOCV). Questa procedura di validazione viene eseguita rimuovendo un campione per volta, da utilizzare come un test set, mentre i campioni rimanenti formano il training set. I risultati della classificazione LDA di tutti i campioni provenienti dai quattro gruppi sono mostrati in Tabella 4.15.

Tab 4.15. Risultati della capacità di classificazione del modello LDA per i succhi a seconda del frutto di origine

Classification matrix						
True fruit category	<i>Assigned fruit category</i>					Correct %
	Correct %	Apple	Pineapple	Grapefruit	Orange	
	Apple	95.58%	411		19	
	Pineapple	100.00%		516		
	Grapefruit	94.88%	22		408	
	Orange	100.00%				473
	Total	97.62%	433	516	427	473
Prediction matrix						
True fruit category	<i>Assigned fruit category</i>					Correct %
	Correct %	Apple	Pineapple	Grapefruit	Orange	
	Apple	70.00%	7		3	
	Pineapple	100.00%		12		
	Grapefruit	80.00%	2		8	
	Orange	100.00%				11
	Total	87.5%	9	12	11	11

Si è arrivati ad una corretta classificazione (abilità di riconoscimento e previsione del 97.62% e il 87.50%, rispettivamente) per tutti i campioni

Nel training set, alcuni campioni di succo di mela sono stati erroneamente assegnati dal modello al gruppo dei succhi di pompelmo, e anche alcuni campioni di succo di pompelmo sono stati classificati come succhi di mela. In set di predizione l'abilità di predizione per la categoria succo di mela è stata del 70% in quanto 3 campioni di succo di mela sono stati assegnati in modo non corretto alla categoria succo di pompelmo.

Allo stesso modo, 2 campioni di succo di pompelmo sono stati classificati come succo di mela, con conseguente capacità di previsione per la classe di pompelmo di appartenenza del 80%. I succhi di arancia e ananas sono stati correttamente classificati (100%), sia nella matrice di classificazione che in quella di previsione.

Questo modello di riconoscimento e di previsione è in buona corrispondenza con i risultati delle due analisi esplorative (CA e PCA) condotte. I campioni di succo di mela e di pompelmo sono risultati essere più strettamente correlati rispetto agli altri per il contenuto di ammine biogene. Il metodo proposto in questo articolo è quindi adatto per la discriminazione della origine botanica dei succhi di frutta a partire dal loro contenuto in ammine biogene. A proposito della capacità di previsione, il metodo sembra essere più accurato per la discriminazione di succhi arancia e ananas (100% e 100%), ma i risultati sono soddisfacenti anche per la classificazione dei succhi di frutta da mela e pompelmo (70% e 80%).

4.7. Risultati analisi di campioni di vino rosso italiano

Sessanta bottiglie di vino rosso commerciali (750 ml) sono stati acquistati direttamente da mercati ed enoteche locali. I campioni sono stati prodotti a partire da quattro vitigni, rappresentanti del settore vitivinicolo italiano e del territorio. Per ogni campione di vino è stato assegnato un codice numerico di identificazione, come segue: Primitivo (Sud Italia, Tag P), Syrah di Sicilia (Sud Italia, Tag S), Montepulciano D'Abruzzo (Centro Italia, Tag M), Dolcetto D'Alba (Nord Italia, Tag D), per ogni vitigno sono stati acquistati 15 campioni.

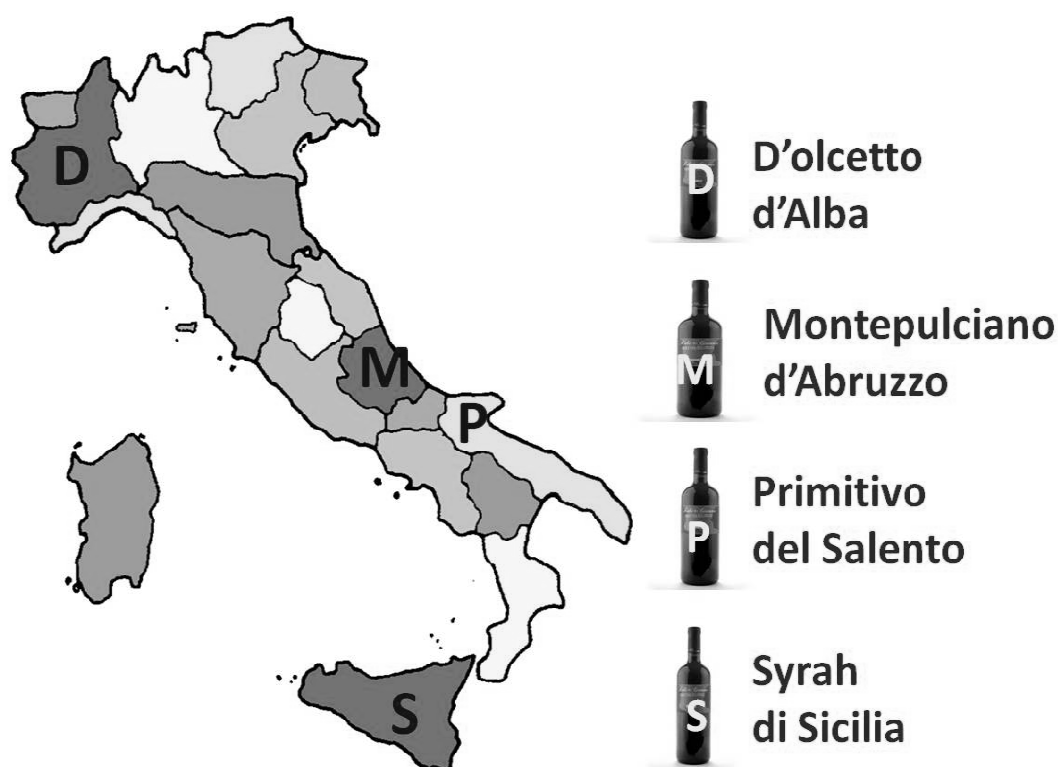


Fig 4.9. Origine dei 4 vitigni di vino rosso italiano oggetto dello studio

L'anno di vendemmia andava dal 2007 al 2012. I campioni sono stati divisi in tre classi di prezzo, ciascuna con 20 vini:

- 1- <4 €, segmento a basso prezzo;
- 2- tra 4-7 €, segmento di prezzo medio;
- 3- > 7 €, segmento a prezzo elevato.

I vini sono stati conservati al buio a 15-20 ° C e ogni bottiglia è stata aperta immediatamente prima della analisi.

4.7.1. Materiali e metodi

La procedura per la determinazione del profilo e del contenuto di ammine biogene nei campioni di vino rosso analizzati è quella precedentemente descritta. La determinazione delle ammine biogene è stata affiancata dalla quantificazione di altri parametri importanti per i vini rossi: contenuto in Trans resveratrolo, capacità antiossidante e contenuto in polifenoli totali, le cui metodiche sono brevemente illustrate di seguito.

Trans-resveratrolo: Il procedimento di estrazione liquido-liquido con etere dietilico segue quello descritto da Malovana et al. (2001). La colonna analitica usata per la determinazione in HPLC è stata una Supercolsil C18 (250x 46 mm, 5µm), con fase mobile: metanolo + acido formico al 2% come solvente A e acqua + acido formico al 2% come solvente B. Le condizioni al tempo iniziale erano 80% B e 20% A; è stato poi applicato un gradiente lineare fino ad arrivare al 40% B in 30 minuti ad una velocità di flusso di 1,3 mL / min. La rivelazione fluorimetrica è stata effettuata a 330 nm per l'eccitazione e 374 nm per l'emissione (Buiarelli et al., 2006). La curva di calibrazione è stata costruita in un intervallo tra 0,1 e 10 mg / mL ($R^2 > 0,99$).

Determinazione della capacità antiossidante. L'attività di scavenging nei confronti del radical libero 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) dei campioni di vino è stata valutata misurando la diminuzione della assorbanza a 517 nm come precedentemente riportato (Granato et al., 2010) con alcune modifiche. La miscela di reazione era costituita da 5,8 ml della soluzione metanolica di DPPH (0,05 mg / mL), e da 0,2 ml di vino diluito 50 volte in metanolo. Dopo agitazione, la miscela è stata mantenuta al buio per 30 minuti a temperatura ambiente. L'assorbanza è stata misurata contro metanolo utilizzando un Perkin Elmer 554 UV-Vis spettrofotometro con cuvette da 1 cm. I risultati sono stati calcolati usando il tasso di inibizione (I) del catione radicalico, secondo la seguente equazione:

$$I \% = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \cdot 100$$

Determinazione del contenuto totale di fenoli. Il contenuto di polifenoli totali è stato determinato con il metodo Folin-Ciocalteu secondo Singleton et al. (1999). Brevemente, 1 ml di reagente Folin-Ciocalteu è stato aggiunto a 0,2 ml di vino (diluito 1 a 5 ml con acqua distillata), e lasciata al buio per 5 min. Poi sono stati aggiunti 4 ml di carbonato di sodio al 20% (m / v). La miscela è stata mescolata e lasciata per 30 minuti a temperatura ambiente. L'aumento di assorbanza è stata misurato a 750 nm contro un bianco preparato sostituendo il volume del campione con metanolo. L'acido gallico (GA) è stato utilizzato come standard di riferimento e una curva di calibrazione è stata preparata con una gamma di concentrazioni fra 0 e 10 g/L. Il tenore dei composti

fenolici totali è stato calcolato come la media di tre misurazioni ed espresso in grammi equivalenti di GA (GAE)/L.

Misure strumentali del Colore. Le coordinate CIELAB, luminosità (L *), croma o saturazione (C *), tonalità (h), la parte verde rosso (a *) e la parte giallo-azzurro (b *) sono stati determinate secondo Ayala et al. (1997), ed i dati sono stati trattati con il software MSCV® (Ayala et al., 2001).

4.7.2. Risultati dei parametri chimico fisici

I campioni di vino sono stati scelti per essere il più rappresentativo possibile del mercato del vino italiano, che è uno dei più complessi del mondo. Per questo motivo i campioni costituiscono un gruppo piuttosto eterogeneo, fatto di quattro vitigni diversi, di diverse annate, di quattro diverse regioni di coltivazione geografiche e climatiche, con diverse pratiche enologiche. Quindi sono state osservate grandi differenze nella composizione chimica. La tabella 4.16 mostra una sintesi dei parametri analitici generali valutati nei 60 vini rossi italiani studiati.

Tab 4.16. Valore commerciale, annata, caratteristiche colorimetriche, contenuto di etanolo e solfiti, pH, dei campioni di vino rosso di fasce di prezzo differenti

	Ranges			Medie e differenze significative		
	Basso	Medio	Alto	Basso	Medio	Alto
Prezzo¹	1.89-3.49	4.20-7.00	7.75-13.50	2.66 a	5.42 b	9.08 c
Annata	2009-2012	2007-2012	1998-2011	2011 a	2010 a	2008 b
L*	68.00-86.50	64.70-87.30	66.50-84.20	78.54 a	81.54 a	76.24 a
C*	13.42-33.90	14.33-32.38	17.34-32.34	22.35 a	22.86 a	25.16 a
h*	10.93-52.63	6.75-39.37	18.44-45.37	26.33 a	25.99 a	28.01 a
a*	8.14-28.41	12.26-32.27	18.39-32.48	19.87 a	21.56 a	24.04 a
b*	3.70-18.50	3.57-14.79	6.89-22.46	9.69 a	9.23 a	12.56 b
pH	3.24-3.73	3.48-3.72	3.53-3.82	3.49 a	3.58 b	3.67 c
Etanolo²	12.10-14.00	12.25-14.25	12.75-15.00	12.63 a	13.10 b	13.57 c
SO₂ free³	1.08-48.64	1.45-48.64	1.97-44.80	16.87 a	14.70 a	16.99 a
SO₂ tot³	10.24-112.64	10.88-94.72	10.24-104.32	56.8 a	45.90 a	47.70 a

¹ Prezzo di vendita riferito ad una bottiglia di 0.75 L (€), ² (% V/V), ³ espresso in mg/L. Lettere diverse nella stessa riga mostrano risultati statisticamente differenti second il test LSD (p<0.05).

Per quanto riguarda la composizione del colore, la coordinata unica CIELAB che ha mostrato differenze significative tra i tre segmenti di prezzo è di colore giallo-azzurro (b*), che ha avuto il più alto valore nei vini costosi.

Il tasso di inibizione di DPPH (Tabella 4.17) varia notevolmente 10,34-49,48%, nonché fenoli totali e contenuto di resveratrolo che variava 0,40-2,84 e 7,19-53,61 mg / L, rispettivamente. Questi valori sono in accordo con precedenti studi in cui i diversi vini rossi italiani sono stati valutati (Cimino et al., 2007).

I campioni sono stati raggruppati in tre categorie in relazione al loro valore al dettaglio, e al fine di esplorare l'effetto "valore commerciale", i dati sono stati elaborati mediante il test ANOVA ($p < 0.05$). Per i parametri analitici generali, è stata osservata una dispersione significativa pH, etanolo, vendemmia e prezzo al dettaglio, con il segmento di prezzo elevato con i vini maggiori, come previsto. Per quanto riguarda i solfiti non vi era alcuna chiara tendenza tra le diverse categorie di prezzo, con una gamma 14,7-16,99 mg / L per i solfiti liberi e 45,9-56,8 per il totale.

Tab. 4.17. Polifenoli totali, trans resveratrolo e capacità antiossidante di campioni di vino rosso di differente fasce di prezzo.

	Ranges			Medie e differenze significative		
	Basso	Medio	Alto	Basso	Medio	Alto
Polifenoli¹	0.40-2.49	1.21-2.45	1.03-2.84	1.35 a	1.79 b	1.76 b
Resveratrolo²	1.10-3.20	0.72-4.53	1.84-5.36	1.95 a	2.55 a	3.13 b
Capacità antiossidante³	10.34-42.46	15.83-45.88	28.99-49.48	28.99 a	30.96 a	39.85 b

¹concentrazioni espresso come (g/L GAE), ²esprese come % inibizione, ³espresso in mg/L. Lettere diverse nella stessa riga mostrano risultati statisticamente differenti secondo il test LSD ($p < 0.05$).

Differenze significative sono state osservate tra i vini appartenenti a diverse fasce di prezzo, in generale, i vini di alta prezzo esposto il più alto livello di sostanze antiossidanti legate (composti fenolici, resveratrolo e DPPH tasso di inibizione), come mostrato in figura 4.10.

Su 60 campioni di vino, sono stati rilevati, identificati e quantificati nove ammine biogene. Differenze significative ($p < 0,05$) trovati confrontando i tre diversi segmenti di

prezzo di vino ed i risultati sono diversi per ciascuna ammina considerati (Tabella 4.18). In particolare, metilammina, agmatina e istamina sono stati trovati statisticamente più presente nei vini a basso prezzo, con istamina che ha raggiunto una media più che doppia degli altri due segmenti.

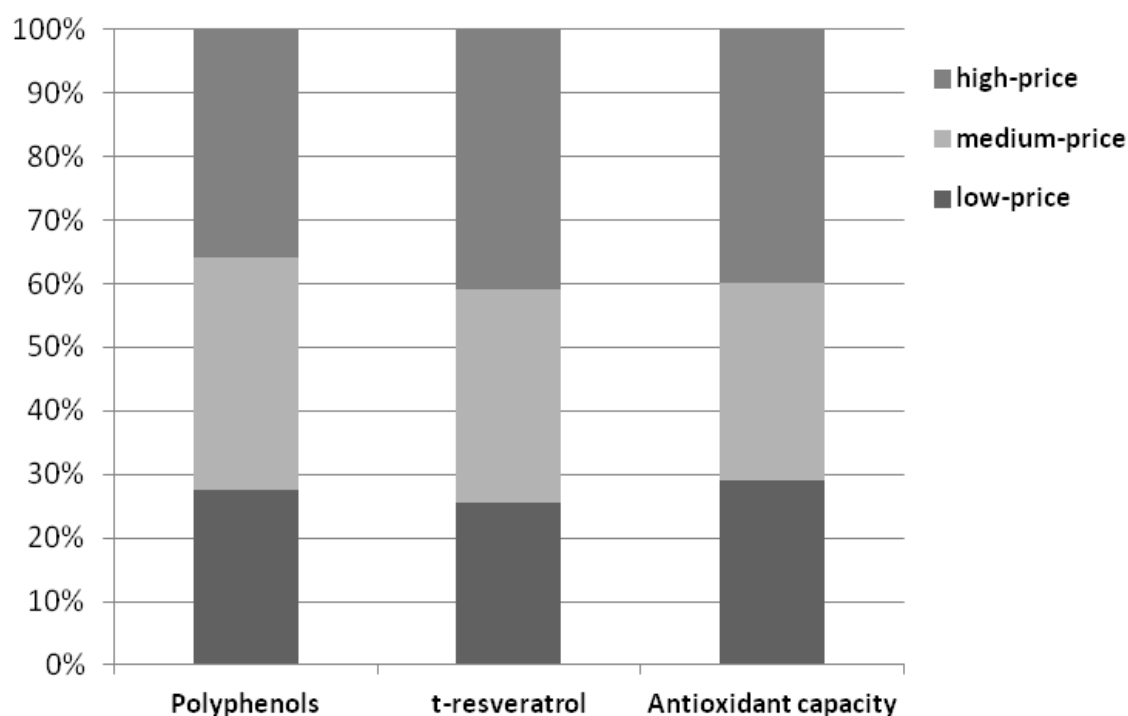


Fig. 4.10. Antioxidant properties of wines of different price categories.

Al contrario cadaverina e putrescina risultato significativamente più presente nei vini di alta di prezzo, con più di un doppio di contenuti di vino a basso prezzo. Le ammine biogene rimanenti, β -phenylethylamine, tiramina, etilammina, spermina e spermidina, non variano tra i segmenti di prezzo e la serotonina è stata mai rilevata.

In generale, si notano differenze significative nel totale delle ammine biogene tra i segmenti di prezzo, essendo il segmento di prezzo più alto è il più ricco di questi composti seguito dagli altri due in ordine (Figura 4.11).

In generale, i livelli di ammine biogene determinati nei campioni esaminati sono ancora considerati sicuri per i pazienti senza intolleranza istamina, soprattutto per quanto riguarda HIS e TYR, la più importante causa di intolleranza al vino (Konakowski et al., 2011).

Tab. 4.18. Composizione in ammine biogene (mg/L) di vini rossi di diverse fasce di prezzo.

Biogenic amines	Ranges			Medie e differenze significative		
	Basso	Medio	Alto	Basso	Medio	Alto
B-PEA	Nq-1.75	Nq-1.47	0.15-1.20	0.49 a	0.42 a	0.54 a
AGM	Nq-5.18	Nq-4.52	Nq-2.72	2.37 a	2.72 a	1.54 b
CAD	0.33-3.90	0.90-4.45	0.86-9.90	1.34 a	1.84 a	3.23 b
ETA	1.01-14.23	1.14-10.03	2.59-16.40	4.69 a	4.20 a	5.56 a
HIS	Nq-3.16	Nq-1.05	Nq-1.26	1.02 a	0.40 b	0.46 b
MEA	0.21-1.63	0.53-1.52	0.15-1.43	1.06 a	0.99 a	0.74 b
PUT	0.84-10.08	2.24-20.28	3.32-25.40	5.55 a	7.03 a	10.71 b
SER	nd	nd-	nd	-	-	-
SPD	Nq-0.58	Nq-1.03	Nq-0.96	0.18 a	0.32 a	0.32 a
SPM	Nq-1.37	Nq-0.33	Nq-0.27	0.15 a	0.09 a	0.11 a
TYM	0.22-13.28	0.75-26.69	3.075-34.99	7.76 a	8.60 a	12.12 a
Total	5.07-48.90	16.04-63.64	22.79-97.11	29.00 a	34.04 b	48.23 c

Lettere diverse nella stessa riga mostrano risultati statisticamente differenti secondo il test LSD ($p < 0.05$).

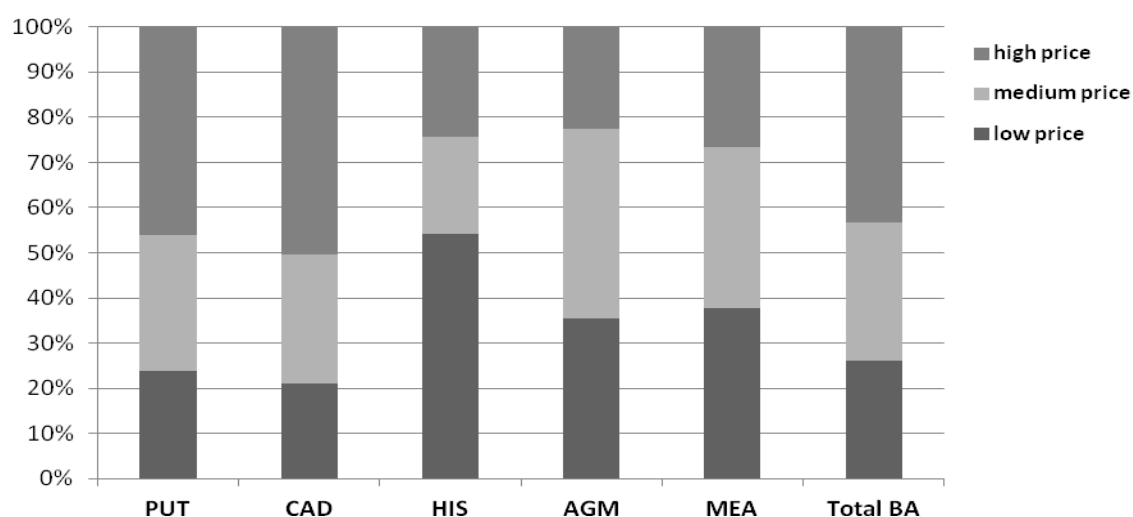


Fig.4.11. Biogenic amines levels in the different price categories.

Ma le possibili reazioni dei consumatori intolleranti all'istamina meritano attenzione anche in considerazione degli altri alimenti ricchi di ammine che si assumono ad ogni pasto.

Anche i livelli totali di anidride solforosa in tutti i campione analizzato sono di gran lunga al di sotto del limite di legge comunitario fissato a 160 mg / L.

4.7.3. Contenuto di ammine biogene nei vini studiati e relazione con gli altri parametri

Uno studio di correlazione è stato effettuato per verificare l'esistenza di rapporti tra i diversi parametri analizzati e soprattutto con il valore commerciale del vino rosso italiano. I risultati sono riportati nella tabella 4.19 (solo parametri con valori significativi sono riportati).

Analizzando innanzitutto la correlazione tra prezzo vino e l'altro valore è evidente il forte correlazione negativa tra prezzo e epoca ($r = -0.57$; $p < 0.01$) e la forte correlazione positiva con il contenuto in etanolo ($r = 0.65$, $p < 0.01$) e con i risultati di pH ($r = 0.57$, $p < 0.01$).

È ben noto che i vini più economici sono solitamente giovani e subiscono una macerazione più piccolo e più della fermentazione avviene in una fase puramente liquido, mentre la fermentazione del vino da invecchiato è il più delle volte effettuata in presenza di uva solidi e in botti di rovere (Granato et al., 2012; San Juan et al., 2012) questo processo è molto costoso e influenza tutti i parametri chimici studiati come indicato nelle seguenti sezioni. La seguente discussione si concentrerà pertanto sulle differenze di composizione chimica tra i vini delle categorie più economiche e più costose, attraverso uno studio di correlazione che mirano a trovare relazioni tra i diversi parametri e prezzi, e cercando di capire la possibile origine di questi risultati soprattutto nelle pratiche enologiche utilizzate.

I consumatori e le industrie vinicole mostrano sempre maggiore interesse per la presenza di alcune ammine biogene negli alimenti e nei vini, in particolare, e la loro assenza è indicata come indice di qualità del prodotto (Onal et al., 2013).

Table 4.19. Correlations among different parameters studied.

	<i>Phenolic s</i>	<i>Ant Cap</i>	<i>t-resv</i>	<i>SO₂ Tot</i>	<i>SO₂ Free</i>	<i>PUT</i>	<i>CAD</i>	<i>TYM</i>	<i>ETA</i>	<i>HIS</i>	<i>AGM</i>	<i>Ethanol</i>	<i>pH</i>	<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>	<i>Vintage</i>	<i>Price</i>
Ant Cap	0.45^C	1.00																
t-Resv	0.22	0.52^C	1.00															
SO ₂ Tot	-0.41^C	-0.06	-0.12	1.00														
SO ₂ Free	-0.24	0.10	0.10	0.79^C	1.00													
PUT	0.23	0.58^C	0.36^B	-0.24	-0.16	1.00												
CAD	0.14	0.35^B	0.42^C	-0.25	-0.05	0.40^C	1.00											
TYM	0.21	0.53^C	0.23	-0.29	-0.25	0.84^C	0.34^A	1.00										
ETA	-0.19	0.48^C	0.37^B	0.25	0.42^C	0.36^B	0.20	0.37^B	1.00									
MEA	0.03	0.01	-0.34^A	0.00	-0.07	0.03	-0.22	0.12	0.00	0.29	0.18							
SPD	-0.15	0.09	0.26	-0.08	0.20	0.17	0.31^A	0.11	0.13	-0.20	-0.24							
Ethanol	0.52^C	0.49^C	0.31^A	-0.35^B	-0.28	0.30^A	0.40^C	0.28	0.08	-0.16	-0.32^A	1.00						
pH	0.32^A	0.46^C	0.29	-0.18	-0.16	0.41^C	0.40^C	0.32^A	0.19	-0.13	-0.10	0.53^C	1.00					
L*	-0.39^C	-0.36^B	-0.23	0.28	-0.02	-0.20	-0.15	-0.21	-0.16	-0.04	0.10	-0.39^C	-0.32^A	1.00				
a*	0.42^C	0.45^C	0.35^B	-0.26	0.09	0.34^A	0.40^C	0.30^A	0.43^C	-0.07	-0.09	0.39^C	0.38^C	-0.79^C	1.00			
b*	0.31^A	0.17	-0.11	-0.47^C	-0.49^C	0.37^B	0.26	0.47^C	-0.13	-0.10	-0.16	0.35^B	0.38^C	-0.43^C	0.30^B	1.00		
Vintage	-0.13	-0.34^A	-0.13	0.32^A	0.30	-0.48^C	-0.22	-0.51^C	0.12	0.15	0.19	-0.27	-0.29	0.34^B	-0.12	-0.66^C	1.00	
PRICE	0.35^A	0.46^C	0.36^B	-0.26	-0.08	0.41^C	0.52^C	0.26	0.05	-0.35^B	-0.29	0.65^C	0.57^C	-0.36^B	0.33^A	0.38^C	-0.57^C	1.00
BA Tot	0.18	0.60^C	0.43^B	-0.26	-0.10	0.83^C	0.77^C	0.82^C	0.49^C	0.03	-0.19	0.38^B	0.46^B	-0.23	0.47^B	0.38^A	-0.39^A	0.46^B

significance: ^Ap<0.05, ^Bp<0.02, ^Cp<0.01. Significant correlations are in bold.

Dai nostri dati sulla presenza di BAs in vini rossi italiani in relazione al valore commerciale del vino, cadaverina e putrescina sembrano aumentare con il prezzo del vino ($r = 0.52$, e 0.41 , rispettivamente), mentre l'istamina sembra essere più presente nei vini a basso prezzo ($r = - 0.35$, $p < 0.02$). L'istamina è l'ammina più pericolosa e può causare molti effetti negativi per la salute umana. Per questo motivo, e nonostante il fatto che nessun limite ufficiale è stato ancora stabilito, alcuni paesi hanno stabilito dei limiti di legge o raccomandazioni per le concentrazioni di istamina nel vino. Inoltre, così come il loro effetto sulla salute umana, le ammine biogene possono anche influenzare il sapore di un vino (Bach et al., 2011).

Interessante l'elevata correlazione positiva tra putrescina e tiramina ($r = 0.84$, $p < 0.01$). Questa associazione è già stata descritta (Romero et al., 2002), mentre la correlazione tra putrescina e cadaverina ($r = 0.40$, $p < 0.01$), è stata rilevata da Konakowski et al. (2011).

Le ammine biogene sono naturalmente presenti nel vino ed è molto difficile, se non impossibile, ottenere un vino che non le contenga.

La presenza di BAs nel vino può avere molte fonti diverse: il tempo di contatto con il mosto d'uva, tipo e quantità di aminoacidi contenuti nelle fasi iniziali e finali della fermentazione alcolica, tempo di contatto del vino con i lieviti, ma anche il tipo e il grado di maturazione dell'uva, il clima e il terreno della zona di viticoltura, e le tecniche di vinificazione (Ferreira e Pinho, 2006).

In particolare, è stato osservato da vari autori l'aumento della concentrazione di BA durante la fermentazione malolattica (FML) e durante l'invecchiamento (Soufleros et al., 1998; Landete et al., 2005; Pramateftaki et al., 2006). Alcuni autori hanno dimostrato che la FML ha una grande influenza sul livello di PUT in vini rossi (Izquierdo, et al., 2008; Gardini et al., 2005; Martin-Alvarez, et al., 2006), mentre le altre ammine fisiologicamente attive potrebbero essere prodotte durante la fermentazione alcolica e malolattica, o provenire direttamente dalle uve.

Particolare attenzione dovrebbe essere prestata ad alcune pratiche enologiche frequentemente utilizzate per migliorare la complessità del vino (sapore e aroma), ma che può anche aumentare la concentrazione degli acidi precursori aminoacidi, come ad esempio l'invecchiamento dei vini con fecce, tempi di macerazione più lunghi (Villamiel et al., 2008). Lieviti e batteri fecce possono indirettamente svolgere un ruolo

importante nella produzione di ammine biogene, in quanto influenzano la composizione aminoacidica durante la fermentazione alcolica o durante autolisi (Marcobal et al., 2006; Alcaide- Hidalgo et al., 2007), e può anche essere una fonte per gli enzimi decarbossilasi che potrebbero essere coinvolti nella produzione di ammine. Inoltre, il tipo di contenitore impiegato durante la fermentazione malolattica (acciaio inossidabile o botte di rovere) sembra influenzare il contenuto di ammine biogene nei vini (Jimenez Moreno et al., 2003). L'invecchiamento dei vini rossi in botti di rovere aumenta notevolmente il contenuto di putrescina, e, in misura inferiore, di cadaverina (Dapkevicius et al., 2000).

Inoltre, un altro parametro che è importante per la presenza di questi contaminanti naturali è il pH, che risulta infatti significativamente correlata con putrescina, cadaverina e tiramina. Molti studi correlano la formazione di BAs con elevati valori di pH nel vino (Landete et al., 2005; martin-Alvarez, Marcobal et al., 2006). In realtà, questo parametro influenza il tasso di crescita delle specie di batteri che partecipano al micro biota del vino, e quindi la loro attività malolattica. Un pH sotto 3.3 potrebbe causare una difficile fermentazione malolattica, ma un pH elevato può aumentare la suscettibilità del vino al deterioramento microbico. Alcuni autori hanno stabilito un livello critico tra pH 3,5 e 3,6, sopra il quale è più difficile controllare la popolazione di microrganismi, con la possibilità di problemi derivanti a causa della produzione di BA. Per quanto riguarda la relazione tra BA e grado alcolico, è considerato uno dei parametri che influenzano le attività dei batteri coinvolti nella decarbossilazione degli aminoacidi durante la fermentazione malolattica. La correlazione positiva tra grado alcolico e presenza di BAs nel vino dovrebbe essere evidenziata a causa del possibile effetto sinergico dell'etanolo sulla attività delle BAs, che può rappresentare un rischio significativo per alcuni consumatori. L'andamento dei livelli di concentrazione di istamina, che sono, al contrario, maggiori nei vini a basso costo, può essere spiegato da una diminuzione di questi composti durante la conservazione dei vini ad alto costo. Infatti, in alcuni alimenti fermentati è stato osservato che la degradazione di istamina può essere dovuto all'azione delle ammina ossidasi presenti, impedendo così il suo accumulo (Dapkevicius et al., 2000). I livelli rilevati per il biossido di zolfo libero e totale sembrano generalmente poco correlati con gli altri parametri di controllo della qualità del vino; con l'eccezione della correlazione con etilammina. Pertanto l'effetto

inibitorio di SO₂ verso la fermentazione malolattica e quindi il suo conseguente effetto nell'impedire la formazione delle ammine riportato da Marcobal et al. (2006) non è stato confermato.

4.7.4. Classificazione dei vini in base al valore commerciale e al vitigno

LA PCA è stata effettuata allo scopo di fornire la visualizzazione parziale dei dati impostati in una dimensione ridotta. L'analisi multivariata è stata eseguita da prima sulla sola matrice di dati composta dai 60 campioni e dalle variabili corrispondenti alle ammine biogene studiate, come riportato nella figura 4.12, queste variabili non sono state da sole sufficienti a discriminare i vini oggetto dello studio nel dal punto di vista dell'origine geografica e del vitigno né della fascia di prezzo.

La PCA è stata quindi ripetuta includendo i dati derivanti da tutti gli altri parametri studiati non considerando le coordinate del colore C * e h * e il prezzo. Dopo autoscaling, due componenti importanti sono stati individuati dando conto per il 26% e il 14% della varianza totale, rispettivamente.

Il secondo componente principale (PC2) è dominata dall'effetto positivo di polifenoli, coordinata b * e spermina, mentre negativamente da SO₂ ed etanolamina.

Dai loadings delle variabili (Figura 4.13), si evidenzia come ammine biogene putrescina, cadaverina e tiramina, capacità antiossidante, polifenoli e trans-resveratrolo con il contenuto di etanolo sono le caratteristiche che influenzano positivamente la prima componente principale (PC1), mentre l'annata e la coordinata L hanno un impatto negativo.

Il grafico degli scores ottenuto da dati quantitativi di ciascun campione di vino rivela una certa discriminazione dei campioni in base al loro valore commerciale lungo PC1 e i dati mostrano un raggruppamento naturale. Infatti, nella parte positiva della PC1 si trovano principalmente i vini costosi (in rosso) che sono chiaramente separati dalla categoria a costo minore (in marrone) che è limitato nel lato sinistro del grafico. Il segmento a medio prezzo (in verde) si colloca equamente distribuito nello spazio, senza una chiara differenziazione.

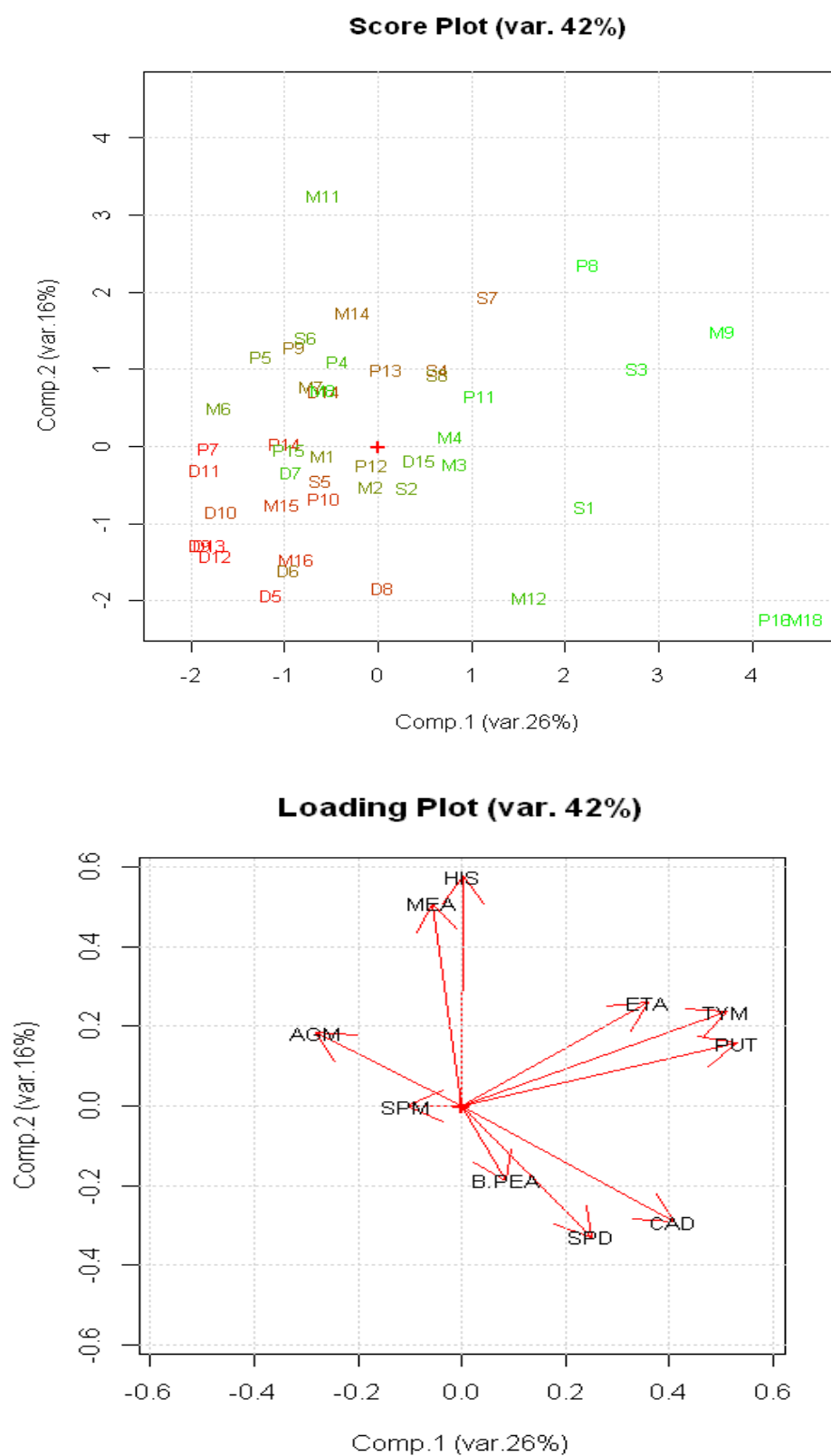


Fig. 4.12. Scores e loadings della PCA sui livelli delle ammine biogene nei campioni di vino rosso.

La PC2 riesce parzialmente nel discriminare i vini secondo la varietà di uva, essendo i campioni Syrah nella parte inferiore del grafico e campioni Primitivo nella parte superiore, mentre Dolcetto sono più concentrati nella parte sinistra della trama e i Montepulciano d'Abruzzo sono sparsi nello spazio.

LA netta separazione dei vini di segmento a basso prezzo da quelli del segmento costoso lungo la PC1 rivela chiaramente una diversa composizione chimica in termini di proprietà antiossidanti e contenuti di ammine biogene. Le differenze nelle pratiche enologiche sembrano essere alla base delle differenze nei parametri chimici studiati tra le categorie di prezzo.

La evidente correlazione tra ammine biogene e la capacità antiossidante e il contenuto in trans-resveratrolo insieme con l'osservazione della correlazione di questi parametri con il prezzo e l'annata, non può che confermare l'ipotesi che questi composti si generano in quei vini derivanti da periodi di maturazione più lunghi, caratterizzati da un esteso tempo di contatto con le bucce e i semi dell'uva e che siano anche influenzati vitigno e dalla zona geografica di origine.

In questo contesto, l'assenza di correlazione tra polifenoli totali e ammine biogene è difficile da spiegare perché questi parametri sono noti per influenzare anche il loro contenuto. Galgano et al (2012) hanno ipotizzato che i composti fenolici sembrano essere un modo naturale per ridurre la formazione della putrescina nel vino, perché queste frazioni sono in grado di proteggere le cellule contro lo stress ossidativo.

Probabilmente, i fattori che promuovono la presenza di BAs nei vini rossi italiani, promuovono anche la parte della capacità antiossidante legato ai composti non determinato con il metodo Folin Ciocalteu, questo è il caso di resveratrolo, che mostra una correlazione significativa con il contenuto fenoli totali. È stato infatti suggerito che l'attività antiossidante del vino è più legata al tipo di composti fenolici che al loro contenuto totale (Gomez-Gallego et al., 2012).

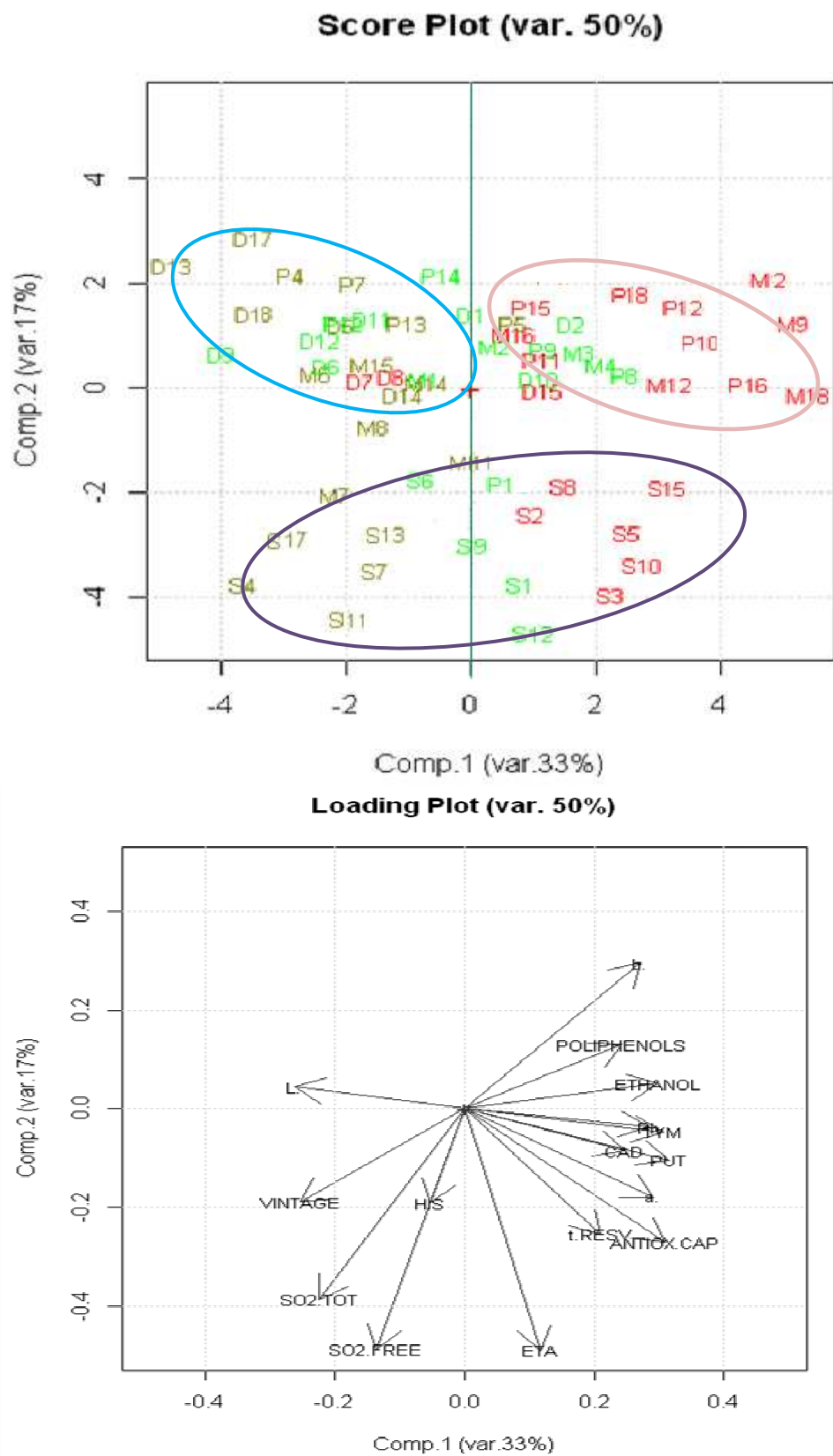


Fig 4.13. Plots della PCA sui 60 campioni di vino analizzati. In rosso i vini di fascia di prezzo alta, in verde chiaro media, in verde scuro bassa

CAPITOLO 5
SECONDO CASO STUDIO:
VERIFICA DELL'ORIGINE DA AGRICOLTURA
BIOLOGICA DEL LATTE TRAMITE IRMS.

Carbonio (C) e azoto (N) sono gli elementi più abbondanti sulla terra, e loro isotopi stabili naturali (^{12}C , ^{13}C , ^{14}N , ^{15}N) hanno abbondanze caratteristiche per ogni creatura vivente. Pertanto, la misura del rapporto isotopico stabile C e N nel latte fornisce un promettente metodo per distinguere tra latte vaccino convenzionale (CM), e biologico (OM).

Infatti i rapporti isotopici di C e N negli esseri viventi possono essere correlati a quelli che si trovano in natura (Kelly, 2003; Kim et al., 2011). Il rapporto isotopico $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ nel latte può variare notevolmente a seconda della dieta della vacca (Molkentin, 2013), e più precisamente in relazione del pathway fotosintetico delle piante consumate dall'animale, C3 (es. erba) o C4 (es. mais) (Badeck et al., 2005; Bahar et al., 2005; Knobbe et al., 2006; Molkentin, 2013).

Quindi la determinazione di $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ nel latte potrebbe essere un mezzo per verificare il latte ingiustamente etichettato come OM, proteggendo così i diritti dei consumatori e consentire un mercato equo (Molkentin, 2013).

E' stato dimostrato che il rapporto isotopico stabile $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ nel latte riflette la dieta delle mucche (Kornexl et al., 1997). I valori di $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ nel latte proveniente dalle regioni dominate da pascoli risulta maggiormente negativo rispetto ai valori che si riscontrano nel latte da regioni dominate da coltivazioni di foraggi. Questa osservazione è già stata usata per discriminare con successo il latte convenzionale da quello biologico in campioni provenienti dalla Germania (Molkentin & Giesemann, 2007), dalla Corea (Il-Min et al., 2014). Gli stessi autori degli studi citati, mettono in guardia sulla possibilità che questo marker non sia universale, ma che possa essere influenzato dalla regione di provenienza geografica del prodotto alimentare considerato e che, volendo applicare quindi la tecnica alla discriminazione di CM e OM in un Paese diverso si debba procedere alla analisi di campioni con origine e processo produttivo certi, al fine di determinare un valore di $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ tipico delle due produzioni per quella regione di provenienza.

Le analisi IRMS impongono la purezza dei composti target analizzati e , conseguentemente, steps di purificazione per la preparazione di estratti di adeguata purezza da una matrice complessa come il latte è stato un passaggio cruciale. La tecnica preparativa si è avvalsa dell'uso dell'HPLC per la purificazione dei campioni di latte.

Pertanto, nel presente studio, sono state analizzate cinque diverse marche commerciali di OM e cinque di CM che sono state acquistate nei mercati locali di Roma, nel periodo estivo del 2012. E' stato misurato il valore del rapporto $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ tramite un Isotope Ratio Mass Spectrometer (IRMS) al fine di rilevare differenze tra produzione convenzionale e biologica.

5.1. Materiali e metodi

Tutti i reagenti, solventi e standards usati in questo lavoro sono stati acquistati da Sigma Aldrich. L'anidride carbonica di riferimento per la calibrazione dell'IRMS (Solgas, Monza, Italy) è stata calibrata attraverso il confronto con i valori certificate di VPDB, obtained from Prof Brenna (Cornell University Ithaca, NY). Tutte le separazioni sono state fatte su un cromatografo liquido Agilent 1100 Series (Agilent Technologies SpA, Cernusco sul Naviglio, MI, Italy) e le frazioni selezionate sono state raccolte da un collettore di frazioni Agilent 1100. La ripetibilità dei tempi di ritenzione del picco del methyltestosterone sono state usate per verificare la stabilità delle corse HPLC.

5.1.1. Protocollo di estrazione del glicerolo dal latte

La prima fase dell'estrazione prevede l'estrazione dei trigliceridi e la rimozione delle proteine. A tal fine, 9.7 mL di latte sono trattati con 1.25 mL di NH_3 25%, 10 mL di etanolo, 25 mL di etil etere agitazione per 1 minuto, 25 mL di etere di petrolio agitazione per 30 secondi. La miscela veniva poi centrifugata e il supernatante raccolto e il portato a secco tramite un rotavapor a 40°C.

La seconda fase prevede una reazione di saponificazione. All'estratto secco si aggiungono 50 mL di metanolo e 15 mL di una soluzione di NaOH (1 M in metanolo) e si tiene in refluxo a 180°C per 2 h. Si porta a secco in rotavapor a 60°C.

Il terzo passaggio della estrazione prevede la purificazione del glicerolo e la rimozione degli acidi grassi, tramite l'estrazione con 10 mL di esano in un bagno ad ultrasuoni per 3 volte. Si estrae la frazione con il glicerolo con 10 mL di acqua ultra-pura in un bagno di ultrasuoni, si raccoglie e si lava con altri 5 mL, unendo poi i due estratti acquosi.

200 µL dell'estratto passato in un filtro a siringa 0.22 µm vengono derivatizzati con 500 µL di anidride acetica e 500 µL di piridina e posto a 100°C per 20 minuti, e poi portato a secco sotto flusso di azoto a 75°C.

Il glicerolo acetilato viene poi ricostituito in 100µl di una soluzione di methyltestosterone 100µg/ml in H₂O/MeOH 50/50 (ISTDLC), centrifugato per 5 minuti a 11600 rpm. Il surnatante viene poi purificato tramite una HPLC preparativa. Lo standard di glicerolo, per determinare il tempo di ritenzione è stato preparato a partire da 5 mg di uno standard acquistato da Sigma Aldrich a purezza $\geq 99\%$ a cui si è aggiunto 5 ml di metanolo, 1 ml di una miscela anidride acetica/piridina (50/50), tenuta a 100°C per 20 minuti, evaporata a 75°C sotto flusso di azoto, e ricostituita con 200µl methyltestosterone 100µg/ml (ISTDLC) in H₂O/MeOH 50/50. Lo standard di glicerolo acetilato si è dimostrato stabile per 1 mese.

Per la purificazione in HPLC sono stati iniettati 40µl della soluzione standard o dell'estratto del campione su una colonna ACE 5 C18 (CPS Analitica, Milano, Italy) (25 cm, 4.6 mm, 5 µm) con una pre-colonna ACE 5 C18. La fase mobile era costituita da A: acqua e B : acetonitrile. Il gradiente andava da 0% a 100% di di acetonitrile in 30 min, che con i 5 minuti di riequilibrio davano un tempo di corsa totale di 35 minuti ad un flusso di 1 ml/min. I 5 canali di acquisizione al DAD sono stati impostati: A=192.4, B=254.8, C=360.16, D=241.16, E=290.16. Il tempo di eluizione di riferimento per il raccoglitore di frazioni era di 13.6 minuti per il glicerolo e di 20.9 minuti per il methyltestosterone (Figura 6.2.). I tempi di ritenzione venivano controllati ogni giorno. La frazione eluita veniva raccolta e poi evaporata a 75°C.

Il glicerolo acetilato con un grado di purezza HPLC veniva ripreso con 30 µl di 5α-androstan-3β-olo (10µg/ml in EtAc), standard interno per le corse GC ed iniettato al GC/MS in split al fine di confermare purezza, la struttura acetilata e la sua concentrazione. Il metodo per il GC/MS prevedeva l'uso di una colonna capillare HP 5MS (J&W Scientific) 5column (30 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm). La rampa del forno andava da 90° a 150°C poi da 180 a 320°C in 17 minuti. Il carrier gas era elio 6.0 ad un flusso di 2.1 ml/min. I tempi di ritenzione per il glicerolo erano di 4.5 minuti mentre per 5α-androstan-3β-olo di 9 minuti. Le analisi sono state acquisite in modalità full scan (range m/z 40–550). Gli ioni di riferimento per il glicerolo erano 145, 43, 103. Il volume del solvente di diluizione è stato modificato di volta in volta a seconda della concentrazione stimata in ogni campione, al fine di ottenere un segnale adeguato all'IRMS (1–2 V) (Figura 6.3).

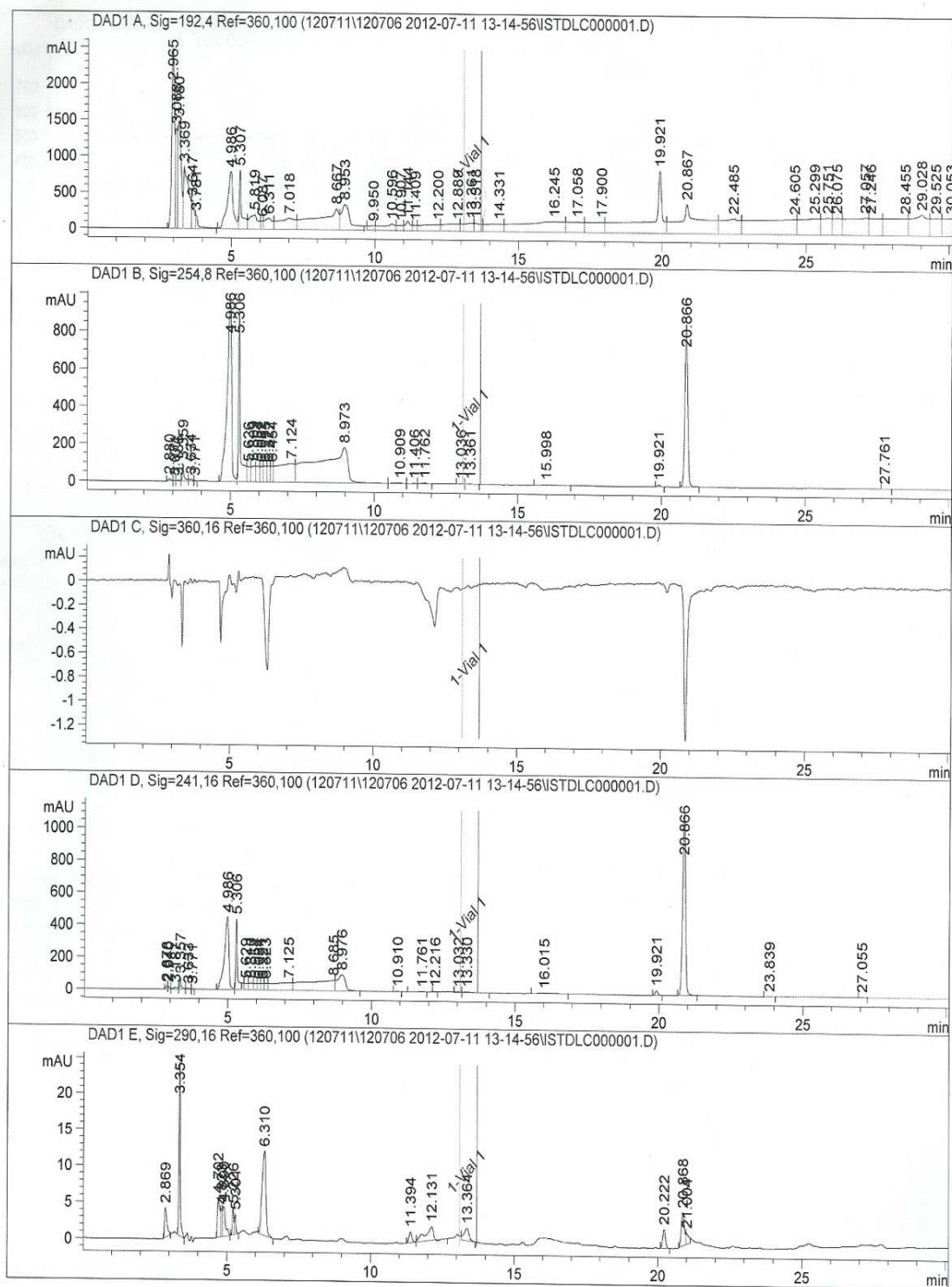


Figura 6.2. Cromatogrammi HPLC/DAD alle diverse lunghezze d'onda impostate dello standard del glicerolo acetilato in un campione di latte, tempo di ritenzione per il raccoglitore di frazioni 13.6 min, per il methyl testosterone, standard interno 20.9.

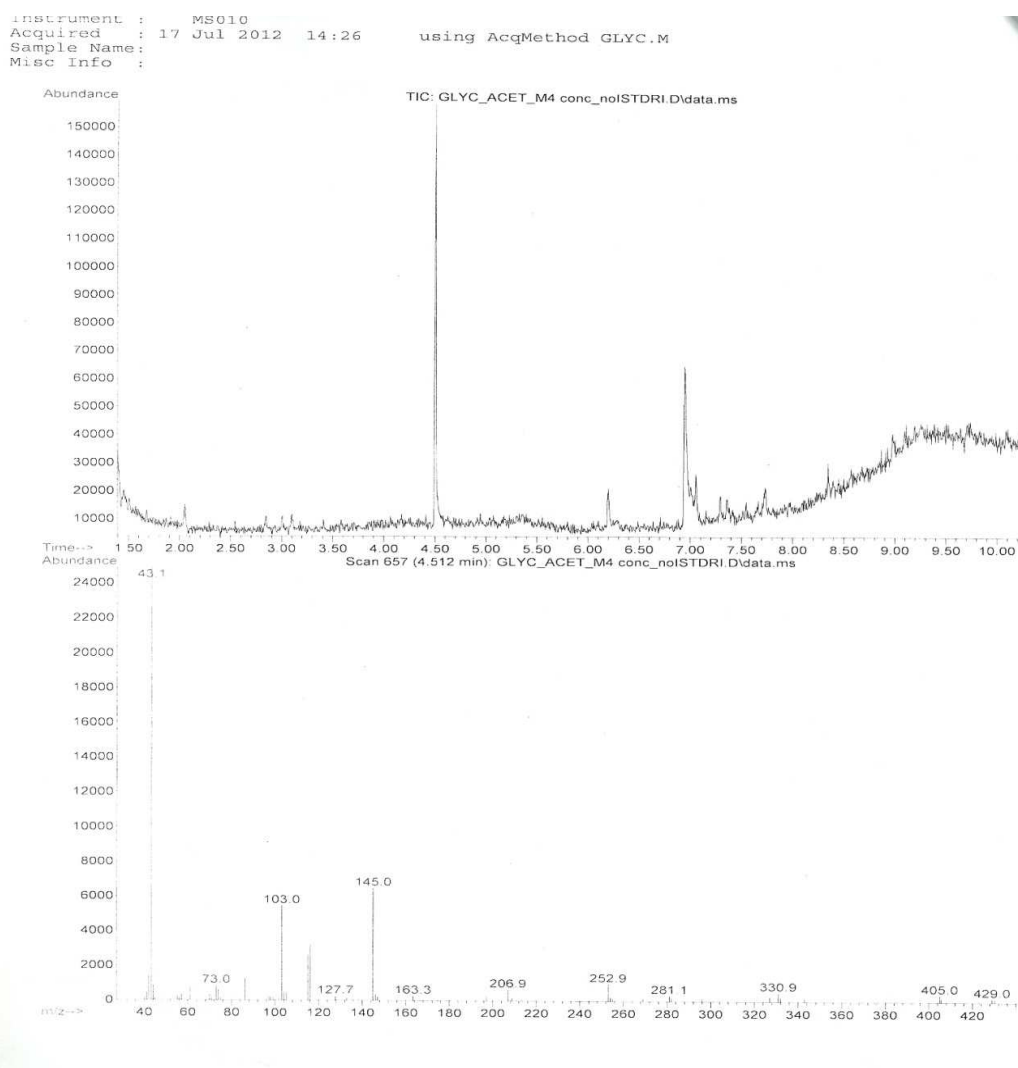


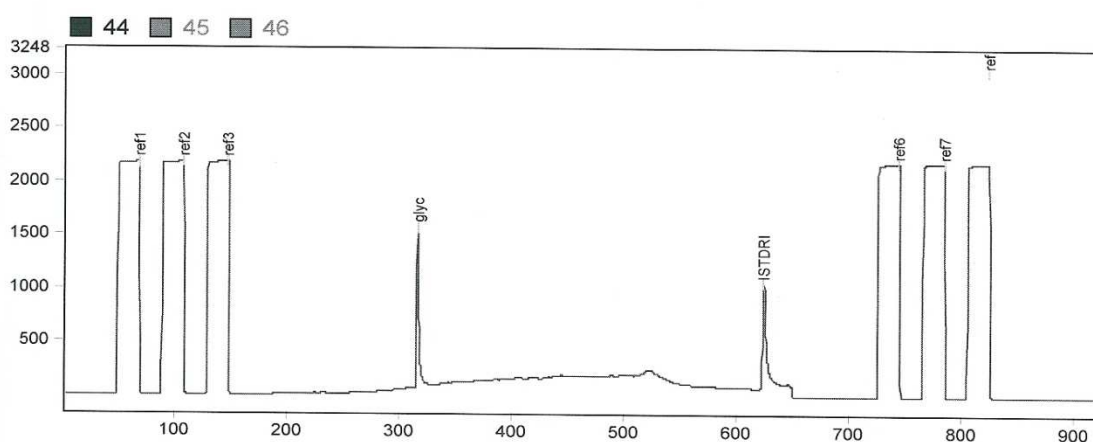
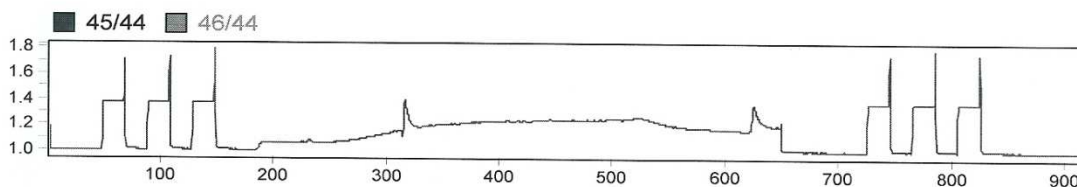
Fig. 6.3. Cromatogramma GC/MS del glicerolo acetilato di una campione di latte purificato tramite HPLC preparativa (RT: 4.5 min) e relativo spettro di massa.

Per le analisi al GC/IRMS è stato utilizzato un gas cromatografo HP6890 connesso a una fornace di combustione Thermo GC Combustion III interfaccia a sua volta interfacciata ad uno spettrometro di massa a rapporto isotopico Thermo Delta Advantage (ThermoElectron, Bremen, Germany).

Per l'analisi del rapporto isotopico $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ ($\delta\%$) del glicerolo all'IRMS si procedeva prima con una ossidazione in forno per 30 minuti. Lo strumento si calibrava con una serie di emissioni interne di CO_2 fino ad avere una serie di 10 valori con una $\text{SD} < 0.1$.

Isodat GC IsoLink Results (RI-003)

GC Method	AS Sample	AS Method	Identifier 1	Identifier 2	Method
GC\glyc.7890	12	Disabled	glyc_ms bio	manuale	glyc.met



Peak Nr.	Component	Rt [s]	Ampl. 44 [mV]	BGD 44 [mV]	d 13C/12C [per mil] vs. VPDB
1	ref1	67.5	2181	0.7	-23.258
2*	ref2	107.2	2182	1.3	-23.351
3	ref3	147.1	2184	1.4	-23.381
4	glyc	315.8	1503	67.5	-42.195
5	ISTDRI	624.3	988	74.1	-31.447
6	ref6	744.2	2185	0.8	-23.472
7	ref7	784.2	2188	1.3	-23.538
8	ref8	823.9	2187	1.4	-23.508

Fig. 6.4. Cromatogramma GC/IRMS del glicerolo acetilato da un campione di latte convenzionale.

La CO₂ generata nella furnace di combustione veniva seccata su una membrana NafionTM prima di entrare nello spettrometro di massa.

Ossigeno di alta purezza veniva usato per pulire la furnace prima dell'analisi di ogni campione. Un re-ossidazione della furnace viene fatta per 3 ore alla fine di ogni sessione analitica e per 30 minuti all'inizio di ogni sessione analitica.

Poi si procedeva con l'iniezione al GC/IRMS di 2 µl in splitless a 280°C. La rampa e la colonna erano le stesse descritte per il GC/MS, con conseguentemente gli stessi tempi di ritenzione per glicerolo e IS, fatta eccezione per i ritardi causati dai volumi morti causati dalle connessioni del sistema GC/C/IRMS.

I valori di riferimento $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ δ‰ per gli standard erano: 40.9 (± 0.6%) per il glicerolo, -31.2 (± 1.2%) per il 5α-androstan-3β-olo), i risultati venivano poi esportati dal programma Workstation a Excel.

La calibrazione del gas di riferimento veniva fatta all'inizio di ogni corsa. Una miscela di standard puri veniva iniettata in triplicate all'inizio di ogni set di campioni e iniettata nuovamente alla fine della sequenza. I valori di $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ δ‰ non dovevano variare più del 0.5 ‰ tra la seconda e la terza iniezione e tra la terza e l'ultima iniezione. La sequenza non dovrebbe includere più di 25 iniezioni al fini di minimizzare variazioni nella performance della fonace di ossidazione.

La linearità strumentale è stata verificata dall'analisi di una serie di standards a varie concentrazioni in triplicato, in un range di 7–0.2 V. Una deviazione massima di 0.5 ‰ è stata stabilita come soglia di accettazione. Anche i livelli di precision e, accuratezza, selettività sono stati valutati e ritenuti soddisfacenti.

La reazione di derivatizzazione più frequente per le analisi IRMS è l'acetilazione in quanto porta all'aggiunta di un ridotto numero di atomi di carbonio (e conseguentemente ad una diluizione isotopica ridotta). I particolari requisiti delle analisi IRMS impongono che debba essere valutata la purezza del picco cromatografico, per assicurare la accuratezza e l'affidabilità delle misurazioni del $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ δ‰. Questo rende la pre-purificazione HPLC la tecnica di elezione. Tentativi di purificazione del campione con altri mezzi non hanno sempre permesso di ottenere estratti di adeguata purezza (de la Torre et al., 2012). L'uso dell' HPLC come tecnica di preparazione del campione è infatti una pratica comune quando devono essere estratte tracce di composti da un grande volume di matrice biologica complessa come il latte. L'applicazione dell'HPLC come tecnica preparativa all'analisi IRMS è stata descritta in precedenza numerose volte, spesso associata all'analisi di composti precedentemente derivatizzati (Piper et al., 2008; Piper et al., 2013).

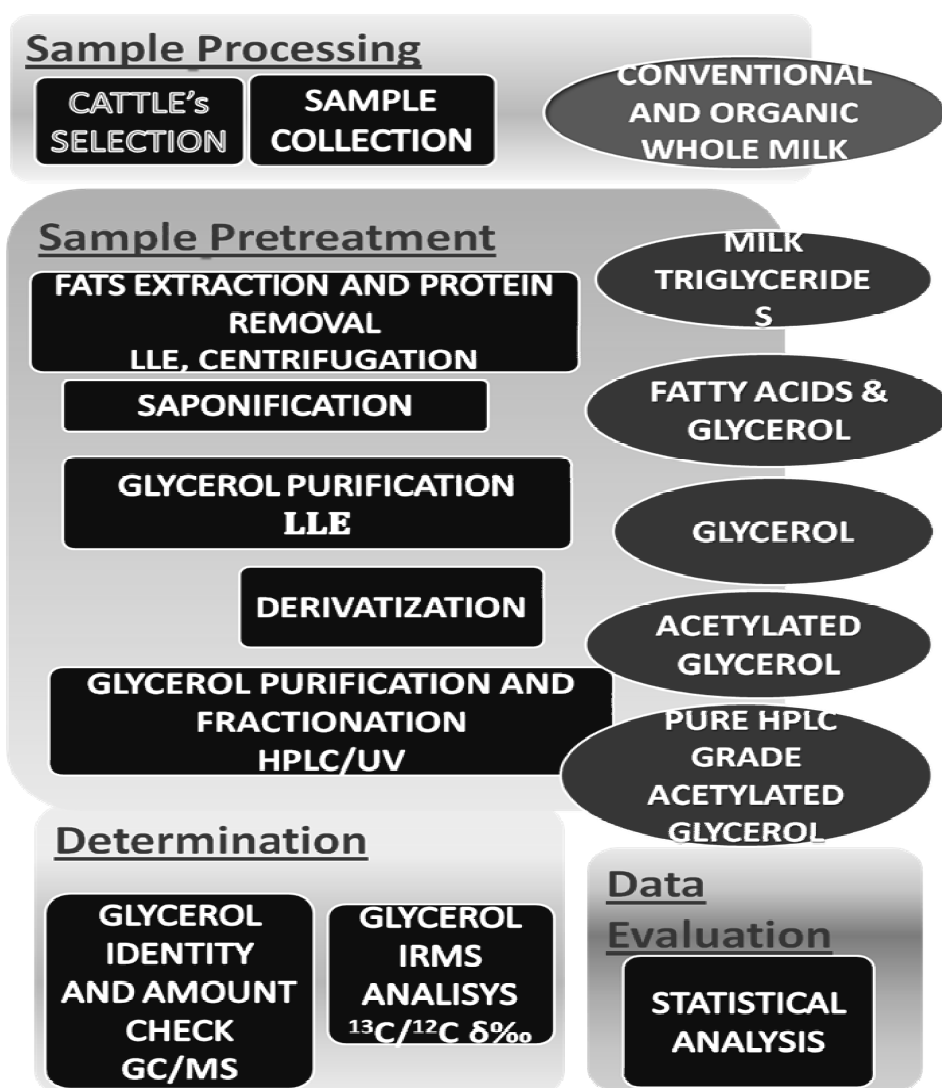


Figura 6.4 Schema riassuntivo del metodo di analisi riportato

5.1.2. Risultati del latte biologico vs convenzionale

I risultati dell'analisi del rapporto isotopico del carbonio nei campioni di latte biologico e convenzionale sono riportati in tabella. La media del rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ si è rivelata significativamente ($p < 0.01$) più alta nei campioni di latte convenzionale ($-43.14 \pm 0.45\text{‰}$) rispetto alla media dei campioni biologici ($-40.98 \pm 0.49\text{‰}$), indicando un arricchimento del carbonio 12 dimostrando un differente regime alimentare delle vacche da latte, più ricco in piante C_4 come mais e soia. Questo risultato, in linea con lavori precedenti sul latte di altri paesi Europei (Molkentin, 2013; Molkentin & Gieseemann, 2007), conferma l'ipotesi del possibile uso del rapporto isotopico $\delta^{13}\text{C}$ per

discriminare tra latte da allevamenti biologici e convenzionali in relazione alla differente regime alimentare. Il mais e i suoi sottoprodotti (paglie, foglie, etc.) sono spesso usati nella alimentazione di tipo convenzionale delle vacche da latte, mentre l'erba da pascolo (trifoglio, segale, grano, etc.) è la tipica dieta usata negli allevamenti biologici. In generale i valori di $\delta^{13}\text{C}$ delle piante C_3 variano in un range da -12 a -35‰, mentre le piante C_4 , come il mais, da -9 a -20‰, ed infatti i valori di $\delta^{13}\text{C}$ nel latte sono proporzionali ai valori nelle diverse tipologie di dieta.

Tab 6.1. Confronto dei valori medi $\pm$ SD di $\delta^{13}\text{C}$ in 5 marchi di latte da agricoltura convenzionale e biologica italiani.

Latte biologico		Latte convenzionale	
OM 1 (n=4)	-42.71 $\pm$ 0.25	CM 1 (n=3)	-41.05 $\pm$ 0.20
OM 2 (n=3)	-43.84 $\pm$ 0.36	CM 2 (n=3)	-41.10 $\pm$ 0.19
OM 3 (n=3)	-42.96 $\pm$ 0.64	CM 3 (n=3)	-40.15 $\pm$ 0.32
OM 4 (n=3)	-42.87 $\pm$ 0.55	CM 4 (n=3)	-41.45 $\pm$ 0.27
OM 5 (n=3)	-43.31 $\pm$ 0.53	CM 5 (n=3)	-41.16 $\pm$ 0.18
MEDIA $\pm$ SD	-43.14 $\pm$ 0.45	MEDIA $\pm$ SD	-40.98 $\pm$ 0.49

I risultati mostrati sinora sono da considerarsi un ottimo risultato preliminare che dovrà però essere ampliato in futuro con ulteriori prove che prendano in considerazione altri aspetti che influenzano il frazionamento isotopico. Il primo elemento da considerare sarà quello di aumentare la numerosità dei campioni analizzati e di diversificare l'epoca di campionamento, si è dimostrato infatti, che i valori di $\delta^{13}\text{C}$ nel latte biologico sono tipicamente maggiori in inverno e più bassi in estate, a causa delle differenze nella alimentazione delle vacche da latte (es. mais in inverno e trifoglio o legumi in estate). Inoltre sarebbe anche interessante rimuovere lo step di derivatizzazione con anidride acetica, al fine di evitare la presenza di carboni non derivanti direttamente dal latte. Interessante, al fine di avere un modello statistico applicabile alla corretta discriminazione dei due tipi di allevamento, sarebbe quello di aggiungere altri parametri come altri rapporti isotopici, in particolare quello dell'azoto, interessante per la verifica dell'uso di fertilizzanti sintetici nelle coltivazioni dei foraggi, o il profilo in acidi grassi.

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni il concetto di qualità di un prodotto alimentare ha subito una importante evoluzione dalla ricerca di qualità oggettive a quello di qualità estrinseche proprie delle scelte e della sensibilità di ciascun consumatore. Molti consumatori sono infatti alla ricerca di alimenti che rispondano a requisiti salutistici, etici, ambientali, religiosi e politici tra i più diversi, e come risultato di questo nuovo approccio agli acquisti alimentari, abbiamo visto una crescita in settori come l'agricoltura biologica e biodinamica, il sourcing locale, il commercio equo e solidale, i prodotti cruelty free, lo sviluppo dei marchi a denominazione e degli alimenti funzionali.

La accresciuta consapevolezza del consumatore nei riguardi delle scelte alimentari, accanto ad un incremento della quota di reddito destinata all'acquisto di prodotti di qualità, hanno quindi portato i diversi marchi che attribuiscono un qualsivoglia attributo di autenticità o qualità al prodotto alimentare ad essere un vantaggio competitivo sul mercato.

Le scelte del consumatore sono quindi sempre più guidate dalla ricerca di caratteristiche di natura prettamente soggettiva, che esulano dalle qualità intrinseche del prodotto alimentare, ma che contribuiscono in maniera preponderante alle differenze di prezzo tra beni che invece per proprietà intrinseche sono da considerarsi simili.

Si può derivare da queste considerazioni come le caratteristiche non legate al prodotto alimentare nella sua funzione primaria di nutrimento, ma attribuibili a scelte di comportamento dettate dalle più disparate motivazioni etiche (equo e solidale, cruelty free), salutistiche (agricoltura biologica, alimenti funzionali) o di tendenze della moda o della pubblicità, assurgano esse stesse a *commodities*, con un prezzo e un mercato propri, che si aggiungono a quello attribuito al bene in quanto tale.

Accanto ai controlli atti a svelare frodi ed adulterazioni che possano mettere a repentaglio la salute del consumatore, che sono indispensabili ad assicurare un requisito da considerarsi “minimo” in un sistema agroalimentare moderno, appare ora come fondamentale la necessità di sviluppare controlli più fini, che vadano a smascherare false etichettature di origine, di appartenenza a determinate specie botaniche particolari o di sistemi di produzione non convenzionali.

Il problema della verifica della corretta attribuzione dei marchi o delle denominazioni di qualità, o semplicemente della correttezza delle informazioni riportate in etichettatura,

rientra nel più ampio concetto di autenticità del prodotto alimentare, concetto, che a seguito della complessa evoluzione del mercato agroalimentare descritta, è stato caricato di una importanza economica crescente che ha portato all'investimento di notevoli sforzi commerciali, governativi e scientifici per la sua definizione e tutela.

Il consumatore attento, disposto a pagare anche un consistente *premium price* per un prodotto corrispondente a determinati requisiti percepiti come di qualità, ha bisogno di informazioni chiare e precise in modo da poter operare scelte informate sulla sua dieta e sugli alimenti che acquista. Spesso quelle fornite per obbligo di legge in etichetta non sono sufficienti a garantire al consumatore che dietro al marchio o alla dicitura evidenziata a scopo pubblicitario, ci sia realmente quanto cercato, e non si stia quindi pagando un prezzo maggiore per un prodotto che in realtà è identico a quello privo di quel marchio.

I molteplici scandali, i troppo frequenti casi di frode, adulterazione, sofisticazione emersi dalle cronache recenti, hanno reso infatti il consumatore molto diffidente anche su sistemi di certificazione normati e ormai a regime da anni. Questa diffidenza, generata inevitabilmente nell'opinione pubblica, colpisce i produttori onesti, vanificando i loro sforzi e quelli di chi, associazioni ambientaliste e di consumatori, istituzioni pubbliche e private, cerca di differenziare i prodotti di qualità da quelli derivanti dalla concorrenza sleale di aziende alla ricerca di facile profitto.

La descrizione e/o l'etichettatura dei prodotti alimentari deve essere onesta e accurata, soprattutto dove il cibo è stato elaborato e la capacità di distinguere un ingrediente da un altro si è persa. La attuale normativa europea sulla etichettatura, nonostante i notevoli progressi in materia di trasparenza, non consente però al consumatore di effettuare una scelta pienamente consapevole e di conseguenza di praticare quel consumo critico a cui una sempre più ampia fetta della popolazione aspirerebbe.

La verifica della autenticità del prodotto alimentare e di quanto dichiarato in etichetta è affidata ad una fitta rete di controlli che possono essere però percepiti dal consumatore come una autenticazione di carattere solamente documentale, fatta di norme, certificati, ispezioni, mentre i controlli di tipo analitico che vadano a garantire non solo il prodotto finito appena prima che esso finisca sulla tavola del consumatore ma anche lungo tutta la filiera e ne garantiscano oltre la salubrità, anche la rispondenza a requisiti di origine,

di produzione, ambientali o salutistici dichiarati in etichetta e per i quali il consumatore paga un prezzo maggiore al corrispettivo prodotto che ne è privo, sono percepiti dall'opinione pubblica come maggiormente affidabili e rigorosi.

Il ricorso più esteso a queste metodiche, e la diffusione dei dati scientifici da esse derivate, potrebbe essere la risposta al calo della fiducia del consumatore e innescare anche elementi di valorizzazione commerciale di quei prodotti con evidenze di controlli analitici che certifichino caratteristiche dichiarate in etichetta.

Esempi di queste potenzialità sono le informazioni contenute nella etichettatura nutrizionale che in origine erano su base volontaria e rappresentavano uno strumento di interesse ed attrazione per il consumatore attento ad una corretta alimentazione, mentre con l'ultima normativa sulla etichettatura sono divenute obbligatorie per tutti i prodotti alimentari, o la indicazione della composizione analitica delle acque minerali, anche essa obbligatoria per legge.

Data la complessità della materia le sfide analitiche atte a stabilire la natura esatta del prodotto e a soddisfare le richieste del consumatore attento sono molteplici e le grandi possibilità che la tecnologia scientifica ci mette a disposizione non sono ancora state del tutto esplorate.

Lo scoglio analitico più grande è da identificarsi nella individuazione di markers peculiari dell'alimento e della caratteristica oggetto della verifica (origine geografica, metodo di produzione etc), la cui variabilità naturale deve essere limitata e ben caratterizzata e tale da poter essere misurata accuratamente se necessario.

In generale, devono essere considerate insieme molte caratteristiche analitiche - perché le loro inter-correlazioni possono svolgere un ruolo cruciale al fine di fornire quella che viene chiamato fingerprinting analitico. In altre parole, un approccio di riconoscimento attraverso un pattern multivariato è di solito necessario per ottenere modelli di successo per verificare l'autenticità di alimenti. L'output di questi modelli deve essere binario, con risposte qualitative (ad esempio, " il prodotto in esame è compatibile con l'origine dichiarata " o " il prodotto in esame non è compatibile con l'origine dichiarata ").

I casi studio riportati in questa tesi riflettono l'approccio sinora descritto. Il primo marker individuato come utile nella verifica della autenticità sono state le ammine biogene nel caso del vino e dei succhi di frutta.

Il razionale della scelta delle ammine biogene come valido marker di autenticità di queste bevande è nella loro origine dalla decarbossilazione degli amminoacidi per via microbica, di cui riflettono quindi il profilo e la concentrazione, in dipendenza con la specie/cultivar botanica di origine, e sono quindi in grado di discriminare il frutto o il vitigno di origine nel caso di succhi di frutta e vino. Le ammine biogene sono inoltre influenzate da altri fattori quali il tipo e il grado di maturazione dell'uva, il clima e il terreno della zona di viticoltura, e dalle diverse tecniche enologiche praticate nella produzione del vino, così da poter discriminare anche zona e tecnica di produzione oltre che il vitigno.

Data la grande mole di dati e di parametri le tecniche di analisi multivariata sono state poi indispensabili per individuare le ammine maggiormente informative e per la costruzione di un modello di autenticazione.

I dati dell'analisi di questo marker nel set di campioni di vini rossi italiani, hanno portato quindi ad una serie di risultati che potrebbero essere proposti anche alle aziende vinicole come strumenti di differenziazione e valorizzazione del proprio prodotto sul mercato, legati alle caratteristiche intrinseche del vino e non solo al marchio o al territorio di origine.

Infatti, se da un lato le analisi presentate in questo lavoro sono state utili ad identificare e quantificare il grado di rischio da ammine biogene legato al consumo di questi vini, che può essere interessante da un punto di vista tossicologico, dall'altro lato il contenuto particolarmente basso di ammine di un vino potrebbe essere evidenziato nella sua etichetta, al fine di fornire una corretta informazione al consumatore sensibile a questo tipo di contaminante naturale e attrarne in questo modo l'acquisto. Allo stesso modo il produttore potrebbe essere invece interessato alla valorizzazione in etichetta del contenuto particolarmente elevato in antiossidanti del proprio vino, tale magari da proporlo come alimento funzionale.

Allo stesso modo il produttore si potrebbe avvalere della analisi di questi composti come strumento per garantire chimicamente la autenticità del vitigno, della zona di origine e delle pratiche enologiche del vino esaminato.

Lo studio della presenza delle 11 ammine biogene in succhi e nettari di frutta rappresenta il primo lavoro in letteratura su questo tema, che copre quindi un vuoto di informazioni sull'apporto di queste bevande all'introito totale giornaliero di ammine

attraverso la dieta, interessante a causa dell'associazione tra questi composti e vari effetti avversi sulla salute umana, specialmente nel caso di pazienti sensibili, e dall'aumento di consumo di queste bevande legato alla crescente percezione della utilità del consumo di frutta per il mantenimento di un buono stato di salute.

Le tecniche chemiometriche hanno però consentito di ampliare il lavoro verso la possibilità di usare i dati delle ammine biogene anche come marker di autenticità, oltre che come indice di qualità, proponendo un approccio basato su una semplice tecnica cromatografia, con il duplice obbiettivo di fornire informazioni sulla qualità del succo di frutta e delle materie prime usate per la sua produzione, ma anche sulla veridicità della dichiarazione della sua composizione, tema piuttosto importante, in quanto i succhi di frutta considerati, posizionandosi in una fascia elevata di prezzo, sono molto suscettibili alla adulterazione tramite miscelazione con succhi di frutta meno costosi.

Il metodo qui illustrato per la determinazione delle ammine biogene nel vino e nei succhi di frutta si propone quindi come una valida alternativa alle procedure analitiche proposte in letteratura, ed illustrate nel terzo capitolo, per la autenticazione di prodotti di notevole importanza come vini e succhi di frutta.

Il metodo analitico proposto e validato in questo lavoro, si è dimostrato robusto ed affidabile in termini di performances analitiche, ma anche in linea con i principi della chimica verde per il consumo di solventi ridotto del 75% e del tempo di analisi abbreviato del 60% rispetto ai metodi HPLC in letteratura, grazie all'impiego di una colonna cromatografica innovativa senza variare la semplice strumentazione impiegata. Per queste caratteristiche il metodo è in grado perciò di essere impiegato per l'analisi di routine in modo rapido ed economico di una grande mole di campioni, proprio come le analisi di autenticazione richiedono.

La sfida analitica più difficile si è senz'altro rivelata quella della autenticazione di un processo produttivo particolare come quello della produzione del latte da agricoltura biologica, in cui viene sostanzialmente autenticata una tipologia di alimentazione zootecnica. Per risolvere questa sfida ci si è dovuti rivolgere ad una strumentazione con un grado di complessità superiore sia dal punto di vista analitico che come costo economico.

La determinazione del rapporto isotopico del carbonio nel glicerolo nel latte da agricoltura biologica confrontato con quello del latte prodotto in maniera tradizionale ha dimostrato di avere un elevato grado di specificità per il problema in oggetto e una bassa variabilità naturale, queste caratteristiche hanno portato all'uso di questo unico marker come sufficiente alla autenticazione.

Il caso studio proposto dimostra quanto sia di fondamentale importanza la corretta individuazione di un marker appropriato che, determinato con le tecniche analitiche opportune, possa dare una risposta univoca alla verifica della autenticità.

Sicuramente bisogna sottolineare che se da un lato una analisi IRMS ha dei costi operativi e gestionali notevolmente superiori da quelli di una corsa cromatografica o di una determinazione spettroscopica, dall'altra parte ha il vantaggio di essere praticamente impossibile da ingannare, grazie alla doppia specificità degli atomi analizzati e della loro posizione nelle molecole all'interno dell'alimento, oltre ad una altissima dipendenza con la dieta dell'animale, tale da rendere l'IRMS la tecnica di elezione per questo tipo di autenticazione. L'importanza dei controlli analitici della autenticità dei prodotti alimentari e il grande rilievo che questa tecnica sta sempre più assumendo in questo settore, probabilmente farà sì, nel prossimo futuro, che la sempre più ampia diffusione di questa strumentazione renderà i costi maggiormente accessibili anche a laboratori di minori dimensioni e possibilità economiche.

Se in mancanza di uno strumento sofisticato come l'IRMS, si dovessero prendere in considerazione altri parametri analitici, ciascuno portatore di una quota informativa inferiore e meno specifica, dovrebbero essere usati il maggior numero di parametri possibili, per poi ridurli ai maggiormente informativi tramite strumenti multi-parametrici, al fine di costruire poi modelli validati per l'analisi di routine.

Allo scopo di rendere uniforme e condiviso il sistema di verifica della autenticità dei prodotti alimentari, anche per perseguire l'accrescimento della soddisfazione e della fiducia del consumatore, si dovrebbero incoraggiare le istituzioni e gli enti di controllo a stabilire una approfondita valutazione dei parametri chimici adatti a descrivere e differenziare alcuni prodotti da altri ad essi simili in modo da tracciare un fingerprinting analitico di quei prodotti di eccellenza con un alto valore aggiunto derivante da caratteristiche peculiari, tramite anche l'istituzione e l'aggiornamento di banche dati di prodotti certificati che servano come standard di riferimento.

Un tipo di politica per la autenticità alimentare “analytical-based” avrebbe l’effetto di promuovere e facilitare i controlli sul mercato, evitando contraffazioni ed adulterazioni pericolose per la salute o semplicemente lesive degli interessi dei produttori onesti e del consumatore attento.

APPENDICE A

GC-IRMS: principi e strumentazione

AI.1. Analisi dei rapporti degli isotopi stabili

Le analisi dei rapporti di isotopi stabili e del contenuto di isotopi instabili (radioisotopi), in particolare elementi pesanti (ad esempio, l'uranio, lo stronzio, torio o piombo) sono stati utilizzati principalmente dalle scienze geologiche per la determinazione dell'età. La determinazione dei rapporti isotopici per gli elementi di H, C, N, O e S dimostrano che gli isotopi più leggeri sono i più abbondanti, mentre, per gli elementi più pesanti, il rapporto tra i leggeri e i pesanti è più equilibrato.

Ogni animale o vegetale ha la sua composizione isotopica naturale che può essere modificata solo dal processo di turnover metabolico, e rappresenta pertanto un 'impronta digitale' o 'firma isotopica' nei tessuti. Interessante è lo studio della 'firma isotopica' attraverso il campionamento di vari tessuti animali.

In generale, le composizioni isotopiche di carbonio e azoto a prodotti di origine animale sono legati ai sistemi di produzione, e non specificamente per provenienza geografica. Possono, tuttavia, essere utile come indicazione indiretta di provenienza geografica se utilizzato in combinazione con altri isotopi stabili, quali idrogeno e ossigeno.

Questi ultimi due elementi sono particolarmente interessanti rispetto alla provenienza geografica dei prodotti alimentari, legata alle condizioni climatiche regionali, perché sono fortemente latitudine - dipendenti. Tuttavia, essi sono anche influenzati da altitudine, distanza dal mare, precipitazioni totali, e la stagionalità.

La variazione del rapporto isotopico $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ in prodotti di origine animale riguarda la dieta. La determinazione del SIR permette la discriminazione della dieta dell'animale, distinguendo piante con diversi percorsi fotosintetici, C_3 o C_4 , e si può anche ricostruire la storia del regime alimentare degli animali analizzando tessuti animali specifici, come i capelli o gli zoccoli.

Il livello del rapporto $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$ nel materiale biologico di un animale e nei prodotti di origine animale è fortemente legata a quello della dieta.

Poiché nessuna differenza significativa è stata trovata tra le piante C_3 e piante C_4 , i valori del SIR di azoto possono essere marker per la zona di produzione.

Nelle piante, la $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$ e rapporti $^2\text{H} / ^1\text{H}$ dipendono dall' acqua assorbita dal suolo; Tuttavia l'acqua della pianta a livello fogliare subisce un processo di frazionamento isotopico causato dall' evapotraspirazione.

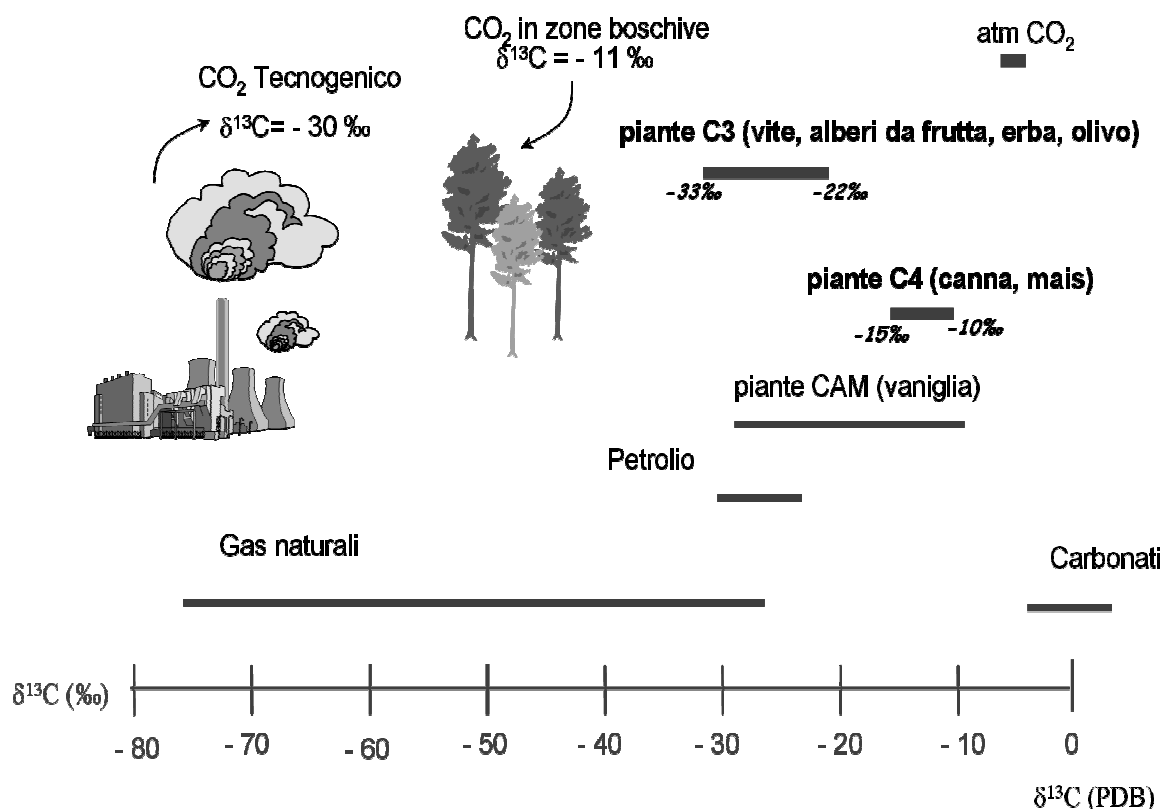


Figura AI.1. Scala che illustra qualitativamente la composizione isotopica del carbonio di alcune sostanze naturali

Questi processi sono influenzati dalla temperatura e dalla umidità relativa, portando ad un arricchimento dell'isotopo pesante. L'acqua presente nei composti di origine animale deriva le sue caratteristiche da quella introdotto dall'animale come l'acqua potabile e quella presente nel cibo, ed è perciò influenzata dalla geologia della zona dove si coltiva il mangime degli animali (sedimentaria, ignea, acido o base) nonché la vicinanza alle zone costiere, a causa dei solfati presenti nell'acqua di mare- che arricchisce in ^{34}S , le condizioni climatiche e le pratiche di fertilizzazione (ad esempio l'uso di solfato marino come fertilizzante). Lo stronzio è il metallo pesante comunemente usato per l'analisi del rapporto isotopico.

Il rapporto $^{87}\text{Sr} / ^{86}\text{Sr}$ ha dimostrato di variare ampiamente in rocce superficiali, in modo che qualsiasi Sr rilasciato nel suolo, fiumi, e le acque sotterranee ha un firma isotopica che riflette la sua fonte. isotopi Sr e sono stati utilizzati anche per tracciare i prodotti agricoli, che hanno incorporato Sr, insieme a Ca, da terreni incorporando i rapporti Sr-isotopi delle rocce sottostanti.

Così, idealmente, una analisi del rapporto $^{87}\text{Sr} / ^{86}\text{Sr}$ potrebbero fornire un ulteriore livello di risoluzione geografica, sulla base di diversi litologie, su materiali provenienti da diverse micro-regioni nella stessa zona climatica, e quindi con simile valori di $\delta ^2\text{H}$ e $\delta ^{18}\text{O}$.

Per misure a rapporto isotopico, la massa di uso comune spettrometri (ad esempio, singoli quadrupoli, trappole ioniche, analizzatori a tempo-di-volo) generalmente non forniscono il grado di sensibilità e la precisione richiesta per rilevare le piccole differenze di abbondanze isotopiche naturali, che richiede una strumentazione specializzata. I rapporti isotopici $^2\text{H} / ^1\text{H}$, $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N} / ^{14}\text{N}$, $^{18}\text{O} / ^{16}\text{O}$ e $^{34}\text{S} / ^{32}\text{S}$ sono comunemente analizzati con lo spettrometro di massa a rapporto isotopico (IRMS).

Per la determinazione dei rapporti isotopici, gli analiti devono essere convertiti in una fase gassosa tipicamente H_2 , N_2 , CO , CO_2 e SO_2 - prima di essere ionizzati. Per questo scopo, l'anidride carbonica è generata dalla ossidazione organica dei composti con ossido di rame e criogenicamente intrappolata in azoto liquido. L'idrogeno si ottiene dalla conversione riduttiva dell'acqua usando un metallo appropriato (ad esempio zinco).

Le interfacce comuni per l'introduzione di campioni nell' IRMS sono l'analizzatore elementare (EA), che può essere sia a flusso continuo (CF / EA) o a conversione termica (TC / EA) o il gas cromatografo (GC). Per la misurazione degli isotopi di Sr, Pb e altri pesanti isotopi, è più opportuno utilizzare altre tecniche strumentali (ad esempio, TIMS, DRC-ICP-MS e MC-ICP-MS).

TIMS si basa sulla ionizzazione termica del campione solido caricata nella sorgente dello spettrometro di massa. Questa tecnica è meno costosa dell'IRMS e adatta per le specie con un basso potenziale di ionizzazione.

Il principale svantaggio è che non tutti gli elementi sono facilmente ionizzati, e la ionizzazione non è ugualmente efficiente per tutti gli elementi limitando così le applicazioni ad elementi con bassi potenziali di ionizzazione. Strumenti MC-ICP-MS sono stati progettati specificamente per superare i limiti delle altre tecniche MS. Gli svantaggi principali delle tecniche MS sono il costo elevato di analisi e la necessità di personale qualificato.

I due più comuni strumenti per determinare SIR sono il flusso continuo rapporto isotopico spettrometro di massa (CF-IRMS) e doppio ingresso rapporto isotopico

spettrometro di massa (DI-IRMS). In DI-IRMS, i campioni per l'analisi sono preparati (convertiti in gas semplici) off-line. Mentre il DI-IRMS fornisce generalmente misurazioni più accurate della SIR, il CF-IRMS offre campione preparazione on-line, dimensione del campione più piccolo, più veloce e più facile analisi, più economicità, e la possibilità di interfacciare con altre tecniche preparative, compresi analisi elementare (EA-IRMS), gas cromatografia (GC-IRMS) e, più recentemente, cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC).

Per gli elementi più pesanti (ad esempio, Pb e Sr), il frazionamento è insignificante rispetto ai rapporti isotopici originali perché i nuclidi hanno massa elevata rispetto alle differenze di massa degli isotopi. In questo caso, i rapporti degli isotopi stabile dipendono essenzialmente dalla origine del minerale e può essere utilizzato per identificare la fonte di un materiale o la caratterizzazione della sua storia (ad esempio, $^{208}\text{Pb} / ^{207}\text{Pb}$)

Tabella AI.1. Gli isotopi stabili usati comunemente nella verifica di autenticità alimentare

Rapporto isotopico	Abbondanza naturale	Modalità di Frazionamento	Informazione	Standard internazionale di riferimento	Rapporto di abbondanza dello standard
$^2\text{H}/^1\text{H}$	99.985/0.015	Evaporazione, condensazione, precipitazione	Geografica	SMOW (standard mean ocean water)	1.5575×10^{-4}
$^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$	98.892/1.108	Piante C_3 e C_4	Dieta, Geografica	PDB (Pee Dee belemite)	1.1237×10^{-2}
$^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$	99.6337/0.3663	Livello trofico, piante terrestri e marine, pratiche agricole	Dieta, Geografica	N_2 atmosferico	3.677×10^{-3}
$^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$	99.7587/0.2039	Evaporazione, condensazione, precipitazione	Geografica	SMOW	2.0052×10^{-3}
$^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$	95.02/4.22	Batterica	Geografica	CDT (Canyon diablo triolite)	4.5005×10^{-2}
$^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$	7.02/9.86	Età della roccia, rapporto Rb/Sr, geologia del territorio	Geografica	Rapporto assoluto	-

Molti isotopi possono essere rilevati dalla risonanza magnetica nucleare (NMR), e ^1H e ^{13}C rimangono i più utilizzati. Il principale nuclide determinato nei prodotti alimentari con l'NMR è ^1H a causa della sua elevata sensibilità e abbondanza naturale. ^{13}C NMR è

meno sensibile, perché questo nuclide costituisce circa 1% del carbonio totale sulla Terra, ma come risultato dei recenti progressi nella strumentazione ^{13}C NMR può essere utilizzato per integrare i dati su ^1H è diventato un parametro di routine sulla maggiorparte degli NMR

L' NMR a frazionamento sito-specifico naturale degli isotopi (SNIF-NMR) è spesso utilizzato in analisi degli alimenti e, in particolare, è stato adottato dalla UE come metodo ufficiale di controllo per la aggiunta di zuccheri ai vini SNIF-NMR e IRMS sono le tecniche più specifiche o sofisticate per determinare l'autenticità alimentare, fornendo una unica carta d'identità isotopica del campione di alimento analizzato. Negli ultimi anni l'IRMS è diventata la tecnica più utilizzata, con il doppio numero di studi pubblicati rispetto al SNIF-NMR.

Sebbene i costi di acquisto e di gestione di tali strumenti siano abbastanza elevati e la consistente richiesta di tempo per la preparazione del campione e la necessità di operatori con alta specializzazione, queste tecniche sono le più promettenti nella autenticazione e tracciabilità degli alimenti.

AI.2. GC-C-IRMS

È costituito da un gas cromatografo interfacciato, tramite un forno di ossidazione, ad uno spettrometro di massa per rapporto isotopico. Consente la determinazione del rapporto isotopico tra $^1\text{H}/^2\text{H}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ e $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ $^{37}\text{Cl}/^{35}\text{Cl}$ di campioni convertiti in gas di H_2 , N_2 , CO_2 , CO , SO_2 e CH_3Cl , anche se nella maggior parte delle analisi si misura l'abbondanza isotopica di ^{13}C rispetto ad uno standard o ad un gas di riferimento; questo viene fatto per compensare eventuali fluttuazioni della massa che potrebbe cambiare col tempo e da uno strumento a un altro.

AI.2.1. Spettrometro di massa per rapporto isotopico

Gli spettrometri di massa utilizzati per l'analisi isotopica sono costituiti da una *sorgente ionica*, un *magnete* e un *rivelatore*. Il campione gassoso, proveniente dalla colonna GC, passa attraverso una sorgente di ioni, generati sotto vuoto spinto per impatto elettronico.

Questo fascio di ioni giunge ad un campo magnetico, generato da un elettromagnete, per poi essere analizzato da un rivelatore a collettore triplo, che misura contemporaneamente l'intensità di corrente a m/z 44, 45, 46 dei tre diversi isotopomeri della CO_2 .



Fig. AI.2. GC-C-IRMS presso il Laboratorio anti-doping di Roma

Le molecole dell'analita provenienti dalla colonna gas-cromatografica vengono trasformate in ioni gassosi grazie all'urto con elettroni ad alta energia.

Nella camera di ionizzazione viene prodotto un vuoto tale (da 10^{-4} a 10^{-8} Torr) che il cammino libero medio delle molecole e degli ioni prodotti sia superiore alle dimensioni

lineari della camera di ionizzazione, in questo modo vengono evitate le possibili collisioni e reazioni, rendendo così il processo di ionizzazione tipico della natura della molecola analizzata. Nella camera di ionizzazione le molecole del campione in fase gassosa sono bombardate da un fascio di elettroni emessi da un filamento di tungsteno o renio percorso da corrente. Qui avviene l'urto tra questi elettroni ad alta energia e le molecole di campione: la reazione primaria consiste nella formazione dello ione molecolare, conseguenza della espulsione di un elettrone dal guscio elettronico esterno dell'analita.

Come mostrato nella Figura AI.3., i cammini degli elettroni e delle molecole sono ortogonali tra loro e si intersecano al centro della sorgente, nella regione di ionizzazione.

Gli ioni, poi, sono accelerati con un'energia di 3000 eV e, attraverso delle fenditure, passano una serie di lenti elettrostatiche che focalizzano gli ioni a formare un fascio.

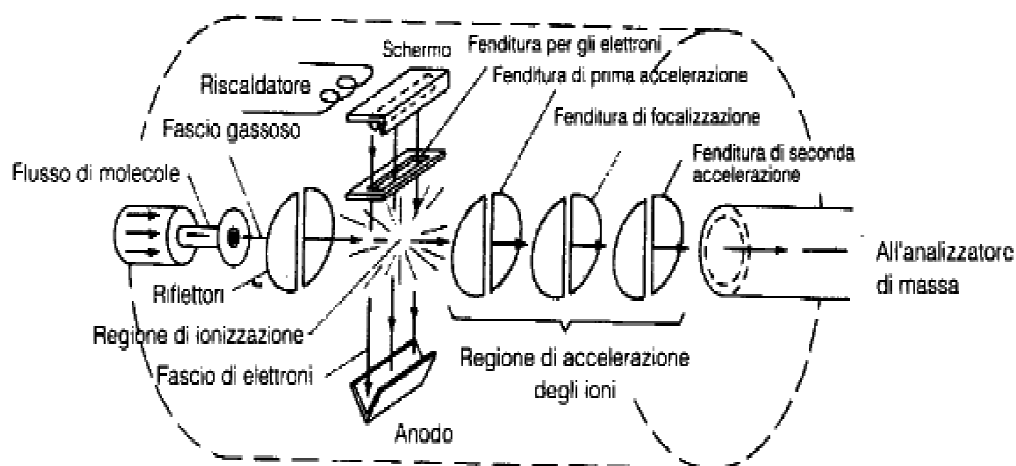
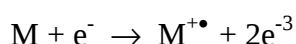


Fig. AI.3. Sorgente a impatto elettronico

Il fascio di ioni esce dalla sorgente e attraverso una fessura di 0.2 mm, giunge ad un campo magnetico, percorrendo un cammino con un'inclinazione che varia dai 26.5° ai 90° (Figura AI.4.).

Il campo magnetico è generato da un elettromagnete con forza massima di 0.75 Tesla, coprendo un range di masse da 1 a 70 u.m.a., a seconda della forza e del voltaggio applicato.

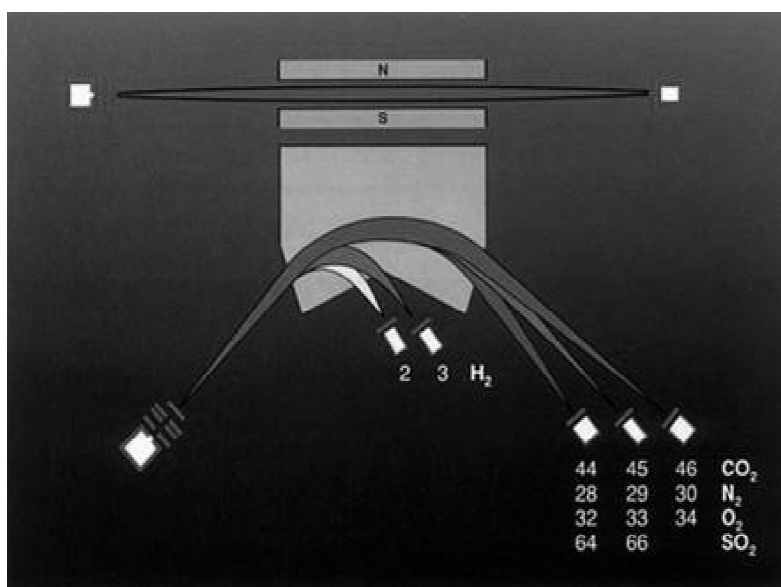


Figura AI.4. Rivelatore di ioni

I raggi ionici, che provengono dall'analizzatore, sono raccolti, generalmente dopo focalizzazione, su un opportuno elettrodo, detto *collettore* o *Faraday cup*.

Le Faraday cups convertono il voltaggio prima in frequenza, poi in impulsi; a seconda della massa lo ione avrà l'impatto con un opportuno collettore, producendo un'informazione relativa al rapporto isotopico degli ioni individuati dal rivelatore. Le cups 2, 3 e 4 rilevano i valori di corrente ionica per m/z 44, 45 e 46 per la CO₂, che rappresentano rispettivamente le specie $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^{+\bullet}$, $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^{+\bullet}$ e $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^{+\bullet}$.

Tuttavia bisogna considerare che la corrente ionica per m/z 45 viene corretta, per tener conto del contributo della specie $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{17}\text{O}^{+\bullet}$; questo contributo viene calcolato in

funzione dell'intensità della corrente misurata per $m/z = 46$, considerando una relazione fissa tra le abbondanze relative di ^{18}O e ^{17}O (correzione di Craig). Per $m/z = 46$, invece, i contributi delle altre due specie, $^{13}\text{C}^{17}\text{O}^{16}\text{O}^{+\bullet}$ e $^{12}\text{C}^{17}\text{O}^{17}\text{O}^{+\bullet}$ sono trascurabili, a causa della loro scarsa abbondanza.

Poiché la corrente ionica è dell'ordine di 10^{-11} - 10^{-15} A, è necessario amplificarla con un elettromoltiplicatore; gli elettroni vengono emessi da un catodo, poi sono inviati contro una superficie più sensibile (Be-Cu o Cs-Sb), mantenuta ad un potenziale più positivo. Un elettrone incidente su questa superficie causa per urto l'emissione di parecchi elettroni secondari, i quali sono costretti da un opportuno campo elettrico e magnetico ad effettuare traiettorie circolari del tipo a semi-cerchio, per cui ricadono più volte sullo stesso elettrodo da cui erano stati emessi, ma in un punto differente.

AI.2.2. Notazione δ

Il rapporto isotopico relativo al carbonio è espresso in termini di valore $\delta^{13}\text{C}$, con l'unità di misura in parti per mille (‰).

La notazione δ è generalmente usata per esprimere la composizione isotopica di un campione. Questo parametro è definito come la differenza relativa per mille tra i valori di ^{13}C e ^{12}C del campione, rispetto allo standard internazionale V-PDB (Vienna Pee-Dee Belemnite). Il PDB, riferimento primario per la misura delle variazioni naturali delle abbondanze isotopiche di ^{13}C , era un carbonato di calcio proveniente da un rostro di belemnite del periodo Cretaceo della formazione 'Pee-Dee' dello Stato della Carolina del Sud (USA). Il suo rapporto isotopico $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ (R_{PDB}) è 0,0112372. La maggior parte dei composti conteneva meno ^{13}C rispetto allo standard e quindi questi assumevano valori negativi di $\delta^{13}\text{C}$. Il PDB è esaurito da parecchio tempo, ma è rimasto il riferimento primario per esprimere le variazioni naturali dei tenori isotopici di ^{13}C , rispetto al quale vengono tarati i materiali di riferimento, disponibili presso l'Agenzia internazionale dell'energia atomica (AIEA) a Vienna (Austria). Le determinazioni isotopiche dell'abbondanza naturale di ^{13}C sono pertanto espresse, per convenzione, rispetto al V-PDB, il cui valore di $\delta^{13}\text{C}$ è stato calcolato essere +1.95 ‰ rispetto al riferimento.

Oggi, la scala $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}$ è usata per definire i valori di $\delta^{13}\text{C}$ come differenze in parti per mille da V-PDB²⁹.

La tecnica di analisi del confronto tra campione e standard certificati è in grado di rilevare differenze molto piccole nella composizione isotopica dei campioni da determinare in modo affidabile e accurato, in sostanza, l'utilizzo dell'equazione seguente facilita il confronto delle proporzioni degli isotopi, specialmente al livello di abbondanza naturale in cui le differenze sono relativamente piccoli.

$$\delta^{13}\text{C} = (r_{\text{campione}}/r_{\text{standard}} - 1) \times 1000$$

dove $r = (^{13}\text{C}/^{12}\text{C})$.

Una differenza di una unità in questa scala in parti per mille (‰) corrisponde ad un cambiamento di 0.001099 nella % dell'abbondanza naturale di ^{13}C .

Quindi, un $\delta^{13}\text{C}$ di -25 ‰ significa che il campione, su mille parti di ^{13}C , ne presenta 25 in meno rispetto allo standard.

Appendice B
Le tecniche chemometriche

Secondo la definizione comune, la chemiometria è una disciplina chimica che utilizza metodi matematici, statistici, e altri metodi basati sulla logica formale per la costruzione o la selezione dei metodi di misurazione ottimali e disegni sperimentali ed anche per l'individuazione delle informazioni più importanti per l'analisi dei risultati sperimentali. L'idea di base della maggioranza dei metodi chemiometrici si basa sulle cosiddette variabili latenti o componenti principali (PC), i cui dati iniziali sono rappresentati nello spazio. Questo suggerisce che uno dei principali vantaggi della analisi chemiometrica è la possibilità di proiettare gli iniziali dati multidimensionali, il cui numero può essere anche di decine di migliaia, su un pochi nuovi assi. I dati delle nuove coordinate possono essere in questo modo facilmente visualizzati e interpretati;

Pertanto, non è necessario conoscere i fondamenti matematici fondamentali di un metodo chemometrico in dettaglio per effettuare una pratica applicazione efficace della chemiometria.

Negli ultimi decenni, vi è stato una esplosione dell'uso della chemometria in tutto il mondo; Indubbiamente, questo è stato grazie allo sviluppo di computer ad alta velocità con hardware sofisticati in grado di ripetere l'esecuzione di un gran numero di misurazioni (Massart, 1988).

E' ampiamente riconosciuto che questi metodi possono essere raggruppati a seconda dei problemi pratici che riescono a risolvere. Il primo gruppo riguarda la semplificazione di e insiemi di dati enormi e complessi e la ricerca di relazioni nascoste tra di loro (analisi delle componenti principali, PCA) (Wold et al., 1987).

Il secondo gruppo è composto dai metodi per la classificazione e la discriminazione di oggetti, che, a sua volta, possono essere in modelli di classificazione con e senza validazione. L'applicazione del secondo tipo di metodi è preferibile perché in questo caso è usato un set di campioni di validazione di cui conosciamo a priori informazioni certe sulla loro classificazione, come nel caso della analisi discriminante lineare (LDA) e della Soft Independent Modelling of class Analogy (SIMCA).

La validazione con l'uso di un set di dati test indipendenti è il metodo di convalida migliore in quanto esso comprende i dati di oggetti che non sono stati utilizzati inizialmente per la costruzione del modello. Questo metodo rende possibile stimare in modo attendibile la capacità predittiva di un nuovo modello. Poiché questo approccio non è sempre possibile a causa di problematiche sperimentali e / o economiche, il

metodo di convalida incrociata (Indahl et al., 1999; Wold, 1978) o leave one out (LOO) può essere utilizzato. In questo metodo di validazione, una porzione di campioni è inizialmente rimossa automaticamente dal modello al fine di usarli successivamente per stimare la qualità del modello.

Di seguito si illustrano le principali tecniche chemiometriche usate per la autenticazione di alimenti.

B.1. Analisi della varianza

L'ANOVA è un insieme di modelli statistici, e delle loro procedure associate, in cui la varianza osservata in una particolare variabile è ripartita in componenti attribuibili a diverse fonti di variazione. Nella sua forma più semplice, l'ANOVA fornisce un test statistico per verificare se le medie dei valori di vari gruppi siano o meno tutti uguali, e pertanto generalizza t-test per più di due gruppi. Al contrario, l'esecuzione di più test t a due e campioni comporterebbe una maggiore probabilità di commettere un errore di tipo I.

Pertanto, ANOVA è utile nel confrontare due, tre, o più medie ed è stato utilizzato per confrontare dati da alimenti di origine diversa, e il suo impiego è principalmente quello di identificare le variabili con il potere discriminante maggiore, ad esempio quelle che ad un livello di probabilità più basso di 0.05 danno un alto valore F di Fisher. MANOVA e l'analisi della varianza multivariate e si utilizza nel caso di due o più di due variabili dipendenti che possono portare a delle differenze nelle variabili indipendenti considerate.

B.2. Principal Component Analysis (PCA)

PCA è una tecnica che, riducendo la dimensione dei dati, permette la loro visualizzazione, pur mantenendo quanto più possibile le informazioni presenti nei dati originali. Così, la PCA trasforma le variabili originali misurate in nuove variabili non correlate, denominate componenti principali (PC). Ciascuna PC è una combinazione lineare delle variabili originali. Questa tecnica permette una visualizzazione grafica

tramite un gruppo di assi ortogonali che rappresentano le direzioni di varianza maggiore nei dati

La prima PC (PC1) spiega la maggiore percentuale della varianza totale, la seconda (PC2) è correlata con la prima e spiega la percentuale maggiore della varianza residua, e così via, fino a che non sia spiegata la varianza totale.

In una PCA classica la matrice dei dati originale è modificata da prima da un pre-trattamento (centraggio o autoscaling), al fine di assicurare che la PC1 descriva la direzione corretta della varianza massima. Dopo il pre-trattamento la matrice dei dati di dimensione " $m \times n$ ", con m il numero delle variabili misurate e n il numero degli oggetti, e decomposta per ottenere una nuova matrice degli scores di dimensioni " $m \times a$ ", con a il numero delle PC, e una matrice dei loadings di dimensioni " $a \times n$ ". In questo modo la matrice originale delle variabili, ottenuta per gli n campioni, genera uno spazio ad m dimensioni, che definisce la posizione di ciascun campione.

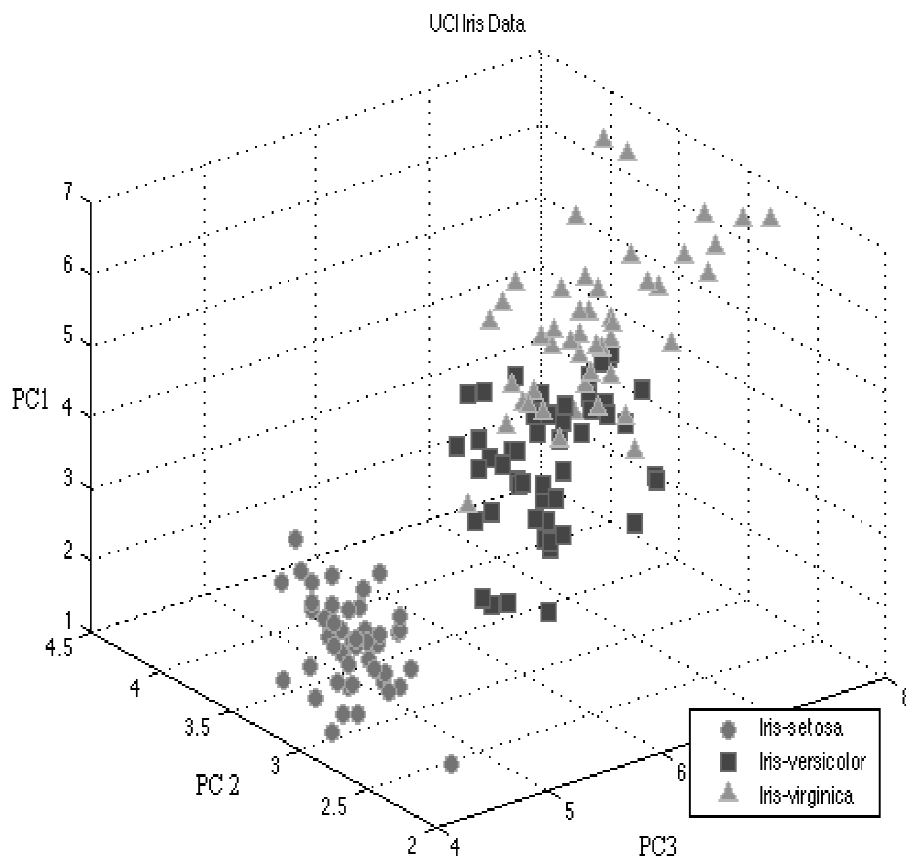


Fig. B.1. Grafico rappresentativo di una Principal Component Analysis (PCA);

La grande riduzione di questo spazio da m a un numero di PC a , genera un nuovo posizionamento degli oggetti nello nuovo spazio ortogonale rappresentato dalla matrice degli scores, e quindi. L'orientamento delle nuove assi rispetto alle coordinate originali definisce la matrice dei loadings, che è una matrice " $a \times m$ ", che spiega la varianza totale dei dati man mano che si aumenta il numero delle PC considerate.

AII.3. Cluster Analysis (CA)

La riduzione delle dimensioni dello spazio in piani e volume (2D e 3D) permette una più agevole interpretazione delle relazioni tra campioni e tra di essi e le variabili esaminate, oltre a permettere l'identificazione di raggruppamenti differenti dei campioni. CA o clustering è una tecnica unsupervised che ha la capacità di assegnare un insieme di oggetti a determinati gruppi (chiamati cluster) in modo che gli oggetti nello stesso cluster siano più simili tra loro rispetto a quelli di altri raggruppamenti. Il suo procedimento implica l'uso del concetto di distanza calcolata dalle varie proprietà dei campioni misurate sperimentalmente.

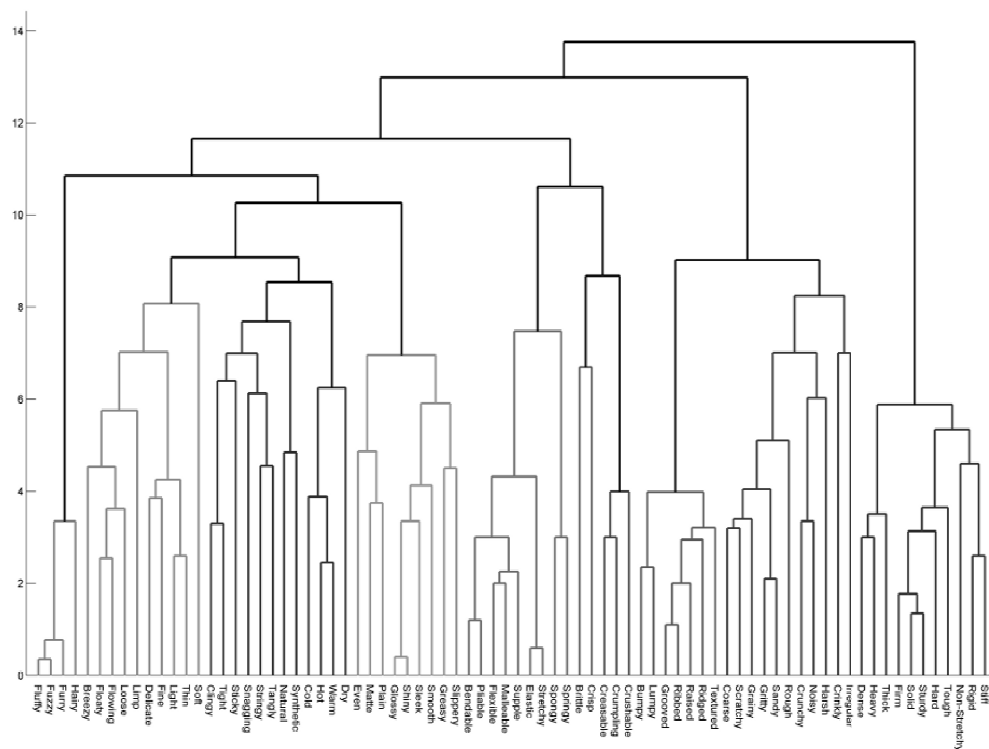


Fig. B.2. Grafico rappresentativo di una Cluster Analysis (CA).

Il calcolo della distanza tra i campioni può essere valutata con diversi metodi (il più comune è il calcolo della distanza Euclidea) e i gruppi che si vengono a creare possono essere visualizzati graficamente in un dendrogramma con l'indicazione della distanza tra i campioni attraverso una scala normalizzata. In questo modo, noi classifichiamo i campioni al fine di avere una discriminazione efficace. Solitamente CA rappresenta uno step preliminare.

B.4. Analisi Discriminante Lineare (LDA)

LDA è probabilmente la tecnica supervised più frequentemente utilizzata. LDA si basa sulla determinazione delle funzioni discriminanti lineari che consentono di massimizzare la percentuale della varianza tra gruppi e minimizzare quella intra gruppi. Nella LDA, le classi dovrebbero seguire una distribuzione normale ed essere linearmente separate. La LDA può essere considerata, come la PCA, un metodo di riduzione dimensionale nel senso che entrambi, LDA e PCA, determinano uno spazio a minori dimensioni rispetto all'originale, sul quale verranno proiettati gli oggetti.

Questa tecnica statistica è usata per stabilire se un campione incognito sia simile a un gruppo di campioni autentici. Il fattore che viene matematicamente calcolato è la distanza di Mahalanobis di ciascun oggetto dal centro delle categorie individuate e quindi l'oggetto è assegnato alla categoria per la quale la distanza è inferiore. Nel caso di due variabili, il grafico derivante dalla funzione di probabilità è a forma di campana e le sue sezioni sono delle ellissi caratterizzate dalla stessa distanza di Mahalanobis dal centroide. Ogni ellisse rappresenta le diverse categorie e ha una diversa posizione nello spazio, connettendo i punti di intersezione di ciascuna coppia di ellissi si identifica la linea di delimitazione tra le due classi.

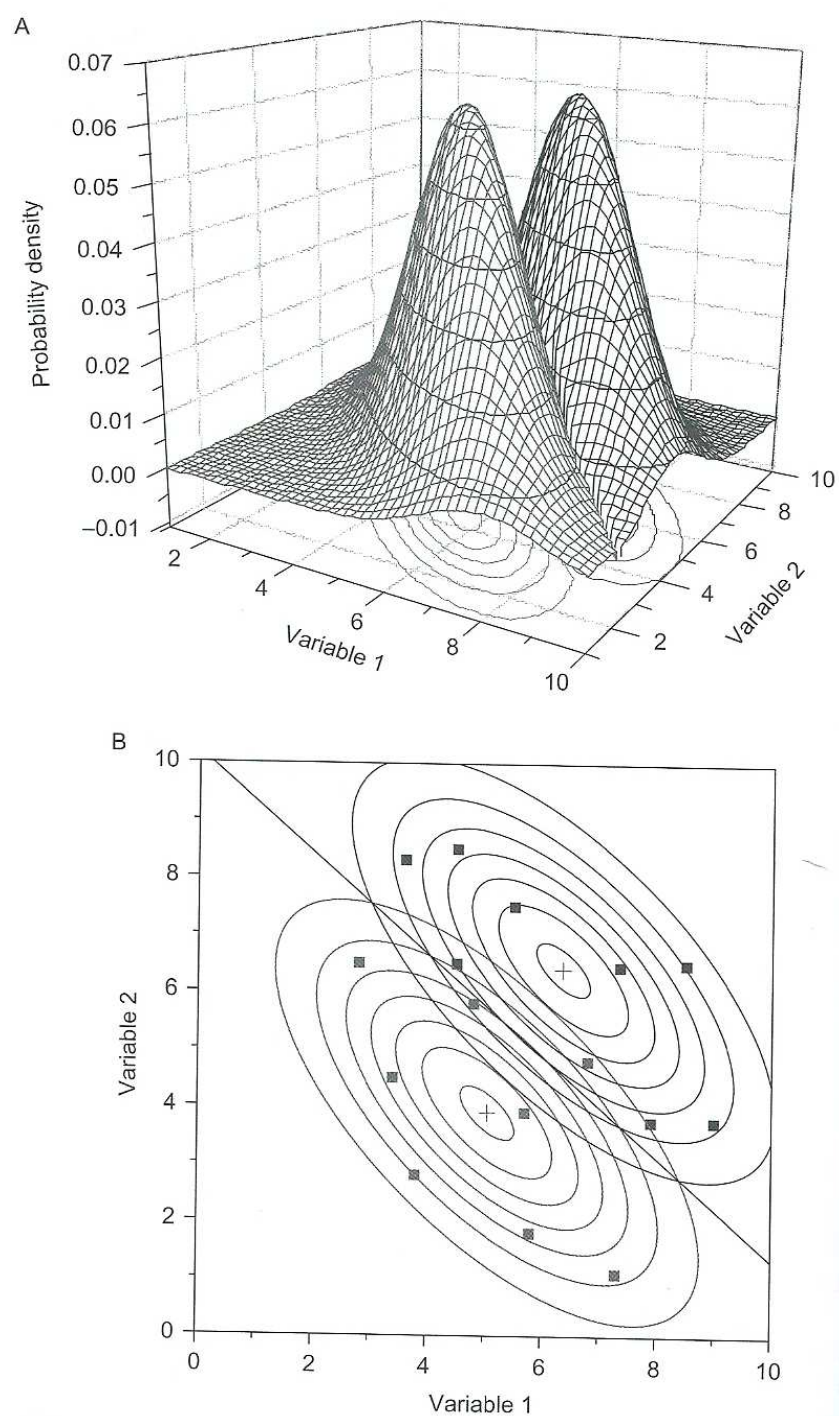


Fig. B.3. Grafico rappresentativo di una Linear Discriminant Analysis (LDA);

BIBLIOGRAFIA

- Abad-García B, Berrueta LA, Garmón-Lobato S, Urkaregi A, Gallo B, Vicente F. Chemometric Characterization of Fruit Juices from Spanish Cultivars According to Their Phenolic Compound Contents: I. Citrus Fruits. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 60 (2012): 3635–3644.
- Adler S, Dahl AV, Vae AH, Thuen E, Garmo T, Krogh-Jensen S, et al. Effect of pasture botanical composition on milk composition in organic production, in *Grassland Science in Europe*, Vol. 15, ed. by Schnyder H, Isselstein J, Taube F, Auerswald K, Schellberg J, Wachendorf M, et al, European Grassland Federation, Zurich, 425–427 (2010).
- Akerstrom A, Jaakola L, Bang U, Jaderlund A. Effects of Latitude-Related Factors and Geographical Origin on Anthocyanidin Concentrations in Fruits of *Vaccinium myrtillus* L. (Bilberries) *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 58 (2010): 11939–11945
- Alcaide-Hidalgo J., Moreno-Arribas, M., Martín-Alvarez, P., Polo, M. Influence of malolactic fermentation, post fermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines. *Food Chemistry* 103 (2007): 572–581.
- Alexander A.J., Waeghe T.J., Himes K.W., Tomasella F.P., Hooker T.F. Modifying conventional high-performance liquid chromatography systems to achieve fast separations with Fused-Core columns: A case study. *Journal of Chromatography A* 1218 (2011): 5456–5469.
- Alfaia, CM, Castr, MF; Reis VA; Prates JM, de Almeida IT; Correia AD; Dias MA. Changes in the profile of free amino acids and biogenic amines during the extended short ripening of Portuguese dry-cured ham. *Food Science And Technology International* 10 (2004): 297–304.
- Ali M.A., Strömberg, R.E., Yngve A. Polyamines in foods: development of a food database. *Food & Nutrition Research* 55 (2011): 5572–5587.
- Arozarena I., Casp A., Marin R., Navarro M.). Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. *European Food Research and Technology* 212 (2000): 108–112.
- Arvanitoyannis IS, Katsota MN, Psarra EP, SouXeros EH, Kallithraka S. Application of quality control methods for assessing wine authenticity: use of multivariate analysis (chemometrics). *Trends in Food Science and Technology* 10 (1999):321–336
- Bach B., Le Quere S., Vuchot, P., Grinbaum M., Barnavon, L. Validation of a method for the analysis of biogenic amines: Histamine instability during wine sample storage. *Analitica Chiica Acta* 732 (2011): 114–119.
- Badeck F.W., Tcherkez G., Nogués S., Piel C., Ghashghaie J. Post-photosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs—a widespread phenomenon. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 19 (2005): 1381–1391.
- Bauer T., Weller P., Hammes W.P., Hertel C. The effect of processing parameters on DNA degradation in food. *European Food Research and Technology* 217 (2003): 338–343
- Bauza T, Kelly MT, Blaise A Study of polyamines and their precursor amino acids in Grenache noir and syrah grapes and wine of the Rhone Valley. *Food Chemistry* 105 (2007):405–413 .
- Bellomario S. A., Conlan X. A., Parker R. M., Barnett N.W., Adams M. J. Geographical classification of some Australian wines by discriminant analysis using HPLC with UV and chemiluminescence detection. *Talanta* 80 (2009): 833–838.
- Beltrán N. H., Duarte-Mermoud M.A., Bustos M.A., Salah S. A., Loyola E. A., Peña-Neira A. I., et al. Feature extraction and classification of Chilean wines. *Journal of Food Engineering* 75 (2006): 1–10.
- Bergamo P, Fedele E, Iannibelli L and Marzillo G, Fat-soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chemistry* 82 (2003):625–631.
- Bizjak Bat K, Vidrih R, Neemer B, Vodopivec MB, Muli I, Kump P, Ogrinc N. Characterization of Slovenian Apples with Respect to Their Botanical and Geographical Origin and Agricultural Production Practice: Botanical and Geographical Origin of Slovenian Apples, *Food Technol. Biotechnol* 50 (2012): 107–116.
- Borges G., Crozier A. HPLC–PDA–MS fingerprinting to assess the authenticity of pomegranate beverages. *Food Chemistry* 135 (2012): 1863–1867.
- Bover-Cid S, Izquierdo-Pulido M, Marine-Font A, Vidal-Carou MC. Biogenic mono-, di- and polyamine contents in Spanish wines and influence of a limited irrigation. *Food Chemistry* 96 (2006):43–47.

- Brandt K, Leifert C, Sanderson R, Seal CJ. Agroecosystem management and nutritional quality of plant foods: the case of organic fruits and vegetables. *Critical Reviews in Plant Science* 30 (2011):177–197.
- Butler G, Collomb M, Rehberger B, Sanderson R, Eyre M, Leifert C. Conjugated linoleic acid isomer concentrations in milk from high- and low-input management dairy systems *Journal of the Science of Food and Agriculture* 89 (2009): 697–705.
- Butler G, Nielsen JH, Slots T, Seal C, Eyre MD, Sanderson R, et al. Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and low-input conventional and organic systems: seasonal variation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88 (2008):1431–1441.
- Butler G, Stergiadis S, Seal C, Eyre M, Leifert C. Fat composition of organic and conventional retail milk in northeast England. *Journal of Dairy Science* 94 (2011): 24–36.
- Capuano E, Boerrigter-Eenling R, van der Veer G, van Ruth SM. Analytical authentication of organic products: an overview of markers. *Journal of Science and Food Agriculture* 93 (2013): 12–28.
- Cattaneo P. Scombroid syndrome- histamine poisoning. *Food* 2 (2011): 5-80.
- Cawthorn D., Steinman H.A., Hoffman L.C. A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. *Food Control* 32 (2013): 440–449.
- Charalampous P, Paul L, Komaitis M. Determination of biogenic amines in wines by HPLC with precolumn dansylation and fluorimetric detection. *Food Chemistry* 106 (2008): 1218–1224.
- Charlton A. J., Wrobel M. S., Stanimirova I., Daszykowski M., Grundy H. H., Walczak, B. Multivariate discrimination of wines with respect to their grape varieties and vintages. *European Food Research and Technology* 231 (2010): 733–743.
- Chiacchierini E., Restuccia D., Vinci G. Evaluation of two different extraction methods for chromatographic determination of bioactive amines in tomato products. *Talanta*, 69 (2006): 548–555.
- Christoph N., Rossmann, A., Schlicht C., Voerkelius S. Wine authentication using stable isotope ratio analysis: Significance of geographic origin, climate, and viticultural parameters. In S. E. Ebeler, G. Takeoka, & P. R. Winterhalter (Eds.), *Authentication of Food and Wine*, Vol. 952 (2006). (pp. 166–179).
- Cimino F., Sulfaro V., Trombetta D., Saija A., Tomaino A. Radical scavenging capacity of several Italian red wines. *Food Chemistry* 103 (2007): 75–81
- Cipolla, B. G., Havouis, R., Moulinoux, J. P. (2007). Polyamine contents in current foods: a basis for polyamine reduced diet and a study of its long term observance and tolerance in prostate carcinoma patients. *Amino Acids*, 33, 203–212.
- Cohen, A. Sturgeon poaching and black market caviar: a case study. *Environmental Biology Fishes* 48 (1997): 423–426.
- Collomb M, Bisig W, Bütikofer U, Sieber R, Bregy M, Etter L. Fatty acid composition of mountain milk from Switzerland: comparison of organic and integrated farming systems. *International Dairy Journal* 18 (2008):976–982.
- Cordente A. G., Curtin C. D., Varela C., Pretorius I. S. Flavour-active wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* 96 (2012): 601–618.
- Cozzolino D., Smyth, H. Chapter 15—Analytical and chemometric-based methods to monitor and evaluate wine protected designation. In G. Miguel de la, & G. Ana (Eds.), *Comprehensive analytical chemistry*, Vol. 60. (2013): 385–408 : Elsevier.
- Csomós E, Héberger K, Simon-Sarkadi L. Principal component analysis of biogenic amines and polyphenols in Hungarian wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50 (2002): 3768–3774.
- Cynkar W., Damberg R., Smith P., Cozzolino D. Classification of Tempranillo wines according to geographic origin: Combination of mass spectrometry based electronic nose and chemometrics. *Analytica Chimica Acta* 660 (2010): 227–231.
- D’Amico, P., Armani, A., Castiglione, L., Sheng, G., Gianfaldoni, D., Guidi, A., Seafood traceability issues in Chinese food business activities in the light of the European provisions. *Food Control* 35 (2014): 7–13.
- Dadáková E., Křížek M., Pelikánová T. Determination of biogenic amines in foods using ultra-performance liquid chromatography (UPLC). *Food Chemistry* 116 (2009): 365–370.

- Dangour AD, Dodhia SK, Hayter A, Allen E, Lock K, Uauy R Nutritional quality of organic foods: a systematic review. *American Journal of Clinical Nutrition* 90 (2009):680–685.
- Del Mar Castineira Gomez M., Feldmann I., Jakubowski N., Andersson J. T. Classification of German white wines with certified brand of origin by multielement quantitation and pattern recognition techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004): 2962–2974.
- Del Mar Castineira Gomez M., Brabdt R., Jakubowski N., Andersson, T. Changes of the metal composition in German white wines through the winemaking process. A study of 63 elements by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004): 2953–2961.
- Delcambre A., Saucier C. High-throughput oenomics: Shotgun polyphenomics of wines. *Analytical Chemistry* 85 (2013): 9736–9741.
- Di Mauro A., Passerini A., Rapisarda P., Maccarone E. Distribution of hydroxycinnamic acids as a criterion to evaluate genuineness and geographic origin of Italian orange juices. *Italian Journal of Food Science* 14 (2002): 301–315.
- Di Paola-Naranjo R. D., Baroni M. V., Podio N. S., Rubinstein H. R., Fabani M. P., Badini R.G., et al. Fingerprints for main varieties of argentinean wines: Terroir differentiation by inorganic, organic, and stable isotopic analyses coupled to chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (2011): 7854–7865.
- Díaz-García M.C., Obón J.M., Castellar M.R, Collado J., Alacid M. Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chemistry* 138 (2013): 938–949.
- Direttiva 2000/13/CE Del Parlamento Europeo E Del Consiglio del 20 marzo 2000 relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità
- Direttiva 2001/112/CE Del Consiglio del 20 dicembre 2001 concernente i succhi di frutta e altri prodotti analoghi destinati all'alimentazione umana
- Direttiva 2003/89/CE Del Parlamento Europeo E Del Consiglio del 10 novembre 2003 che modifica la direttiva 2000/13/CE per quanto riguarda l'indicazione degli ingredienti contenuti nei prodotti alimentari
- Direttiva 2009/106/CE Della Commissione del 14 agosto 2009 recante modifica della direttiva 2001/112/CE del Consiglio concernente i succhi di frutta e altri prodotti analoghi destinati all'alimentazione umana
- Direttiva 2012/12/UE Del Parlamento Europeo E Del Consiglio del 19 aprile 2012 che modifica la direttiva 2001/112/CE del Consiglio concernente i succhi di frutta e altri prodotti analoghi destinati all'alimentazione umana
- Direttiva 79/112/CEE del Consiglio, del 18 dicembre 1978, relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati Membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari destinati al consumatore finale, nonché la relativa pubblicità
- Dong X, Sa JA. Ethylene and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1 (1998): 316–323.
- Dordevic N., Camin F., Marianella R. M., Postma G. J., Buydens L. M. C., Wehrens R. Detecting the addition of sugar and water to wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19 (2013): 324–330.
- Dordevic N., Wehrens R., Postma G. J., Buydens L. M., Camin F. Statistical methods for improving verification of claims of origin for Italian wines based on stable isotope ratios. *Analytica Chimica Acta* 757 (2012): 19–25.
- Drivelos S.A., Georgiou C.A. Multi-element and multi-isotope-ratio analysis to determine the geographical origin of foods in the European Union. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 40 (2012): 38–51.
- Du Z., Sun S. Determination of SUDAN Red I-IV in duck egg yolk using ultra performance liquid chromatography-tandem mass. *Chinese Journal of Chromatography* 25 (2007), 705–710.
- EC (1990). Commission Regulation (EC) No 2676/90 of 3 October 1990. Community analytical methods which can be applied in the wine sector. Detecting enrichment of grape musts, concentrated grape

- musts, rectified concentrated grape musts and wines by application of nuclear magnetic resonance of deuterium (SNIF-NMR). Official Journal of the European Communities, Vol. L 272. (pp. 64–73)
- EC (1991). Commission Regulation (EC) No 2347/91 of 29 July 1991 collection of samples of wine products for the purposes of cooperation between Member States and for the analysis by nuclear magnetic resonance, including analysis for the purposes of the Community databank. Official Journal of the European Communities, Vol. L 214. (pp. 32).
- EC (1991). Commission Regulation (EC) No 2348/91 of 29 July 1991 establishing a databank for the results of analyses of wine products by nuclear magnetic resonance of deuterium. Official Journal of the European Communities, Vol. L 214. (pp. 39–43).
- EC (1997). Commission Regulation (EC) No 822/97 of 6 May 1997 amending Regulation (EEC) No 2676/90 determining Community methods for the analysis of wines. Official Journal of the European Communities, Vol. L 117. (pp. 10–12).
- EC (2003). Commission Regulation (EC) No 440/2003 of 10 March 2003 amending Regulation (EEC) No 2676/90 determining Community methods for the analysis of wines. Official Journal of the European Union, Vol. L 66. (pp. 15).
- EC (2009). Commission Regulation (EC) No 436/2009 of 26 May 2009 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards the vineyard register, compulsory declarations and the gathering of information to monitor the winemarket, the documents accompanying consignments of wine products and the wine sector registers to be kept. Official Journal of the European Union, Vol. L 128/15. (pp. 1–39).
- EC (2009). Commission Regulation (EC) No 606/2009 of 10 July 2009 laying down certain detailed rules for implementing Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards the categories of grapevine products, oenological practices and the applicable restrictions. Official Journal of the European Union, Vol. L 193/1. (pp. 1–59).
- EC (2009). Commission Regulation (EC) No 607/2009 of 14 July 2009 laying down certain detailed rules for the implementation of Council Regulation (EC) No 479/2008 as regards protected designations of origin and geographical indications, traditional terms, labelling and presentation of certain wine sector products. Official Journal of the European Union, Vol. L 193/60. (pp. 1–80).
- EC (2013). European Commission, Agriculture and Rural Development, Agricultural markets, Wine, E-Bacchus. accessed date: Dec 19, 2013. <http://ec.europa.eu/agriculture/markets/wine/e-bacchus/index.cfm?&language=EN>
- EC (2013). European Commission, European Union (EU) Agricultural Product. Quality Policy, Specific EU Quality Schemes—Guaranteeing Quality (accessed Dec 19, 2014, In <http://ec.europa.eu/agriculture/quality>).
- Ehling S., Cole S. Analysis of Organic Acids in Fruit Juices by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Enhanced Tool for Authenticity Testing. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 59 (2011): 2229–2234
- Ellis KA, Innocent G, Grove-White D, Cripps P, McLean WG, Howard CV, et al, Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. *Journal of Dairy Science* 89 (2006):1938–1950.
- Fall N, Emanuelson U, Fatty acid content, vitamins and selenium in bulk tank milk from organic and conventional Swedish dairy herds during the indoor season. *Journal of Dairy Research* 78 (2011): 287–292.
- Fauhl-Hassek, C. Trends in wine authentication. *Bulletin de l'OIV*, 82(935-936-937), (2009) 94–100.
- Faustini F, Cavazza A, Martuscelli M, et al. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control* 16 (2005): 609–616.
- Fedrizzi B., Nicolis E., Camin F., Bocca E., Carbognin C., Scholz M., et al. Stable isotope ratios and aroma profile changes induced due to innovative wine dealcoholisation approaches. *Food and Bioprocess Technology* 39 (2013): 1–9.
- Ferrandino A., Carra A., Rolle L., Schneider A., Schubert A. Profiling of hydroxycinnamoyl tartrates and acylated anthocyanins in the skin of 34 *Vitis vinifera* genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012): 4931–4945.

- Ferrandino A., Carra A., Rolle L., Schneider A., Schubert A. Profiling of hydroxycinnamoyl tartrates and acylated anthocyanins in the skin of 34 *Vitis vinifera* genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012): 4931–4945.
- Ferreira I., Pinho O. Biogenic amines in Portuguese traditional foods and wines. *Journal of Food Protection* 69 (2006): 2293–2303.
- Fiehn O. Metabolomics—The link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48 (2002):155–171.
- Forina M., Lanteri S., Armanino C., Cerrato-Oliveiros C., Casolino C. V-PARVUS: An extendable package of programs for data explorative analysis, classification and regression analysis. Genova, Italy: Department of Chimica e Tecnologie Farmaceutiche e Alimentari, University of Genova (2010).
- Forina M., Oliver, P., Jäger H., Römisch U., Smeyers-Verbeke J. Classmodeling techniques in the control of the geographical origin of wines. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 99 (2009): 127–137.
- Fugel R., Carle R., Schieber A. Quality and authenticity control of fruit purees, fruit preparations and jams—a review. *Trends in Food Science & Technology* 16 (2005): 433–441.
- Galgano F, Caruso M, Favati F Biogenic amines in wines: a review, chap 6. In: Byrne Paul O (ed) *Red Wine and Health*. Nova Science Publisher, Inc., (2009), 174–203.
- Galgano F, Caruso M, Perretti G, Favati F. Authentication of Italian red wines on the basis of the polyphenols and biogenic amines *European Food Research and Technology* 232 (2011):889–897.
- Galgano F., Favati, F Caruso M., Scarpa T., Palma A. Analysis of trace elements in southern Italian wines and their classification according to Provenance. *LWT—Food Science and Technology* 41 (2008): 1808–1815.
- Gallastegui I.G. The use of eco-labels: a review of the literature. *European Environment* 12 (2002): 316–331.
- Garcia-Beneytez E., Revilla E., Cabello F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *European Food Research and Technology* 215 (2002): 32–37.
- Garcia-Wass, F., Hammond, D., Mottram, D.S., Gutteridge, C.S. Detection of fruit juice authenticity using pyrolysis mass spectroscopy. *Food Chemistry* 69 (2000): 215–220.
- Gardini F., Zaccarelli A., Belletti N., Faustini F., Cavazza A., Martuscelli M. Factors influencing biogenic amine production by a strain of *Oenococcus oeni* in a model system. *Food Control* 16 (2005): 609–616.
- Gomez-Gallego M., Gomez Gallego E., Gomez Garcia Carpintero E., Sánchez-Palomo M., González Viñas I., Hermosín-Gutiérrez, A. Oenological Potential, Phenolic Composition, Chromatic Characteristics and antioxidant activity of red single-cultivar wines from Castilla-La Mancha. *Food Research International* 48 (2012): 7-15
- Gonzalez G, Peña-Méndez EM. Multivariate data analysis in classification of must and wine from chemical measurements. *European Food Research and Technology* 212 :100-107
- Gonzalez-Neves G., Franco J., Barreiro L., Gil G., Moutounet M., Carbonneau A. Varietal differentiation of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. *European Food Research and Technology* 225 (2007): 111–117.
- Gonzalez A., Armenta S., de la Guardia M. Trace-element composition and stable-isotope ratio for discrimination of foods with Protected Designation of Origin. *Trends in Analytical Chemistry* 28 (2009): 1295-1309.
- Gougeon R. D., Lucio M., Frommberger M., Peyron D., Chassagne D., Alexandre H., et al. The chemodiversity of wines can reveal a metaboledgeography expression of cooperage oak wood. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (2009): 9174–9179.
- Granat D, Chizuko F, Katayama U, Alves de Castro I. Characterization of red wines from South America based on sensory properties and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92 (2012): 526–533.
- Granato D., Castro I., Katayama F. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. *LWT—Food Science Technology* 43 (2010): 1542–1549.

- Granato D., Chizuko F., Katayama U., Alves de Castro I. Characterization of red wines from South America based on sensory properties and antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92 (2012): 526–533.
- Granato D., Katayama, F C.U., Castro, I.A. Assessing the association between phenolic compounds and the antioxidant activity of Brazilian red wines using chemometrics. *LWT—Food Science and Technology*, 43 (2010): 1542–1549.
- Gritti F., Guiochon G. Speed-resolution properties of columns packed with new 4.6 μm Kinetex-C18 core-shell particles. *Journal of Chromatography A* 1280 (2013): 35-50.
- Gritti F., Leonardis I., Abia J., Guiochon G. Physical properties and structure of fine core-shell particles used as packing materials for chromatography: Relationships between particle characteristics and column performance. *Journal of Chromatography A* 1217 (2010): 3819-3843.
- Gritti F., Guiochon G. Repeatability of the efficiency of columns packed with sub-3 μm core-shell particles: Part I. 2.6 μm Kinetex-C18 particles in 4.6 mm and 2.1 mm $\times$ 100 mm column formats. *Journal of Chromatography A* 1252 (2012): 31-44.
- Halberg N. Assessment of the environmental sustainability of organic farming: Definitions, indicators and the major challenges. *Canadian Journal of Plant Science*, 92 (6) (2012): 981-996.
- Han J, Wu Y, Huang W, Wang B, Sun C, Ge Y, Chen Y, PCR and DHPLC methods used to detect juice ingredient from 7 fruits *Food Control* 25 (2012): 696–703
- Héberger K, Csomós E, Simon-Sarkadi L. Principal component and linear discriminant analyses of free amino acids and biogenic amines in Hungarian wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51 (2003): 8055–8060.
- Henríquez-Aedo K, Vega M, Prieto-Rodríguez S, Aranda M. Evaluation of biogenic amines content in Chilean reserve varietal wines *Food and Chemical Toxicology* 50 (2012): 2742–2750
- Herbert P, Cabrita MJ, Ratoa N, Laureano O, Alves A. Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo region. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *Journal of Food Engineering* 66 (2005):315–322.
- Holmberg, L. Wine fraud. *International Journal of Wine Research* (2010): 105–113.
- Hong Y. SNMR-based metabolomics in wine science. *Magnetic Resonance in Chemistry* 49 (2011): S13–S21.
- Hopfer H., Nelson J., Mitchell A. E., Heymann H., Ebeler S. E. Profiling the trace metal composition of wine as a function of storage temperature and packaging type. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28 (2013): 1288-1298
- Hunter D, Foster M, McArthur JO, Ojha R, Petocz P, Samman S. Evaluation of the micronutrient composition of plant foods produced by organic and conventional agricultural methods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 51 (2011): 571–582.
- Ignat I, Volf I, Popa VI. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables *Food Chemistry* 126 (2011): 4-15.
- Imparato G., Paolo E. D., Braca A., Lamanna R. Nuclear Magnetic Resonance profiling of wine blends. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (2011): 4429–4434.
- Innocente N., Biasutti M., Padovese M., Moret S. Determination of biogenic amines in cheese using HPLC technique and direct derivatization of acid extract. *Food Chemistry* 101 (2007): 1285-1289.
- Izquierdo P., García E., Gómez S., Fernández M., Palop M. Amino acids and biogenic amines during spontaneous malolactic fermentation in Tempranillo red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* 21 (2008): 731-735.
- Jaitz L., Siegl K., Eder R., Rak G., Abranko L., Koellensperger G., et al. LC-MS/MS analysis of phenols for classification of red wine according to geographic origin, grape variety and vintage. *Food Chemistry*, 122 (2010): 366–372
- Jakszyn P., Agudo A., Ibanez R., Garcia-Closas R., Pera G., Amiano P., Gonzales C.A. Development of a food database of Nitrosamine, Heterocyclic Amines, and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *The Journal of Nutrition* 134 (2004): 2011-2014.
- Jia S., Kang Y.P., Park J.H., Lee J., Kwon S.W. Determination of biogenic amines in Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) wines using a novel ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Food Chemistry* 132 (2012): 1185-1190.

- Jimenez Moreno N., Torrea Goni D., Ancin Azpilicueta C. Changes in amine concentrations during aging of red wine in oak barrels. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51 (2003): 5732-5737.
- Kalac P, Krausova P. A review of dietary polyamines: Formation, implications for growth and health and occurrence in foods. *Food Chemistry* 90 (2005): 219–230.
- Kalač P., Krizek M., Špička J. Biogenic amines in sauerkraut. Biologically-active phytochemicals in food: analysis, metabolism, bioavailability and function. (2001): 217-220.
- Kaufmann A., Widmer M. Quantitative analysis of polypeptide antibiotic residues in a variety of food matrices by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta* 797 (2013): 81-88.
- Kelly S.D., Rhodes C., Lofthouse J.H, Anderson D., Burwood C.E., Dennis M.J. Detection of sugar syrups in apple juice by delta H-2 parts per thousand and delta C-13 parts per thousand analysis of hexamethylenetetramine prepared from fructose. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003): 1801–1806.
- Kim SH, Chuang JC,B. Kelly PB,Clifford AJ. Carbon Isotopes Profiles of Human Whole Blood, Plasma, Red Blood Cells, Urine and Feces for Biological/Biomedical ¹⁴C-Accelerator Mass Spectrometry Applications *Analytical Chemistry* 83 (2011): 3312–3318.
- Knight AI., Mooney R., Chappell, L. Evaluation of a polymerase chain reaction-based heteroduplex assay for detection the adulteration of processed orange juice with mandarin juice. *Journal of AOAC International* 89 (2006): 1052-1061.
- Knobbe N, Vogl J, Pritzkow W, Panne U, Fry H, Lochotzke HM, et al. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. *Anal Bioanal Chem* 386 (2006):104–108.
- Konakovsky V., Focke M., Hoffmann-Sommergrube, K., Schmid R., Scheiner O. Levels of histamine and other biogenic amines in high-quality red wines. *Food Additives and Contaminants* 28,(2011): 408-416.
- Korenovska M., Suhaj M. Identification of some Slovakian and European wines origin by the use of factor analysis of elemental data. *European Food Research Technology* 221 (2005): 550–558.
- Kornel BE, Werner T, Rossmann A, Schmidt HL. Measurement of stable isotope abundances in milk and milk ingredients as a possible tool for origin assignment and quality control. *Z Lebensm Unters Forsch A* 205 (1997):19–24.
- Kruzlicova D., Mocak J., Balla B., Petka J., Farkova M., Havel, J. Classification of Slovak white wines using artificial neural networks and discriminant techniques. *Food Chemistry* 112 (2009): 1046–1052.
- Laghi L., Versari A., Marcolini E., Parpinello G. P. Metabonomic investigation by ¹H NMR to discriminate between red wines from organic and biodynamic grapes. *Food and Nutrition Sciences* 5 (2014): 52–59.
- Lairon D. Nutritional quality and safety of organic food. A review. *Agronomic Sustainable Development* 30 (2010):33–41
- Landete J., Ferrer S., Polo L., Pardo I. Biogenic amines in wines from three Spanish regions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (2005): 1119-1124.
- Lapa-Guimaraes J., Pickova J. New solvent systems for thin-layer chromatographic determination of nine biogenic amines in fish and squid. *Journal of Chromatography A* 1045 (2004): 223–232.
- Latorre-Moratalla M.L., Veciana-Nogués T, Bover-Cid S, Garriga M, Aymerich T, Zanardi E, Ianieri A, Fraqueza M.J, Patarata L., Drosinos E.H., Lauková A, Taloni R., Vidal-Carou M.C. Biogenic amines in traditional fermented sausages produced in selected European countries. *Food Chemistry* 107 (2008): 912-921.
- Lavizzari T., Veciana-Nogués M.T., Weingart O., Bover-Cid S., Mariné-Font A., Vidal-Carou M.C. Occurrence of biogenic amines and polyamines in spinach and changes during storage under refrigeration. *Journal Agricultural Food Chemistry* 14 (2007): 9514-9519.
- Lima A. S., Glória M. B. A. Aminas bioativas em alimentos. *Bolletín of SBCTA* 33 (1999): 70-79.
- Loret S., Deloyer P., Dandrifosse G. Levels of biogenic amines as a measure of the quality of the beer fermentation process: Data from Belgian samples. *Food Chemistry* 89.(2005):519-525.
- Mafra I. M., Ferreira V., Beatriz M., Oliveira P. P. Food authentication by PCR-based methods *Eur Food Res Technol* 227 (2008):649–665.

- Manach C., Scalbert A., Morand C., Remesy C., Jimenez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition* 79 (2004): 727 – 747.
- Manning L., Soon JM. Developing systems to control food adulteration. *Food Policy* 49 (2014): 23–32
- Marcobal Á., Martín-Álvarez, P., Polo, M., Muñoz, R., Moreno-Arribas, M. Formation of Biogenic Amines throughout the Industrial Manufacture of Red Wine. *Journal of Food Protection* 2 (2006): 397-404.
- Mardiana S., Bahrudin, S., Noor H.H., Abdussalam Salhin, M.A., Muhammad, I.S. Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chemistry* 113 (2009): 1356-1362.
- Martin, G. J., Martin, M. L. Deuterium labelling at the natural abundance level as studied by high field quantitative ²H NMR. *Tetrahedron Letters* 22 (1981): 3525–3528.
- Martin-Alvarez P., Marcobal A., Polo C., Moreno-Arribas M. Influence of technological practices on biogenic amine contents in red wines. *Euopena. Food Research and Technology* 222 (2006): 420–424.
- Martínez Montero C., Rodríguez Doderó, M. C., Guillén Sánchez, D. A. , Barroso, C. G. Analysis of low molecular weight carbohydrates in food and beverages: a review. *Chromatographia* 59 (2004):15-30.
- Martuscelli M, Arfelli G, Manetta AC, Suzzi G. Biogenic amines content as a measure of the quality of wines of Abruzzo (Italy). *Food Chemistry* 140 (2013): 590-597
- Mattila P, Hellström J, Törrönen R. Phenolic acids in berries, fruits, and beverages. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54 (2006):7193-7199.
- Min Chung I, Park I, Yoon JY, Yang YS, Kim SH. Determination of organic milk authenticity using carbon and nitrogen natural isotopes. *Food Chemistry* 160 (2014): 214–218.
- Molkentin J, Giesemann A. Follow-up of stable isotope analysis of organic versus conventional milk. *Analitical and Bioanalitical Chemistry* 398 (2010): 1493–1500.
- Molkentin J, Giesemann A. Differentiation of organically and conventionally produced milk by stable isotope and fatty acids. *Analitical and Bioanalitical Chemistry* 388 (2007): 297–305.
- Molkentin J. Authentication of organic milk using $\delta^{13}\text{C}$ and the α -linolenic acid content of milk fat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009):785–790.
- Moore J.C., DeVries J.W., Lipp M., Griffiths J.C., Abernethy, D.R., Total protein methods and their potential to reduce the risk of food protein adulteration. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 9 (2010): 330–357.
- Moore, J.C., Spink, J., Lipp, M.. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. *Journal of Food Science* 77 (2012):, R118–R126.
- Moret S., Smela D., Populin T., Conte L.S. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. *Food Chemistry* 89 (2005): 355-361.
- Mota RV, Amorim DA, Fávero AC, Gloria MBA, Regina MA. Physico-chemical characterization and bioactive amines in Syrah wines I- Influence of growing season. *Ciência Tecnologia Alimentar* 29 (2009):380–385.
- Nishibori N., Fujihara S., Akatuki T. Amounts of polyamines in foods in Japan and intake by Japanese. *Food Chemistry* 100 (2007): 491-497.
- Novella-Rodriguez S., Veciana-Nogues M.T., Vidal-Carou M.C.. Biogenic Amines and Polyamines in Milks and Cheeses by Ion-Pair High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 (2000): 5117-5123.
- O'Donnell AM, Spatny KP, Vicini JL, Bauman DE. Survey of the fatty acid composition of retail milk differing in label claims based on production management practices. *Journal of Dairy Science* 93 (2010): 1918–1925.
- Obón J.M., Díaz-García, M.C, Castellar, M.R. Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis* 24 (2011): 760-771.
- Oliveri P., Downey, G. Multivariate class modeling for the verification of food-authenticity claims. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 35 (2012): 74–86.
- Onal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry* 103 (2007): 1475–1486

- Onal A., Serife, E.K.T., Cem, O. A review of the liquid chromatographic methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food chemistry* 139 (2013): 509-515
- Papotti G., Bertelli D., Graziosi R., Silvestri M., Bertacchini L., Durante C., et al. Application of one- and two-dimensional NMR spectroscopy for the characterization of Protected Designation of Origin Lambrusco wines of Modena. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013): 1741-1746.
- Penza M, Cassano G. Recognition of adulteration of Italian wines by thin-film multisensory array and artificial neural networks. *Analytica Chimica Acta* 509 (2004): 159-177.
- Perestrelo R., Barros A. S., Camara J. S., Rocha, S.M. In-depth search focused on furans, lactones, volatile phenols, and acetals as potential age markers of Madeira wines by comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry combined with solid phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59 (2011): 3186-3204.
- Piper T, Geyer H, Gougoulidis V, Flenker U, Schänzer W. Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of urinary excreted boldenone and its main metabolite 5- androst-1-en-17-ol-3-one. *Drug Testing and Analysis* 2 (2010): 217-224.
- Piper T., Mareck U., Geyer H., et al., Determination of $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios of endogenous urinary steroids: method validation, reference population and application to doping control purposes. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 22 (2008): 2161-2175.
- Polaskova P., Herszage J., Ebeler S. E. Wine flavor: Chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews* 37 (2008): 2478-2489.
- Pramateftaki P., Metaza M., Kallithraka S., Lanaridis P. Evolution of malolactic bacteria and biogenic amines during spontaneous fermentations in a Greek winery. *Letters of Applied Microbiology* 43 (2006): 155-160.
- Prandini A, Sigolo S, Piva G. Conjugated linoleic acid (CLA) and fatty acid composition of milk, curd and Grana Padano cheese in conventional and organic farming systems. *Journal of Dairy Research* 76 (2009): 278-282.
- Preti R., Antonelli M., Bernacchia R., Vinci G. Fast determination of biogenic amines in beverages by a core-shell particle column. *Food Chemistry*. In press.
- Primetta AK, Jaakola L, Ayaz FA, Inceer H, Riihinen KR. Anthocyanin fingerprinting for authenticity studies of bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) *Food Control* 30 (2013): 662-667.
- Primrose S., Woolfe M., Rollinson S. Food forensics: methods for determining the authenticity of foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology* 21 (2010): 582-590.
- Pyrzyska K. Analytical methods for the determination of trace metals in wine. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 34 (2004): 69-83.
- Rauscher-Gabernig E., Grossgut R., Bauer F., Paulsen P. Assessment of alimentary histamine exposure of consumers in Austria and development of tolerable levels in typical foods *Food Control* 20 (2009): 423-429.
- Regolamento (CE) N. 178/2002 Del Parlamento Europeo E Del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare
- Regolamento (CE) N. 1804/1999 Del Consiglio Del 19 luglio 1999 che completa, per le produzioni animali, il regolamento (CEE) n. 2092/91 relativo al metodo di produzione biologico di prodotti agricoli e alla indicazione di tale metodo sui prodotti agricoli e sulle derrate alimentari
- Regolamento (CE) N. 1829/2003 Del Parlamento Europeo E Del Consiglio del 22 settembre 2003 relativo agli alimenti e ai mangimi geneticamente modificati
- Regolamento (CE) N. 479/2008 Del Consiglio Del 29 Aprile 2008 Relativo All'organizzazione Comune Del mercato vitivinicolo, che modifica i regolamenti (CE) n. 1493/ 1999, (CE) n. 1782/2003, (CE) n. 1290/2005 e (CE) n. 3/2008 e abroga i regolamenti (CEE) n. 2392/86 e (CE) n. 1493/1999
- Regolamento (CE) N. 509/2006 Del Consiglio Del 20 Marzo 2006 Relativo Alle Specialità Tradizionali Garantite dei prodotti agricoli e alimentari
- Regolamento (CE) N. 510/2006 Del Consiglio del 20 marzo 2006 relativo alla protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli e alimentari
- Regolamento (CE) N. 555/2008 Della Commissione Del 27 Giugno 2008 Recante Modalità Di Applicazione del regolamento (CE) n. 479/2008 del Consiglio relativo all'organizzazione comune del

- mercato vitivinicolo, in ordine ai programmi di sostegno, agli scambi con i paesi terzi, al potenziale produttivo e ai controlli nel settore vitivinicolo
- Regolamento (CE) N. 882/2004 Del Parlamento Europeo E Del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali
- Regolamento (CE) N. 889/2008 Della Commissione del 5 settembre 2008 recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici, per quanto riguarda la produzione biologica, l'etichettatura e i controlli
- Regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio, del 28 giugno 2007, relativo alla produzione biologica e all'etichettatura dei prodotti biologici e che abroga il regolamento (CEE) n. 2092/91
- Regolamento (CEE) n. 2082/92 del Consiglio del 14 luglio 1992 relativo alle attestazioni di specificità dei prodotti agricoli ed alimentari.
- Regolamento (UE) N. 1151/2012 Del Parlamento Europeo E Del Consiglio Del 21 Novembre 2012 sui regimi di qualità dei prodotti agricoli e alimentari
- Regolamento (UE) N. 271/2010 Della Commissione del 24 marzo 2010 recante modifica del regolamento (CE) n. 889/2008, recante modalità di applicazione del regolamento (CE) n. 834/2007 del Consiglio, per quanto riguarda il logo di produzione biologica dell'Unione europea
- Regolamento (UE) n. 1169/2011 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 25 ottobre 2011, relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n.1924/2006 e (CE) n.1925/2006 Parlamento europeo e del Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione.
- Regolamento CE n. 2081/92 del Consiglio del 14 luglio 1992 protezione delle indicazioni geografiche e delle denominazioni d'origine dei prodotti agricoli ed alimentari.
- Restuccia D. , Spizzirri U. G. , Puoci F. , Cirillo G. , Curcio M. , Parisi O. I. , Iemma F. , Picci N. A new method for determination of biogenic amines in cheese by HPLC with evaporative light scattering detection. *Talanta* 85 (2011): 363-369.
- Robinson A. L., Adams D. O., Boss P. K., Heymann H., Solomon P.S., Trengove, R. D. Influence of geographic origin on the sensory characteristics and wine composition of Vitis vinifera cv. Cabernet Sauvignon wines from Australia. *American Journal of Enology and Viticulture* 63 (2012): 467–476
- Rodriguez-Ramirez R, Gonzalez-Cordoba AF, Vallejo-Cordoba B. Review: authentication and traceability of foods from animal origin by polymerase chain reaction- based capillary electrophoresis. *Anal Chim Acta* 685 (2011): 120-130.
- Romisch U., Jager H., Capron X., Lanteri S., Forina M., Smeyers-Verbeke, J. Characterization and determination of the geographical origin of wines. Part III:Multivariate discrimination and classification methods. *European Food Research Technology* 230 (2009): 31–45.
- Roßmann A., Schmidt H. -L., Reniero F., Versini G.,Moussa I., Merle, M. H. Stable carbon isotope content in ethanol of EC data bank wines from Italy, France and Germany. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 203 (1996): 293–301
- Ruiz-Capillas C., Carballo J., Jimenez Colmenero F. Biogenic amines in pressurized vacuum-packaged cooked sliced ham under different chilled storage conditions. *Meat Science* 75 (2007):397-405.
- San Juan, F., Cacho, J., Ferreira, V, Escudero, A. Aroma Chemical Composition of Red Wines from Different Price Categories and Its Relationship to Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60 (2012): 5045–5056.
- Santiago-Silva P., Labanca R.A., Gloria M.B.A. Functional potential of tropical fruits with respect to free bioactive amines. *Food Research International* 44 (2011): 1264–1268.
- Schlesier K., Fauhl-Hassek C., Forina M., Cotea V., Kocsi E., Schoula R., et al. Characterisation and determination of the geographical origin of wines. Part I: Overview.*European Food Research Technology* 230 (2009): 1–13.

- Schroder M, Vetter W. GC/EI-MS determination of the diastereomer distribution of phytanic acid in food samples. *Journal American Oil Society* 88 (2011): 341–349.
- Schroder M, Yousefi F, Vetter W. Investigating the day-to-day variations of potential marker fatty acids for organic milk in milk from conventionally and organically raised cows. *European Food Research and Technology* 232 (2010):167–174.
- Scott M, Knight A. Quantitative PCR analysis for fruit juice authentication using PCR and laboratory-on-a-chip capillary electrophoresis according to the Hardy-Weinberg law. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57 (2009):4545-4551.
- Shalaby A.R. Significance of biogenic amines to food safety and human health. *Food Research International* 29 (1996): 675-690.
- Shui G., Leong L.P. Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 977(2002): 89–96.
- Silla Santos M.H. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 9 (1996): 213–231.
- Smeyers-Verbeke J., Jager H., Lanteri S., Brereton P., Jamin E., Fauhl-Hassek C., et al. Characterization and determination of the geographical origin of wines. Part II: Descriptive and inductive univariate statistics. *European Food Research Technology* 230 (2009): 15–29.
- Soufleros E. H., Bouloumpasi E., Zotou A., Lokou Z. Determination of biogenic amines in Greek wines by HPLC and ultraviolet detection after dansylation and examination of factors affecting their presence and concentration. *Food Chemistry* 101 (2007). 704–716.
- Spano G., Russo P., Lonvaud-Funel A., Lucas P., Alexandre H., Grandvalet C., Coton E., Coton M. Biogenic amines in fermented foods. *European journal of Clinical nutrition* 64 (2010): 95-100.
- Spink, J., Moyer, D.C.,. Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science* 76 (2011): R157–R163.
- Spiros A., Drivelos F., Constantinos A., Georgiou B. Multi-element and multi-isotope ratio analysis to determine the geographical origin of foods in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry* 40 (2012): 154-163.
- Stute R., Petridis K., Steinhart H., Biernoth G. Biogenic amines in fish and soy sauces. *European Food Research and Technology* 215 (2002): 101-107.
- Styger G., Prior B., Bauer F. F. Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 38 (2011): 1145–1159
- Suzzi G., Gardini F. Biogenic amines in dry fermented sausages: a review. *International Journal of Food Microbiology* 88 (2003): 41-54.
- Takeoka, G. R., Ebeler, S. E. Progress in authentication of food and wine. In S. E. Ebeler, G. R. Takeoka, & P. Winterhalter (Eds.), *Progress in authentication of food and wine*. ACS Symposium Series. (2011). 4–11).
- Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E. (2004). Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 480-490.
- Traccia M., Boldi M.O., Rawlyer, A. Différenciation des vins de barrique et de copeaux. *Revue Suisse Viticulture, Arboriculture, Horticulture* 45 (2013): 240–247.
- Vaclavik, L., Lacina, O., Hajslova, J., Zweigenbaum, J. The use of high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry coupled to advanced data mining and chemometric tools for discrimination and classification of red wines according to their variety. *Analytical Chimica Acta*, 685(2011): 45–51.
- Versari A., Laurie FV., Ricci A, Laghi L, Parpinello GP. Progress in authentication, typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches. *Food Research International* 60 (2014): 2–18
- Versari A., Parpinello G., Mattioli A., Galassi S. Characterisation of Italian commercial apricot juices by high-performance liquid chromatography analysis and multivariate analysis. *Food Chemistry* 108 (2008): 334–340.

- Vetter W, Schroder M. Concentrations of phytanic acid and pristanic acid are higher in organic than in conventional dairy products from the German market. *Food Chemistry* 119(2010):746–752.
- Vieira S.M., Theodoro K.H., Glória M.B. Profile and levels of bioactive amines in orange juice and orange soft drink. *Food Chemistry* 100 (2007): 895–903.
- Vieri S. Agricoltura: settore multifunzionale allo sviluppo, Edagricole-il Sole 24 ore (2012).
- Villamiel M., Polo M., Moreno-Arribas M. Nitrogen compounds and polysaccharides changes during the biological ageing of sherry wines. *LWT - Food Science and Technology* 41 (2008): 1842–1846.
- Vinci G., Antonelli M. L., Preti R. Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater by liquid-liquid microextraction and LC with core-shell particles column and fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 36 (2013): 461-468.
- Vinci, G., Antonelli, M.A. Biogenic amines: quality index of freshness in red and white meat. *Food Control* 113 (2002): 519-524.
- Visciano P, Schirone M, Tofalo R, Suzzi G. Biogenic Amines in Raw and Processed Seafood. *Frontiers in Microbiology* 3 (2012): 188-199..
- Walters D. R. Polyamines and plant disease. *Phytochemistry* 64 (2003): 97–107.
- Wang X., Barber W.E, Long W.J. Applications of superficially porous particles: high speed, high efficiency or both?. *Journal of Chromatography A* 1228 (2012): 72-88.
- Weldegergis B. T., de Villiers A., Crouch A.M. Chemometric investigation of the volatile content of young South African wines. *Food Chemistry* 128 (2011): 1100–1109.
- Wheaton, T.A., Stewart, I. Quantitative analysis of phenolic amines using ion-exchange chromatography. *Analytical Biochemistry* 12 (1965): 585–592.
- Xiu C., Klein K.K. Melamine in milk products in China: Examining the factors that led to deliberate use of the contaminant. *Food Policy* 35 (2010): 463–470.
- Zach L., Doyle M.E., Bier, V., Czuprynski, C. Systems and governance in food import safety: A U.S. perspective. *Food Control* 27 (2012): 153–162.
- Zou J. F., Peng Z. X., Du H. J., Duan C. Q., Reeves M. J., Pan Q. H. Elemental patterns of wines, grapes, and vineyard soils from Chinese wine-producing regions and their association. *American Journal of Enology and Viticulture* 63 (2012): 232–240.

Sitografia

- DOOR database : <http://ec.europa.eu/agriculture/quality/door/list.html?locale=it>
- E-Bacchus database:
<http://ec.europa.eu/agriculture/markets/wine/e-bacchus/index.cfm?event=pwelcome&language=IT>
www.ismea.it
- Eurostat: data on the organic sector (area, crop and animal products, operators):
http://epp.eurostat.ec.europa.eu/portal/page/portal/statistics/search_database
- Eurobarometro: http://ec.europa.eu/public_opinion/index_en.htm
- Serra R. European Union policy for high quality agricultural products. *International Symposium On Geographical Indications* (2007)
[Http://www.wipo.int/edocs/mdocs/geoind/en/wipo_geo_bei_07/www_81757.doc](http://www.wipo.int/edocs/mdocs/geoind/en/wipo_geo_bei_07/www_81757.doc) (last accessed 21.10.2014)
- US FDA, 2008. FDA Advises Consumers to Avoid Toothpaste from China Containing Harmful Chemical. June 2007.
<http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/2007/ucm108927.htm> (accessed 02.12.14).

Ringraziamenti

Alla fine del mio percorso di dottorato desidero esprimere la mia gratitudine a coloro che mi hanno aiutato in questo lavoro con informazioni, osservazioni, critiche e suggerimenti.

Ringrazio, innanzitutto, il Prof. Simone Vieri, per il suo supporto sempre amichevolmente critico e mai banale, teso a fornire prospettive e spunti di riflessione fondati su conoscenza e passione profonde.

Ringrazio il Prof. Francesco Botrè, direttore del laboratorio dell'Anti Doping del CONI di Roma, per avermi permesso di frequentare il suo laboratorio e per aver reso il breve periodo trascorso presso la sua équipe di ricerca ricco di stimoli e di conoscenze utili per la mia preparazione.

Un ringraziamento particolare lo riservo per la Prof.ssa Giuliana Vinci, che ha sempre creduto in me, spronandomi a perseguire continuamente nuovi obiettivi, con un entusiasmo e una gioia per il conoscere assolutamente contagiosi.

Sarò sempre e comunque grata a tutti coloro che con me sono stati limpidi e sinceri, per ogni risata vera.

“When you realize the value of all life, you dwell less on what is past and concentrate more on the preservation of the future.”

Dian Fossey