INDUSTRIE BELLE BINANDE





LUCA ROLLE° - FABRIZIO TORCHIO - GIUSEPPE ZEPPA -GIUSEPPINA COMBERIATI - VINCENZO GERBI

Di.Va.P.R.A. - Microbiologia agraria e Tecnologie Alimentari -Università degli Studi di Torino - Via L. da Vinci 44 - 10095 Grugliasco - TO - Italia *e-mail: luca.rolle@unito.it

FABRIZIO STECCA - MARCO CERRUTI

Enocontrol Scarl - Corso Enotria 2/c - 12051 Alba - CN - Italia

PIERGUIDO FIORINA - GIOVANNI VIGLIONE

Assessorato Agricoltura, Provincia di Cuneo - Corso Nizza 21 - 12100 Cuneo - Italia

CLAUDIO SALARIS

Consorzio Tutela Barolo Barbaresco Alba Langhe e Roero -Corso Enotria 2/c - 12051 Alba - CN - Italia

RICERCA DI MICROCOMPONENTI

INORGANICI TOSSICI, **OCRATOSSINA A, AMINE BIOGENE IN VINI A BASE** NEBBIOLO (BAROLO DOCG, **BARBARESCO DOCG E** ROERO DOCG)

Research on toxic inorganic microcomponent, ochratoxin A, biogenic amine monitoring in Nebbiolo wines (Barolo DOCG, Barbaresco DOCG, and Roero DOCG)

Parole chiave: sicurezza alimentare, Barolo, metalli pesanti, ocratossina A, amine biogene Key words: food safety, Barolo, heavy metal, ochratoxin A, biogenic amine

INTRODUZIONE

La sicurezza igienico sanitaria è un prerequisito indispensabile per un alimento. Per essere considerato "sicuro" questo non deve contenere sostanze tossiche contaminanti di origine chimica e/o microbiologica che possano arrecare danni alla salute del consumatore. Per raggiungere tale sicurezza è necessaria una strategia integrata lungo tutta la filiera di produzione, che permetta di monitorare tutti i "punti critici" del processo produttivo e di ottemperare a quanto previsto dal

Reg. CE 852/2004 in materia di autocontrollo.

Nel settore enologico è necessario che i produttori rispettino tutti i limiti legali imposti dalla normativa comunitaria e italiana, ma attualmente è richiesto un controllo analitico documentato unicamente per due sostanze contaminanti: l'anidride solforosa ed il piombo. In questo lavoro, finanziato dalla Provincia di Cuneo e dalla Regione Piemonte nell'ambito del Piano Regionale di ricerca del Distretto dei vini e dal laboratorio Enocontrol Scarl, è stato realizzato un monitoraggio analitico su

SUMMARY

The quantification of chemical and biological contaminants in foods is an important parameter for consumer's

In this work the first results of an analytical monitoring of Nebbiolo wines produced in Cuneo province are reported.

In particular the contents of heavy metal (lead, copper, cadmium, zinc, mercury, selenium, arsenic) fluorides, inorganic bromine, biogenic amines, and ochratoxin A were determined. No indicators of danger for consumer's health emerge from the analysis results and all the samples are widely in the limits established by the regulation.

SOMMARIO

La determinazione dei contaminanti di origine chimica e biologica negli alimenti risulta sempre più importante al fine di garantire la sicurezza alimentare del consumatore.

In questo lavoro vengono riportati i primi risultati di un monitoraggio analitico sui principali inquinanti tossici presenti in vini piemontesi a base Nebbiolo prodotti nella Provincia di Cuneo. In particolare sono stati determinati i contenuti di metalli pesanti (piombo, rame, cadmio, zinco, mercurio, selenio, arsenico), di fluoruri, di bromo inorganico, di ammine biogene e di ocratossina A.

Dai risultati ottenuti non sono emerse, per tutti i parametri analitici considerati, indicazioni di pericolo per il consumatore e i campioni analizzati rientrano ampiamente nei limiti stabiliti dalla normativa vigente.

vini DOCG prodotti nelle Langhe a base Nebbiolo (Barolo, Barbaresco e Roero), commercializzati a partire dal 2007.

L'indagine si è focalizzata in particolare sul controllo del contenuto di metalli pesanti, di fluoruri, di bromo inorganico, ocratossina A (OTA) e amine biogene.

Tra i contaminanti ambientali i metalli pesanti rivestono un ruolo di primaria importanza poiché, a causa della loro inerzia metabolica, residuano permanentemente e danno luogo al fenomeno del bioaccumulo. La quantità di metalli nel vino, importante anche dal punto di vista tecnologico, può dipendere dalle caratteristiche ambientali e pedologiche del sito di coltivazione, delle tecniche di lotta fitosanitaria, e anche dalle possibili contaminazioni durante la vinificazione e/o lo stoccaggio in cantina. Il contenuto in metalli pesanti in alcuni vini italiani è stato valutato in diverse pubblicazioni, senza riscontrare peraltro contaminazioni o campioni superiori ai limiti legali (Buldini et al., 1999; Dugo et al., 2005).

Il monitoraggio della presenza del piombo nei vini è stato inserito nel piano di autocontrollo aziendale con un limite di riferimento di 0,2 mg/L stabilito dalla normativa europea (Reg. CE 1881/2006; Reg. CE 466/2001). L'Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (OIV) incoraggia tuttavia gli stati membri a diminuire ancora tale limite a 0,15 mg/L dalla vendemmia 2007 (OIV, Risoluzione 13/2006). Il cadmio è un elemento particolarmente tossico per l'uomo a piccole dosi, infatti, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha fissato un limite pari a $5 \mu g/L$ nell'acqua potabile. Nel vino l'OIV ha indicato un limite pari a $10 \mu g/L$ (OIV, 2005), mentre non esiste attualmente nessun limite di riferimento indicato dall'Unione Europea. Lo zinco è un microelemento essenziale, ma in caso di assunzione in dosi elevate può causare dei problemi fisiologici. Nei vini il limite legale nazionale è pari a 5 mg/L (Art. 1 del D.M. del 29/12/1986). Il rame è presente nell'uva e nel mosto in seguito a trattamenti antiperonosporici effettuati con prodotti rameici, ma durante la fermentazione alcolica il suo contenuto si riduce notevolmente con la formazione di solfuri insolubili. Nel vino è autorizzata l'aggiunta di rame sotto forma di solfato (Reg. CE 1493/1999; Reg. CE 1622/2000) per eliminare i composti solforati maleodoranti. Il contenuto limite di rame è 1 mg/L, come previsto dall'Art. 1 del D.M. del 29/12/1986. Lo stesso D.M. fissa anche ad 1 mg/L il tenore massimo in bromo inorganico. Mercurio, selenio, arsenico ed i fluoruri nel vino sono generalmente presenti allo stato di tracce.

L'ocratossina A (OTA) è una micotossina tossica, prodotta da funghi filamentosi, che si può riscontrare nei cereali, nel cacao, nel caffè, nei legumi, nella frutta secca, nell'uva appassita e nel vino (Pohland, 1993). I principali funghi produttori di OTA sull'uva sono l'Aspergillus niger e l'Aspergillus carbonarius; da un'indagine effettuata nei vigneti italiani risulta come questi due funghi colonizzino diffusamente gli acini, con una prevalenza di A. carbonarius in quelli delle regioni meridionali (Battilani et al., 2006; Cecchini et al., 2006). Dalla vendemmia 2005 l'Unione Europea ha stabilito un limite di legge

pari a 2 μ g/L nel vino (Reg. CE 1881/2006; Reg. CE 123/2005; Reg. CE 466/2001).

Le amine biogene nel vino sono prodotte dalla decarbossilazione degli aminoacidi presenti nel mezzo ad opera dei batteri lattici (Busto et al., 1996; Lonvaud-Funel, 2001; Costantini et al., 2006) e dai lieviti, tra cui Brettanomyces spp. e Saccharomyces cerevisiae (Caruso et al., 2002). Non sono ancora stati fissati dei limiti di legge a livello europeo, ma alcuni stati hanno posto dei limiti nazionali riferiti all'istamina.

L'esclusione o la quantificazione a bassi livelli dei suddetti potenziali inquinanti tossici nei vini può costituire un elemento di ulteriore valorizzazione del prodotto.

MATERIALI E METODI

In questo lavoro sono stati analizzati un centinaio di vini piemontesi prodotti nella provincia di Cuneo e commercializzati tutti a partire dal 1° gennaio 2007 con le denominazioni Barolo DOCG (annata 2003), Barbaresco DOCG (annata 2004) e Roero DOCG (annata 2005). Tutti i prodotti analizzati sono stati prelevati dal Consorzio di Tutela presso le aziende afferenti su partite di vino imbottigliato.

Per tutte le D.O. considerate, i campioni sono rappresentativi di almeno il 75% della produzione complessiva dell'annata di riferimento.

Le analisi sono state condotte in diversi laboratori di ricerca utilizzando le metodiche ufficiali indicate dall'Unione Europea (ECC, 1990), i metodi previsti dall'OIV (OIV, 2005) nonché i metodi di

prova definiti in conformità alla Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2000 (Pavanello, 2005). Rame e zinco sono stati determinati mediante spettrofotometria ad assorbimento atomico mentre cadmio, piombo, selenio e mercurio sono stati determinati utilizzando uno Spectrometer AA M-Series (Thermo Electron Corporation, Runcorn, Cheshire, UK) equipaggiato con fornetto di grafite (GF95Z Zeeman Graphite Furnace). La determinazione dell'arsenico è stata effettuata in accordo con il metodo OIV - MA-F-AS323-01-ARSENI, con assorbimento atomico accessoriato con generatore di idruri.

Il dosaggio del bromo inorganico è stato valutato per via colorimetrica a 590 nm (OIV - MA-F-AS321-01-BROTOT) utilizzando uno spettrofotometro UV-1601 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).

I fluoruri sono stati determinati per via potenziometrica con elettrodo specifico a membrana solida HI 4110 (HANNA Italia srl, Villafranca Padovana, PD).

L'OTA è stata quantificata con rilevatore a fluorescenza (λ_{ex} = 333 nm, $\lambda_e = 460$ nm) (Perkin Elmer LC 240) previa separazione HPLC su colonna Discovery C_{18} (15 cm x 4,6 mm, 5 μ m) (Supelco, Bellafonte, PA, USA) come previsto dal metodo messo a punto da Visconti e collaboratori (1999).

Le amine biogene sono state determinate per HPLC utilizzando una colonna ODS C₁₈ Speri-5 (22 cm x 4,6 mm, 5 μ m) (Kasei Co., Tokyo, Japan), un rilevatore a fluorescenza ($\lambda_{\rm ex} = 252$ nm, $\lambda_{\rm e}$ = 500 nm) e previa derivatizzazione con Dansil Cloruro (Marcè et al., 1995).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nelle **tab.** 1, 2 e 3 sono riportati i valori di piombo, rame, zinco, cadmio, ocratossina A e amine biogene rispettivamente riscontrate in 50 campioni di vino Barolo DOCG, in 30 di Barbaresco DOCG e in 20 di Roero DOCG. In tutti i vini analizzati, i contenuti di mercurio, di selenio, di arsenico, di bromo inorganico e dei fluoruri sono sempre risultati inferiori al limite di rilevabilità del metodo strumentale utilizzato e pertanto non riportati in tabella. L'analisi del contenuto in piombo ha evidenziato come tale pericolo non costituisca allo stato attuale un problema di sicurezza alimentare. Infatti i valori massimi riscontrati in tutte le tipologie di vino sono risultati circa un quarto del limite imposto dalla legge. Tuttavia, su un unico campione tra quelli studiati, seppure all'interno della conformità legale, è stato evidenziato un valore in piombo elevato (188 μ g/L) come riportato in tab. 3.

Il contenuto di rame rilevato in tutti i vini analizzati è risultato sempre inferiore al limite di 1 mg/L. In molti campioni (30%), il contenuto risulta addirittura inferiore al limite di rilevabilità strumentale mentre nei restanti il contenuto medio è inferiore agli 0,5 mg/L (50% limite legale).

Dall'indagine eseguita il contenuto di zinco non supera in nessun campione il limite di 5 mg/L, anzi risultando nei valori massimi (1,03 mg/L) cinque volte inferiore al limite legale.

Anche per il cadmio tutti i campioni analizzati risultano ampiamente rientranti nel valore di riferimento stabilito dall'OIV. I

contenuti dei metalli pesanti determinati sono in accordo a quelli riscontrati in precedenti studi in vini a base Nebbiolo di annate precedenti (Marengo e Aceto, 2003).

Per quanto riguarda la presenza di ocratossina A, dall'indagine effettuata è emerso che tale problematica non costituisce un fattore di rischio per le produzioni oggetto di studio in quanto il contenuto di OTA rilevato è nettamente inferiore al limite di legge imposto dall'Unione Europea (2 μ g/L). Seppur presente in più dell'85% dei campioni analizzati, il suo contenuto massimo è stato rilevato in $0.14 \mu g/L$. La durata differente dell'invecchiamento fra i tre vini considerati non sembra avere influenza sul contenuto di OTA, che risulta piuttosto simile e comunque molto inferiore ai dati presenti in bibliografia. Nei vini italiani la valutazione del contenuto di OTA è stato infatti oggetto di numerosi lavori scientifici. În particolare, i risultati ne evidenziano un contenuto estremamente variabile. In vini rossi e bianchi liquorosi di diversa origine delle annate dal 1995 al 1997 è stata rilevata una quantità variabile di OTA tra il limite di rilevabilità strumentale e 3,6 μ g/L con una media superiore a $1,2 \mu g/L$ solo per quelli provenienti dalle regioni meridionali (Pietri et al., 2001). In altri lavori sono stati rilevati valori massimi fino a 7,6 μ g/L con un contenuto medio superiore a $1 \mu g/L$ solo nei vini rossi (Castellari et al., 2000; Visconti et al., 1999). Anche l'indagine effettuata su vini italiani e sudafricani delle vendemmie 2000 e 2001 ha confermato il contenuto di OTA superiore nei vini rossi, ma, in questo caso, con

Tabella 1 Contenuto medio, minimo, massimo e relativa deviazione standard (DS) di metalli pesanti, ocratossina A e amine biogene in 50 vini Barolo DOCG prodotti nella vendemmia 2003.

		Media	DS	Min	Max
Metalli pesanti	Piombo (μg/L)	15	13	3	58
*	Rame (mg/L)	0,32	0,16	0,10	0,75
	Zinco (mg/L)	0,46	0,17	0,05	1,03
	Cadmio (µg/L)	0,60	0,43	0,10	1,80
Ocratossina	OTA (μg/L)	0,05	0,04	0,02	0,14
Amine Biogene	Istamina (mg/L)	0,97	0,730	0,05	3,71
8	Tiramina (mg/L)	1,71	0,850	0,53	4,14
	Putrescina (mg/L)	0,10	0,029	0,05	0,20
	Cadaverina (mg/L)	0,12	0,076	0,05	0,23
	β-feniletilammina (mg/L)	0,27	0,152	0,03	0,55

Contenuto medio, minimo, massimo e relativa deviazione standard (DS) di metalli pesanti, ocratossina A e amine biogene in 30 vini Barbaresco DOCG prodotti nella

		Media	DS	Min	Max
Metalli pesanti	Piombo (μg/L)	20	16	5	52
•	Rame (mg/L)	0,27	0,17	0,10	0,59
	Zinco (mg/L)	0,36	0,16	0,12	0,66
	Cadmio (µg/L)	0,70	0,36	0,20	1,20
Ocratossina	OTA (μg/L)	0,05	0,03	0,02	0,14
Amine Biogene	Istamina (mg/L)	0,51	0,30	0,36	1,12
8	Tiramina (mg/L)	1,39	0,81	0,52	3,93
	Putrescina (mg/L)	0,11	0,06	0,01	0,12
	Cadaverina (mg/L)	nr	-	-	-
	β-feniletilammina (mg/L)	0,10	0.06	0,02	0,32
	. (8)	,	,		,

Tabella 3 Contenuto medio, minimo, massimo e relativa deviazione standard (DS) di metalli pesanti, ocratossina A e amine biogene in 20 vini Roero DOCG prodotti nella vendemmia 2005.

			DS	Min	Max
Metalli pesanti Piombo (µ Rame (mg	y/L)	33 0,40	76 0,23	6 0,14	188 0,77
Zinco (mą Cadmio (, Ocratossina OTA (µg/l	ug/L)	0,44 0,70 0,06	0,19 0,52 0,03	0,19 0,30 0,03	0,94 1,70 0,13
Amine Biogene Istamina Tiramina Putrescina	(mg/L)	0,69 1,42 0.06	0,36 0,62 0.03	0,13 0,26 0.03	1,20 2,43 0,10
Cadaverir	` 0 /	nr 0,13	0,10	0,02	0,45

tenori sempre inferiori a 1 μg/L (Shepard et al., 2003). L'areale di produzione piemontese sembra pertanto non favorevole allo sviluppo di queste muffe tossinogene.

Le analisi effettuate per la determinazione delle amine biogene hanno permesso di determinare la concentrazione di istamina, cadaverina, putrescina, β-feniletilammina e tiramina, mentre spermina, serotonina, triptamina e spermidina non hanno raggiunto concentrazioni rilevabili strumentalmente. Dallo studio condotto è emerso che le amine maggiormente presenti in questi vini sono la tiramina e l'istamina, rilevate in tutti i vini esaminati, con concentrazioni medie rispettivamente di circa 1,5 e 0,7 mg/L. La concentrazione di istamina in sei campioni di Barolo 2003 supera il limite imposto dalla Germania all'importazione (2 mg/L), con valori massimi di 3,7 mg/L che tuttavia non costituiscono un problema per i limiti più elevati di Svizzera e Austria (10 mg/L). Tali tenori sono probabilmente imputabili ad una fermentazione malolattica effettuata da ceppi produttori di amine biogene (Guerrini et al., 2002) condotta a pH elevati (maggiori di 3,50) caratteristici dei vini dell'annata 2003, particolarmente siccitosa. Andrà valutato se nelle annate successivamente commercializzate, caratterizzate da andamenti climatici meno estremi, saranno riscontrate concentrazioni analoghe.

In una recente indagine contenuti fino a 10,5 mg/L di istamina sono stati riscontrati in vini rossi prodotti in Cina (Zhijuna et al., 2007).

Anche se a concentrazioni decisamente inferiori, sono state rilevate anche putrescina, presente nel 73% dei campioni, β-feniletilammina (38% dei campioni) e cadaverina (7% dei campioni). Tale modesto contenuto di queste amine differisce dai valori più elevati trovati in alcune indagini condotte su altri vini italiani, in cui l'amina più presente è stata la putrescina con valori variabili tra 0,2 e 20 mg/L, ma con campioni in cui la presenza arriva fino a 78 mg/L (Vecchio et al., 1989; Mangani et al., 2006).

CONCLUSIONI

Dall'indagine condotta su un elevato numero di campioni di vino prodotti nella Provincia di Cuneo nelle annate dal 2003 al 2005 e commercializzati nel 2007 con le denominazioni Barolo DOCG, Barbaresco DOCG e Roero DOCG non è stata evidenziata la presenza di inquinanti tossici tali da creare nessun tipo di problema di ordine sanitario.

In particolare, i contenuti in metalli pesanti sono risultati piuttosto bassi rispetto ai valori previsti dalla normativa vigente, anche se bisogna sempre porre attenzione a possibili fonti di inquinamento di piombo che potrebbero generare non conformità nel vino prodotto. Il contenuto di OTA è risultato sempre ampiamente inferiore al limite previsto a livello europeo. Le amine biogene sono risultate presenti in basse quantità in particolare quelle associate a cattive condizioni igieniche quali putrescina e cadaverina. L'istamina presente preclude solo in pochissimi vini la possibilità di commercializzazione in quegli stati dalla normativa più restrittiva.

Questi dati costituiscono per il Consorzio di Tutela una prima banca dati per tutela e la valorizzazione dei vini. Occorre tuttavia implementare con un monitoraggio annuale costante questa prima serie di indicazioni.

RINGRAZIAMENTI

Lavoro eseguito con il contributo finanziario della Provincia di Cuneo, del Piano di Distretto dei Vini Piemonte Sud e di Enocontrol Scarl.

BIBLIOGRAFIA

- Battilani P., Giorni P., Bertuzzi T., Formenti S., Pietri A., (2006) - Black aspergilli and ochratoxin A in grapes in Italy. Int. J. Food Microbiology, 111, 53-60.
- Buldini P.L., Cavalli S., Lal Sharma J., (1999) - Determination of transition metal in wine by IC, DPASV-DPCSV and ZGFAAS coupled with UV photolysis. J. Agric. Food Chem., 47, 1993-1998.
- Busto O., Guash J., Borrul F., (1996) Biogenic amines in wine: a review of analytical methods. J. Int. Sc. Vigne Vin, 30, 85-101.
- Caruso M., Fiore C., Contursi M., Salzano G., Paparella A., Romano P., (2002) -Formation of biogenic amines as criteria for the selection of wine yeast. World J. Microbiol. Biotechnol., 18, 159-163.
- Castellari M., Fabbri S., Fabiani A., Amati A., Galassi S., (2000) - Comparison of different immunoaffinity clean-up procedures for high-performance liquid chromatographic analysis of ochratoxin A in wines. J. Chromatogr. A, 888, 129-136.
- Cecchini F., Morassut M., Moruno E.G., Di Stefano R., (2006) - Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. Food Microbiology, 23, 411-417.
- Costantini A., Cersosimo M., Del Prete V., Moruno E.G., (2006) - Production of biogenic amines by lactic acid bacteria: Screening by PCR, thin-layer chromatography, and high-performance liquid chromatography of strains isolated from wine and must. Journal of Food Protection, 69, 391-396.
- Dugo G., La Pera L., Pellicanó T.M., Di Bella G., D'Imperio M., (2005) - Determina-

- tion of some inorganic anions and heavy metals in D.O.C. golden and amber Marsala wines: statistical study of the influence of ageing period, colour and sugar content. Food Chem., 91, 355-363.
- EEC. 1990. Commission Regulation N. 2676 of 17 September 1990 Determining Community methods for analysis of wines. OJ L272, 3.10.1990.
- Guerrini S., Mangani L., Vincenzini M., (2002) - Biogenic amine production by Oenococcus oeni. Curr. Microb., 44, 374-378
- Lonvaud-Funel A., (2001) Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. FEMS Microb. Letters, 199, 9-13.
- Marcè M., Brown D.S., Capell T., Figueras X., Tiburcio A.F., (1995) - Rapid high-performance liquid chromatographic method for the quantisation of polyamines as their dansyl derivatives: application to plant and animal tissues. J. Chromatogr. B, 666, 329-335.
- Mangani G., Galli C., Guerrini S., Granchi L., Vincenzini M., (2006) - Sviluppo di popolazioni microbiche ed accumulo di ammine biogene in vinificazione. Vignevini, 6, 79-83.
- Marengo E., Aceto M., (2003) Statistical investigation of the difference in the distribution of metals in Nebbiolo-based wines. Food Chem., 81, 621-630.
- OIV, (2005) Recueil international des méthodes d'analyses, Vol. 1., OIV Eds.
- Pavanello F., (2005) Guida alle analisi enologiche - Metodi di prova definiti in conformità alla Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2000. eds Unione Italiana Vini.
- Pietri A., Bertoluzzi T., Pallaroni L., Piva G., (2001) - Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. Food Additives and Contaminants, 18, 7, 647-654.
- Pohland A.E., (1993) Mycotoxins in review. Food Additives and Contaminants., 10, 17-28.
- Shepard G.S., Fabiani A., Stockenström S., Mshicilieli N., Sewram V., (2003) -Quantisation of ochratoxin A in South African wines. J. Agric. Food Chem., 51,
- Vecchio A., Finoli C., Cerutti G., Moeler F., (1989) - Ammine biogene in vini italiani. Vignevini, 16 (5), 57-59.
- Visconti A., Pascale M., Centoze G., (1999) - Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A, 864,
- Zhijuna L., Yongningb W., Gongb Z., Yunfengb Z., Changhu X., (2007) - A survey of biogenic amines in Chinese red wines. Food Chem., 105, 1530-1535.