

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

***La valutazione della genuinità dei mosti concentrati e
rettificati: la validazione del metodo basato sul
contenuto di mio- e scillo-inositolo.***

Relatore
Prof. Vasco Ladislao Boatto
Correlatore
Dott. Mario Pecile

Laureanda
Milena Carlot
Matricola n. 1015158

ANNO ACCADEMICO 2012 - 2013

RIASSUNTO

Le recenti normative europee in campo vitivinicolo ed in particolare la fine del sostegno all'utilizzo dei mosti concentrati per l'aumento del grado alcolico dei vini (luglio 2012) ha fatto tornare alla ribalta il mai sopito tema riguardante la discriminazione delle aree vitivinicole del sud Europa (Italia, Spagna, Grecia, Portogallo) costrette ad usare gli zuccheri dell'uva, più costosi e difficili da utilizzare rispetto al saccarosio, ammesso nel resto d'Europa e di quasi tutto il mondo vitivinicolo.

In questa tesi verranno presi in esame gli aspetti normativi che storicamente hanno regolamentato lo zuccheraggio dei vini in Italia per passare all'analisi della problematica legislativa su scala europea fino ai giorni nostri.

Sarà illustrato l'aspetto produttivo dei mosti concentrati (MC) ed in particolare dei mosti concentrati rettificati (MCR), mettendone in evidenza i parametri qualitativi ed i requisiti legislativi, comprendendo in quest'ultimo aspetto anche i metodi analitici che la normativa vigente stabilisce per la verifica delle possibili contraffazioni. In particolare sarà illustrata la parte sperimentale per la validazione del metodo descritto nel regolamento CE 2676/90, mirato alla valutazione della genuinità dei mosti concentrati e rettificati. La metodica prevede la quantificazione in gas cromatografia dei polialcoli minori (mio-inositolo e scillo-inositolo), previa derivatizzazione degli stessi; pur essendo stata inclusa tra i metodi ufficiali (*G. U. L 272 del 03/10/1990*) non è presente nella "Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti" dell'OIV (*Organization Internationale de la Vigne et du Vin*) ai quali il regolamento CE n. 479/2008 e il regolamento CE n. 606/2009 prevedono si faccia riferimento per stabilire se i prodotti enologici siano stati sottoposti a trattamenti in violazione delle pratiche enologiche autorizzate. Al fine di far entrare la metodica nella categoria dei metodi ufficiali dell'OIV sono necessari una serie di test di validazione analitica (ripetibilità, riproducibilità, linearità....) che saranno descritti nel lavoro di tesi. La possibilità di poter usufruire di metodiche validate è di particolare importanza soprattutto nel contesto sanzionatorio o legale. Gli enti preposti al controllo della qualità e alla prevenzione o repressione delle frodi necessitano di metodiche analitiche che siano estremamente affidabili in modo che le irregolarità riscontrate possano essere adeguatamente confermate anche in contesto forense.

La parte sperimentale è stata svolta presso i laboratori dell'ICQRF di Conegliano-Susegana, sezione vini, ente promotore della validazione del metodo ai fini dell'inserimento tra le metodiche ufficiali dell'OIV.

ABSTRACT

Recent European regulations about viticulture and oenology and in particular the end of the aid for the use of concentrated grape must to increase the alcohol content of wines (July 2012), brought back to the never faded issue on discrimination of viticultural areas of southern Europe (Italy, Spain, Greece, Portugal), forced to use grape sugars instead of the less expensive and easy- to-use sucrose, utilized in the other European countries and almost all the rest of the world.

In this thesis, regulatory issues that have historically regulated enrichment of wines in Italy will be examined; then the analysis will be extended to the European scale in order to illustrate present day legislation on this matter.

The production of concentrated grape must (MC) and in particular of rectified concentrated must (RCM) will be explained, highlighting the quality parameters and the requirements of legislation, including the analytical methods that the existing law provides for the verification of potential adulteration. In particular it will be shown the experimental validation of the method described in the EC Regulation 2676/90, designed to assess the genuineness of concentrated and rectified grape musts. The method involves the quantification by gas chromatography of minor polyols (myo-inositol and scyllo-inositol), after their derivatization. Although it was included in the official methods (OJ L 272, 10.3.1990), the protocol is not present in the " Compendium of International Methods of Analysis of Wines and Musts" of OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) to which the EC Regulation n. 479/2008 and EC Regulation n. 606/2009 provide to refer in order to verify whether the oenological products have undergone to processes contrary to the authorized oenological practices. In order to add the protocol into a proper category of official methods of the OIV, a series of tests of analytical validation (repeatability, reproducibility, linearity) are required and the procedure will be described in the thesis. The possibility to use validated methods is especially important in the context of sanctions or legal advice. The institutions responsible for quality control and fraud prevention and prosecution requires analytical methods that are extremely reliable so that irregularities can be adequately confirmed in forensic context.

The experimental part was carried out at the "Ispettorato Centrale per la Qualità e la Repressione Frodi" (central office for quality and fraud repression) of Conegliano – Susegana (TV, Italy), at the wine laboratory section. The institution is the promoter of the validation of the above described method for its insertion in the OIV compendium of the official methods.

INDICE

1. INTRODUZIONE

- 1.1 MOSTI CONCENTRATI E MOSTI CONCENTRATI E RETTIFICATI
- 1.2 MERCATO DEL MOSTO CONCENTRATO E RETTIFICATO
- 1.3 TECNOLOGIE DI PRODUZIONE DEI MCR
- 1.4 ASPETTI LEGISLATIVI RELATIVI AI MOSTI CONCENTRATI
 - 1.4.1 ASPETTI LEGISLATIVI SULL'USO DEI MOSTI CONCENTRATI
 - 1.4.2 ASPETTI LEGISLATIVI DELLA QUALITÀ DEI MOSTI CONCENTRATI RETTIFICATI
 - 1.4.3 LA QUALITÀ OLTRE GLI ASPETTI LEGISLATIVI: IL VALORE AGGIUNTO DELL'INOSITOLO
- 1.5 I METODI PER LE ANALISI IN CAMPO ENOLOGICO: ASPETTI TECNICI E LEGISLATIVI
- 1.6 I METODI DI ANALISI DEI MCR
- 1.7 IL PROTOCOLLO DI VALUTAZIONE DELLA GENUINITÀ DEI MOSTI
- 1.8 LA VALIDAZIONE DEI METODI DI ANALISI
- 1.9 SCOPI DELLA TESI

2. MATERIALI E METODI

- 2.1 REAGENTI
- 2.2 PROTOCOLLI E STRUMENTI
- 2.3 PROVE PRELIMINARI
- 2.4 RING TEST

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

- 3.1 PROVE PRELIMINARI DI MESSA A PUNTO DEL PROTOCOLLO
- 3.2 PROVE DI RILEVABILITÀ DEL MIO-INOSITOLO
- 3.3 PROVE DEL RING TEST

4. CONCLUSIONI

5. BIBLIOGRAFIA

1.INTRODUZIONE

1.1 MOSTI CONCENTRATI E MOSTI CONCENTRATI E RETTIFICATI

La concentrazione dei mosti è una pratica che è stata utilizzata fin dall'antichità. I Romani la praticavano per aumentare la conservabilità dei vini. L'eliminazione dell'acqua avveniva sostanzialmente tramite ebollizione del mosto che, oltre a ridurre il volume, migliorava la conservabilità del prodotto grazie all'eliminazione, con il calore, della microflora responsabile di fermentazioni spontanee. Il mosto cotto degli antichi romani (*carenum*) veniva poi diluito con acqua e fatto fermentare all'occorrenza. In alternativa veniva aggiunto al mosto in fermentazione attiva allo scopo di aumentare il grado alcolico e quindi la conservabilità del vino finale. Per molti secoli il mosto è stato concentrato con i mezzi disponibili ed ancora oggi ci sono prodotti di nicchia ottenuti con mosti concentrati tramite cottura (vino cotto, aceti balsamici, ...).

Attualmente il termine "mosto concentrato" è riservato al prodotto della spremitura delle uve parzialmente disidratato con qualsiasi metodo autorizzato, escluso il fuoco diretto per evitare la caramellizzazione degli zuccheri. L'acqua viene eliminata dal mosto tramite osmosi inversa, crio- concentrazione o tramite evaporazione sottovuoto per limitare l'innalzamento della temperatura. Quest'ultima metodica è la più diffusa rispetto alle prime due per motivi di costi di gestione (Amati et al., 1983).

Il prodotto che ne risulta ha una concentrazione di zuccheri così elevata (la legge prevede minimo 50,9 °Brix a 20 °C) che l'attività dell'acqua risulta fortemente limitante per lo sviluppo di microrganismi, già ridotti dalla mutizzazione del mosto di partenza. Nel mosto concentrato sono presenti molti elementi nutritivi, ma le condizioni di pH e la pressione osmotica ne inibiscono l'utilizzo alla maggior parte delle specie microbiche. L'innesco di fermentazione infatti deve essere accuratamente evitato; a questo proposito la legge prevede che il titolo alcolometrico volumico (TAV) effettivo non debba essere pari o superiore all'1%. Gli acidi, gli aminoacidi, i polifenoli, le sostanze minerali risultano incrementati di circa 3-4 volte rispetto ad un mosto naturale e la sua addizione al mosto è spesso discussa per lo squilibrio che può portare nella composizione del vino. Da questo punto di vista, il prodotto privato di tutti i composti ad eccezione dello-zucchero, ossia il mosto concentrato e rettificato, risponde meglio all'esigenza di incrementare il grado alcolometrico senza interferire con le altre caratteristiche del vino. Le prime testimonianze riguardo all'esistenza di questo prodotto le troviamo in un avviso del Regno d'Italia,

Dipartimento del Tagliamento, del 1° ottobre 1810 dove si legge: “... *dalla Sovrana Munificenza viene accordato un generoso premio a que’ stabilimenti che avranno introdotta la fabbricazione dello Zucchero d’uva, e che riusciranno a migliorarla ed aumentarla*”. Evidentemente lo zucchero d’uva, anche se molto diverso da quello oggi esistente sul mercato, era noto già nel XIX secolo e ne venivano incoraggiati la produzione ed il miglioramento della qualità. Non è dato sapere quali fossero all’epoca le quantità prodotte e quali le destinazioni, ma non è difficile immaginare che il suo impiego fosse in sostituzione del saccarosio e del miele. Non si hanno inoltre notizie di quale destino abbia avuto questo prodotto nell’800 e nei primi tre quarti del ‘900 (Pompei, 2005). Dal 1975 lo zucchero d’uva ha attirato l’attenzione del mondo enologico grazie alla proposta del Prof. Pier Giovanni Garoglio di usarlo come alternativa allo zuccheraggio dei mosti con saccarosio e come mezzo per limitare le eccedenze vinicole, che allora pesavano fortemente sul bilancio della Comunità Europea. Era un possibile contributo a ridurre il quantitativo di vini destinati alla distillazione.

A seguito delle ricerche condotte per la messa a punto e per l’ottimizzazione del processo di produzione e del successivo lavoro di una commissione creata *ad hoc* presso la Comunità, dopo cinque anni, lo zucchero d’uva, nel frattempo denominato Mosto Concentrato Rettificato (MCR), è divenuto una realtà ed è stato definito da un autorevole personaggio della Comunità Europea “una delle principali vere innovazioni in campo enologico dell’ultimo quarto del secolo scorso”.

Nelle intenzioni del Prof. Garoglio, così come in quelle della Comunità, l’MCR era un prodotto a destinazione enologica. La sua principale funzione doveva essere quella di eliminare dal mercato mosti destinati a fornire vini comuni, trasformandoli in un prodotto assolutamente neutro, utilizzabile per l’arricchimento zuccherino dei mosti, anche di pregio, ai quali non apportava costituenti caratteristici del mosto dal quale era ottenuto. (Pompei, 2005). Questo è il motivo per il quale è stata messa a punto una tecnologia di rettificazione basata sul passaggio del mosto su resine a scambio ionico in grado di eliminare tutti i costituenti diversi dagli zuccheri e di ottenere un prodotto fondamentalmente costituito da uno sciroppo di glucosio e fruttosio, con un bassissimo contenuto in sostanze polifenoliche ed elementi metallici e neutro per quanto riguarda il sapore (escluso il dolce, ovviamente) e cioè il Mosto Concentrato Rettificato da utilizzare anche per l’arricchimento dei vini e dei mosti, senza modificare le caratteristiche organolettiche ed analitiche del vino arricchito.

1.2 MERCATO DEL MOSTO CONCENTRATO E RETTIFICATO

Il MCR in Italia deve la sua importanza soprattutto al suo impiego nel settore enologico, grazie anche a scelte economico-legislative, sia nazionali che comunitarie, che, per favorire la viticoltura in particolare nel mezzogiorno, ha incentivato l'uso di MCR, vietando, almeno in alcune zone, l'uso di zuccheri alternativi (vedasi paragrafo 1.4.1).

Il primo impianto di produzione industriale di MCR ha iniziato la sua attività in Sicilia a Campobello di Mazara nel 1983. Negli anni successivi sono entrati in funzione altri impianti e nel 2000 ce n'erano 27, distribuiti principalmente in Sicilia (11), Emilia Romagna (5) e Puglia (4) e con una produzione che ammontava a 900.000 hl di cui 700.000 ricevevano l'incentivazione per l'arricchimento dei vini. Dati del 2008 riferiscono una produzione nazionale di mosti pari a 2,3 milioni di hl con un incremento del 7,1% rispetto all'anno precedente.

Ad inizio millennio solo la Sicilia lavorava 2 milioni di hl/anno di mosto muto producendo il 55% del mosto concentrato e rettificato nazionale (circa 500.000 hl), con un trend in aumento in parte a sfavore del mosto concentrato tradizionale, ma anche per l'incremento dello sbocco nel settore dolciario (Pirrone e Gattuso, 2000). Nel 2008 la produzione risultava più che raddoppiata (1,1 milioni di hl). Puglia ed Emilia Romagna producevano nel 2008 rispettivamente 486.450 e 409.400 hl di MCR, ma, mentre per la prima la produzione risultava costante, per la seconda il quantitativo era aumentato del 45% rispetto all'anno precedente. Il Veneto si attestava sui 170.000 hl. sempre nel 2008. Bisogna riconoscere però che l'analisi su due annate successive ha poco significato, anche perché la produzione di mosto in linea generale segue la stagionalità della produzione di vino. E', tuttavia, plausibile che la quantità di mosto "sottratta" alla vinificazione sia più che proporzionale alla produzione, visto che in linea tendenziale la produzione di vino è in costante diminuzione. Interessanti sono anche gli sbocchi esteri: Regno Unito e Svizzera, tradizionali importatori dall'Italia, ma anche Russia, Giappone e Stati Uniti. Germania e Francia hanno ridotto drasticamente le loro importazioni dall'Italia. Il nostro Paese, pur essendo un esportatore netto, acquista una buona quantità di prodotto dalla Spagna.

L'utilizzo di MCR per l'arricchimento del vino, a causa del non finanziamento della misura di sostegno per l'utilizzo del Mosto Concentrato Rettificato a partire dal 31 luglio 2012, subirà un drastico ridimensionamento già da quest'anno (www.corriere.uiv.it/corriere/federmosti-combattere-la-decisione-della-francia-sul-saccarosio). La riduzione di consumo probabilmente comporterà una diminuzione di produzione ed una ricerca di utilizzi alternativi all'arricchimento del vino.

Negli ultimi anni già sono stati trovati sbocchi interessanti nel settore dell'industria alimentare, soprattutto nei segmenti delle marmellate e confetture, frutta scioppata, succhi di frutta, dello yogurt, del gelato (soprattutto artigianale) e dei prodotti da forno.

L'acquisto di zucchero per uso domestico, ha subito nell'ultimo trentennio una forte flessione controbilanciata da un aumento del consumo dello stesso da parte dell'industria (si è avuta un'evoluzione dell'acquisto del cibo pronto, rispetto alla preparazione casalinga con le materie prime). E' estremamente improbabile che lo zucchero d'uva possa mettersi in concorrenza con il saccarosio per un utilizzo a livello domestico (il prezzo sarebbe eccessivo, visto il costo di produzione della materia prima), ma potrebbe avere un suo sbocco nel segmento degli edulcoranti naturali, soprattutto se di origine biologica, accanto agli sciroppi di agave, di mela, etc. recentemente apparsi sul commercio. Lo zucchero d'uva sarebbe destinato ad un consumatore più attento ed esigente in termini di valenze salutistiche e disposto a pagare un surplus per un prodotto che ritiene più genuino rispetto al saccarosio, dato che, non essendo cristallizzato, ma solo purificato, mantiene le tracce di polialcoli e zuccheri minori potenzialmente benefici per la salute (vedasi paragrafo 1.4.3).

1.3 TECNOLOGIE DI PRODUZIONE DEI MCR

La produzione industriale dei MCR prevede le seguenti fasi: mutizzazione (blocco dell'attività microbica) del mosto, chiarifica, rettifica e concentrazione. La mutizzazione immediata del pigiato appena ottenuto, è effettuata solitamente con l'aggiunta di anidride solforosa. E' importante, infatti, che non venga innescata alcuna fermentazione sia per la resa, che per requisiti di legge riguardo il tenore alcolico (<1%). Il mosto reso infermentescibile, potrà essere conservato per alcuni mesi in contenitori di acciaio inox, per poterlo lavorare svincolandosi dalla stagionalità degli arrivi. Le diverse tipologie di mosto (mosto fiore o mosto integro) possono seguire vie separate o essere mescolati in varie proporzioni portando ad un prodotto qualitativamente diverso a seconda della percentuale di mosto integro presente, essendo quest'ultimo più ricco di polifenoli.

In alcuni impianti è previsto un trattamento di desolforazione, ma non essendo economicamente conveniente, nella maggior parte dei casi si lascia che l'anidride solforosa venga trattenuta dalle resine. Importanti, invece, sono i trattamenti per togliere i solidi sospesi che altrimenti andrebbero a depositarsi sulle resine diminuendone la capacità di scambio e la durata. Il trattamento di base prevede l'aggiunta di chiarificanti in successione a partire dalla bentonite per passare alla gelatina e per ultimo, carbone attivo o, in alternativa, sol di silice, caseina ed albumina. Questi trattamenti sono effettuati uno dopo

l'altro con brevi intervalli di tempo e con rimontaggi per assicurare un miglior contatto della matrice con il chiarificante. Dopo una sosta di 24-48 ore il mosto limpido viene separato dalle fecce sedimentate e filtrato con farina fossile o, negli impianti più evoluti, con filtrazione tangenziale, per ottenere un liquido limpido e brillante.

Il mosto così depurato può entrare nell'impianto di rettifica costituito da resine a scambio cationico ed anionico che trattengono i componenti con cariche forti e deboli, liberando il mosto da cationi e anioni organici e minerali, dai composti polifenolici e dal 90% dei composti azotati; rimane praticamente inalterata la concentrazione degli zuccheri iniziale. Solitamente gli impianti sono costituiti da 4 colonne a scambio ionico, due anioniche e due cationiche, due forti due deboli, interconnesse tra loro in serie, che possono essere alimentate sia dall'alto che dal basso (forzatamente). Talvolta le colonne anioniche possono essere miste (una parte debole ed una forte separate da resina inerte) mentre può essere presente una colonna cationica di finitura.

Le caratteristiche delle resine devono essere di tipo alimentare e seppur variabili in termini di capacità di scambio diverse (gli impianti degli anni '80 avevano capacità di scambio tra 4-8 meq/kg). Le resine vengono rigenerate dopo ogni ciclo e devono essere sostituite quando diminuisce sensibilmente la capacità di scambio ionico, ossia quando aumenta la conducibilità del mosto in uscita dopo l'ultima rigenerazione. Il decadimento avviene dopo circa mille cicli. Per aumentare la durata e l'efficienza di scambio delle resine è possibile aggiungere delle resine inerti che consentono una migliore distribuzione nello spazio dei siti attivi; inoltre, l'immissione del mosto dal basso e la conseguente leggera turbolenza delle sferette di resina, ne aumenta l'attività. Le caratteristiche delle resine sono disciplinate a livello comunitario dall'art.2 del Reg. 2310/1980 (o dall'art 12 reg.1622/2000 nonché dal Reg CE 606/2009) che stabilisce, oltre al tipo di resina, anche la modalità di analisi per verificarne la cessione di sostanze organiche al mosto (allegato IX) che non devono essere maggiori di 1mg/l. L'impianto di rettificazione prevede una serie di punti di ispezione visiva (su resine, valvole, tubazioni etc.) e soprattutto è controllato da una serie di sensori elettronici collegati ad un pannello centrale che consentono di rilevare in tempo reale i valori di pH, conducibilità, temperatura, portata e velocità degli effluenti per mettere puntualmente in evidenza perdite di carico che possono essere indice di malfunzionamento dell'apparecchiatura.

Reg 606/2009

Omissis...

Appendice 4

Resine scambiatrici di ioni

1. Le resine scambiatrici di ioni di cui è permesso l'impiego conformemente all'allegato I A, punto 20, sono copolimeri dello stirene o del divinilbenzene, contenenti gruppi acido solfonico o ammonio. Tali resine devono essere conformi alle norme del regolamento (CE) n. 1935/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio nonché alle disposizioni comunitarie e nazionali adottate in applicazione di quest'ultimo. All'atto del controllo con il metodo di analisi descritto al punto 2 della presente appendice, esse inoltre non devono cedere, in ciascuno dei solventi menzionati, più di 1 mg/l di sostanze organiche. La loro rigenerazione deve essere effettuata utilizzando sostanze autorizzate per l'elaborazione degli alimenti.

Il loro impiego è consentito soltanto sotto il controllo di un enologo o di un tecnico e in impianti riconosciuti dalle autorità dello Stato membro nel cui territorio tali resine sono utilizzate. Dette autorità stabiliscono le funzioni e la responsabilità che incombono agli enologi e ai tecnici riconosciuti.

2. Metodo di analisi per determinare la cessione di sostanze organiche da parte delle resine scambiatrici di ioni.

omissis

Fig. 1.1 estratto dal Reg. CE 606/2009 nella parte riguardante le caratteristiche delle resine

Questi sistemi, infatti funzionano in discontinuo e per questo motivo in genere gli impianti sono composti di due linee che lavorano in maniera complementare alternando il processo di rigenerazione e di rettificazione del mosto. La durata di un ciclo è di 4-6 ore ed altrettanto è il tempo necessario per la rigenerazione. Quest'ultimo processo inizia quando la resina ha raggiunto una resa del 60% circa, facendo entrare dell'acqua depurata che andrà a sostituire il mosto; gli eluati della prima fase di lavaggio vengono conservati a parte e concentrati successivamente, mentre le soluzioni acquose più diluite vengono scartate; segue un lavaggio delle resine con acqua in controcorrente per eliminare ogni traccia di zucchero prima di procedere alla rigenerazione vera e propria con acidi e basi. Per questo motivo i contenitori devono essere di materiale resistente alla corrosione. Dopo un accurato lavaggio, al raggiungimento del pH prestabilito, l'entrata del nuovo mosto sposta l'acqua di lavaggio delle resine ed il mosto diluito viene recuperato per la concentrazione. Tutti questi passaggi avvengono in automatico con un controllo elettronico dei parametri prefissati

come la velocità e la portata dei liquidi, il dosaggio e concentrazione delle soluzioni rigeneranti, verificando pH e conducibilità per accertare l'efficienza del processo.

Dagli eluati delle colonne anioniche si possono recuperare interessanti quantità di tartrati che rappresentano un sottoprodotto economicamente valido che viene riutilizzato in parte nel settore enologico, come correttore di acidità, ma anche nell'industria per la produzione di agenti lievitanti chimici. Negli impianti più efficienti si recuperano anche acido tartarico ed acido malico. Questo recupero permette di ridurre sensibilmente il carico di inquinanti degli effluenti il cui trattamento comporta procedure piuttosto complesse e costose.

La soluzione zuccherina ottenuta dal processo di rettificazione ha un contenuto di glucosio e fruttosio di circa 200 g/l totali; per produrre l'MCR deve subire il processo di concentrazione. Il metodo più diffuso è tramite riscaldamento sottovuoto, sebbene esistano sistemi basati sull'osmosi inversa e crio-concentrazione che però risultano più costosi. (D'Agostino e Gattuso, 1990).

L'accurata gestione del processo di concentrazione è importante per sia la qualità dei mosti che per la forte incidenza del suo costo energetico sull'economicità del prodotto.

Gli impianti di concentrazione si distinguono per tipo di evaporatori (a fascio tubiero orizzontale, verticale e a piastre) e per numero di stadi. I concentratori di mosti i più diffusi sono quelli verticali e possono essere a film cadente, a grimpaggio o misti. Nel primo caso il mosto scorre all'interno dei tubi riscaldati cadendo per gravità, mentre il fluido riscaldante passa al loro esterno. Il tempo di permanenza a contatto con la superficie calda è molto ridotta (minore di 1 minuto). Nel secondo caso la circolazione è forzata ed il mosto entra dal basso, viene fatto circolare all'interno con elevata velocità che favorisce la formazione di turbolenza già a metà del tubo e formando bolle che diventano via via più grandi fino a riempire gran parte del condotto e spingendo il film verso l'alto. Il vapore liberato, per favorire il processo, viene raccolto tramite un termocompressore e serve ad alimentare il fluido riscaldante dei tubi. I due sistemi a caduta libera e a circolazione forzata si distinguono per la diversa differenza di temperatura tra il mosto ed il fluido riscaldante, rispettivamente $\Delta T=5^\circ$ e $\Delta T=10^\circ\text{C}$. Il primo è caratteristico degli impianti più moderni. Negli impianti sono presenti più moduli concentratori (detti effetti) che agiscono con gradienti via via decrescenti in termini di temperatura e pressione; infatti, con l'aumentare della concentrazione degli zuccheri il rischio di danno termico è maggiore; gli impianti prevedono minimo tre effetti (ma arrivano anche a 9) con temperature che si aggirano intorno agli 80-90°C per il primo, 30-45°C per l'ultimo con pressioni rispettivamente dai 750 ai 220 mbar. In ciascuno stadio il mosto concentrato ed il vapore si separano in un'apposita camera collegata all'evaporatore e munita di ciclone per separare i componenti da avviare al

successivo effetto. I vapori dell'ultimo effetto vengono mandati ad un condensatore e riutilizzati nel processo di depurazione; in particolare se il condensatore è del tipo a superficie, l'acqua in uscita, che non si mescola a quella di raffreddamento, può costituire un'integrazione all'acqua demineralizzata con un certo risparmio di acqua e costi di depurazione.

L'impianto prevede una torre di evaporazione e l'acqua condensata verrà recuperata per i lavaggi delle resine alla quale verrà aggiunta acqua proveniente da un demineralizzatore. (Pirrone et al., 2000). In fig. 1.2a è illustrato un impianto di rettifica del mosto ed in fig 1.2b un impianto di concentrazione.



Fig. 1.2a schema di un impianto di rettifica del mosto per la produzione di MCR



**fig. 1.2a schema di un impianto di concentrazione del mosto.
Concentratore a 4 effetti.**

1.4 ASPETTI LEGISLATIVI RELATIVI AI MOSTI CONCENTRATI

La normativa relativa ai mosti concentrati si ritrova in più punti dell'ampia legislazione enologica che a sua volta coinvolge diverse aree che vanno dalle pratiche vitivinicole, alle analisi di controllo di qualità, agli aspetti igienici della produzione etc.

Ai fini della migliore comprensione della disciplina normativa sull'argomento, in questa tesi si è preferito suddividere la normativa che regola l'utilizzo dei mosti concentrati (legata alla pratica enologica dell'arricchimento) rispetto a quella che prescrive i requisiti minimi di qualità degli MCR, aggiungendo delle riflessioni sulla qualità non descrivibile a livello legislativo. Una sezione a parte sarà dedicata alla normativa sulle analisi enologiche, con particolare riferimento ai mosti concentrati e rettificati.

1.4.1 ASPETTI LEGISLATIVI SULL'USO DEI MOSTI CONCENTRATI

La normativa sui mosti concentrati è stata dettata nel tempo, più da ragioni economiche che dall'esigenza di regolamentare l'utilizzo di questo prodotto specifico. Per comprendere l'origine dell'attuale giurisprudenza sull'argomento è utile ripercorrere i passaggi principali della legislazione sull'arricchimento dei vini e sullo zuccheraggio. Con arricchimento si intende *“l'aumento del titolo alcolometrico naturale delle uve fresche, del mosto di uve, del mosto di uve parzialmente fermentato, del vino ancora in fermentazione, del vino nuovo ancora in fermentazione.”* Esso può avvenire con l'aggiunta di saccarosio

(zuccheraggio) o di mosto concentrato o mosto concentrato e rettificato. (Reg.(CEE) 816/70)

In Italia l'impiego del saccarosio era stato ammesso con Rd del 5/8/1905 n. 497 in applicazione della legge italiana del 11/7/1904 (legge contro le frodi nella preparazione ed il commercio dei vini), ma la pratica venne abolita nel 1918 (decreto luogotenenziale n. 316 del 21/2/1918) allo scopo di favorire l'impiego dei vini meridionali ed assicurare ad essi un mercato interno. Il divieto di impiego del saccarosio fu ribadito dalla legge Medici del 31 luglio 1954 n 561 (concepita in realtà per vietare la preparazione di vini industriali) e le pene inasprite con leggi successive fino ad arrivare, con il dpr 1965/162 art.76, ad infliggere 5 anni di reclusione ed un'ammenda di 500 mila lire per ogni quintale di vino sofisticato *“per chiunque impiega in tutto o in parte alcool, zuccheri o materie zuccherine o fermentati diversi da quelli provenienti dall'uva fresca o leggermente appassita.”*

Se con la legge Medici, si era potuto considerare in maniera diversa l'impiego rispetto all'aggiunta di saccarosio, condannando per quest'ultima al pagamento di una multa anziché considerarlo reato penale, la legge 1965/162 è stata applicata alla lettera; il tentativo di alcuni tribunali di eccepire sull'art. 76 della suddetta norma (decreto delegato), considerando il contrasto tra l'art.2 della legge delegante 991 del 9/10/64) che prevedeva di tener conto della legislazione comunitaria (che permetteva l'uso del saccarosio), è stato respinto dalla Corte Costituzionale. Secondo quest'ultima, infatti, l'art.2 prevedeva che il legislatore delegato “prendesse ispirazione” dalla normativa europea nelle parti che sembravano “attagliarsi” alla produzione vinicola nazionale. La Corte Costituzionale nel 1971 annullò anche la legge regionale approvata nel 1970 dal Consiglio del Trentino Alto Adige che, in considerazione della legge comunitaria, autorizzava l'aggiunta di saccarosio per i vini DOC e DOCG, pur imponendo una tassa per kg di zucchero usato a carico del vinificatore. A motivazione dell'abrogazione la Corte chiarì che la legge comunitaria (Reg. (CEE) 816/70) consentiva lo zuccheraggio unicamente nelle regioni viticole in cui tradizionalmente o eccezionalmente era praticato, conformemente alla legislazione esistente alla data di entrata in vigore della stessa (5 maggio 1970). Poiché in tale data sia la legge nazionale che quella regionale non ammettevano l'impiego del saccarosio, ne conseguiva che in Italia doveva considerarsi vietato.

Il complesso normativo del decreto 162/65 è stato in gran parte superato dalla prevalente disciplina comunitaria. Resta ancora valido tutto l'impianto normativo che riguarda la repressione delle frodi e la prevenzione di esse, in quanto materia rimasta alla potestà regolamentare degli Stati membri. (Caviglia, 2001).

L'OCM vino, avviata negli anni successivi alla sottoscrizione del Trattato di Roma del 1957, si occupò, via via, dei vari aspetti della produzione enologica. Per tener conto delle diverse realtà produttive della Comunità, nel 1970, mediante il Reg. (CEE) 816/70, suddivise il territorio comunitario in zone viticole nelle quali i vini, per essere considerati tali, devono raggiungere un determinato grado alcolico naturale.

Le zone viticole in Italia sono le seguenti:

CI: Valle d'Aosta e nelle province di Sondrio, Bolzano, Trento e Belluno;

CII: Abruzzo, Campania, Emilia-Romagna, Friuli-Venezia Giulia, Lazio, Liguria, Lombardia (esclusa la provincia di Sondrio), Marche, Molise, Piemonte, Toscana, Umbria e Veneto (esclusa la provincia di Belluno), comprese le isole appartenenti a tali regioni, come l'isola d'Elba e le altre isole dell'arcipelago toscano, le isole dell'arcipelago ponziano, Capri e Ischia;

C III b: Calabria, Basilicata, Puglia, Sardegna e Sicilia, comprese le isole appartenenti a dette regioni, come l'isola di Pantelleria, le isole Eolie, Egadi e Pelagie;

In conseguenza di ciò veniva regolato anche l'arricchimento che poteva aumentare la gradazione alcolica del vino entro determinati limiti in relazione appunto alle zone viticole.

La tabella sottostante (Fig. 1.3 a) riassume le disposizioni di detto regolamento.

ZONA	GRADAZIONE MINIMA DI PARTENZA	AUMENTO MASSIMO DI GRADAZIONE IN ANNATE SFAVOREVOLI	AUMENTO MASSIMO DI GRADAZIONE IN ANNATE PARTICOLARMENTE SFAVOREVOLI
A	5%	+3,5%	+4,5%
B	6%	+2,5%	+3,5%
CI	7%	+2%	-
CII	8%	+2%	-
CIII	8,5%	+2%	-

Fig. 1.3 Vincoli per l'arricchimento previsti dal Reg. CEE 816/70.

Con la regolamentazione successiva (Reg. (CEE) 337/79) fu aumentata la gradazione minima di base nelle zone C:

ZONA	GRADAZIONE MINIMA DI PARTENZA
C1a	7,5%
C1b	8%
CII	8,5%
CIII	9%

Fig. 1.3 b Revisione vincoli per l'arricchimento previsti dal Reg. Cee 337/79

Nel 1982 (Reg. CEE 2530/82) in applicazione dell'OCM vino Reg. CEE 337/79 (modificato con Reg. 2144/82), il Consiglio dell'Unione Europea decise di porre i produttori vinicoli su un piano di parità concedendo un aiuto a favore dei MC e dei MCR qualora fosse necessario procedere all'arricchimento di una parte della produzione; tale contributo teneva conto della differenza di costo tra la gradazione alcolica da saccarosio e quella derivante solo dall'uva. Incentivando la produzione dei mosti concentrati, inoltre, si presupponeva di limitare i costi della comunità per lo stoccaggio delle eccedenze di vino o per i contributi alla distillazione. In realtà il contributo compensativo ha da una parte rafforzato la legittimazione dell'uso del saccarosio nei paesi del nord Europa e dall'altra incrementato l'utilizzo dei mosti concentrati anche in annate in cui esso non risultava giustificato, accrescendo la spesa della Comunità. Inoltre, considerato il forte rischio di entrata fraudolenta di saccarosio o di zucchero invertito proveniente da materie prime più economiche (es. mais) nel circuito produttivo dei mosti concentrati, si è aggiunto l'onere di attivare idonei controlli per evitare paradossalmente il finanziamento del saccarosio.

Il sostegno all'utilizzo del MC e MCR, incoraggiato anche dall'autorizzazione all'arricchimento concessa dalle Regioni praticamente ogni anno e non solo nelle annate sfavorevoli, ha di fatto creato un bacino d'utenza abbastanza stabile negli anni che doveva essere soddisfatto. Era prevedibile anche, per la presenza di contributi comunitari, l'instaurarsi di fenomeni fraudolenti. Di qui la necessità di maggiori controlli e della messa a punto di test di laboratorio che consentissero di individuare se il MC o il MCR utilizzati, e per i quali veniva dato il sostegno, derivassero dall'uva o da altre materie prime. Questo argomento sarà oggetto del paragrafo 1.4.2 e 1.8.

Con il Reg. CE 882/1987 viene confermata la possibilità arricchimento sui vini da tavola in annate sfavorevoli, mantenendo i limiti previsti dal Reg. CEE 337/79. Gli stessi limiti si manterranno fino al Reg. CE 1476/1999, salvo introdurre un vincolo sulla gradazione

massima dopo l'aggiunta del mosto concentrato pari a 11,5% (+0,5% per vini rossi) in zona A e 12%(+0,5% per vini rossi) in zona B.

La novità del Reg. (CEE) 822/87 sta nel fatto che per la prima volta si inizia a prendere in considerazione una valutazione dell'aspetto tecnico e non solo economico; in particolare l'art. 20 dice: *“la commissione intraprende uno studio approfondito delle possibili utilizzazioni del mosto di uve concentrato, rettificato o non rettificato, e dello zucchero per l'arricchimento. Questo studio riguarda in particolare gli aspetti enologici dei vari metodi autorizzati, gli aspetti economici dell'utilizzazione del saccarosio o del mosto concentrato, rettificato o non rettificato nonché i metodi di controllo di tali utilizzazioni”*. (Reg. CE 882/1987). Nello stesso regolamento, inoltre, viene ridefinito il mosto concentrato ed il mosto concentrato e rettificato, fissando per la prima volta dei parametri qualitativi. (Fig. 1.4)

b) **Definizione applicabile a decorrere dal 1° settembre 1987**

Mosto di uve concentrato rettificato: il prodotto liquido non caramellizzato:

- ottenuto mediante disidratazione parziale del mosto di uve effettuata con qualsiasi metodo autorizzato escluso il fuoco diretto, in modo che il valore indicato, alla temperatura di 20 °C, dal rifrattometro, impiegato secondo il metodo previsto all'allegato del regolamento (CEE) n. 543/86, non sia inferiore a 70,5 %; tuttavia gli Stati membri possono consentire per i prodotti utilizzati sul loro territorio un valore diverso ma non inferiore a 51,9 %;
- che ha subito trattamenti autorizzati di disacidificazione e di eliminazione dei componenti diversi dallo zucchero;
- che presenta le seguenti caratteristiche:
 - pH non superiore a 5,
 - densità ottica a 425 nm allo spessore di 1 cm non superiore a 0,100,
 - tenore di saccarosio non rivelabile con metodo analitico da stabilirsi,
 - tenore di etanolo non superiore a 0,5 g/kg di zuccheri totali,
 - tenore di azoto totale non superiore a 100 mg/kg di zuccheri totali,
 - un indice Folin-Ciocalteu non superiore a 4,00,
 - acidità totale non superiore a 10 milliequivalenti/kg di zuccheri totali,
 - tenore di anidride solforosa non superiore a 25 mg/kg di zuccheri totali,
 - tenore di solfati non superiore a 2 milliequivalenti/kg di zuccheri totali,
 - tenore di cloruri non superiore a 1 milliequivalente/kg di zuccheri totali,
 - tenore di fosfati non superiore a 1 milliequivalente/kg di zuccheri totali,
 - tenore di cationi totali non superiore a 8 milliequivalenti/kg di zuccheri totali,
 - conduttività non superiore a 50 μ S/cm a 20 °C e a 25° Brix,
 - tenore di idrossimetilfurfurolo non superiore a 25 mg/kg di zuccheri totali;
- proveniente esclusivamente dalle varietà di viti di cui all'articolo 69;
- prodotto nella Comunità;
- ottenuto da mosto di uve avente almeno il titolo alcolometrico volumico naturale minimo fissato per la zona viticola in cui le uve sono state raccolte.

Per il mosto di uve concentrato rettificato è ammesso un titolo alcolometrico effettivo pari o inferiore a 1 % vol.

Fig. 1.4 Estratto dal Reg. Cee 882/1987

Non sono mancati i tentativi della Commissione di vietare l'uso enologico del saccarosio a favore dei mosti concentrati e rettificati promuovendo dapprima la tassazione del saccarosio e poi vientandone l'uso enologico. Questo avrebbe potuto avere il vantaggio di eliminare la spesa per gli aiuti ai mosti concentrati e sottrarre dal mercato ulteriori eccedenze di mosti (potenzialmente vini). Tuttavia, la proposta suscitò una forte opposizione da parte di alcuni Stati membri, che sostenevano che essa avrebbe influito negativamente sulla competitività dei produttori interessati e avrebbe obbligato ad un cambiamento delle pratiche tradizionali in regioni ove non si registravano eccedenze strutturali. E' facilmente comprensibile il disaccordo dei paesi del nord Europa non solo perché l'uso del saccarosio è una pratica più semplice rispetto al mosto concentrato, ma anche perché gli stessi Paesi avevano ed hanno tutto l'interesse a non deprimere il comparto saccarifero, settore importante in queste nazioni. Infatti, è stato calcolato da fonte comunitaria che almeno 200.000 tonnellate di saccarosio sono utilizzate ufficialmente per l'arricchimento dei vini, mentre altrettanta è stata stimata la quantità usata fraudolentemente. (Caviglia, 2001).

Non sono mancati nemmeno i tentativi da parte del Parlamento italiano di legittimare l'uso del saccarosio anche in Italia, come dimostra la proposta di legge del 1996 sotto riportata:

“L'importanza di legittimare, mediante una idonea e precisa regolamentazione, l'uso dello zucchero alimentare o di altro similare ai fini migliorativi nei casi di vini a denominazione di origine controllata e denominazione di origine controllata e garantita, risulta ormai inderogabile per rispondere ad esigenze di carattere tecnico e di carattere economico, affrontate e discusse in convegni, dibattiti e studi che da troppi anni ne hanno posto in evidenza e messo in risalto l'opportunità e l'urgenza, essendo pratica necessaria in tutte le zone settentrionali europee e, quindi, anche in quelle italiane, caratterizzate da un clima temperato-freddo. Queste regioni producono uve e vini con particolari caratteristiche organolettiche, come il fruttato, che consente di mantenere nel tempo la fragranza dell'origine, ma sono molto suscettibili a scompensi nel rapporto acidità-zucchero nelle annate ad andamento climatico sfavorevole, con conseguenze negative sulla qualità del prodotto finale. L'evidenza di queste peculiarità, del loro valore e dell'influenza che su questa hanno particolari annate meteorologiche, ha fatto sì che il legislatore italiano, su sollecitazione dei maggiori tecnici e produttori di vini di qualità, consentisse "fra le pratiche di razionale enotecnica l'aggiunta di saccarosio sui mosti" e questo attraverso l'applicazione del regolamento approvato con regio decreto 5 agosto 1905, n. 497, che dava pratica attuazione alla legge 11 luglio 1904, n. 388, promossa contro le frodi nella preparazione e nel commercio dei vini. Però, mentre in Francia l'impiego dello zucchero di canna e

barbabietola nel miglioramento dei vini ha continuato ad essere praticato e consentito, nel rispetto di idonei regolamenti, in Italia le preoccupazioni e le insistenze di produttori vinicoli del Mezzogiorno e delle isole condizionavano il Parlamento ed il Governo e li inducevano a decretare la proibizione dello zuccheraggio dei mosti e dei vini. Il risultato legislativo é stato, infatti, il regolamento approvato con regio decreto 21 febbraio 1918, n. 316, che riguardava la nuova legge sui vini 12 aprile 1917, n. 729, in cui non veniva più permesso l'uso dello zucchero. Questo divieto, da allora più volte confermato nelle successive norme legislative riguardanti il settore, aveva lo scopo di assicurare il collocamento sul mercato interno dei mosti e dei vini da taglio. Una politica di questo tipo penalizzava e penalizza i nostri vini di qualità ed al tempo stesso non consentiva e non consente lo sviluppo di una corretta concorrenza dei nostri prodotti con quelli della Francia e degli altri Paesi della Comunità europea. Basterà considerare che i vini francesi AOC (Appellation d'origine controlée) si sono largamente affermati presso i buongustai di tutto il mondo e sono tuttora i netti dominatori nelle "carte dei vini" dei ristoranti stranieri, fatto, questo, dovuto alle maggiori possibilità tecniche offerte ai produttori d'Oltralpe, per raggiungere - grazie allo zucchero - livelli qualitativi apprezzabili secondo standard produttivi ripetitivi, nell'ambito delle annuali forniture. Purtroppo, in sede di trattative per la costituzione del Mercato comune del vino é stato commesso, dal nostro Paese, il grave errore di accettare il principio rigido di una constatazione dello stato di fatto legislativo, al momento dell'avvio di tale mercato, stato di fatto da cui sono derivate le principali regole comunitarie con rispetto dell'impostazione delle legislazioni nazionali in atto. Il risultato finale di questo tipo di atteggiamento é l'attuale prevaricazione per i nostri vini di qualità costretti a dover rincorrere sul piano commerciale i vini della Francia, senza avere le stesse possibilità migliorative. Tra l'altro, la Francia ha preteso con insistenza la limitazione dei nostri impianti vitati in un quadro di limitazione europea ed in questo é stata accontentata visto che con regolamento CEE n. 2392/86 del Consiglio del 24 luglio 1986 vengono istituiti gli schedari viticoli nazionali ai quali devono adempiere tutti i Paesi aderenti alla Comunità europea. Se é stato possibile proporre e far approvare questo regolamento CEE, come logico e corretto, non si vede perché non sia altrettanto proponibile - rispetto all'attuale stato di fatto - una innovazione della legislazione enologica italiana. Al riguardo é necessario tener conto che la Francia ha ben diversi comportamenti in fatto di zuccheraggio. Sul Journal Official é stato pubblicato il decreto per la regolamentazione dei Vins de Pays , che sono "vini da tavola", cioè comuni. Il provvedimento ammette l'uso dello zuccheraggio sia pure sotto controllo e ciò é una netta innovazione, in quanto finora l'uso dello zucchero alimentare per aumentare il titolo alcolometrico era limitato alla maggior parte dei vini AOC, esclusi quelli del Midi . Con molta

disinvoltura, quindi, i francesi hanno legiferato in campo nazionale, senza sottoporre la questione a Bruxelles, così circa 7 milioni di ettolitri di vini di varia qualità, delle zone meridionali francesi, potranno valersi, ex novo, dell'uso dello zucchero contrastando le importazioni dei vini dall'Italia meridionale, i quali, per il loro grado alcolico, avevano assolto, finora, a funzioni di complementarietà. Questa situazione e le conseguenti prospettive, devono far meditare attentamente coloro che ancora si oppongono ad una rivendicazione di parità di diritti e di doveri, fra gli Stati membri nell'ambito della CEE. Infatti, il principale problema che affligge la viticoltura italiana di pregio é la regolamentazione e concessione dell'uso dello zucchero alimentare, nell'arricchimento dei vini di qualità prodotti in regioni determinate (VQPRD), quale loro pratica migliorativa per correzione del grado zuccherino dei mosti (e, quindi, del grado alcolico dei vini), così come avviene nelle zone viticole francesi (Bourgogne, Bordeaux, eccetera) e nelle regioni tedesche, svizzere, americane, eccetera. Tale correzione, effettuata con zucchero alimentare, peraltro corrispondente a pochi grammi per litro, permette di ottenere vini equilibrati di ottima qualità e longeva fragranza ed é pratica quasi secolare a partire da Chaptal. Per contrastare tale proposta é stato sovente affermato che concedere una regolamentazione dello zucchero poteva provocare un incontrollabile aumento delle sofisticazioni con l'ipocrisia e la presunzione di mettere sullo stesso piano chi correggeva per migliorare e chi sofisticava per lucrare. Bisogna però rilevare che gli organi di controllo sono dotati di una apparecchiatura - RMN - e di una metodologia ufficiale di analisi, in grado di effettuare analisi immediate e complete di ogni tipo di vino ed individuare, così, qualitativamente e quantitativamente, l'origine degli zuccheri, potendo distinguere tra chi onestamente corregge e chi, in maniera fraudolenta, sofisticava. I viticoltori di pregio richiedono, pertanto, la regolamentazione dell'uso dello zucchero alimentare come arricchimento, in alternativa al mosto concentrato rettificato già regolamentato nel 1978, per andare incontro alle riconosciute esigenze di arricchimento nelle zone di grande tradizione. Sottolineiamo tra l'altro che il saccarosio viene largamente e legittimamente utilizzato per le pratiche di spumantizzazione dei vini spumanti. Per le suddette pratiche nessuno ha mai sollevato problemi di ordine tecnico ed igienico, né si sono mai posti problemi per l'uso dei prodotti alternativi. Perciò, riteniamo che, sia dal punto di vista qualitativo che di controllo, sia chiaramente individuabile e preferibile nella scelta lo zucchero alimentare, la cui utilizzazione costituisce una pratica tradizionalmente eseguita e lungamente sperimentata in tutta la migliore enologia mondiale. Il persistente divieto dell'impiego dello zucchero nella correzione dei VQPRD (DOC e DOCG), oltre a mantenere un'assurda disparità di trattamento tra i membri della Comunità, renderà estremamente difficile sostenere

l'immagine dei nostri vini di qualità con gravi conseguenze per i produttori medesimi ed inique ripercussioni negative dal punto di vista economico sulle aziende vitivinicole italiane. Il problema non é di poco conto, basti pensare che in Italia i VQPRD sono oltre 500. A conclusione di queste brevi e sintetiche considerazioni, appare improrogabile ed indispensabile procedere alla regolamentazione dell'uso dello zucchero per la correzione dei vini di pregio e, pertanto, vi proponiamo l'approvazione del presente disegno di legge." (dal Comunicato alla Presidenza del 4 ottobre 1996, Legislatura 13^a - Disegno di legge N. 1433).

Nonostante siano trascorsi sedici anni, i contenuti di questa proposta (mai approvata) mantengono la loro piena attualità. Infatti, se l'OCM vino (Reg. 1493/99) ha confermato la situazione precedente per quanto riguarda zuccheraggio ed aiuti agli utilizzatori di mosti concentrati, l'attuale OCM 2008-13 (Reg 479/2008), considerata l'inefficacia della compensazione sull'uso dei mosti concentrati nel ridurre le eccedenze produttive di vino, ha deciso di interromperne il finanziamento. Per favorire un adeguamento graduale, l'arricchimento con mosti concentrati è stata finanziato fino al 31.07.2012, con compensi decrescenti negli ultimi tre anni. Non è stata più considerata la discriminazione nei confronti dei vitivinicoltori del Sud Europa meno competitivi perché obbligati ad utilizzare materie prime più costose. Bisogna però puntualizzare che la normativa europea, fin dall'inizio aveva autorizzato e regolamentato l'arricchimento "*in annate sfavorevoli*" o "*particolarmente sfavorevoli*", lasciando ai singoli Stati (o le Regioni in Italia, secondo il d.m. n. 224 del 24 settembre 2008) la decisione riguardo l'opportunità di intervenire per riequilibrare il grado alcolico non ottenuto naturalmente.

ZONA	GRADAZIONE MINIMA DI PARTENZA	AUMENTO MASSIMO DI GRADAZIONE IN ANNATE SFAVOREVOLI	AUMENTO MASSIMO DI GRADAZIONE IN ANNATE PARTICOLARMENTE SFAVOREVOLI *	GRADAZIONE MASSIMA DOPO AGGIUNTA DI MCR	AUMENTO DI VOLUME MAX DOVUTO AD AGGIUNTA DI MC*
A	5%	3%	+0,5%	11,5% (+0,5% PER VINI ROSSI)	11%
B	6%	2%	+0,5%	12% (+0,5% PER VINI ROSSI)	8%
C1a	7,5%	1,5%	+0,5%	12,5%	6,5%
CIb	8%	1,5%	+0,5%	12,5%	6,5%
CII	8,5%	1,5%	+0,5%	13%	6,5%
CIII	9%	1,5%	+0,5%	13,5%	6,5%

Fig. 1.5 Vincoli per l'arricchimento previsti dal Reg. CE 479/2008
 * Su richiesta degli Stati Membri. Essi possono decidere anche sull'aumento del volume massimo per i vini a denominazione di origine.

Di fatto l'arricchimento, da intervento eccezionale si è trasformato in pratica usuale, sia nei Paesi in cui è ammesso lo zuccheraggio che negli altri. A titolo di esempio si ricorda che sono state considerate "annate con condizioni climatiche sfavorevoli", in tutte le Regioni d'Italia, anche il 2007 ed il 2012, che forse hanno avuto il carattere di eccezionalità più in termini di siccità, che di titolo alcolometrico insufficiente. Si comprende come, con la connivenza dei governi, i vini si siano standardizzati su un livello di grado alcolico più elevato di quello naturale in annate climaticamente normali. Questo comportamento non ha riguardato solo i Paesi produttori ed utilizzatori di mosti concentrati che potevano avere un interesse economico usufruendo degli aiuti per questi ultimi, ma anche quelli dove si utilizza il saccarosio. A seguito della soppressione del sostegno all'arricchimento, proprio a settembre 2012, la Francia ha consentito anche alle regioni vinicole meridionali di arricchire i vini con il saccarosio in alternativa al mosto d'uva concentrato e rettificato. I "puristi" dell'arricchimento con mosti derivati dall'uva restano dunque Italia, Spagna, Portogallo e Grecia. Considerato l'impatto economico della produzione francese, questa decisione crea ulteriori squilibri concorrenziali ai produttori di quei Paesi come l'Italia che - in base a precise scelte di qualità e di tradizione enologica, fortemente supportate dall'Amministrazione agricola - permettono ai propri operatori di arricchire solo con mosti concentrati e rettificati, derivanti al 100% dall'uva. Da parte di alcuni si auspica l'emanazione di una normativa che imponga di riportare in etichetta l'avvenuta aggiunta di questo zucchero, come avviene già per i succhi di frutta. Probabilmente il consumatore medio, poco informato sulla questione, non sarà disposto pagare un surplus per avere un prodotto "più naturale" (ammesso che il passaggio su resine possa essere valutato come naturale), considerando anche che dal punto di sensoriale le differenze qualitative tra vini che arricchiti con saccarosio rispetto a quelli addizionati di MCR non sono risultate percepibili nemmeno dal gruppo di degustatori esperti consultati dalla comunità. Nonostante le decisioni governative permissive nei confronti del saccarosio, i produttori francesi difensori dell'arricchimento con mosti concentrati d'uva hanno favorito l'introduzione di una tassa di 13 centesimi di euro per kg di saccarosio utilizzato nei vini. E' un contributo poco più che simbolico e che non copre la differenza di prezzo tra saccarosio e mosti concentrati rettificati, visto che questi ultimi hanno un prezzo 3 volte superiore allo zucchero a parità di titolo alcolometrico ottenuto.

Alla luce di tutte queste considerazioni appare chiara l'opportunità di un intervento legislativo equilibratore per evitare che l'evidente svantaggio a carico dei quattro Paesi del sud Europa sfoci in un incremento delle frodi per l'introduzione di mosti concentrati provenienti da fonti alternative di minor pregio rispetto all'uva.

1.4.2 ASPETTI LEGISLATIVI DELLA QUALITA' DEI MOSTI CONCENTRATI RETTIFICATI

I mosti concentrati rettificati sono attualmente riconosciuti e regolamentati a livello comunitario con il Reg. 479/2008 che ne fornisce dei requisiti minimi qualitativi (Fig. 1.6). Non è la prima volta che la comunità si pronuncia in questo senso (es. Reg. CE 822/1987, Reg. CE 1493/1999), ma in questa sede sarà analizzato il contenuto dell'ultima OCM vino, limitandosi ad evidenziare le differenze più significative con i regolamenti precedenti.

Dal reg 479 2008 (OCM vino 2008-2013)

Allegato IV
CATEGORIE DI PRODOTTI VITIVINICOLI

...omissis...

14. Mosto di uve concentrato rettificato

Il mosto di uve concentrato rettificato è il prodotto liquido non caramellizzato ⁽¹⁾:

a) ottenuto mediante disidratazione parziale del mosto di uve effettuata con qualsiasi metodo autorizzato, escluso il fuoco diretto, in modo che il valore indicato alla temperatura di 20 °C dal rifrattometro, utilizzato secondo un metodo da stabilirsi in conformità dell'articolo 25, non sia inferiore a 61,7 %; ⁽²⁾

b) che ha subito trattamenti autorizzati di disacidificazione e di eliminazione dei componenti diversi dallo zucchero;

c) che presenta le seguenti caratteristiche:

- pH non superiore a 5 per un valore di 25° Brix ⁽³⁾
- densità ottica a 425 nm sotto spessore di 1 cm non superiore a 0,100 su mosto di uve concentrato a 25 °Brix,
- tenore di saccarosio non rilevabile con metodo analitico da stabilirsi, ⁽⁴⁾
- indice Folin-Ciocalteu non superiore a 6,00 per un valore di 25o Brix, ⁽⁵⁾
- acidità titolata non superiore a 15 milliequivalenti/kg di zuccheri totali, ⁽⁶⁾
- tenore di anidride solforosa non superiore a 25 mg/kg di zuccheri totali, ⁽⁷⁾
- tenore di cationi totali non superiore a 8 milliequivalenti/kg di zuccheri totali ⁽⁶⁾
- conduttività non superiore a 120 micro-Siemens/cm a 20 °C e a 25 °Brix, ⁽⁶⁾
- tenore di idrossimetilfurfurolo non superiore a 25 mg/kg di zuccheri totali, ⁽⁸⁾
- presenza di mesoinositolo. ⁽⁹⁾

Per il mosto di uve concentrato rettificato è ammesso un titolo alcolometrico effettivo pari o inferiore a 1 % vol. ⁽¹⁰⁾

Fig. 1.6 estratto dal Reg. CE 479/2008 nella parte riguardante i requisiti dei mosti concentrati e rettificati

- (1) la caramellizzazione degli zuccheri, dovuta alle alte temperature, rende gli zuccheri inutilizzabili per la fermentazione e non è neutro dal punto di vista organolettico. Con la concentrazione tramite fuoco diretto la caramellizzazione è praticamente inevitabile.
- (2) La normativa del 1987 prevedeva una gradazione Brix minima superiore, pari a 70,5, con deroga da parte degli Stati membri di abbassare tale valore a 51,9 °Brix per il materiale che circolava all'interno dello stato stesso. In realtà, spingere le concentrazioni zuccherine a questo livello porta, nella maggior parte degli impianti, ad innalzare le condizioni di temperatura e pressione dei concentratori con danno qualitativo dei mosti. Probabilmente è stato questo il motivo della riduzione uniforme della concentrazione minima.
- (3) Si stabilisce un pH che, nonostante disacidificazione, non sia eccessivamente elevato per non andare ad interferire con il pH del mosto (intorno a 3) al quale viene aggiunto. La diluizione a 25 °Brix serve per standardizzare e facilitare la misura.
- (4) Visto che non è ammesso il saccarosio nel vino, tantomeno dev' essere presente nel MCR; ammettendone la presenza la comunità andrebbe a finanziare il saccarosio, invece che contribuire a ridurre lo svantaggio economico di coloro che sono costretti ad usare il mosto concentrato. La normativa non si pronuncia sul metodo da usare, anche se in precedenza (1987) aveva individuato la cromatografia su strato sottile, avendo stabilito un limite massimo di 20 g/kg di zucchero d'uva.
- (5) Questo indice è un valore che serve a stimare la quantità di polifenoli totali. E' importante che sia basso perché indica una buona purificazione del mosto di partenza dal punto di vista di questi componenti che non sarebbero neutri nei confronti del vino arricchito.
- (6) Lo scopo della rettificazione è togliere tutto quello che non è zucchero. Quindi anche una bassa concentrazione di acidi è indice di qualità; lo stesso vale per i cationi ed i sali misurati tramite la conduttività.
- (7) I mosti di partenza vengono mutizzati con elevate quantità di anidride solforosa che in gran parte reagisce con le resine. Essendoci dei limiti nel vino, devono essere imposti anche sul MCR che ad essi va aggiunto.
- (8) L'idrossimetilfurfurolo è un composto chimico prodotto dall'alterazione degli zuccheri causato dalle alte temperature. La sua presenza indica problemi nella fase di concentrazione del mosto rettificato.
- (9) La presenza di mio- inositolo è un indice di genuinità, in quanto esso è presente solo negli zuccheri dell'uva insieme ad altri polialcoli minori. E' da notare che non viene

fornito un limite minimo, ma è richiesta solo la presenza. Sarà oggetto di approfondimento nei paragrafi successivi.

(10) Il titolo alcolometrico è indice di fermentazione e quindi di contaminazione del mosto.

Non appaiono in quest'ultimo regolamento la necessità che queste le uve provengano da vitigni autorizzati e che il mosto sia ottenuto da mosto di uve aventi il titolo minimo per la zona in cui sono state raccolte.

Aldilà dei limiti normativi, si comprende come il mosto concentrato e rettificato sia di qualità migliore quanto maggiore è la purezza e l'integrità degli zuccheri in esso contenuti, ossia principalmente 50:50 di glucosio e di fruttosio. Questo prodotto così semplice è stato molto apprezzato fin dall'inizio dai produttori di vino, ma ha creato non poche difficoltà legate alle possibili frodi. Infatti, verso la fine degli anni '70, quando fu proposto il suo utilizzo enologico, era già da tempo presente sul mercato, oltre al saccarosio, anche lo zucchero invertito, miscela 50:50 di glucosio e fruttosio, ottenuto a partire soprattutto dal mais, il cui prezzo era drasticamente inferiore a quello dell'uva. Il minor valore economico dello zucchero invertito non derivava da una tecnologia meno sofisticata e quindi meno onerosa, ma dal costo della materia prima mais, decisamente meno cara dell'uva. Si consideri poi che l'MCR poteva essere ottenuto solamente da uve da vino (per limitare le eccedenze), la cui resa per ettaro è decisamente inferiore a quella delle uve da tavola. (Pompei, 2005).

Nel 1984, il gruppo di ricerca del prof. Versini, riuscì a mettere in evidenza nei mosti concentrati e rettificati la presenza di polialcoli (mannitolo, sorbitolo, eritrolo, arabitolo, mio- e scillo-inositolo) e zuccheri minori (ribosio, arabinosio, xilosio, mannosio, galattosio, ramnosio), tra cui il mio inositolo e lo scillo inositolo, che, seppure presenti in minima quantità (rispettivamente circa 2-3 mg e 0,1-0,2 mg) caratterizzavano esclusivamente i mosti d'uva. Il rapporto costante tra la concentrazione di glucosio:fruttosio: mio-inositolo permette di individuare eventuali aggiunte fraudolente di zucchero invertito. Il metodo sarà descritto in dettaglio nel paragrafo 1.8.

A seguito di tale scoperta si sono sviluppati successivamente dei metodi analitici basati sulle caratteristiche degli zuccheri dell'uva e sui loro rapporti.

Una metodica più sofisticata, sviluppata da Martin e Brun (1987), permette di comprendere se il vino o il mosto concentrato sia stato adulterato con zucchero di canna o di mais. Il principio si basa sul diverso rapporto isotopico del carbonio 12 e carbonio 13 nelle piante C4 (come canna da zucchero, mais) rispetto a quelle C3 (la maggior parte delle piante che vivono nei climi temperati, compresa vite e barbabietola). Poiché l'anidride carbonica

atmosferica è costituita dal 98,9% da $^{12}\text{CO}_2$ e 1,1% da $^{13}\text{CO}_2$, e le due tipologie di piante fissano l'anidride carbonica con due enzimi diversi che possiedono una diversa capacità discriminante nei confronti della $^{12}\text{CO}_2$ e $^{13}\text{CO}_2$, anche gli zuccheri che derivano dalle due vie fotosintetiche avranno un diverso rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. Sono state riscontrate anche delle differenze nell'ambito delle piante C3, ma il rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ varia in un intervallo piuttosto ridotto, per cui non è sempre facile una classificazione.

Seguendo lo stesso principio, Martin et al., (1982, 1986;1988) hanno visto che il rapporto isotopico del deuterio:idrogeno (D/H) nell'etanolo ottenuto dalla fermentazione dello zucchero di una determinata pianta dipende da caratteristiche fotosintetiche e fisiologiche del vegetale che lo ha prodotto ed è condizionato da fattori geoclimatici. Il rapporto tra $\text{CH}_2\text{DCH}_2\text{OH}/\text{CH}_2\text{CH}_3\text{OH}$ (D/H_I) offre le maggiori informazioni sull'origine botanica dello zucchero dal quale si sviluppa l'etanolo, mentre il rapporto $\text{CH}_3\text{CHDOH}/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (D/H_{II}) è influenzato dal mezzo in cui lo zucchero viene fatto fermentare. Monetti et al. (1995) hanno verificato che i rapporti isotopici D/H_I e D/H_{II} per i vini italiani variano entro determinati range e sono in relazione alla latitudine e alle condizioni microclimatiche; la stessa correlazione è stata confermata anche da altri ricercatori in Francia (Martin et al, 1988). Quindi, considerando il rapporto $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e D/H_I e D/H_{II} è possibile, tramite una banca dati (iniziata nel 1987 con 500 campioni/anno), è possibile comprendere se tali rapporti sono compatibili con un mosto d'uva e risalire anche alla zona di provenienza del mosto.

Bisogna però considerare che, con molta ingegnosità, sarebbe teoricamente possibile fare una miscela di zuccheri invertiti di diversa provenienza e con opportune proporzioni tale da ottenere un rapporto isotopico compatibile con lo zucchero d'uva. Per questo motivo questa metodica di per sé non può costituire da sola una prova di genuinità. Ben diverso è quando viene affiancata alla quantificazione (e non solo alla presenza, come prescrive la legge) del mio-inositolo, anche se questo poliacolo potrebbe essere aggiunto. Lo scillo-inositolo, invece, pur essendo presente in dosi più limitate (quindi più difficile da determinare con certezza) costituisce un marcatore di un costo tale da non rendere più conveniente la sofisticazione. Considerando la complessità ed i costi delle analisi, attualmente, si preferisce procedere alla determinazione gas-cromatografica del mio- e scillo inositolo e nei casi dubbi si indaga più approfonditamente sui rapporti isotopici tramite lo SNIF-NMR (*Specific Natural Isotopic Fractionation Nuclear Magnetic Resonance*).

La legislazione attuale, quindi, da quanto emerge dalle pubblicazioni scientifiche in merito, lascia ancora un margine di manovra ai sofisticatori, anche se è auspicabile che, una volta validato il metodo di quantificazione di mio-inositolo e scillo-inositolo si possa provvedere ad imporre un limite minimo e non semplicemente la presenza dell'analita. Per quanto

riguarda lo SNIF-NMR, è probabile che possa continuare a costituire solo una prova di supporto in quanto lo strumento e l'analisi è molto costosa ed al momento la sua validazione non è ancora stata proposta.

1.4.3 LA QUALITÀ OLTRE GLI ASPETTI LEGISLATIVI: IL VALORE AGGIUNTO DELL'INOSITOLO

Nel settore enologico, essendo la funzione del MCR legata esclusivamente alla possibilità di elevare il grado alcolico, la qualità è stata considerata in termini di purezza per evitare interferenze sensoriali nel vino oggetto dell'arricchimento. In realtà, proprio la presenza di polialcoli minori, in particolare il mio inositolo, potrebbero dare a questo prodotto un valore aggiunto spesso trascurato.

L'inositolo è un poliolo carbociclico, con formula bruta $C_6H_{12}O_6$, come il glucosio, ma non è uno zucchero in quanto i monosaccaridi, nella loro forma ciclica sono degli emiacetali o emichetali (il gruppo aldeidico del carbonio C1 reagisce con il gruppo alcolico del C5). La formula dell'inositolo, nelle diverse forme isomeriche è rappresentata in fig. 1.7.

L'isomero più importante e più abbondante in natura è il mio-inositolo (un tempo chiamato meso-inositolo). Ha un ruolo biologico molto importante come messaggero secondario nelle cellule eucariote ed entra come componente strutturale nei lipidi.

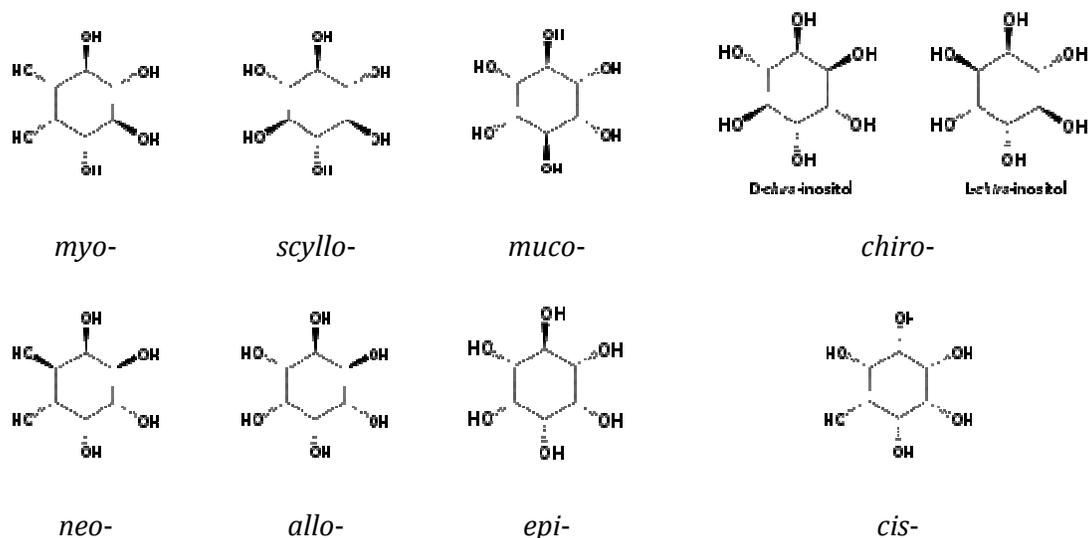


Fig. 1.7 Formula chimica del mio-inositolo e dei suoi isomeri

Il mio-inositolo è classificato nel gruppo delle vitamine B (vitamina B7), ma non è considerato un nutriente essenziale, essendo prodotto anche dall'organismo umano;

tuttavia, la sua sintesi, che avviene a livello renale, è da taluni reputata essere inadeguata per la salute umana e pertanto è importante assumerla con la dieta (Clements e Darnell,1980), tant'è vero che essa esiste già in commercio come integratore. Gli inositoli sono presenti in molti frutti e in semi delle piante dove sono legati al fosfato o alle membrane; nel primo caso funzionano da riserve di fosfato sottoforma di fitato che non è biodisponibile, mentre sono utilizzabili dall'uomo quando sono legati ai fosfolipidi (es. lecitina) (Hurrell, 2003). L'uva è un alimento particolarmente ricco in inositolo ed è il capostipite tra i frutti per concentrazione di questa vitamina (Clements e Darnell,1980). Il suo contenuto viene mantenuto anche nel mosto e nei succhi d'uva e gran parte anche nel vino, tanto che è stato ipotizzato il suo contributo alla spiegazione dell'ormai celeberrimo paradosso francese.

Senza eccedere nel conferire a questa molecola effetti salutistici molto complessi e difficili da provare, la dimostrazione del suo coinvolgimento in una serie di processi biologici (segnale mediatore nella cascata dell'insulina, mantenimento del potenziale di membrana, controllo della concentrazione cellulare del calcio, catabolismo dei grassi e del colesterolo, regolazione dell'espressione genica) ha portato ad indagare sulla possibilità di utilizzarlo in medicina. (Nestler et al., 1999 e 2000; Robinson, et al., 1996; Shen et al., 2003; Steger et al., 2003).

Considerate le vie metaboliche in cui è coinvolto, senza contare il suo ruolo nell'espressione genica, è facilmente comprensibile che siano numerosi i campi di studio e di applicazione clinica dell'inositolo, sia per la cura di disturbi metabolici (insulino-resistenza, sindrome dell'ovaio policistico, infertilità, fegato grasso) che psichiatrico (l'inositolo è un ansiolitico paragonabile ai farmaci comunemente diffusi) (Fux et al.,1996; Levine et al., 1995; Palatnik et al., 2001; Taylor et al., 2001; Atkinson et al.,1977; Lerner, 2002; Luorno et al., 2002). Ovviamente i dosaggi prescritti per la cura di queste malattie sono più elevati delle quantità che normalmente si assumono con la dieta, ma i suoi effetti positivi esortano alla sua regolare assunzione con la dieta anche nelle persone sane (Clements et al., 1980).

Nel settore enologico, essendo un componente naturale e costantemente presente nell'uva e del mosto, non ha ricevuto molto interesse. La sua presenza tuttavia è essenziale come fattore di crescita e attivatore di fermentazione (Ciolfi, 1982), tanto che deve essere sempre presente nei mosti sintetici sperimentali mirati a valutare le performance di fermentazione. L'insufficienza di inositolo comporta nei lieviti la perdita dell'attività fermentativa e respiratoria a causa della riduzione del trasporto degli zuccheri, associata al danneggiamento delle membrane cellulari che conduce alla fine alla perdita della vitalità

cellulare (Ulaszewski et al, 1978; Robinson et al., 1996); infatti, in assenza di lipidi contenenti inositolo l'espansione della superficie cellulare termina dopo una duplicazione cellulare (Atkinson et al., 1977). Studi sull'assorbimento dell'inositolo durante il ciclo vitale in *Saccharomyces cerevisiae* hanno dimostrato che questo è elevato durante la fase di latenza e di crescita esponenziale per diminuire nella fase stazionaria. E' comprensibile come la carenza di questa vitamina possa indurre un prolungamento della fase di adattamento anche all'inizio della fermentazione alcolica quando le cellule si dividono intensamente e l'attività metabolica legata alle membrane è piuttosto intensa. L'effetto protettivo dell'inositolo sulla tolleranza agli stress osmotici e termici durante la fermentazione è stato indagato da Caridi A. (2002), che ha confermato la capacità della molecola di minimizzare l'effetto dei due stress. I lieviti non usano il mio-inositolo come substrato fermentativo, per cui alla fine della fermentazione, parte di esso viene rilasciato nel vino. Non ci sono in letteratura lavori scientifici mirati a valutare l'effetto del mio-inositolo sulla rifermentazione dei lieviti nella produzione degli spumanti. Un eventuale effetto positivo del suo incremento potrebbe dare una giustificazione all'utilizzo dei mosti concentrati e rettificati per la presa di spuma rispetto all'utilizzo del saccarosio (l'aggiunta di mio-inositolo al vino non è consentita).

1.5 I METODI PER LE ANALISI IN CAMPO ENOLOGICO: ASPETTI TECNICI E LEGISLATIVI

La Comunità Europea, allo scopo di uniformare la regolamentazione delle pratiche enologiche, ha deciso di prendere come riferimento quanto elaborato dall'Organizzazione Internazionale della Vite e del Vino (OIV). Questo organismo intergovernativo è stato creato nell'aprile 2001, quale erede dell'Ufficio Internazionale del Vino nato nel 1924 e divenuto Ufficio internazionale della Vigna e del Vino (1958). Riunisce attualmente rappresentanti da 45 stati membri (ai quali si aggiungono degli osservatori) allo scopo di valutare le problematiche delle differenti figure della filiera vitivinicola e di proporre norme su pratiche enologiche ed analisi chimico-enologiche. Quest'ultima attività è affidata ad una Sottocommissione che esamina i protocolli che devono essere poi approvati dall'Assemblea Generale. Le metodiche sono raccolte nei due volumi del compendio *Compendium of International Methods of Analysis of Spirituous Beverages of Vitivinicultural Origin* (ultima edizione nel 2011) a disposizione sul sito internet dell'OIV. La raccolta più aggiornata è presente in lingua inglese e francese, ma molti protocolli sono a disposizione sul sito nelle lingue ufficiali dell'OIV (francese, inglese, spagnolo, tedesco, italiano).

Alcuni accordi bilaterali relativi al commercio del vino riconoscono i metodi di analisi pubblicati dall'OIV come metodi di riferimento per la determinazione della composizione analitica del vino nell'ambito delle operazioni di controllo.

Il reg. CE n. 479/2008 (fig. 1.8) e il reg. CE n. 606/2009 (fig. 1.9) prevedono che i metodi di analisi per determinare la composizione dei prodotti disciplinati dai regolamenti stessi e le regole per stabilire se tali prodotti siano stati sottoposti a trattamenti in violazione delle pratiche enologiche autorizzate siano quelli raccomandati e pubblicati dall'OIV nella sua Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti. La legge comunque stabilisce di pubblicare sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea, serie C, l'elenco e la descrizione dei metodi di analisi descritti nella Raccolta OIV che sono applicabili per il controllo dei prodotti vitivinicoli. Solo i metodi pubblicati nella Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti dell'OIV o nella Raccolta dei metodi internazionali di analisi delle bevande spiritose di origine vitivinicola dell'OIV (in particolare i metodi di tipo II, come si vedrà in seguito) hanno carattere ufficiale di riferimento e sono applicabili per il controllo e la risoluzione di controversie. L'organizzazione pubblica anche delle linee guida per l'utilizzo di strumentazioni per analisi di stima (es. linee guida per gli analizzatori a infrarosso e colorimetrici), utili indicazioni per un corretto utilizzo di questi analizzatori, con l'avvertenza che i metodi che figurano nelle linee guida non possono essere considerati come metodi di riferimento.

Dal Reg. CE 479/2008 (OCM vino 2008-2013)

Articolo (25)

Per conformarsi alle norme internazionali in questo settore, la Commissione dovrebbe basarsi, come regola generale, sulle pratiche enologiche raccomandate dall'Organizzazione internazionale della vigna e del vino (OIV).

Articolo 31

Metodi di analisi

I metodi di analisi per determinare la composizione dei prodotti disciplinati dal presente regolamento e le regole per stabilire se tali prodotti siano stati sottoposti a trattamenti in violazione delle pratiche enologiche autorizzate sono quelli raccomandati e pubblicati dall'OIV.

In assenza di metodi o di regole raccomandati e pubblicate dall'OIV, metodi e regole corrispondenti sono adottati secondo la procedura di cui all'articolo 113, paragrafo 2.

In attesa dell'adozione di dette regole, tali metodi e regole da utilizzare sono quelli autorizzati dagli Stati membri interessati.

Fig. 1.8 estratto dal Reg. CE479/2008 riguardante la scelta dei metodi di analisi sui vini

Dal Reg. CE 606/2009

Articolo (15)

Metodi di analisi comunitari¹.

I metodi di analisi di cui all'articolo 31, secondo comma, del regolamento (CE) n. 479/2008, da applicare per il controllo di alcuni prodotti vitivinicoli o di alcuni limiti fissati a livello comunitario, sono descritti nell'allegato IV.2.

La Commissione pubblica nella Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, serie C, l'elenco e la descrizione dei metodi di analisi di cui all'articolo 31, primo comma, del regolamento (CE) n. 479/2008, descritti nella Raccolta dei metodi internazionali d'analisi dei vini e dei mosti dell'OIV, da applicare per il controllo delle disposizioni e dei limiti stabiliti dalla normativa comunitaria per la produzione dei prodotti vitivinicoli.

Fig. 1.9 estratto dal Reg. CE 606/2009 riguardante la scelta dei metodi di analisi sui vini

Il compendio dei metodi dell'OIV, elaborato dalla Sottocommissione come *Compendio delle bevande spiritose di origine vitivinicola* diventato poi *Compendio dei metodi di analisi Internazionali delle bevande spiritose, dell'alcool e della frazione aromatica* è stato approvato dall'Assemblea generale nel 1994 sotto il nome di OIV *Compendio dei metodi di analisi Internazionali*. Non tutte le metodiche incluse nella raccolta risultano validate in base ai protocolli OIV, ma sono state riprese dalla raccolta del 1994 per ragioni di completezza. Tuttavia la Risoluzione OENO 6/94 ha stabilito che i metodi non ancora convalidati lo sarebbero stati tramite analisi congiunte. Questo lavoro è patrocinato anche dall'Unione Europea che in questo modo evita un comitato apposito come era accaduto in passato (vedi Reg. 1493/99 art. 46.3; fig. 1.10).

Nuove metodiche o aggiornamenti dei metodi ufficiali possono essere proposti dai laboratori dei singoli Stati Membri attraverso i rispettivi rappresentanti nella Sottocommissione per far fronte a problematiche particolari o su pratiche enologiche o normative specifiche del paese.

Le Risoluzioni dell'OIV sono documenti ufficiali adottati dall'Assemblea Generale degli Stati membri. Esse rappresentano il principale canale di comunicazione dell'Organizzazione verso i suoi Stati membri, nonché per il settore vitivinicolo. Le Risoluzioni sono disponibili nelle lingue ufficiali dell'Organizzazione. Le proposte di risoluzioni di carattere generale, scientifico, tecnico, economico e giuridico sono esaminate dagli Stati membri e dagli Osservatori secondo una procedura per fasi e vengono adottate nella loro forma definitiva con il consenso degli Stati membri.

Dal Reg. CE 1493/99 (OCM vino 1999-2007)

art.46

1 *omissis*

2 *omissis*

3. I metodi d'analisi per individuare la composizione dei prodotti disciplinati dal presente regolamento e le regole per stabilire se tali prodotti sono stati sottoposti a trattamenti in violazione delle pratiche enologiche autorizzate sono adottate secondo la procedura di cui all'articolo 75.

Secondo la stessa procedura sono adottati, se necessario, i limiti espressi in cifre degli elementi che caratterizzano l'applicazione di determinate pratiche enologiche e le tabelle per il confronto dei dati analitici.

Tuttavia, qualora non siano previsti metodi di analisi comunitari o regole di cui al primo comma per individuare e quantificare le sostanze ricercate nel prodotto in questione, i metodi di analisi da utilizzare sono i seguenti:

- a) i metodi di analisi riconosciuti dall'assemblea generale dell'Ufficio internazionale della vigna e del vino (OIV) e pubblicati a cura di questo, oppure
- b) qualora tra i metodi di analisi di cui alla lettera a) non figuri un metodo appropriato, un metodo di analisi conforme alle norme raccomandate dall'Organizzazione internazionale per la standardizzazione (ISO), oppure
- c) in mancanza di uno dei metodi di cui alle lettere a) e b) e in funzione della sua esattezza, della sua ripetibilità e della sua riproducibilità:
 - i) un metodo di analisi ammesso dallo Stato membro interessato o
 - ii) se necessario, qualsiasi altro metodo di analisi appropriato.

Sono considerati equivalenti ai metodi di analisi comunitari di cui al primo comma i metodi di analisi automatizzati impiegati in luogo di un metodo di analisi comunitario, a condizione che sia stato stabilito, secondo la procedura di cui all'articolo 75, che i risultati ottenuti sono almeno uguali ai risultati ottenuti con il corrispondente metodo comunitario per quanto concerne l'esattezza, la ripetibilità e la riproducibilità.

Fig. 1.10 estratto dal Reg. CE 1493/99 riguardante la scelta dei metodi di analisi sui vini

I metodi risultano classificati con le regole dell'OIV in quattro categorie:

- ✓ **categoria 1:** metodo che determina un valore al quale si può arrivare solo applicando il metodo *per se* e che serve, per sua definizione, come unico metodo per stabilire il valore accettato del parametro misurato (es. estratto secco, acidità totale, acidità volatile)
- ✓ **categoria 2:** raccoglie i **metodi di riferimento**, indicati quando i metodi di categoria 1 non possono essere impiegati. Dovrebbe essere una sottocategoria della categoria 3. Questi metodi hanno un procedimento molto dettagliato e sono sufficientemente attendibili da essere raccomandati in caso di dispute o per scopi di calibrazione (es. determinazione del potassio, dell'acido citrico)
- ✓ **categoria 3:** metodi che incontrano tutti i criteri specificati dalla Sotto-commissione sui Metodi di Analisi ed è usata per il monitoraggio, ispezione e per regolamentazione.(es. determinazione enzimatica di glucosio e fruttosio).

- ✓ **categoria 4: metodi ausiliari** sono metodi convenzionali o tecniche recentemente implementate rispetto alla quale la Sottocommissione sui Metodi di Analisi non ha ancora specificato i criteri richiesti. (es. agenti coloranti di sintesi, misura del potenziale redox). Sono metodiche superate o in attesa di ulteriore caratterizzazione.

L'OIV possiede anche una sezione in cui fornisce indicazioni per il controllo della qualità nei laboratori di enologia:

CONTROLLO QUALITÀ NEI LABORATORI	Riferimento
Principio di convalida (Oeno 7/98)	OIV-MA-AS1-05
Studio congiunto	OIV-MA-AS1-07
Fedeltà dei metodi (Oeno 5/99)	OIV-MA-AS1-08
Protocollo per la pianificazione, la condotta e l'interpretazione degli studi di performance dei metodi di analisi (Oeno 6/2000)	OIV-MA-AS1-09
Stima limite di rilevamento e limite di quantificazione (Oeno 7/2000)	OIV-MA-AS1-10
Controllo interno di qualità nei laboratori di analisi (Oeno 19/2002)	OIV-MA-AS1-11
Guida di convalida (Oeno 10/98)	OIV-MA-AS1-12
Raccomandazioni per la convalida di un solo laboratorio (Oeno 8/05)	OIV-MA-AS1-13
Raccomandazioni per l'incertezza di misura (Oeno 9/05)	OIV-MA-AS1-14
Raccomandazioni sul tasso di recupero (Oeno 392/2009)	OIV-MA-AS1-15

Fig. 1.11 Risoluzioni dell'OIV riguardanti il controllo delle qualità nei laboratori di enologia

Come si può vedere dall'elenco in fig. 1.11 la Sottocommissione ha previsto una serie di protocolli perché le procedure di validazione possano avvenire con un certo livello di standardizzazione tali da rendere i risultati validi e confrontabili in tutti gli stati membri.

1.6 I METODI DI ANALISI DEI MOSTI CONCENTRATI RETTIFICATI

Nel caso specifico delle analisi sugli MCR, tutti i metodi per il controllo di questo prodotto sono raccolti nella risoluzione 47/2000. Si tratta della raccolta di metodiche internazionale, la cosiddetta "bozza dei metodi" (solo in lingua inglese e francese) sulla quale la sottocommissione lavora per uniformare i protocolli, completandoli con i valori statistici che emergono dalla validazione dei metodi (incertezza, esattezza, ...).

Nella successiva risoluzione sull'argomento 419A-2011, "Metodi particolari per l'analisi degli zuccheri dell'uva", viene riportato il metodo per le seguenti analisi:

Titolo	allegato	Riferimento	Tipo di metodo
Conduttività (Oeno 419A-2011)	B	OIV-MA-F1-01	IV
Idrossimetilfurfurolo (HMF) mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione (Oeno 419A-2011)	C	OIV-MA-F1-02	IV
Determinazione del TAV acquisito dei mosti concentrati (MC) e degli zuccheri d'uva (mosti concentrati rettificati, MCR) (Oeno 419A-2011)	E	OIV-MA-F1-03	IV
Saccarosio (metodo di ricerca e di dosaggio per cromatografia liquida ad alta risoluzione) (Oeno 419A-2011)	G	OIV-MA-F1-04	IV
Acidità totale (Oeno 419A-2011)	H	OIV-MA-F1-05	IV
pH (Oeno 419A-2011)	I	OIV-MA-F1-06	IV
Anidride solforosa (Oeno 419A-2011)	J	OIV-MA-F1-07	IV
Caratteristiche cromatiche (Oeno 419A-2011)	K	OIV-MA-F1-08	IV

Fig. 1.12 Metodi contenuti nella Risoluzione dell'OIV 419A-2011.
La categoria del metodo verrà aggiornata al momento dell'inserimento nel compendio aggiornato dopo l'approvazione della assemblea generale (una volta all'anno)

Aggiornata quest'anno con la risoluzione 419B-2012: allegati A, D1, D2

Titolo	allegato	Riferimento	Tipo di metodo
Cationi totali (Oeno 419B-2012)	A	Non inserito	I
Metalli pesanti Determinazione del tenore di piombo mediante ETAAS (Oeno 419B-2012)	D1	Non inserito	IV
Metalli pesanti. Determinazione di piombo mediante spettrometria di massa al plasma accoppiato induttivamente (ICP-MS) (Oeno 419B-2012)	D2	Non inserito	IV
Meso-inositolo, scillo-inositolo e saccarosio	F	<i>In fieri</i>	II?

Fig. 1.13 Metodi contenuti nella Risoluzione dell'OIV 419B-2011.

Come si può vedere è già previsto un allegato F, che conterrà la determinazione del mio- inositolo, scillo-inositolo e saccarosio nei MCR, che è in fase di elaborazione e si avvarrà anche dei dati esposti in questa tesi.

1.7 IL PROTOCOLLO DI VALUTAZIONE DELLA GENUINITÀ DEI MOSTI

La versione del protocollo per la valutazione del contenuto di mio-inositolo è mostrata in fig. 1.12 ed è pubblicata nella risoluzione OENO 47/2000:

ESTRATTO DALLA RISOLUZIONE OENO 47/2000

3.17. Meso-Inositol
Gas phase chromatography of a silyl-containing derivative.
N.B. : The information given above is provided for informational purposes. There are other techniques for deriving sugars and polyhydroxy alcohols, and chromatographic methods for determining meso-inositol concentrations

3.17.1. Preparing the sample:
Dilute 5 g of grape sugar in 50 ml of water. Dry 50 µl of the dilution and 50 µl of a methyl D-glucopyranoside solution in a concentration of 1 g/liter, (internal standard) under a vacuum in a small 2 ml flask.
Dissolve the residue with 100 µl of pyridine. Add 100 µl of trimethylchlorosilane. Seal the small flask with a teflon stopper and heat at 80 °C for 1 hour. Inject 1 µl with division of the injected volume to 1/60.

3.17.2. Separation
Column: apolar capillary type of fused silica 25 m long and inner diameter of 0.2 mm.
Supporting Gas: helium, 1 ml/minute
Injector and detector: 280 °C
Column temperature: 60-250 °C, at 4 °C per minute, then isothermal at 250 °C.

3.17.3. Expressing the results: g per kg of sugar

**Fig. 1.14 Bozza del metodo di determinazione del meso-inositolo
presente nella risoluzione Oeno 47/2000**

Tuttavia, la normativa comunitaria prevede già un protocollo, pubblicato sulla gazzetta ufficiale della comunità europea n. 193 del 24.7.2009 (fig. 1.15).

Questa metodica descrive la quantificazione non solo del mio-inositolo, ma anche dello scillo-inositolo e del saccarosio. Essa, a sua volta, riprende parte del lavoro pubblicato da Versini et al. nel 1984, mirato a quantificare non solo i polialcoli, ma anche gli zuccheri minori nei mosti concentrati e rettificati.

La tecnica prevede l'analisi in gas-cromatografica dei derivati silanizzati degli zuccheri e polioli presenti nel mosto adeguatamente diluito.

La gascromatografia (GC), è una tecnica cromatografica impiegata a scopo analitico che si basa sulla ripartizione della miscela da analizzare tra una fase stazionaria ed una fase mobile (gassosa), in funzione della diversa affinità di ogni sostanza della miscela con le fasi. La GC ha conosciuto il suo grande boom negli anni sessanta e tuttora conserva una posizione di primo piano fra le tecniche di separazione di miscele complesse.

Strumentalmente, nella forma più elementare, è basata su un piccolo forno accuratamente termostatabile, in cui viene alloggiata la colonna cromatografica.

METODI COMUNITARI SPECIFICI DI ANALISI

A. *omissis*

B. METODI DI ANALISI PARTICOLARI PER MOSTI DI UVE CONCENTRATI RETTIFICATI

...*omissis*

f) **Meso-inositolo, scillo-inositolo e saccarosio**

1. Principio

Gasromatografia di derivati silanizzati.

2. Reattivi

2.1. Standard interno: xilitolo (soluzione acquosa di circa 10 g/l addizionata con una punta di spatola di sodio azide).

2.2. Bistrimetilsililtrifluoroacetamide — BSTFA — (C₈H₁₈F₃NOSi₂)

2.3. Trimetilclorosilano (C₃H₉ClSi)

2.4. Piridina p.a. (C₅H₅N)

2.5. Meso-inositolo (C₆H₁₂O₆)

3. Apparecchiatura

3.1. Gasromatografo provvisto di:

3.2. Colonna capillare (ad esempio in silice fusa, OV 1, spessore del film di 0,15 µ, lunghezza di 25 m e diametro interno di 0,3 mm).

Condizioni operative: gas di trasporto: idrogeno o elio

—flusso del gas di trasporto: circa 2 ml/minuto,

—temperatura dell'iniettore e del rivelatore: 300 °C,

—programmazione di temperatura: 1 minuto a 160 °C, 4 °C/minuto fino a 260 °C, isoterma a 260 °C per 15 minuti,

—rapporto di splittaggio: circa 1 a 20.

3.3. Integratore.

3.4. Siringa micrometrica da 10 µl.

3.5. Micropipette da 50, 100 e 200 µl.

3.6. Fiale da 2 ml con tappo teflonato.

3.7. Stufa.

4. Modo di operare

Circa 5 g di mosto concentrato rettificato, pesati esattamente in un matraccio da 50 ml, sono addizionati di 1 ml di soluzione standard di xilitolo (punto 2.1) e portati a volume con acqua. Dopo omogeneizzazione del campione, si prelevano 100 µl di soluzione che si pongono in una fiala (punto 3.6) e si portano a secchezza sotto leggera corrente d'aria, previa eventuale aggiunta di 100 µl di etanolo assoluto per facilitare l'evaporazione.

Il residuo si scioglie accuratamente in 100 µl di piridina (punto 2.4), si aggiungono 100 µl di bistrimetilsililtrifluoroacetamide (punto 2.2) e 10 µl di trimetilclorosilano (punto 2.3), si sigilla la fiala con tappo teflonato e si pone in stufa a 60 °C per un'ora.

Si prelevano 0,5 µl del limpido iniettando ad ago vuoto e caldo con lo splittaggio sopraindicato.

5. Calcolo dei fattori di risposta.

5.1. Preparare una soluzione contenente: 60 g/l di glucosio, 60 g/l di fruttosio, 1 g/l di meso-inositolo e 1 g/l di saccarosio.

Si pesano 5 g di detta soluzione e si procede come al punto 4. Si calcolano dal cromatogramma ottenuto i fattori di risposta del meso-inositolo e del saccarosio rispetto allo xilitolo.

Per lo scillo-inositolo, non disponibile in commercio, che ha un tempo di ritenzione compreso fra l'ultimo picco delle forme anomeriche del glucosio e quello del meso-inositolo (cfr. figura allegata), utilizzare lo stesso fattore di risposta ottenuto per il meso-inositolo.

6. Espressione dei risultati

6.1. Il meso-inositolo e lo scillo-inositolo si esprimono in mg/kg di zuccheri totali.

Fig. 1.15 Estratto dalla G:U:n 193 del 24.7.2009 nella parte riguardante la determinazione del mio-inositolo.

Nel caso della gasromatografia ad alta risoluzione o HRGC (*high resolution gas chromatography*) normalmente utilizzata la colonna è di tipo capillare, formata da un

avvolgimento costituito da un sottile tubo capillare in vetro, lungo alcuni metri, sulle cui pareti interne è depositato un sottile strato della fase fissa (una sostanza sufficientemente stabile per cui la miscela da analizzare mostri un certo grado di affinità). Il campione viene introdotto con un flusso di gas inerte (elio, idrogeno o azoto) ad una sua estremità (dell'iniettore) e, dopo un certo tempo, i componenti separati fuoriescono col flusso di gas dall'estremità opposta (del detector), ove è posto un opportuno rivelatore in grado di segnalarli. Con questa tecnica è possibile analizzare campioni gassosi, liquidi o solidi purché il campione sia o possa essere reso essere volatile in un intervallo di temperatura compreso tra l'ambiente e i 350 °C circa, la temperatura comunemente raggiunta dai forni degli strumenti in commercio e compatibile con le colonne cromatografiche usate.

La fase stazionaria è generalmente costituita da un liquido non volatile distribuito come film sottile spesso qualche micrometro sulla parete interna di una colonna di lunghezza normalmente superiore ai 10 metri e di diametro inferiore al millimetro ("colonna capillare"). Tale liquido può variare a seconda dell'applicazione, ossia del tipo di composti che si intendono analizzare.

La fase mobile è un gas, detto anche gas di trasporto, gas vettore o gas *carrier*. Generalmente, vengono scelti gas chimicamente inerti, a bassa viscosità ed ottenibili ad elevata purezza (99,9%) quali l'azoto, l'elio o l'argon; per alcune applicazioni vengono anche utilizzati l'idrogeno o l'anidride carbonica.

Il campione, posto in testa alla colonna e sottoposto al flusso costante del gas di trasporto, viene separato nelle sue componenti in funzione di quanto queste siano affini (di solito per polarità) alla fase stazionaria; per migliorare la separazione si può agire sulla temperatura della colonna, che può essere tenuta costante ("isoterma") o fatta variare secondo un gradiente desiderato (programmata di temperatura).

Quando il campione esce dall'estremità finale della colonna (si dice che è stato eluito) viene raccolto da un rivelatore. Il diagramma che rappresenta il segnale generato dal rivelatore in funzione del tempo - fissato a zero l'istante in cui il campione è stato immesso nella colonna - è il cromatogramma del campione. Il cromatogramma si presenta come una sequenza di picchi di varia ampiezza ed altezza distribuiti lungo l'asse del tempo.

Dal tempo di ritenzione di ogni picco è possibile dedurre l'identità del composto eluito; dall'area o dall'altezza dei picchi è possibile dedurre le concentrazioni o le quantità assolute dei vari composti presenti nel campione analizzato, a seconda del rivelatore impiegato.

Il campione viene generalmente introdotto in colonna tramite una siringa; il volume va da 10 a 0.5 microlitri in cui sono sciolti pochi microgrammi di campione oppure automaticamente tramite un auto campionatore che solitamente fornisce migliore riproducibilità e

ottimizzazione dei tempi. La riproducibilità dell'analisi consiste nella possibilità della ripetizione della stessa separazione per poi avere un confronto tra le due eluizioni appena fatte. Come è logico che sia i campionatori hanno una iniezione con migliore riproducibilità rispetto all'iniezione fatta dall'operatore.

Il campione può essere introdotto direttamente in testa alla colonna (introduzione *on-column*) o "depositato" in un iniettore, dove viene vaporizzato ed eventualmente ripartito in modo che solo una parte di esso vada nella colonna analitica mentre la restante parte viene eliminata dalla linea dello split (iniezione *split* o *splitless*).

L'iniettore è composto essenzialmente da una scatola chiusa e termicamente stabilizzata, al suo interno trova alloggio un inserto in vetro ed un blocco riscaldante. Per la buona riuscita dell'analisi è necessario che il campione sia il più omogeneo possibile e che il suo stato sia gassoso; l'iniettore serve a garantire queste condizioni.

Nel caso sopracitato dell'analisi *on column* a motivo della degradabilità termica dei componenti si deposita il campione liquido dentro la colonna con parte del solvente non evaporato, ma vicino all'ebollizione, questa tecnica oltre ad evitare il *cracking* termico e quindi la degradazione delle sostanze, ne migliora anche la separazione dalla miscela.

Esistono due tipi di iniezione, *split* e *splitless*. Lo *split* si usa quando il campione a causa della sua alta concentrazione potrebbe saturare la risposta del detector ed uscendo fuori scala falsare il risultato dell'analisi; lo *split* diluisce il campione nel gas di trasporto, ne libera una parte (regolabile) all'esterno mediante uno sfiatatoio e dopo un certo periodo di tempo (misurato per via empirica) lo immette in colonna. L'iniezione *splitless* invece invia direttamente in colonna tutto il campione - di fatto è equivalente ad una iniezione *on-column* - in tal caso il solvente dovrebbe essere sempre il primo ad arrivare e creare un picco visibile ed inconfondibile (questo tipo di analisi viene usata ad esempio per l'identificazione degli acidi grassi volatili identificativi della maturazione o della putrefazione, o per le droghe).

Il solido di supporto è spesso gel di silice, allumina o carbone, che viene impregnato del liquido che costituisce l'effettiva fase stazionaria. La scelta del liquido è in funzione dei composti che si vogliono separare. In genere si usa squalano, olio o grasso di silicone, glicoli polietilenici (*Carbowax*), oli di vaselina o trietanolamina, ma la scelta è estremamente ampia.

Le colonne capillari sono sottilissimi tubi di silice fusa di diametro generalmente non superiore agli 0,53 millimetri e di lunghezza non inferiore ai 10 metri (fino a 150–200 m) avvolte a spirale su un supporto metallico. La fase stazionaria è spalmata in maniera

uniforme sulla superficie interna della colonna, dove forma un film di spessore costante che, a seconda della capacità di carico della colonna, varia generalmente tra 0,5 e 2,5 μm . Le diverse fasi stazionarie si differenziano in primo luogo per la diversa polarità. A questo proposito si deve tener conto che le interazioni tra soluto e fase stazionaria sono maggiori quanto più simile è la loro polarità. Proprio per questo motivo, sostanze che risulteranno avere una polarità simile alla fase stazionaria saranno maggiormente trattenute in colonna (tempi di ritenzione più lunghi). La selettività di una fase stazionaria risiede nelle diverse interazioni che si attuano in presenza dei diversi analiti. Nel caso dell'esperimento della tesi si usa una colonna apolare (OV1)

Il rivelatore o detector è posto alla fine della colonna e può essere di diverso tipo in funzione del principio fisico utilizzato per rilevare l'uscita delle sostanze dalla colonna e alla specificità. Possono essere distruttivi (FID) o non distruttivi (ECD, TCD). Rivelatori non distruttivi per le molecole analizzate permettono il successivo invio delle stesse ad ulteriori gradi di analisi (ad esempio analisi di massa). Le tre classi più comuni sono quelle dei rivelatori a conducibilità termica, dei rivelatori a ionizzazione di fiamma (o *FID*) e dei rivelatori a cattura di elettroni (o ECD). Nel caso specifico degli esperimenti di questa tesi è stato usato un GC con rivelatore un *rivelatore a ionizzazione di fiamma* (FID, Flame Ionization Detector): il gas di trasporto (detto anche carrier, in genere elio o azoto) in uscita dalla colonna viene mescolato a idrogeno, e ossigeno (aria). Nella fiamma, quando una sostanza viene eluita, a motivo di un elettrodo posto all'uscita del gas, i vapori combusti vengono caricati elettricamente producendo ioni che vengono raccolti sulla superficie del detector (un anello di metallo sensibile) producendo una corrente elettrica che, amplificata, rappresenta il segnale del detector, la differenza tra il gas puro e quello contenente la sostanza separata rappresenta un picco. Nonostante il suo essere cieco a tutte le sostanze che non bruciano (ad esempio, l'acqua), il FID è uno dei detector più diffusi perché molto robusto (il suo limite di rilevabilità resta basso anche dopo molte ore di lavoro) e perché esso è un rivelatore universale.

Infine, all'uscita di una colonna cromatografica si può porre direttamente od in serie ad un detector che effettui una analisi non distruttiva uno spettrometro di massa, per avere indicazioni sulla struttura di ogni singola sostanza eluita.

Per poter procedere ad una quantificazione è necessario creare uno standard ad hoc che contengano miscele variabili di sostanze ricercate a concentrazioni prefissate. Analizzate prima, costituiscono un campione standard a cui riferirsi creando una curva di taratura a standard esterno oppure a standard interno ove al campione viene aggiunta una sostanza

di riferimento quantitativo, che non è assolutamente contenuta nel campione. Nel caso sperimentale di questa tesi è stato utilizzato uno standard interno a concentrazione nota. Per poter procedere all'analisi in GC dei campioni dei polialcoli è stato necessario prima procedere alla derivatizzazione ossia un processo che permette di modificare chimicamente un composto non volatile al fine di ottenerne un nuovo le cui proprietà siano compatibili con la gas cromatografia; in particolare nella silanizzazione si ha la sostituzione di un idrogeno dell'ossidrile con un gruppo contenente silicio legato a tre gruppi metilici (il più usato è il trimetilclorosilosano). Poiché i reattivi si combinano con l'acqua, è necessario usare solventi anidri (la piridina è il solvente più utilizzato). Le modifiche effettuate ai protocolli (che sono inserite nella proposta di validazione del metodo all'OIV) sono discusse nel capitolo dei risultati.

1.8. LA VALIDAZIONE DEI METODI DI ANALISI

La validazione di un metodo analitico è definita come *“la conferma attraverso l'esame e l'apporto di evidenza oggettiva che i requisiti particolari per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti”* (UNI EN ISO 9000:2000).

I principali parametri utilizzati per la determinazione delle prestazioni di un metodo sono descritti nel Reg. CE 882/2004 (allegato III) e sono i seguenti (o una combinazione di essi):

- Selettività
- Limite di rilevabilità
- Limite di quantificazione
- Intervallo di lavoro e intervallo di linearità
- Precisione (ripetibilità e riproducibilità)
- esattezza
- Sensibilità
- Robustezza
- Recupero
- Incertezza

La **selettività** si riferisce alla capacità di un metodo analitico di determinare univocamente l'analita di interesse. Una misurazione è in grado di essere influenzata da diverse variabili, comprese le altre specie chimiche che costituiscono la matrice. Un'elevata selettività garantisce quindi che la misura sia effettivamente riferibile solamente al composto oggetto dell'analisi. Le interferenze possono portare a sottostimare o sovrastimare il risultato finale, pregiudicandone l'accuratezza. Per ovviare a ciò, quando possibile, e quando non si hanno a disposizione altri metodi, si eseguono procedure atte ad eliminare tali interferenze prima

di effettuare la misurazione riguardante l'analita. È ovvio quindi che oltre all'affidabilità del risultato, un'elevata selettività garantisce anche vantaggi quali ridotti tempi di analisi e costi minori, non essendo richiesti pretrattamenti supplementari. Un modo di valutare la selettività consiste nel verificare come varia la misura aggiungendo specie potenzialmente presenti nei campioni; allo stesso modo si possono variare le condizioni operative (ad esempio in cromatografia si può valutare l'effetto della variazione di fase stazionaria, dell'eluente o della temperatura a cui è effettuata la separazione).

Il **limite di rilevabilità** è la minima quantità misurabile dalla quale è possibile dedurre la presenza dell'analita con ragionevole certezza statistica (solitamente 99% o 95%). Il limite di rilevabilità si presenta come un test statistico di ipotesi (decidere, per esempio, se una piccola onda in un tracciato cromatografico sia un picco o un artefatto) e richiederebbe come concetti aggiuntivi quelli di errore di I e di II tipo e i parametri α e β che caratterizzano tali errori. Questi concetti non sono essenziali per la comprensione della tesi e quindi non saranno approfonditi.

Il **limite di quantificazione** o (detto anche limite di rilevabilità quantitativo) è il limite inferiore di concentrazione al quale è possibile esprimere una misura quantitativa con un'incertezza a priori (solitamente 5% o 1%). È più alto del limite di rilevabilità, che indica invece la concentrazione minima a cui è possibile effettuare un'analisi qualitativa sulla presenza o meno di un determinato analita.

La **linearità** è la proprietà di uno strumento di misura di dare in uscita (lettura) valori che possano mettersi in relazione lineare con il segnale d'ingresso (misurando), ossia, seguirà la funzione: $G_{out}=K \cdot G_{inp}+o$ dove G_{out} è il valore della lettura in uscita; G_{inp} è il valore del misurando in ingresso; k è la sensibilità nominale dello strumento; "o" è l'offset dell'uscita quando la grandezza d'ingresso è uguale a zero. Normalmente la sensibilità nominale "k" e il valore "o" di offset, si ricava calcolando i parametri caratteristici della retta di regressione lineare ottenuta a partire dai valori ottenuti dalla taratura dello strumento. Questa è una caratteristica molto voluta in un metodo o in uno strumento per la semplicità di utilizzo, in quanto è facile ricavare la misura a partire della lettura d'uscita e per la maggiore precisione (riduzione degli errori sistematici). La linearità può essere anche parziale, ma è importante che lo sia nel campo della misura stessa. La presenza di discordanze tra il comportamento reale dello strumento e quello "nominale" si traduce in un errore sistematico che influisce sulla precisione di misura. Questo errore viene chiamato "errore di linearità", e costituisce una componente della valutazione dell'incertezza di misura.

La **precisione** è il grado di “dispersione” di dati rilevati individualmente (campione) rispetto al valore medio della serie cui appartengono; essa è indicata dalla varianza (somma del quadrato degli scarti) o dalla deviazione standard (radice quadrata della varianza).

Si distinguono tre diversi tipi di precisione:

- ripetibilità stretta: la dispersione di valori ottenuta usando gli stessi strumenti, con gli stessi operatori, nelle stesse condizioni ed in un tempo ragionevolmente breve,
- riproducibilità: la dispersione ottenuta compiendo le stesse misurazioni con strumenti ed operatori differenti e/o su un tempo relativamente lungo.
- precisione intermedia: è come la ripetibilità, ma effettuata in momenti diversi

L'**accuratezza**, o meglio l'**esattezza** secondo le nuove definizioni, è il grado di corrispondenza del dato teorico, desumibile da una serie di valori misurati (campione di dati), con il dato reale o di riferimento, ovvero la differenza tra valor medio campionario e valore vero o di riferimento. Normalmente non costituisce una componente nella valutazione dell'incertezza della misura, anche se teoricamente le variazioni dovute alla non accuratezza strumentale dovrebbero farne parte. Questo tema è ancora dibattuto a livello statistico e di normativa ISO. Bisogna notare che il valore vero è un valore convenzionale, tanto più che nessun valore può essere perfettamente noto. Il valore vero, pur essendo convenzionale, è dedotto da misure effettuate con strumenti molto precisi, cioè strumenti i cui valori misurati, di una stessa grandezza fisica, si discostano molto poco fra loro. Ne consegue che il concetto d'accuratezza va sempre messo in relazione al **valore-vero** che gli operatori considerano "giusto", per scelta, dove tale scelta è motivata dalla precisione dello strumento con cui è stato ottenuto quel valore: la precisione è oggettiva non soggettiva.

La **sensibilità** di uno strumento di misura o un sensore, è il rapporto tra la variazione del valore misurato e la variazione del valore reale della grandezza considerata, per variazioni arbitrariamente piccole: esiste una variazione del valore reale limite al di sotto della quale il valore misurato non è non visualizzabile oppure si confonde con il rumore intrinseco dello strumento. Ciò determina la sensibilità minima del sistema, ovvero la minima grandezza fisica in grado di produrre un effetto.

La **robustezza** indica la capacità di un metodo analitico di non risentire degli effetti delle variazioni operative deliberatamente introdotte. Quindi può considerarsi come la capacità del metodo di non essere significativamente influenzato da variazioni delle condizioni

analitiche. Ogni metodo possiede delle fasi critiche e richiede che certe condizioni (ad esempio temperatura, pH, flusso di eluente eccetera) vengano rispettate, pena la compromissione del dato analitico finale. Per valutare la robustezza occorre in particolare identificare tali fasi e modificare le variabili critiche. Quindi si procede alla misura su replicati e si confronta con un test F (test che valuta l'ipotesi che due popolazioni abbiano la stessa varianza) la ripetibilità ottenuta in queste condizioni con la ripetibilità ristretta calcolata operando da prassi.

In chimica analitica il **recupero** è un parametro che indica la quantità una sostanza determinata da un metodo di analisi rispetto alla quantità totale. Permette di determinare perdite di analita durante la procedura, oltre a essere un modo in cui esprimere l'accuratezza. Il recupero si valuta misurando concentrazioni di analita aggiunte a campioni reali (campioni *spiked*).

$$\text{Recupero (\%)} = [(C_1 - C_2) / C_3] \cdot 100$$

Dove C_1 è la concentrazione dell'analita misurata dopo l'aggiunta, C_2 è la concentrazione dell'analita misurata prima dell'aggiunta, C_3 è la concentrazione aggiunta. Tanto più il recupero è prossimo al 100% tanto migliore è il risultato sebbene un recupero del 100% non indichi necessariamente l'assenza di errori. Il risultato finale dell'analisi può essere espresso tenendo conto della correzione apportata in funzione del recupero. È possibile ottenere anche valori superiori al 100%. Solitamente un metodo analitico prescrive che si debba rientrare entro un ben definito intervallo di valori di recupero.

Secondo il "Vocabolario Internazionale di Metrologia" (*VIM*) del 2007, per **incertezza di misura** si intende un parametro non negativo che caratterizza un intervallo di valori attribuiti ad un misurando. Esso è diverso dall'errore di misura che è definito come il valore ottenuto dalla misurazione di una grandezza meno il valore di riferimento di questa; per calcolare l'incertezza, infatti non è necessario conoscere il valore vero (in senso statistico). Per stimare l'incertezza globale, sarebbe utile esaminare ciascuna delle sue componenti e trattarle separatamente per valutarne il contributo all'incertezza totale. Il più delle volte, tuttavia, è possibile valutare l'effetto contemporaneo di più componenti, il che permette di semplificarne il calcolo. La stima dell'incertezza di misura è molto importante in chimica analitica in quanto esprime l'affidabilità intrinseca del risultato. Dal 1999 la norma ISO/IEC 17025, fondamentale per l'accREDITAMENTO dei laboratori di prova e di taratura, prevede infatti che le misurazioni siano espresse in termini di incertezza di misura. L'incertezza può

essere espresse sottoforma di scarto tipo (chiamato in questo caso «incertezza tipo») , oppure come la semiampiezza di un intervallo avente una probabilità di copertura stabilita. Secondo la norma UNI ISO 3534-1:2000, l'incertezza di misura è la stima legata ad un risultato di prova che caratterizza l'escursione dei valori entro cui si suppone che cada il valore vero (del misurando); ha le dimensioni di uno scarto tipo e si indica con la lettera "u".

Una volta chiariti i termini statistici necessari alla validazione dei metodi analitici, è opportuno vedere quali sono le tappe principali e i fattori da considerare per la pianificazione di esperimenti mirati alla validazione del metodo analitico.

Nella risoluzione OENO 6/2000 *"protocollo per la pianificazione, la condotta e l'interpretazione degli studi di performance dei metodi di analisi"*, l'OIV descrive con precisione come debba essere condotto il lavoro pratico di valutazione del metodo, prendendo come riferimento quanto descritto nella pubblicazione *"Protocol for the design, conducts and interpretation of collaborative studies"* (1995) seppure con delle modifiche. Sono previste diverse fasi:

1. Studio preliminare

Dato lo sforzo necessario per organizzare i test di validazione collaborativa, è richiesto un lavoro preliminare all'interno del laboratorio proponente, che prevede di ottenere una stima della deviazione standard intra-laboratorio nel range di concentrazione dell'analita, considerando i limiti minimo e massimo, con particolare enfasi su valori specifici o standard. Il valore deve essere dato cercando di massimizzare le variabili ordinarie (es. giorni differenti, curve di calibrazione diverse, cambio degli operatori...), facendo prove ripetute sia a partire dalla preparazione del campione che semplicemente ripetendo l'analisi strumentale. Dall'analisi di questi dati preliminari si ottiene una riproducibilità intra-laboratorio. Se questo valore non è accettabile, è inutile aspettarsi risultati migliori in una prova inter-laboratori. Lo studio preliminare prevede una descrizione dettagliata e non ambigua della procedura e la stima dei seguenti dati:

- dell'errore sistematico (es. errore strumentale)
- del tasso di recupero del materiale
- della selettività
- dell'interferenza di altri costituenti probabilmente presenti a concentrazioni apprezzabili nella matrice di interesse che possono interferire con la determinazione.
- sulla comparazione del nuovo metodo con i metodi esistenti già testati per la stessa finalità

- sulle procedure di calibrazione e sulle correzioni con il bianco che devono essere introdotte per non incorrere in errori sistematici nei risultati
- sul numero di cifre significative da riportare, basandosi sui dati emessi dallo strumento

2. Progettazione dello studio delle caratteristiche del metodo

In fase di progettazione delle prove sperimentali mirate alla validazione del metodo è necessario tener conto delle seguenti regole:

- il numero dei materiali (combinazione di analita/matrice/concentrazione): devono essere minimo 5, salvo ridurre a 3 quando ogni specifico livello è valutato per una singola matrice. Ci sono regole precise su come considerare i campioni duplicati (ciechi o aperti che siano) e calcolarne la deviazione separatamente dal resto dei campioni; su come valutare i controlli negativi a seconda che siano procedurali o necessari per confermare i limiti di rilevabilità.
- numero dei laboratori: almeno 8 laboratori devono riportare i risultati per ciascun materiale; qualora la strumentazione sia appannaggio solo di laboratori specializzati, il numero scende a 5 o tutti nel caso in cui il numero sia inferiore. Se il metodo è internazionale, dovrebbero essere coinvolti laboratori di più paesi.
- numero dei replicati: il protocollo fornisce diverse modalità di disegno sperimentale in ordine di preferenza. I materiali possono essere forniti ai laboratori partecipanti al lavoro di validazione in maniera diversa: materiali esattamente uguali per tutti, con replicati che possono essere ciechi o conosciuti oppure con analisi indipendenti (più difficile da trattare). Ovviamente la scelta dipenderà dal tipo di strumentazione e dalle possibilità di intervento dell'operatore (soprattutto sulla scelta del campione cieco o meno), anche se l'OIV stabilisce una lista di preferenza di queste modalità.

3. Analisi statistica

Per l'analisi statistica dei dati le raccomandazioni sono le seguenti:

- devono essere considerati solo i dati validi, ossia quelli ottenuti con le normali prestazioni del laboratorio (senza malfunzionamenti di strumenti, errori di trascrizione...)

- deve essere applicata l'analisi della varianza ad una via (ANOVA) per ciascun materiale, togliendo i valori aberranti (valori distanti dal resto dei dati raccolti) al fine di stimare i componenti della varianza interna ai gruppi ed intergruppo, ossia rispettivamente ripetibilità e riproducibilità.
- Deve essere calcolata la media delle medie di ciascun laboratorio e la ripetibilità della deviazione standard relativa (RSDr) e la riproducibilità della deviazione standard relativa (RSDR) (la deviazione standard relativa è il rapporto tra la deviazione standard e la media) considerando anche gli aberranti.
- Deve essere effettuato il trattamento degli aberranti applicando il test statistico di Cochran e Grubbs. Il primo serve a vedere se una deviazione standard è significativamente più elevata di altre deviazioni standard. Il secondo presuppone una distribuzione normale dei dati ed elimina uno ad uno gli aberranti. I test vanno applicati fino all'esclusione di tutti i devianti o al massimo fino al 22,2% del numero originale.
- La verifica deve essere ripetuta dal terzo punto senza gli aberranti. Se non vengono rimossi ulteriori aberranti la procedura è terminata, altrimenti bisogna riapplicare il test.

Per tutte queste procedure ci sono programmi applicativi ed i test statistici si trovano anche on-line.

4. Report finale

Il report finale deve essere pubblicato e deve comprendere tutti i dati validi. Deve contenere le seguenti informazioni:

- Numero della valutazione del metodo effettuata a livello internazionale
- anno
- nome del laboratorio organizzatore
- numero di laboratori, partecipanti
- numero di replicati analizzati da ciascun laboratorio,

e fornire i seguenti risultati statistici:

- Analita; risultato espresso in [unità]
- Materiale [Descrizione ed elenco in ordine crescenti di grandezza della media]
- Numero di laboratori considerato dopo l'eliminazione degli aberranti
- Numero di laboratori devianti

- Codice (designazione) dei laboratori devianti
- Numero di risultati accettati
- Media
- Valore vero o valore accettato (se conosciuto)
- Deviazione standard della ripetibilità (Sr)
- Deviazione standard relativa della ripetibilità (RSDR)
- Limite di ripetibilità r ($2.8 \times Sr$)
- Deviazione standard della riproducibilità (SR)
- Deviazione standard relativa della riproducibilità (RSDR)
- Limite di riproducibilità R ($2.8 \times SR$)

Il limite di ripetibilità r, dovrebbe essere interpretato come il valore all'interno del quale due determinazioni ottenute all'interno di uno stesso laboratorio dovrebbero concordare tra loro nel 95% dei casi. Parimenti per il limite di riproducibilità, ovviamente riferita a due determinazioni ottenute in differenti laboratori, con strumenti differenti.

Una volta completato il lavoro, esso viene mandato all'analisi della Sotto-commissione dell'OIV e, dopo questo vaglio, sottoposto all'approvazione dell'Assemblea.

1.9 SCOPI DELLA TESI

La tesi si propone di dare un panorama sulla pratica dell'arricchimento dei vini, con particolare riferimento all'utilizzo dei mosti concentrati e rettificati. Viene illustrato il panorama storico ed economico-legislativo che ha portato all'attuale situazione critica con la scadenza degli aiuti economici comunitari al loro utilizzo. In tale contesto, la necessità di contenimento ulteriore dei costi di produzione facilmente può portare alla sofisticazione dei mosti concentrati con prodotti alternativi agli zuccheri dell'uva, ma meno costosi (zuccheri invertiti da materie prime più economiche). In questo ambito si inserisce il lavoro sperimentale mirato alla validazione di un metodo per la determinazione del contenuto di mio-inositolo e scillo inositolo nei mosti concentrati e rettificati. Questi due polialcoli del mosto sono caratteristici dell'uva e possono fungere da marcatori di genuinità dei mosti e dei mosti concentrati e rettificati in quanto il processo di produzione non li elimina. Essendo presenti a basse concentrazioni possono essere rivelati tramite gas cromatografia. La metodica, sviluppata da Versini e collaboratori nel 1984, sebbene ed introdotta nella legislazione comunitaria, non è tuttavia ancora stata caratterizzata, ossia non sono ancora stati pubblicati i parametri statistici indicatori della sua affidabilità (es. ripetibilità,

riproducibilità, esattezza, sensibilità...etc); pertanto, nonostante vengano evidenziate le frodi, l'utilizzo del metodo risulta limitante in ambito forense in caso di contestazione delle frodi. Il lavoro di questa tesi, è stato svolto presso l'Istituto per il Controllo della Qualità e Repressione Frodi (ICQRF) di Conegliano che, insieme ad altri 8 laboratori ha partecipato al ring test per ottenere i dati che, a seguito dell'elaborazione statistica, forniranno i risultati necessari per la validazione del metodo.

2. MATERIALI E METODI

2.1 REAGENTI

I reagenti utilizzati sono i seguenti:

Reagente	Ditta	Purezza
glucosio	sigma	100%
fruttosio	sigma	100%±0,1%
saccarosio	Sigma	100%±0,1%
Mio-inositolo	Fluka	100%±0,1%
xylitolo	sigma	Min.99%

2.2 PROTOCOLLI E STRUMENTI

Il protocollo di partenza utilizzato è descritto nel Reg. CEE 2676/90 (lettera f) fig. 2.1:

<p>...omissis...</p> <p>f) MESO-INOSITOLO, SCILLO-INOSITOLO E SACCAROSIO</p> <p>1. PRINCIPIO DEL METODO</p> <p>Cromatografia in fase gassosa di derivati silanizzati.</p> <p>2. REAGENTI</p> <p>2.1. Standard interno: xilitolo (soluzione acquosa di circa 10 g/l aggiunta di una punta di spatola di sodio azide)</p> <p>2.2. Bistrimetilsililfluoroacetamide - BSTFA - (C₈H₁₈F₃NOSi₂)</p> <p>2.3. Trimetilclorosilano (C₃H₉ClSi)</p> <p>2.4. Piridina p. a. (C₅H₅N)</p> <p>2.5. Meso-inositolo (C₆H₁₂O₆)</p> <p>3. APPARECCHIATURA</p> <p>3.1. Gascromatografo dotato di:</p> <p>3.2. Colonna capillare (per esempio in silice fusa, OV 1, spessore del film di 0,15 µ, lunghezza di 25 m e diametro interno di 0,3 mm).</p> <p>Condizioni di lavoro: fase di trasporto: idrogeno o elio</p> <ul style="list-style-type: none">- flusso del gas di trasporto: circa 2 ml/minuto,- temperatura dell'iniettore e del rivelatore: 300 °C,- programmazione di temperatura: 1 minuto a 160 °C, 4 °C/minuto fino a 260 °C, isoterma a 260 °C per 15 minuti,- rapporto di splittaggio: circa 1 a 20. <p>3.3. Integratore.</p> <p>3.4. Siringa micrometrica da 10 µl.</p> <p>3.5. Micropipette da 50, 100 e 200 µl.</p> <p>3.6. Fiale da 2 ml con tappo teflonato.</p> <p>3.7. Stufa.</p> <p>4. MODO DI OPERARE</p> <p>Circa 5 g di MCR, esattamente pesati in un matraccio da 50 ml sono aggiunti di 1 ml di soluzione standard di xilitolo (2.1) e portati a volume con acqua. Dopo omogeneizzazione del campione si prelevano 100 µl di soluzione che si pongono in fiala (3.6) e si portano a secchezza sotto leggera corrente d'aria, previa eventuale aggiunta di 100 µl di etanolo assoluto per facilitare l'evaporazione.</p> <p>Il residuo si scioglie accuratamente in 100 µl di piridina (2.4), si aggiungono 100 µl di bis-trimetilsililfluoroacetamide (2.2) e 10 µl di trimetilclorosilano (2.3), si sigilla la fiala con tappo teflonato e si pone in stufa a 60 °C per un'ora.</p> <p>Si prelevano 0,5 µl del limpido iniettando ad ago vuoto e caldo con lo splittaggio sopraindicato.</p> <p>5. CALCOLO DEI FATTORI DI RISPOSTA</p> <p>5.1. Si prepara una soluzione contenente: glucosio 60 g/l, fruttosio 60 g/l, meso-inositolo 1 g/l e saccarosio 1 g/l. Si pesano 5 g di detta soluzione e si procede come al punto 4. Si calcolano dal cromatogramma ottenuto i fattori di risposta del meso-inositolo e del saccarosio rispetto allo xilitolo.</p> <p>Per lo scillo-inositolo, non disponibile in commercio, che ha un tempo di ritenzione compreso fra l'ultimo picco delle forme anomeriche del glucosio e quello del meso-inositolo (vedi figura allegata), si usa lo stesso fattore di risposta ottenuto per il meso-inositolo.</p> <p>6. ESPRESSIONE DEI RISULTATI</p> <p>6.1. Il meso-inositolo e lo scillo-inositolo si esprimono in mg/kg di zuccheri totali. Il saccarosio si esprime in g/kg di mosto.</p>
--

Fig.2.1 Estratto dal Reg. CEE 2676/90 (lettera f)

apportando le seguenti varianti:

- La miscela silanizzante non viene preparata al momento, ma viene utilizzato il kit Supelco cod. 33038 contenente hexamethyldisilazane (HMDS), trimethylchlorosilane (TMCS), pyridine 3:1:9
- E' stato soppresso il passaggio di aggiunta di etanolo
- La durata della silanizzazione è stata saggiata a 45', 60', 70' tenendo l'ultimo valore per le prove del ring test.
- Essiccazione con azoto anziché aria.
- La temperatura dell'iniettore e del rivelatore è stata ridotta a 250°C.

Lo strumento utilizzato è un gas cromatografo DANI Master, che utilizza il software di analisi Data Apex Clarity™, dotato della colonna capillare sopradescritta. L'elio è stato usato come carrier. Il flusso è stato portato a 3 ml/min, lavorando a pressione costante. Il grado Brix è stato misurato sugli MCR di partenza, utilizzando un rifrattometro Mettler-Toledo.

Il calcolo del fattore di diluizione è stato effettuato applicando la formula:

$$\text{fattore di diluizione} = (100/^\circ\text{Brix}) * 5 / \text{peso MCR(g)} * 10$$

Tale valore è stato inserito nel programma Clarity per la quantificazione.

2.3 PROVE PRELIMINARI

Per le prove di ottimizzazione della dose di silanizzante e del tempo di reazione è stato utilizzato un MCR a disposizione in laboratorio.

Lo stesso MCR è stato utilizzato per effettuare le prove per individuare il limite di rilevabilità, diluendo il campione con una soluzione di glucosio e fruttosio 1:1 (600 g/l totali) in modo da avere il MCR 1:5 e 1:10.

2.4 RING TEST

Nella prova ufficiale sono stati analizzati le aliquote di 4 campioni di MCR preparati dell'ENEA ed inviati a tutti i laboratori coinvolti nel ring test. I campioni sono nominati con "livello 1...4.

Accanto ai campioni è stata inviata una soluzione di riferimento contenente la miscela analiti da quantificare.

Materiali, strumenti e condizioni sono stati mantenuti costanti. Le prove sono state effettuate in triplicato indipendente ed in condizioni di ripetibilità stretta.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 PROVE PRELIMINARI ED ESAME DEI PUNTI CRITICI

Il punto di partenza è stato il protocollo pubblicato sulla gazzetta ufficiale comunitaria in fig.3.1:

Gazzetta ufficiale dell'Unione europea n 193 del 24.7.2009

ALLEGATO IV

....omissis

f) **Meso-inositolo, scillo-inositolo e saccarosio**

1. Principio
Gascromatografia di derivati silanizzati.

2. Reattivi

2.1. Standard interno: xilitolo (soluzione acquosa di circa 10 g/l addizionata con una punta di spatola di sodio azide).

2.2. Bistrimetilsililtrifluoroacetamide — BSTFA — (C₈H₁₈F₃NOSi₂)

2.3. Trimetilclorosilano (C₃H₉ClSi)

2.4. Piridina p.a. (C₅H₅N)

2.5. Meso-inositolo (C₆H₁₂O₆)

3. Apparecchiatura

3.1. Gascromatografo provvisto di:

3.2. Colonna capillare (ad esempio in silice fusa, OV 1, spessore del film di 0,15 µ, lunghezza di 25 m e diametro interno di 0,3 mm).

Condizioni operative: gas di trasporto: idrogeno o elio
— flusso del gas di trasporto: circa 2 ml/minuto,
— temperatura dell'iniettore e del rivelatore: 300 °C,
— programmazione di temperatura: 1 minuto a 160 °C, 4 °C/minuto fino a 260 °C, isoterma a 260 °C per 15 minuti,
— rapporto di splittaggio: circa 1 a 20.

3.3. Integratore.

3.4. Siringa micrometrica da 10 µl.

3.5. Micropipette da 50, 100 e 200 µl.

3.6. Fiale da 2 ml con tappo teflonato.

3.7. Stufa.

4. Modo di operare

Circa 5 g di mosto concentrato rettificato, pesati esattamente in un matraccio da 50 ml, sono addizionati di 1 ml di soluzione standard di xilitolo (punto 2.1) e portati a volume con acqua. Dopo omogeneizzazione del campione, si prelevano 100 µl di soluzione che si pongono in una fiala (punto 3.6) e si portano a secchezza sotto leggera corrente d'aria, previa eventuale aggiunta di 100 µl di etanolo assoluto per facilitare l'evaporazione.

Il residuo si scioglie accuratamente in 100 µl di piridina (punto 2.4), si aggiungono 100 µl di bistrimetilsililtrifluoroacetamide (punto 2.2) e 10 µl di trimetilclorosilano (punto 2.3), si sigilla la fiala con tappo teflonato e si pone in stufa a 60 °C per un'ora.

Si prelevano 0,5 µl del limpido iniettando ad ago vuoto e caldo con lo splittaggio sopraindicato.

5. Calcolo dei fattori di risposta.

5.1. Preparare una soluzione contenente: 60 g/l di glucosio, 60 g/l di fruttosio, 1 g/l di meso-inositolo e 1 g/l di saccarosio.

Si pesano 5 g di detta soluzione e si procede come al punto 4. Si calcolano dal cromatogramma ottenuto i fattori di risposta del meso-inositolo e del saccarosio rispetto allo xilitolo.

Per lo scillo-inositolo, non disponibile in commercio, che ha un tempo di ritenzione compreso fra l'ultimo picco delle forme anomeriche del glucosio e quello del meso-inositolo (cfr. figura allegata), utilizzare lo stesso fattore di risposta ottenuto per il meso-inositolo.

6. Espressione dei risultati

6.1. Il meso-inositolo e lo scillo-inositolo si esprimono in mg/kg di zuccheri totali.

Fig. 3.1 Estratto dalla G:U:n 193 del 24.7.2009 nella parte riguardante la determinazione del mio-inositolo

Si è iniziato con un'attenta analisi del protocollo al fine di evidenziarne i punti critici e verificare dove potevano essere introdotte delle modifiche migliorative. E' stata considerata inopportuna l'aggiunta di sodio azide, antimicrobico tossico, nella soluzione di xilitolo in quanto la soluzione è stata fatta con acqua sterile in un contenitore pulito e la soluzione era destinata ad essere usata in breve tempo.

Per quanto riguarda la silanizzazione, si è ritenuto che l'utilizzo di un kit commerciale standardizzato potesse essere vantaggioso in contesti di validazione e di analisi accreditate in quanto il prodotto è più standardizzato rispetto alle soluzioni preparate in laboratorio. La forte sensibilità dei suddetti reagenti nei confronti dell'umidità renderebbe necessario preparare la soluzione molto spesso e, date le piccole quantità necessarie, le riduzioni in termini di precisione potrebbero non essere trascurabili. D'altro canto, aumentare i volumi di reazione comporterebbe perdita di materiale e per di più, essendo tossico, un aumento delle spese di smaltimento.

Con le prove preliminari è stata ottimizzata la quantità di silanizzante al fine di avere una completa reazione con gli zuccheri evitando sprechi di reagente. La miscela, infatti, differisce da quella del protocollo ufficiale in quanto il silanizzante bis-trimetilsililtrifluoroacetamide è stato sostituito con l'esametildisilazano; essendo differente l'efficienza dei diversi silanizzanti non si sono potuti i stessi volumi descritti come riferimento.

Per silanizzare 100 µl di campione, dosi pari a 300 µl di miscela derivatizzante si sono rivelate a volte insufficienti per ottenere la reazione completa di tutti gli zuccheri. In particolare in questo caso è stata notata una maggiore densità dei picchi in prossimità del mio-inositolo ed una drastica riduzione del contenuto di quest'ultimo rispetto alle aspettative.

Il volume iniziale è stato scelto considerando di utilizzare una fiala (volume nominale 1 ml) per tre campioni, o meglio, per un campione in triplicato. Una volta aperta, la fiala va utilizzata ed eventuali residui non possono essere conservati. Nella pratica, il volume della fiala è 1,2 ml, quindi, con un puntale lungo e sottile si riesce a recuperare rapidamente tutto il prodotto ed utilizzarlo per 3 campioni.

Il tentativo di ridurre il tempo di reazione a 45' non ha dato risultati soddisfacenti, anzi, si è ritenuto opportuno incrementarlo a 70' rispetto ai 60' descritti nel protocollo.

L'estrema sensibilità dei reagenti all'umidità induce a fare particolare attenzione al processo di disidratazione del campione; in questo senso, un punto critico è la calibrazione del flusso di azoto per evitare che un'eccessiva pressione del gas sul liquido faccia spruzzare le gocce in parti del flacone che non verranno poi bagnate dal silanizzante (depositato sul

fondo per evitare dispersione del reagente). L'aggiunta di etanolo per ridurre il tempo di evaporazione è stato giudicato superfluo, visto che il tempo di essiccazione è di circa 10 minuti/campione.

E' stato verificato che i campioni silanizzati non hanno perdite significative nell'arco delle 24 ore se accuratamente chiusi e mantenuti al buio. E' sconsigliabile una conservazione di più lunga durata.

3.2 PROVE DI RILEVABILITA' DEL MIO-INOSITOLO.

Allo scopo di verificare l'intervallo di applicazione del metodo è stata allestita una prova con MCR a diverse dosi di mio-inositolo, ottenute tramite diluizione del MCR o con aggiunta di una soluzione stock dell'analita durante la preparazione del campione. La diluizione del mosto è stata effettuata con una soluzione di glucosio e fruttosio 1:1 (600 g/l totale) ad imitazione della composizione del MCR per evitare effetti negativi sulla riproducibilità dovuti al cambio della matrice. L'aggiunta di mio-inositolo, invece, è stata effettuata in fase di diluizione del campione, aggiungendo 2 ml di una soluzione stock 1 g/l. I risultati sono esposti in Tab.3.1:

livello	n. ripetizioni	media mg/l	ds	cv%
ld2	3	3990	1732	43,4
tal quale	5	2214	57	2,6
diluito 1:5	6	456	54	11,7
diluito 1:10	3	172	14	7,9

Tab 3.1 Quantificazione del mio-inositolo in campioni di MCR preparati *ad hoc*

Come emerge dall'analisi dei dati ottenuti, ad eccezione del campione addizionato di mio-inositolo, la deviazione standard è stata valutata accettabile (considerando che si tratta di prove preliminari). Nel suddetto campione l'errore è particolarmente elevato essendo tutti e i tre campioni molto diversi (non è stato possibile escludere dei devianti). Sarebbe stato auspicabile aumentare il numero di ripetizioni e far luce sulla fonte di variabilità. Tuttavia, considerata la linearità dei risultati ottenuti con le medie (fig. 3.2), si è deciso di non ripetere il campione. La deviazione standard anche nei diluiti è accettabile, sicuramente per coprire l'intervallo di variazione dei contenuti di inositolo dei MCR.

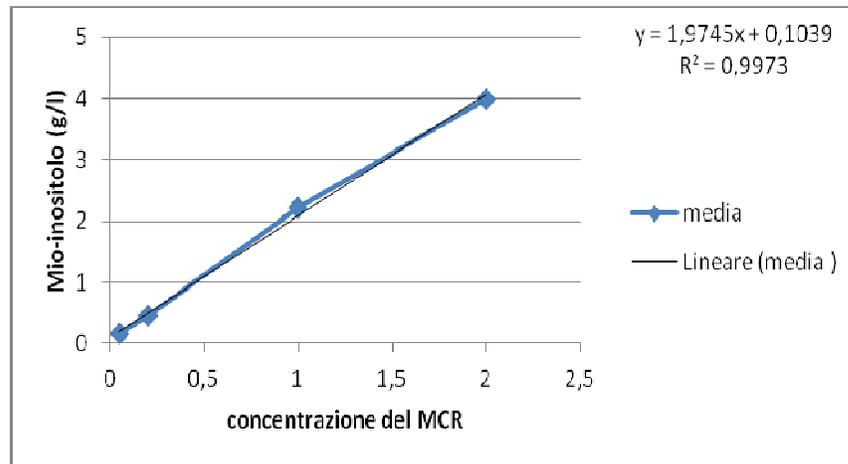


Fig. 3.2 Quantificazione del mio-inositolo in campioni di MCR preparati ad hoc

Tuttavia una certa disomogeneità del campione può essere dovuta alla sua conservazione in frigo, dove una parte di cristallizzazione non visibile potrebbe essere avvenuta.

Ulteriori prove svolte all'interno dello stesso laboratorio avevano tuttavia individuato un limite di rilevabilità pari a 15 mg/kg ed un limite di quantificazione di 50 mg/kg (Fugaro, comunicazione personale).

In questa prova non si è preso in considerazione lo scillo-inositolo in quanto è rilevabile solo nel campione tal quale. Parimenti il saccarosio, trattandosi di un campione regolare, non era presente e non è stato aggiunto. Questo zucchero è rilevabile con altre metodiche ufficiali, più semplici quali l'HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*).

3.3 RING TEST

Nella prova ufficiale sono stati analizzati le aliquote di 4 campioni di MCR preparati dell'ENEA ed inviati a tutti i laboratori coinvolti nel ring test. I campioni sono nominati con "livello 1-2-3-4" Accanto ai campioni è stata inviata una soluzione di riferimento contenente gli analiti da quantificare allo scopo di individuare le fonti di variabilità. Le prove sono state effettuate in triplicato indipendente.

Una volta verificata la correttezza dell'assegnazione automatica dei picchi da parte del software, forniti i dati di diluizione dei campioni (vedi di seguito) e la concentrazione dello standard interno, il programma calcola automaticamente la concentrazione delle sostanze corrispondenti ai picchi assegnati. In fig. 3.1 è illustrato un esempio di corsa cromatografica del mosto livello 1 e per paragone la corsa alle stesse condizioni della soluzione acquosa con i soli analiti (eccetto lo scillo-inositolo).

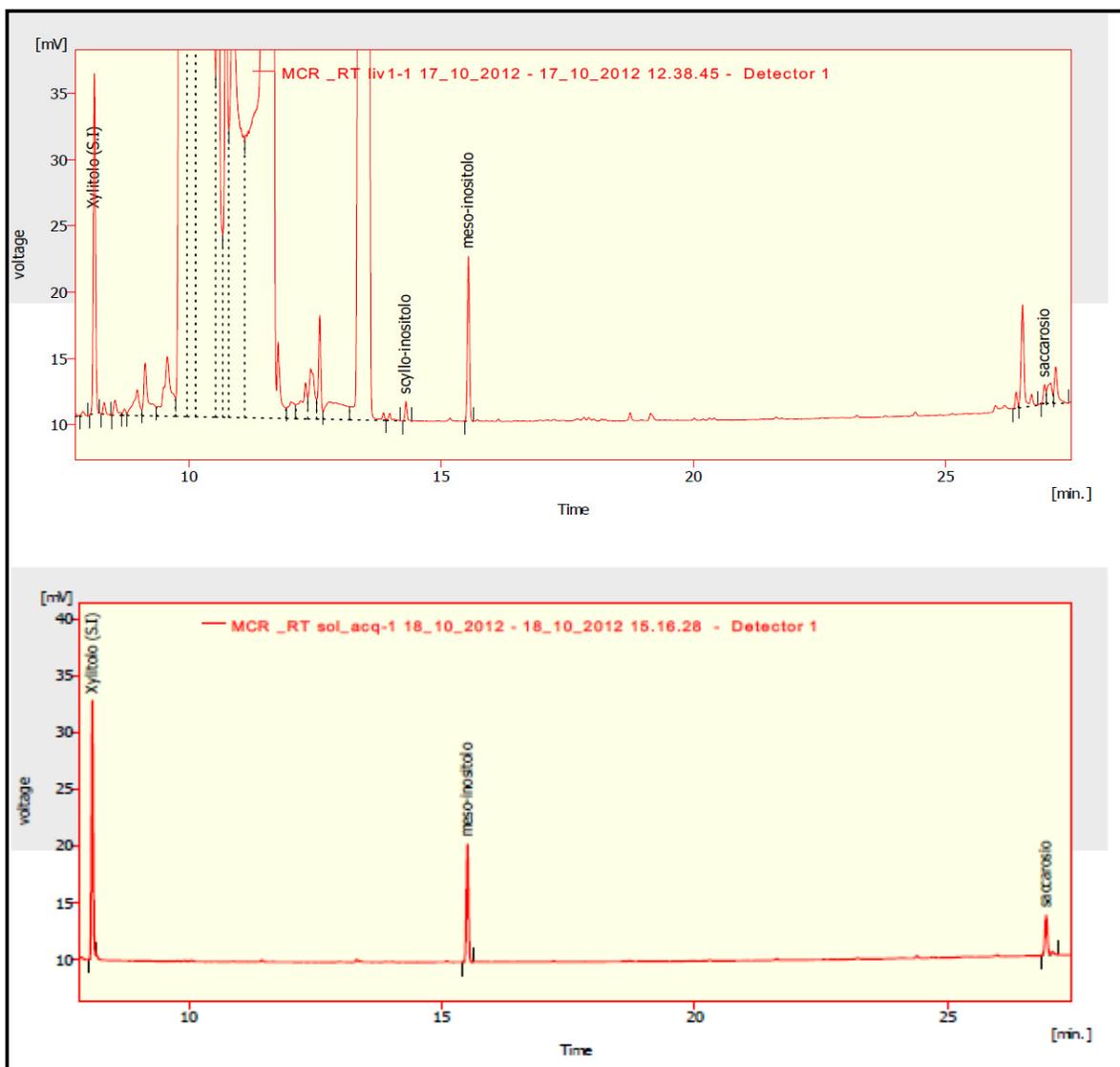


Fig.3.3 Esempio di cromatogramma (livello 1)in alto e cromatogramma dei soli analiti (in basso)

Come si vede dal cromatogramma (fig. 3.3), il picco dello standard interno (xilitolo) esce molto chiaro e distinto ad 8 minuti dall'inizio della corsa; dopo una serie complessa di composti silanizzati non identificati; a 14,3 minuti esce il picco dello scillo-inositolo, anch'esso ben distinto, e a quasi 16 minuti si vede il picco del mio-inositolo. Il saccarosio esce dopo 27 minuti, ma il suo picco non è ottimale a livello di separazione.

Non si è ritenuto opportuno modificare il protocollo, allungando ulteriormente la corsa, per poterlo distinguere meglio in quanto questo zucchero è rilevabile già con altre metodiche ufficiali, più semplici quali l'HPLC che non richiede preparative particolarmente lunghe.

Sarebbe stato tuttavia interessante poter quantificare tutti e tre gli analiti contemporaneamente con la stessa corsa.

In tabella 3.1 sono riassunti i dati grezzi ottenuti dall'elaborazione delle corse cromatografiche:

LIVELLI	REPLICA	PESO MOSTO	°BRIX	°BRIX MEDIO	FATTORE DILUIZIONE	meso inositolo (mg/kg)	scillo inositolo (mg/kg)	saccarosio (g/kg)
livello 1	1-1	5,0003	62,9	62,9	15,90	1206	143	0,4
	1-2	5,0127	63,0		15,86	1247	151	0,5
	1-3	5,0171	62,8		15,84	1286	143	0,4
livello 2	2-1	5,0028	62,8	62,9	15,90	1573	142	1,0
	2-2	5,0348	62,9		15,80	1563	138	0,9
	2-3	5,0351	62,9		15,80	1595	131	0,9
livello 3	3-1	5,0189	62,9	62,9	15,83	1977	138	1,2
	3-2	5,0259	62,9		15,81	1909	130	1,3
	3-3	5,0434	63,0		15,75	1965	137	1,3
livello 4	4-1	5,0056	63,1	63,1	15,84	2876	148	2,6
	4-2	5,0307	63,0		15,76	2981	147	2,7
	4-3	5,0076	63,1		15,83	2979	140	2,6
soluzione di riferimento	FR1	5,0323				1084	0	0,7
	FR2	5,0311				1132	0	0,8
	FR3	5,0430				1005	0	0,7

Tab 3.2 dati grezzi ottenuti dall'elaborazione delle corse cromatografiche

Dai dati precedenti è stata calcolata la deviazione standard e la deviazione standard relativa percentuale (CV%) per ciascun livello (tab. 3.2):

	meso inositolo (mg/kg)			scillo inositolo (mg/kg)			saccarosio (g/kg)		
	media	ds	CV%	media	ds	CV%	media	ds	CV%
1	1246	40,0	3,2	145,7	4,6	3,2	0,4	0,1	13,3
2	1577	16,4	1,0	137,0	5,6	4,1	0,9	0,1	6,2
3	1950	36,3	1,9	135,0	4,4	3,2	1,3	0,1	4,6
4	2945	60,1	2,0	145,0	4,4	3,0	2,6	0,1	2,2
SR	1074	64,1	6,0	0,0	0,0	0,0	0,7	0,1	7,9

Tab 3.3 Elaborazione statistica dei dati ottenuti dalla quantificazione in GC

L'elaborazione grafica rende più immediato il risultato (fig.3.4):

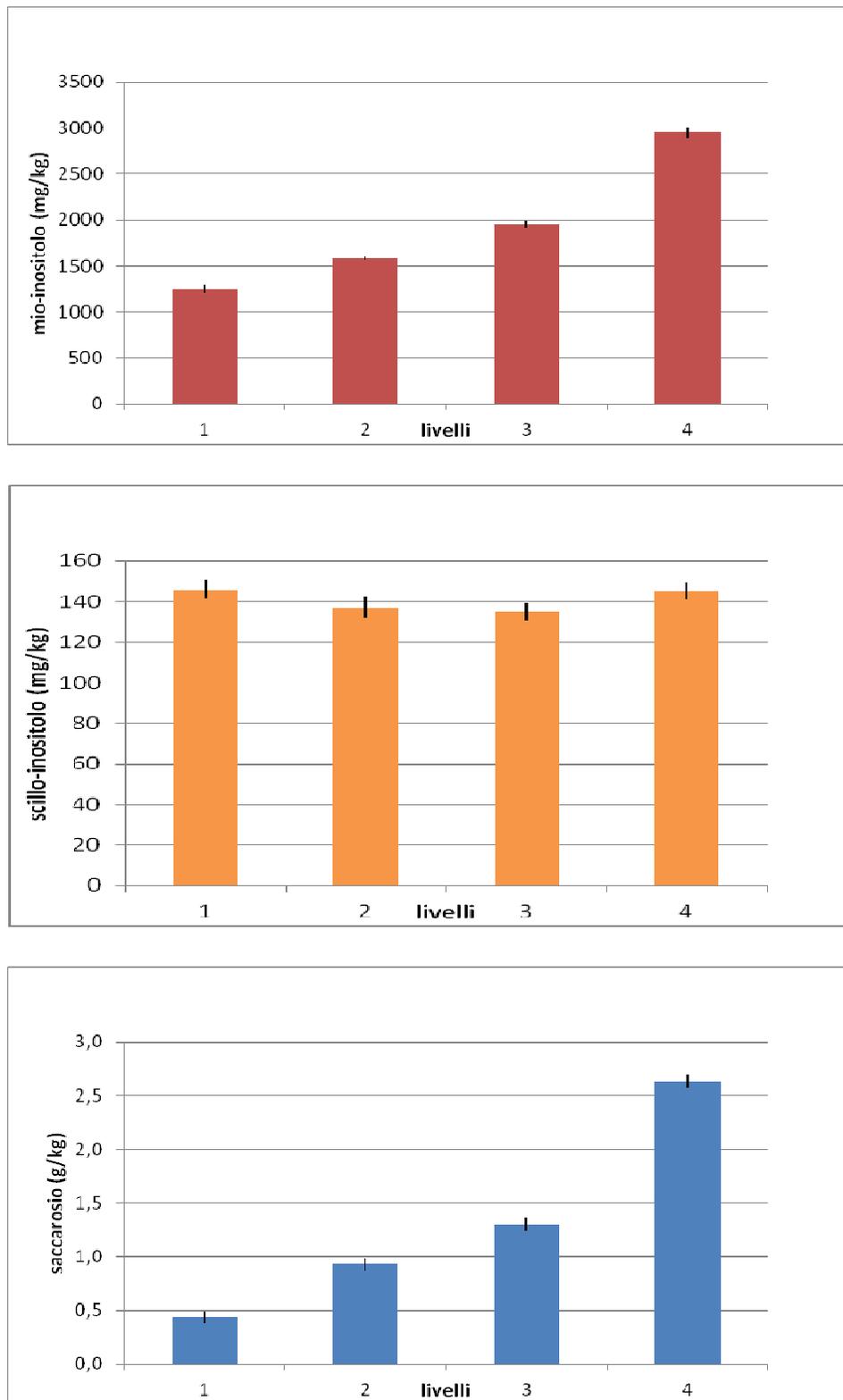
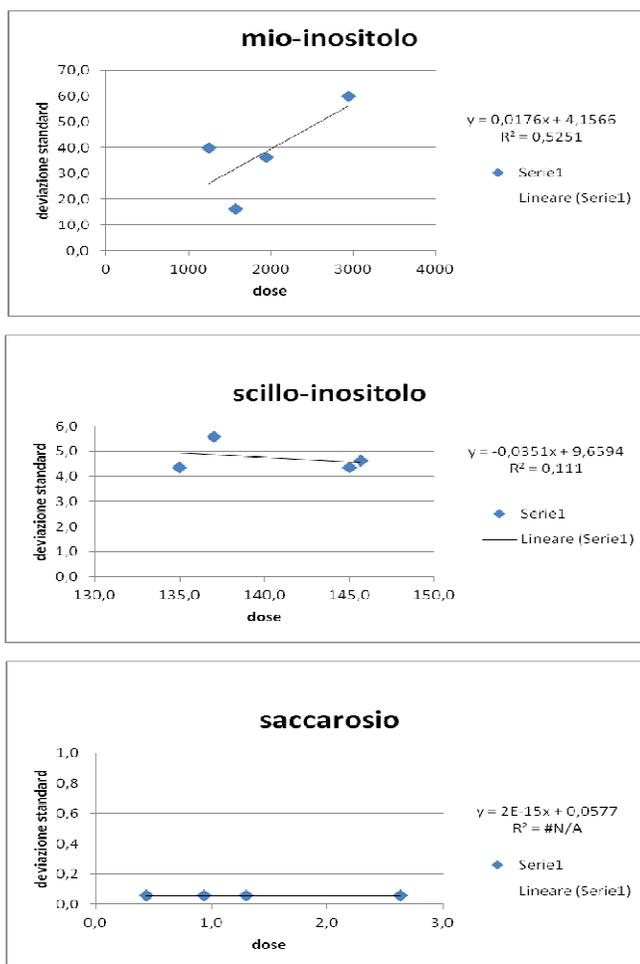


Fig.3.4 Concentrazioni di meso-inositolo; scillo-inositolo e saccarosio riscontrati nei 4 livelli. Le barre d'errore indicano la deviazione standard delle tre repliche indipendenti.

Come si può evincere dai grafici, il livello di precisione è soddisfacente per i tre zuccheri. Mentre ai vari campioni è stato aggiunto sia saccarosio che mio-inositolo, lo scillo-inositolo è quello contenuto naturalmente nei mosti. Questo isomero, infatti, è particolarmente costoso e di difficile reperibilità, soprattutto per il grado di purezza necessario per queste prove. Le concentrazioni rivelate per ciascun livello, infatti non hanno una differenza significativa, mentre nella soluzione di riferimento è totalmente assente.

Nonostante la deviazione standard generalmente non sia molto elevata, si è verificato se questa in parte potesse essere legata alla dose di analiti. Come si vede dai grafici che mettono in relazione la dose alla deviazione standard (fig.3.5), non vi è alcuna correlazione tra i due parametri (nel migliore dei casi R^2 è 0,5).



**Fig.3.5 Relazione tra deviazione standard e dose di analita:
per i tre analiti non c'è correlazione**

Poiché la deviazione standard della soluzione acquosa di analiti è superiore a quella dei campioni, si deduce che non esiste alcun effetto matrice che possa contribuire a rendere il metodo meno preciso.

Per poter procedere al completamento dell'elaborazione statistica necessaria per la validazione del metodo sono necessari i dati ottenuti dagli altri laboratori partecipanti al *ring test*. Purtroppo questi non sono giunti nei tempi previsti, nonostante le proroghe concesse. Non tutti i laboratori coinvolti hanno la stessa confidenza con il protocollo e con il tipo di matrice; come spesso accade, una nuova metodica richiede del tempo per la messa a punto con la strumentazione a disposizione, anche se il protocollo è dettagliato e vincolante.

Con i dati a disposizione è stato tuttavia possibile procedere ad una stima dell'incertezza (u), basandosi sull'equazione empirica di Horwitz. Tale equazione viene utilizzata ogni qualvolta non siano disponibili dati provenienti da più laboratori per calcolare l'incertezza con dati sperimentali veri e propri. Non sempre, infatti è possibile eseguire dei *ring test*, o perché strumenti e tecniche particolari sono presenti in un solo laboratorio o perché l'analisi in gruppo richiederebbe la diffusione di materiale potenzialmente protetto da brevetto (es. chimica farmaceutica)

L'equazione di Horwitz permette di calcolare la deviazione standard relativa percentuale, in base alla sua sola concentrazione, a prescindere dalla natura dell'analita della matrice e dal metodo di misura impiegato:

$$\text{RDS}\% = 2[1 - 0,5 \log(C)]$$

da questo è possibile calcolare lo scarto tipo di riproducibilità:

$$\sigma_R = \text{RDS}\% \cdot C/100$$

quindi si verifica che il proprio scarto sia compreso tra $\frac{1}{2} \sigma_R \leq S_r \leq \frac{2}{3} \sigma_R$, o nei casi di ripetibilità migliore che $S_r \leq \frac{1}{2} \sigma_R$.

Utilizzando i dati ottenuti nell'esperimento si può non solo verificare la bontà della deviazione standard, ma anche procedere al calcolo dell'incertezza (U), considerando $U = 2 \cdot S_r$ (2 = fattore di copertura ad un livello di confidenza del 95%). I risultati sono esposti nelle 3.4:

MIO-INOSITOLO						
media mg/kg	RSDR Horwitz	SR	sr=SR*0,5	sr=0,66*SR	ds	U=2*SR
1246	5,66	70	35	47	40,0	141
1577	5,66	89	45	59	16,4	178
1950	5,66	110	55	73	36,3	221
2870	5,66	162	81	107	60,1	325

SCILLO-INOSITOLO						
media mg/kg	RSDR Horwitz	SR	sr=SR*0,5	sr=0,66*SR	ds	U=2*SR
145,7	8,0	12	6	8	4,6	23
137,0	8,0	11	5	7	5,6	22
135,0	8,0	11	5	7	4,4	22
145,0	8,0	12	6	8	4,4	23

SACCAROSIO						
media mg/kg	RSDR Horwitz	SR	sr=SR*0,5	sr=0,66*SR	ds	U=2*SR
0,43	22,63	0,1	0,05	0,06	0,058	69
0,93	22,63	0,21	0,11	0,14	0,058	149
1,30	16	0,21	0,10	0,14	0,058	147
2,66	16	0,42	0,28	0,28	0,058	301

Tab 3.4 Elaborazione statistica dei dati secondo la formula di Horwitz

Quindi, secondo Horwitz i dati ottenuti sono accettabili e potranno essere espressi nel seguente modo:

	mio-inositolo			scillo-inositolo			saccarosio		
	g/Kg	±	U	g/Kg	±	U	g/Kg	±	U
livello 1	1,25	±	0,14	0,15	±	0,02	0,43	±	0,20
livello 2	1,58	±	0,18	0,14	±	0,02	0,93	±	0,42
livello 3	1,95	±	0,22	0,14	±	0,02	1,30	±	0,42
livello 4	2,87	±	0,32	0,15	±	0,02	2,63	±	0,84

Quindi, anche nel caso del saccarosio, pur essendoci una deviazione standard relativamente elevata rispetto agli altri analiti, l'elaborazione statistica di Horwitz fornisce un range di valori di incertezza sui quali basarsi in assenza di dati di riproducibilità effettuati con la specifica tecnica nelle condizioni dettate dal protocollo.

E' presumibile che i dati di incertezza originati dall'elaborazione statistica del *ring test* siano diversi e probabilmente avranno un intervallo di incertezza più ampio rispetto a quelli ottenuti in questo esperimento. Poiché questa analisi è mirata alla rivelazione delle frodi ed è possibile che ci siano riscorsi sui risultati delle analisi, è fondamentale che l'intervallo di incertezza possa essere sufficientemente ampio da non incorrere in falsi positivi da parte di tutti i laboratori autorizzati che lavorano con sistemi accreditati.

Concludendo, per quanto l'analisi possa essere soltanto parziale se non confrontata con i dati degli altri laboratori, i risultati ottenuti hanno consentito di ottenere i dati di ripetibilità stretta e di incertezza del metodo. Essi risultano soddisfacenti per quanto riguarda la quantificazione di mio- e scillo- inositolo e saccarosio, anche se per quest'ultimo l'OIV prevede la quantificazione con HPLC, metodica già caratterizzata ufficialmente. La cromatografia liquida, però, è un metodo molto meno sensibile e meno ripetibile rispetto alla gas cromatografia; infatti la ripetibilità della determinazione del saccarosio nei mosti, secondo il metodo OIV, risulta essere pari a 1,1 g/kg, rispetto al dato gas cromatografico qui ottenuto che si attesta sui 0,1 g/kg. Se i dati verranno confermati dagli altri laboratori, si potrà avere a disposizione un metodo che, per quanto più laborioso, fornisce i dati per tre analiti contemporaneamente e con un limite di rilevabilità del saccarosio molto inferiore al precedente.

NOTA:

I dati riportati in questa tesi sono di proprietà dell'ICQRF di Conegliano. L'utilizzo per il presente elaborato è stato richiesto ed approvato dal Direttore dei laboratori della suddetta sezione, Dott. Giacomo Gagliano, e dal Responsabile del progetto, Dott. Michele Fugaro. La riproduzione o l'utilizzo dei dati presentati per motivi diversi dalla tesi dovranno essere richiesti al suddetto ente.

4.CONCLUSIONI

La normativa comunitaria in materia viticolo enologica regola abbastanza minuziosamente tutti gli aspetti della produzione ed immissione in commercio del vino. E' un complesso di disposizioni che ha non solo una funzione amministrativa, ma anche di accompagnamento dell'evoluzione del comparto verso obiettivi di miglioramento qualitativo delle produzioni ottenute. Per tale ragione nell'OCM vino sono previste le cosiddette "misure di sostegno" cioè contributi finanziari per determinate attività. Una di queste misure consiste nella concessione al produttore di un finanziamento comunitario per l'arricchimento del vino in annate particolarmente sfavorevoli alla produzione di zuccheri da parte della vite e di conseguenza si ottengono vini con ridotto grado alcolico. Il finanziamento comunitario è concesso solo per l'arricchimento con MC o MCR in quanto prodotti ottenuti dal mosto d'uva e quindi più costosi del saccarosio da barbabietola utilizzato, legalmente, nelle zone viticole comunitarie a clima meno favorevole del nostro. La possibilità di arricchire il vino ha sempre sollevato discussioni soprattutto in relazione al fatto che si dava la patente di vino ad un prodotto che naturalmente non ne avrebbe avuto le caratteristiche. E', però, anche vero che in alcuni Paesi l'aggiunta di saccarosio è una tradizione radicata difficile da modificare. Il legislatore ha mediato assicurando a questi ultimi di continuare a farlo e agli altri (sostanzialmente i Paesi mediterranei) un sostegno all'arricchimento con zucchero derivato dall'uva per compensare i maggiori costi di produzione dei mosti concentrati e mettere quindi su un piede di parità i produttori dei diversi Paesi della Comunità. L'utilizzo dei mosti concentrati aveva, però, anche un'altra finalità: drenare vino potenziale da un mercato strutturalmente saturo per le politiche di sostegno del prezzo perseguite dalle prime OCM. L'arricchimento, poi, da misura eccezionale è diventata una pratica adottata annualmente ed ha determinato, così, analogamente a quanto riscontrato per la distillazione, un mercato di tale prodotto. L'impegno finanziario comunitario mancava così, almeno in parte, l'obiettivo per cui era stato istituito e l'attuale OCM vino, prendendone atto, ne ha decretata l'abolizione. Il che non significa che l'arricchimento sia pratica vietata, ma solo che ora non è più sostenuto dalle finanze comunitarie. Resta aperta la questione se arricchire con saccarosio o con mosti concentrati. Non è una questione da poco ed è molto dibattuta, ma attiene principalmente alla sfera tecnica e non a quella normativa; in altre parole, dovranno prima essere i produttori ad individuare la scelta ottimale. In linea generale l'aumento di alcol nel vino è ottenibile mediante l'aggiunta di sostanze zuccherine, meno costano più alto è il guadagno. Per evitare che con pubblico denaro si arricchisse il vino con zuccheri non derivati dall'uva e quindi si creasse un illecito guadagno, la Comunità

ha disposto determinate procedure, registrazioni e controlli per la produzione e l'utilizzo del MC e MCR. Non solo, ma accanto alle metodiche analitiche di controllo di qualità, ha anche stabilito un protocollo per la valutazione della genuinità dei mosti basata sulla determinazione del contenuto polialcoli minori (mio- e scillo-inositolo), esclusivi del mosto d'uva e che pertanto costituiscono gli indicatori di corretta origine dei suoi derivati. Questa metodica è basata sul lavoro scientifico di Versini e collaboratori (1984) , ma per dare la possibilità di un uso ufficiale dell'analisi, il protocollo è stato inserito nella legislazione comunitaria; tuttavia, per renderlo incontestabile in sede forense, è necessaria una sua validazione, a seguito della quale avviene il riconoscimento da parte dell'OIV (Organizzazione Internazionale della Vite e del Vino) e quindi della UE. Nell'ambito della validazione di un metodo analitico è prevista l'organizzazione *ring test* che vede coinvolti un numero stabilito di laboratori che conducono l'analisi con le stesse modalità; nel caso presentato nella tesi, il lavoro è stato svolto presso il laboratorio dell'ICQRF di Conegliano che, insieme ad altri 8 laboratori, ha svolto le analisi sugli stessi campioni ciechi preparati da un laboratorio esterno. Dall'analisi dei dati ottenuti si evidenzia che il protocollo previsto dalla normativa comunitaria e seguito nella prova, consente la determinazione dei due polialcoli citati con una buona ripetibilità. Tale risultato potrebbe essere stato sicuramente più significativo se si fosse potuto disporre anche dei dati degli altri laboratori partecipanti al ring test per completare l'analisi statistica per la validazione.

Come già detto i risultati finali del ring test, che ragionevolmente si ritiene confermino quelli ottenuti a Conegliano, verranno poi riconosciuti dall'OIV per la definitiva validazione del metodo d'analisi. Allo stato attuale, sulla base dei dati ottenuti, si ritiene di poter anche proporre la sostituzione delle parole "presenza di meso-inositolo", nel testo del protocollo riportato nel Reg.(CE) 606/2009, con l'indicazione dei valori minimi di concentrazione dei due polialcoli rispetto al contenuto di zuccheri totali.

5. BIBLIOGRAFIA

- Amandola G., Terreni G., (1997) *Analisi chimica strumentale e tecnica*, VI ed, ZANICHELLI.
- Amati A., Galassi S., Marignetti N. (1983) La produzione industriale del mosto concentrato rettificato. *Vignevini* VII (7-8) 29-33.
- Atkinson K D, Kolat A I and Henry S A (1977) Osmotic imbalance in inositol-starved spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 132(3): 806–817.
- AA.VV "Protocol for the design, conducts and interpretation of collaborative studies" (1995) In: *Pure & Appl. Chem.* 60, 855-864
- Caridi A. (2002) Protective agents used to reverse the metabolic changes induced in wine yeasts by concomitant osmotic and thermal stress. *Letters in Applied Microbiology* 35, 98–101
- Caviglia P., (2001) *Manuale di diritto vitivinicolo*. Calderini Edagricole.
- Clements RS Jr, Darnell B. (1980). "Myo-inositol content of common foods: development of a high-myo-inositol diet". *American Journal of Clinical Nutrition* .33(9) 1954-1957.
- Ciolfi G. (1982) Sul fabbisogno di inositolo come fattore di crescita e attivatore di fermentazione di *Saccharomyces uvarum*. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*). v. 35(12) p. 560-570
- De Vita G., De Vita P. (1994) *Corso di Meccanica Enologica*. Ed. Hoepli pag 190-205
- Ente Nazionale Italiano di Unificazione (UNI) *UNI CEI ENV 13005" (2000) "Guida all'espressione dell'incertezza di misura" Milano, UNI.*
- Eur-lex.europa.eu: tutti i regolamenti citati nella tesi.
- Fux M, Levine J, Aviv A, Belmaker RH (1996). "Inositol treatment of obsessive-compulsive disorder". *American Journal of Psychiatry* 153 (9): 1219–21.
- Giordano D, Corrado F, Santamaria A, Quattrone S, Pintaudi B, DiBenedetto A, D'Anna R (2011). "Effects of myo-inositol supplementation in postmenopausal women with metabolic syndrome: a perspective, randomized, placebo-controlled study". *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society* 18 (1): 102–104..
- Horwitz W., (1997) A heuristic derivation of the Horwitz curve. *Anal. Chem.* 69 (4) 789-790.
- Hurrell RF (2003). Influence of vegetable protein sources on trace element and mineral bioavailability. *The Journal of Nutrition* 133 (9): 2973S–7S.
- Iuorno M J, Jakubowicz D J, Baillargeon J P, Dillon P, Gunn R D, Allan G, Nestler J E (2002). "Effects of d-chiro-inositol in lean women with the polycystic ovary syndrome". *Endocr Pract* 8 (6): 417–423.
- Joint Committee for Guides in Metrology (JCGM), (2008) *International Vocabulary of Metrology, Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM)*, III ed., Pavillon de Breteuil : JCGM 200:2008 (on-line); UNI CEI 70099:2008, "Vocabolario Internazionale di Metrologia - Concetti fondamentali e generali e termini correlati (VIM)". Milano : Ente Nazionale Italiano di Unificazione.

- Larner J (2002). D-chiro-inositol--its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance. *Int J Exp Diabetes Res* 3 (1): 47–60.
- Levine J, Barak Y, Gonzalves M, Szor H, Elizur A, Kofman O, Belmaker RH. (1995). Double-blind, controlled trial of inositol treatment of depression. *American Journal of Psychiatry* 152 (5): 792–794.
- Marina Patriarca, Ferdinando Chiodo et al. (a cura di), (2000) *Quantificazione dell'incertezza nelle misure analitiche, Seconda edizione della Guida EURACHEM / CITAC CG 4*. Roma: Istituto Superiore di Sanità, Rapporti ISTISAN 03/30, 2003 (e-text)
- Martin G.J.; Brun S. (1987) Application de la résonance magnétique nucléaire du deutérium au controle des mouts, des mouts concentrés, du sucre de raisin et des vins (R.M.N.-F.I.N.S./S.N.I.F.-N.M.R.). *Bull. O.I.V.* 1987, 671-672, 131-145.
- Martin G. J.; Danho D.; Vallet C. (1991) Natural isotope fractionation in the discrimination of sugar origins. *J. Sci. Food Agric.* 56, 419-434.
- Martin G. J.; Guillou C.; Martin M. L.; Cabanis M.-T.; Tep Y.; Aerny J. (1988) Natural factors of isotope fractionation and the characterization of wines. *J. Agric. Food Chem.* 1988, 36,316-322.
- Martin, G. J.; Guillou, C.; Naulet, N.; Brun, S.; Tep, Y.; Cabanis, J.-C.; Cabanis, M.-T.; Sudraud, P. (1986) Control of origin and enrichment of wine by specific isotope analysis. *Sci. Aliments* 6, 385-405.
- Martin, G. J.; Martin, M. L. ; (1988) The site-specific natural isotope fractionation-NMR method applied to the study of wines. In *Modern methods of plant analysis*; Linskens, H. F., Jackson, J. F., Eds.; Springer: Berlin, Vol. 6, Chapter 9.
- Martin, G. J.; Martin, M. L.; Mabon, F.; Michon, M. J. (1982), Identification of the origin of natural alcohols by natural abundance hydrogen-2 nuclear magnetic resonance. *Anal.Chem.* 54, 2380-2382.
- Martin, G. J.; Zhang, B. L.; Naulet, N.; Martin, M. L. (1986) Deuterium transfer in the bioconversion of glucose to ethanol studied by specific isotope labeling at the natural abundance level. *J. Am. Chem. Soc.*, 108, 5116-5122.
- Martin, M. L.; Martin, G. J.; Guillou, C. (1991). A site-specific and multi-element isotopic approach to origin inference of sugars in foods and beverages. *Mikrochim. Acta*, 2, 81-91.
- Monetti A., Versini G., Dalpiaz G and Raniero F., 1996 Sugar adulterations control in concentrated rectified grape musts by finite mixture distribution analysis of the myo-inositol and scyllo-insitol content and the D/H methyl ratio of fermentative ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44-8: 2194-2210.
- Nestler J E, Jakubowicz D J, Reamer P, Gunn R D, Allan G (1999). "Ovulatory and metabolic effects of D-chiro-inositol in the polycystic ovary syndrome". *N Engl J Med* 340 (17): 1314–1320
- Nestler J E, Jakubowicz D J, Iuorno M J (2000). "Role of inositolphosphoglycan mediators of insulin action in the polycystic ovary syndrome". *J Pediatr Endocrinol Metab* 13 Suppl 5: 1295–1298..
- Palatnik A, Frolov K, Fux M, Benjamin J (2001). "Double-blind, controlled, crossover trial of inositol versus fluvoxamine for the treatment of panic disorder". *Journal of Clinical Psychopharmacology* 21 (3): 335–339

Pompei, C. In prefazione di . "Zucchero d'uva: impieghi e prospettive" di Mauro Manaresi. Clueb, Bologna 2005.

Robinson KS, Lai K, Cannon TA, McGraw P. 1996 Inositol transport in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by transcriptional and degradative endocytic mechanisms during the growth cycle that are distinct from inositol-induced regulation. *Mol Biol Cell*. Jan;7(1):81-9.

Shen, X.; Xiao, H; Ranallo, R; Wu, WH; Wu, C (2003). "Modulation of ATP-dependent chromatin-remodeling complexes by inositol polyphosphates". *Science* 299 (5603): 112-4.

Steger, D. J.; Haswell, ES; Miller, AL; Wentz, SR; O'Shea, EK (2003). "Regulation of chromatin remodelling by inositol polyphosphates". *Science* 299 (5603): 114-6

Taylor MJ, Wilder H, Bhagwagar Z, Geddes J (2004). Taylor, Matthew J. ed. "Inositol for depressive disorders". *Cochrane Database Syst Rev* (2):

Versini, G., Dalla Serra, A., & Margheri, G. (1984). Polialcoli e zuccheri minori nei mosti concentrati rettificati. Possibili parametri di genuinità? *Vignevini*, 11(3), 41-47.

Vucenik, I; Shamsuddin, AM (2003). "Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic.". *The Journal of nutrition* **133** (11 Suppl 1): 3778S-3784S.

Ulaszewski S, Woodward J R, and Cirillo V P (1978) Membrane damage associated with inositol-less death in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. October; 136(1): 49-54.

www.eur-lex.europa.eu: Tutti i regolamenti citati nella tesi.

www.oiv.int: Raccolta dei metodi internazionali di analisi dei vini e dei mosti Vol. 1 e 2 versione 2012. (EN). Risoluzioni OIV; Codex enologico internazionale; Codice internazionale delle pratiche enologiche.