



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
Dipartimento Territori e Sistemi Agro Forestali

Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie Viticole ed Enologiche

**EFFETTI DEI COLLOIDI PROTETTORI
SULLA STABILITÀ DELLA QUERCETINA NEI
VINI ROSSI**

Docente di riferimento:

Professor Simone Vincenzi

Laureando: Francesco Zaniboni

Matricola n. 1232768

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO

1 INTRODUZIONE

1.1 La quercetina

1.1.1 Classificazione chimica e funzioni nella pianta

1.1.2 Precipitati e stabilità

1.1.3 Caratteristiche enologiche della quercetina

1.1.4 Fattori che influenzano il contenuto di quercetina a livello di pianta

1.1.5 Fattori che influenzano il contenuto nel vino

1.2 Colloidi protettori

2. MATERIALI E METODI

2.1 Vini

2.2 Fase preliminare: scelta del vino da testare

2.3 Colloidi protettori utilizzati

2.4 Effetto dei colloidi protettori nel tempo su Sangiovese 2018 e 2019

2.5 Effetto di composti fenolici sulla stabilità della quercetina

2.6 Effetto copigmentazione tramite prove con vino modello a diversa % alcolica e antociani

2.7 Valutazione componente polifenolica, antocianica e dei flavonoidi endogena nei vini 2018 e 2021.

2.8 Valutazione componente polisaccaridica endogena nei Sangiovesi 2018 e 2021

2.9 Valutazione combinazione antociani-OPC-etanale sulla stabilità della quercetina

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Fase preparatoria

3.2 Effetti dell'aggiunta di colloidii protettori

3.2.1 Effetti dell'aggiunta di colloidii protettori su vino 2018

3.2.2 Effetti dell'aggiunta di colloidii protettori su vino 2019

3.3 Prove con polisaccaridi estratti da vini 2018 e 2021

3.4 Effetti dell'aggiunta di polifenoli su vino modello

3.5 Prove con frazioni polifenoliche estratte dai vini 2018 e 2021 su vino modello

3.6 Prove con vino modello a diversa gradazione alcolica aggiunto di antociani

3.7 Prove con vino modello addizionato di antociani, tannini e acetaldeide a diversa concentrazione

4 CONCLUSIONI

BIBLIOGRAFIA

RIASSUNTO

La quercetina è un flavonolo che negli ultimi anni sta creando sempre più problemi ai vini derivanti soprattutto dalla varietà Sangiovese, che ne è naturalmente ricca, seppur si abbiano riscontri di depositi anche su vini ottenuti da altre varietà.

L'instabilità in questione provoca la formazione di un sedimento amorfo e sgradevole alla vista del consumatore, che causa un forte deprezzamento del prodotto.

La formazione del sedimento avviene anche a distanza di un paio di anni dall'imbottigliamento, indicando che si tratta di un processo lento e difficile da prevedere. Il fenomeno avviene quando la quercetina passa dalla forma glicosilata, solubile grazie alla presenza di zucchero, alla forma aglicone, ovvero priva dello zucchero e quindi insolubile. Tale deglicosilazione può avvenire per via enzimatica, ma in tempi più lunghi può avvenire anche per semplice idrolisi chimica causata dal basso pH.

Il presente lavoro ha lo scopo di valutare l'eventuale efficacia dei colloidali protettori riguardo la precipitazione della quercetina.

Si sono utilizzati 4 vini da uve Sangiovese prodotte dalla stessa azienda in quattro annate (2018, 2019, 2020, 2021), su cui sono state fatte indagini preliminari per valutare la dose minima di quercetina che ne provoca instabilità.

Sono stati individuati come più instabili i vini del 2018 e 2019, e come più stabile quello del 2021. Sui vini più instabili è stata eseguita una aggiunta di quercetina esogena per indurre la precipitazione e sono stati addizionati diversi colloidali protettori per valutarne eventuali effetti.

I colloidali utilizzati non hanno ridotto la torbidità, in alcuni casi hanno addirittura aumentato la torbidità, rispetto ai controlli con sola quercetina, nel vino dell'annata 2018.

La stessa cosa si è manifestata con gran parte dei colloidali per quanto riguarda il vino dell'annata 2019, seppur alcuni di essi siano riusciti a ridurla.

Vista la differenza di comportamento del vino 2018 e 2021, si è ipotizzata la presenza di colloidali endogeni diversi nei due vini: per questo motivo i colloidali di entrambi i vini sono stati precipitati con etanolo e quindi riaggiunti in un vino modello in presenza di quercetina. Anche in questo caso non è stata evidenziata nessuna differenza, indicando che la diversa instabilità della quercetina nei due vini non dipende dalla componente colloidale.

Con l'obiettivo di indagare meglio il meccanismo di precipitazione, oltre ai colloidali protettori sono stati testati, questa volta direttamente in vino modello, anche dei composti fenolici (antociani, tannini condensati e tannini idrolizzabili). Un effetto protettivo sembra essere svolto dagli antociani.

Anche in questo caso, partendo dai vini 2018 e 2021, sono stati purificati i polifenoli totali e, separatamente i flavonoidi e gli antociani. Degli effetti protettivi nei confronti della precipitazione di quercetina si sono manifestati solo con l'aggiunta dei polifenoli totali e degli antociani estratti dal vino dell'annata 2021 e dell'annata 2018, sebbene per quest'ultimo gli effetti siano stati meno evidenti.

A fronte delle varie prove fatte, sembra che il meccanismo di precipitazione della quercetina sia influenzato dalla componente antocianica. Il confronto tra i vini 2018 e 2021 suggerisce che l'evoluzione nel tempo degli antociani potrebbe essere uno dei fattori responsabili della tardiva precipitazione della quercetina nei vini.

1 INTRODUZIONE

Da molto tempo la ricerca in ambito enologico cerca di trovare soluzioni ai vari difetti, alterazioni o instabilità cui vanno incontro i vini. I motivi principali sono legati alle scarse conoscenze e alle asimmetrie informative del mondo enologico fra i consumatori, i quali richiedono vini limpidi e privi di apparenti difetti, senza probabilmente sapere che questi sono, in buona parte dei casi, assolutamente normali e legati al processo produttivo in questione, invecchiamento compreso. Sicuramente oggi più che in passato, grazie al grande sviluppo dell' enoturismo, la conoscenza e la consapevolezza dei consumatori o comunque degli interessati al panorama viticolo ed enologico sta ampliandosi sempre di più, ma non risulta ancora sufficiente per permettere a tali attori di comprendere l' assoluta normalità (in gran parte dei casi) delle alterazioni suddette.

Alle note problematiche quali, per esempio, precipitazioni di sali, torbidità dovute in particolare ad instabilità proteica e modifiche del colore, nell'ultimo decennio è venuto sempre più prepotentemente alla ribalta un nuovo problema: il deposito del flavonoide quercetina.

Tale fenomeno, seppur sporadico ma non per questo meno economicamente impattante e meno lesivo nei confronti dell'immagine delle cantine, è in particolare legato alla varietà Sangiovese. Come riportato da UNIONE ITALIANA VINI (2010), il Sangiovese è la principale cultivar italiana per superficie occupata, pari all'11% del totale (70'000 Ha circa). La varietà è presente in varie regioni, dall'Emilia alla Campania, risultando però la cultivar di punta della Toscana (Quattrocali, 2019).

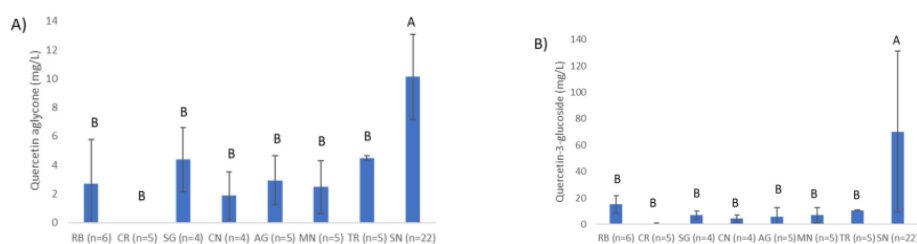


Figura 1: contenuto di quercetina aglicone (A) e quercetina 3-glucoside (B) su vini italiani monovarietali. Lettere maiuscole diverse indicano gruppi con differenze statisticamente significative ($p > 0,05$). Da sinistra a destra: Raboso (RB), Corvina (CR), Sagrantino (SG), Cannonau (CN), Aglianico (AG), Montepulciano (MN), Teroldego (TR), Sangiovese (SN).

In un lavoro recente (Gambuti et al., 2020) è stato dimostrato che il Sangiovese è la varietà, tra quelle analizzate, con il più alto contenuto di quercetina aglicone (0.4-8.6 mg/L) e di quercetina glicoside (3.1-33.9 mg/L). Ancora più recentemente, in un'altra pubblicazione (Vendramin et al., 2022), è stato confermato questo comportamento, come riportato in Figura 1.

Dato che il Sangiovese è la varietà più coltivata in Toscana, qui il fenomeno della precipitazione della quercetina è particolarmente sentito. Per rimarcare l'importanza che questo problema ha, in particolare nella zona della Toscana, si è sviluppato e concluso nel 2018 il progetto QUE-STAB. Si trattava di “un’iniziativa sperimentale di Col d’Orcia e ISVEA nell’ambito del PSR Regione Toscana e focalizzato alla stabilità della quercetina nel Sangiovese, vino che presenta un tenore significativamente maggiore di quercetina rispetto ad altre varietà”. Il lavoro aveva lo scopo di identificare e precipitazioni di quercetina e ridurre il depauperamento qualitativo dei prodotti, prevenendo danni economico-commerciali, al fine di migliorare la conservabilità e trovare una soluzione per stabilizzare la quercetina.

Il Sangiovese è una varietà molto antica, ne sono accertate produzioni già dal '500 anche se potrebbe essere presente già da secoli prima (Quattrocali, 2019), dunque ci si potrebbe chiedere come mai la problematica del deposito sia recente. Secondo il dottor Ferrari (ISVEA) ciò è dovuto alla solo recente attendibilità nella caratterizzazione dei sedimenti di quercetina. Egli attribuisce inoltre il fenomeno a evoluzioni degli stili agronomici, su tutti l'aumento della densità delle piante, l'utilizzo di portinnesti meno vigorosi e l'incremento di tecniche come la sfogliatura, ma anche delle tecniche enologiche, in particolare rispetto alla protezione dei vini dalle ossidazioni e dalle alte temperature in affinamento, come riportato da Martelli, E. (2018).

Nonostante il problema sia presente da pochi anni, Somers e Ziemelis già nel 1985 segnalano un “precipitato giallo o giallo-verde” (quercetina) in vini bianchi (in Australiani dell'annata 1977 ottenuti da uve vendemmiate a macchina, ipotizzando che il composto derivasse dalle foglie inevitabilmente raccolte con tale tipo di vendemmia).

Ad oggi sappiamo che il fenomeno di precipitazione è più frequente in vini affinati in botti grandi rispetto a vini affinati in *barrique*, poiché nelle prime il contatto vino-ossigeno è minore rispetto alle *barriques*. Il ruolo centrale dell'ossigeno e dell'ossidazione è confermato anche da una minor incidenza del fenomeno a seguito di travasi multipli, come riportato da Lanati e colleghi (2014). La *barrique* rispetto alla botte favorirebbe una maggiore precipitazione prima dell'imbottigliamento, riducendo il rischio di instabilità tardive in bottiglia con conseguente impossibilità di commercializzare il prodotto.

Da un lavoro svolto su Brunello si è riscontrato che i sedimenti sono costituiti fondamentalmente dalla forma aglicone della quercetina (meno solubile) e tali depositi avvengono anche dopo 2 anni dall'imbottigliamento. Il medesimo studio ha messo in luce che la maggior frequenza del problema in questione si ha in bottiglie da 0,75 L piuttosto che 1,5 L e 3L, il sedimento tende inoltre a

formarsi su vini di elevata qualità con maturazione fenolica ottimale, infine bottiglie dello stesso lotto possono essere o meno soggette al fenomeno. (Tranchida, A. et al., 2017).

Le uve di Sangiovese sono utilizzate per la produzione, tra gli altri, in purezza o come uvaggio, di Chianti, Chianti Classico, Brunello di Montalcino e del famoso Tignanello (Antinori).

Volendo analizzare la questione da un punto di vista del marketing, i piccoli depositi (quercetina inclusa) vengono maggiormente accettati dai consumatori su vini rossi di pregio o considerati tali e più costosi quali il Tignanello o Brunello di Montalcino mentre per rossi di minor pregio o comunque di prezzo inferiore, circa 8-10 €, sono richieste “stabilità assolute” (G.O. VINTEGRO 2022).

Questo potrebbe essere dovuto al fatto che bottiglie di maggior notorietà vengono acquistate da segmenti di consumatori che hanno conoscenze enologiche e delle relative problematiche, al contrario vini di prezzo inferiore sono destinati a consumatori che potrebbero essere meno formati, da qui una differente propensione ad accettare sedimenti.

Come già accennato in precedenza, visti i danni economici per impossibilità di commercializzazione delle bottiglie con annesso smaltimento del vino e i danni inquantificabili d’immagine, risulta fondamentale porre rimedio a questa problematica sempre più urgente.

Come sempre si verifica in ambito enologico, vi sono due soluzioni per la chiarifica; la prima è quella più drastica e consiste nelle tecniche sottrattive, nel nostro caso tramite coadiuvanti (eliminazione della quercetina), la seconda è riferita alle tecniche di stabilizzazione additiva (intendendo in questo caso il tentativo di mantenere in soluzione la quercetina rendendola più stabile mediante l’aggiunta di colloidali protettori).

Ad oggi l’unico trattamento che funziona, seppur solo parzialmente, è la chiarifica tramite l’aggiunta di PVPP (Polivinilpolipirrolidone) al vino, che comunque rimuove solo un 20% circa della quercetina aglicone, come riportato nell’articolo di OenoOne di Vendramin e colleghi (2022).

Si tratta di un coadiuvante enologico, derivante dalla polimerizzazione del vinilpolipirrolidone, che appare come polvere biancastra insolubile nel vino, con la capacità di eliminare la frazione ossidata ed ossidabile dei vini, ovvero i polifenoli, quercetina compresa (O.I.V., 2007).

Essendo l’utilizzo del PVPP un trattamento ad azione sottrattiva, il vino viene parzialmente spogliato e se ne riduce la ‘naturalità’. Il PVPP, inoltre, in quanto molecola di sintesi non naturale, risulta bandito nelle produzioni biologiche (GUCE, regolamento di esecuzione (UE) n. 203/2012), ad oggi in notevole espansione, da qui la necessità di trovare una soluzione alternativa.

Lo scopo della tesi è valutare l'eventuale efficacia di colloidali protettori aggiunti che possano mantenere in sospensione la quercetina grazie ad un'azione stabilizzante.

1.2 La quercetina

1.1.1 Classificazione chimica e funzioni nella pianta

La quercetina è un flavonolo, sottoclasse dei flavonoidi, classificabili come polifenoli.

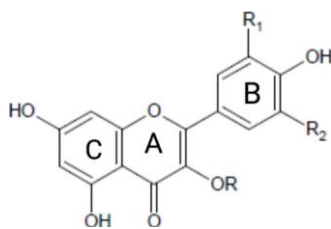


Figura 2: struttura generale flavonoli.

I polifenoli sono composti che presentano almeno un anello fenolico. Sono una classe di molecole prodotti dalle piante definibili come metaboliti secondari, ovvero molecole non fondamentali per la vita del vegetale (come possono invece essere zuccheri, aminoacidi...) ma frutto dell'espressione genetica della pianta stessa. I polifenoli sono accomunati dalla capacità antiossidante, grazie a cui limitano nella pianta i rischi dovuti a ossidazioni causate da luce solare e dagli UV in particolare (Price et al. 1995), caratteristica comunque variabile a seconda della categoria fenolica di appartenenza; inoltre interagiscono con i patogeni, come riportato da Macheix, J. E. colleghi (2005).

La struttura dei fenoli risulta planare a causa dell'ibridazione sp^2 dei carboni coinvolti nei legami, ciò comporta che siano molecole prevalentemente idrofobiche, in grado quindi di interagire con l'alcol piuttosto che con l'acqua in una soluzione quale il vino.

Oltre alla fondamentale azione antiossidante, i polifenoli partecipano alla colorazione di svariati frutti, tra cui l'uva e conseguentemente il vino, dove garantiscono allo stesso struttura e astringenza.

Ponendo l'attenzione sui flavonoli, essi si trovano di norma in forma glicosilata e differiscono per i gruppi R portati sull'anello B. La presenza di 1OH porta alla formazione di campferolo, la presenza di 2OH porta alla formazione di quercetina, la presenza di 3OH porta alla formazione della

miricetina, quest'ultima assente nelle uve bianche. La quercetina, essendo un flavonoide, si trova nelle parti solide dell'acino (vinaccioli e buccia) ma anche in foglie, tralci e raspi.

La quercetina è presente nelle uve in diverse concentrazioni, che vanno da pochi mg/kg a oltre 200 mg/kg. Essa si trova nelle uve in forma prevalentemente glicosilata (glucoside, glucuronide, galattoside e rutinoside), il che ne facilita la solubilizzazione nell'acino (Martelli, E. 2018).

Secondo uno studio di Mattivi e colleghi (2006) volto a classificare i flavonoli e antociani in 91 varietà di *Vitis vinifera*, la quercetina glicosilata è risultata effettivamente il principale flavonolo nelle bucce di uve rosse (media 43,99%) seguita da miricetina e campferolo. Nelle bucce di varietà a bacca bianca la quercetina glicosilata è ancora più presente (media 81,35%), in quantità minori sono presenti campferolo e isoramnetina, è invece assente la miricetina che rimane in forma esterificata.

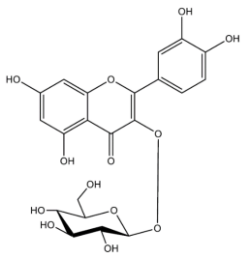


Figura 3: Quercetina-3 glucoside.

La quercetina ha un'elevatissima capacità antiossidante, grazie ai due gruppi ossidrilici in posizione orto (anello B, posizioni 3'-4'). A seguito della loro ossidazione la molecola diviene un ortochinone, ovvero un composto altamente reattivo in grado a sua volta di ridursi per ossidare altre molecole, riacquisendo di fatto capacità antiossidante, oppure di polimerizzare con altri chinoni e precipitare come composto bruno. La sua velocità nel reagire con anione superossido e altri radicali dell'ossigeno (escluso radicale idrossile OH^-) è rispettivamente da 3 a 6 volte maggiore dei flavan-3-oli catechina ed epicatechina (Boulton e colleghi, 2001).

Nei vini, il sedimento di quercetina è un problema relativo principalmente ai vini rossi; i quali subiscono una macerazione più o meno prolungata con le bucce, il che, purtroppo, comporta anche l'estrazione di quercetina, l'assenza (salvo eccezioni) di detta operazione nella vinificazione in bianco rende praticamente nullo tale rischio.

1.1.2 Precipitati e stabilità

Come accennato nell'introduzione, il sedimento di quercetina venne per la prima volta descritto e caratterizzato nel 1985 da Somers e Ziemelis.

Il precipitato è amorfo e sgradevole alla vista, di consistenza simile alla fibra di vetro, da qui il rischio di compromettere la commerciabilità del vino soprattutto quando l'instabilità si manifesta tardivamente, cioè direttamente in bottiglia.



Figure 4-5: sedimento di quercetina (sinistra); deposito di quercetina su Brunello affinato in botte, travasato dopo un anno (destra).

La precipitazione della quercetina è legata a una sua perdita di solubilità: in particolare, come detto, nell'uva la quercetina si trova in forma glicosilata. La presenza dello zucchero permette alla stessa di essere solubile in mezzo acquoso. L'attività dei lieviti e lo stesso ambiente acido, come verrà spiegato successivamente, possono causare una deglicosilazione, con liberazione dello zucchero e perdita di solubilità dell'aglicone. La forma agliconica del flavonolo è infatti idrofobica, a causa dei 2 anelli benzenici che lo costituiscono.

Un lavoro svolto da Somers e Zeimelis (1985) afferma che la solubilità della quercetina aglicone è molto bassa, pari a 3-4 mg/L in vini bianchi, secondo Boulton (2001) la solubilità è di 5 mg/L circa.

Al contrario, secondo studi più recenti, la solubilità della quercetina aglicone è maggiore di 5 mg/L. Questo è dovuto al fenomeno della copigmentazione di cui si parlerà dettagliatamente al paragrafo 1.1.3. Brevemente, la copigmentazione si ha quando due molecole idrofobiche (quercetina aglicone + fenoli come antociani) sovrappongono la propria struttura planare per divenire più stabili, aumentando notevolmente l'intensità del colore, come riportato da Lanati e colleghi (2014).

Secondo l'esperienza maturata tra laboratori di analisi, produttori e dati di letteratura la dose critica di quercetina aglicone è 15-30 mg/L, come riportato in un lavoro di Vendramin e colleghi (2022).

Come visto sopra, però, la sola eliminazione della forma aglicone non è sufficiente per garantire stabilità nel tempo, in quanto i glicosidi, presenti in quantità maggiore nel vino, sono dei precursori della forma aglicone.

Il passaggio dall'una all'altra forma è influenzato da parametri che si vedranno meglio al paragrafo 1.1.5, comunque riassumibili in:

- idrolisi acida: è il meccanismo più importante
- generi, specie, ceppi di lievito differenti con diversa attività glicosidica,
- temperatura,
- aggiunta di enzimi esogeni con attività secondaria glicosidica.

I fattori che intervengono nell'equilibrio tra le varie forme di quercetina possono essere molto diversi e ne derivano tantissime combinazioni diverse (diversa attitudine dei lieviti a produrre glicosidasi, diverse temperature di stoccaggio, diverso pH). La solubilità della quercetina è inoltre fortemente influenzata dalla matrice in cui si trova, come si potrà vedere più avanti.

Una soluzione al problema potrebbe essere quello di utilizzare dei chiarificanti per rimuovere la quercetina. Studi svolti da Vendramin e colleghi (2022) e da Gambuti et al. (2020) hanno dimostrato, però, che i chiarificanti sono efficaci solo sulla forma aglicone e non su quella glicosilata, permettendo di ottenere una stabilità solo apparente e limitata nel tempo. Tra i prodotti testati, il migliore sembra essere il PVPP.

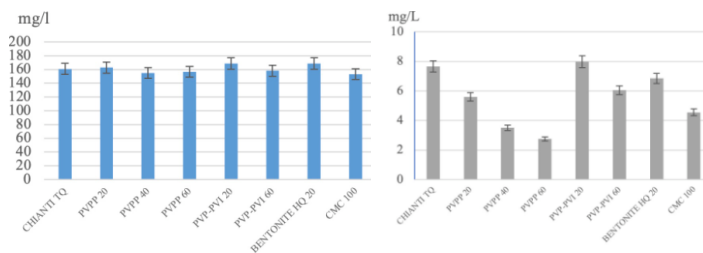


Figure 6-7: effetti coadiuvanti su quercetina 3-glucoside (sinistra) e aglicone (destra).

1.1.3 Caratteristiche enologiche della quercetina

I flavonoli sono composti sintetizzati in prevalenza nella buccia degli acini. Durante il processo di vinificazione in rosso, questi composti sono estratti dalle bucce e svolgono un ruolo chiave in termini qualitativi; al contrario, nella vinificazione in bianco, l'anticipata separazione delle bucce dal mosto non ne permette una sufficiente diffusione (Mattivi et al., 2006).

La quercetina è un flavonoide e si ritrova quindi nelle parti solide dell'uva, ne consegue che la sua estrazione sia tanto più marcata quanto più si macera. A tal proposito possono sicuramente avere effetto anche operazioni pre-fermentative come la *flash-détente* che comportano un indebolimento delle pareti cellulari dell'acino e un maggior rilascio dei composti presenti nelle bucce, così come

aggiunte di anidride solforosa per protezione dalle ossidazioni. Al contrario, da studi svolti, la criomacerazione è priva di effetti o riduce il contenuto di polifenoli totali (Manzo, F. 2019).

Un importante fenomeno enologico che avviene in presenza di quercetina e che potrebbe spiegarne la perdita di solubilità con il passare del tempo è la copigmentazione, tramite cui varia l'intensità colorante del vino. La copigmentazione è uno dei più importanti fattori che permettono di spiegare la variazione del colore dei vini rossi. Tale fenomeno consiste nella formazione di legami tra antocianine (intramolecolare) o tra antociani e altre strutture con anelli idrofobici che possano legarsi (intermolecolare). Nella seconda situazione, la sovrapposizione dei legami π - π avviene tra l'anello B antocianico e un anello B planare di un fenolo come la quercetina. Tale fenomeno è sfavorito da un solvente parzialmente apolare come l'etanolo, il che comporta la labilità di questa interazione nel tempo (He et al., 2012).

All'inizio gli antociani sono in forma libera e in parte ionizzati (ioni flavilio), dotati quindi di una carica positiva che ne favorisce la solubilità. Con la copigmentazione aumenta di conseguenza la solubilità della quercetina aglicone legandosi all'antociano. Le interazioni, seppur deboli, portano a una certa stabilizzazione del pigmento con manifestazione degli effetti batocromico (colore tendente al violaceo) e ipercromico (aumento dell'intensità colorante), entrambi tipici dei vini rossi giovani. Con il passare del tempo gli antociani si legano ai tannini e si sottraggono alla reazione con la quercetina, che perde di solubilità, inoltre si riduce l'intensità del colore per il minor effetto ipercromico-batocromico.

A livello gustativo la quercetina viene percepita come amara e debolmente astringente, come riportato da Gawel, R. (1998).

1.1.4 Fattori che influenzano il contenuto di quercetina a livello di pianta

La quercetina è una molecola sintetizzata dalla pianta in diversi tessuti in periodi di stress (metabolita secondario). Nell'acino viene sintetizzata prevalentemente nelle bucce e, di conseguenza, sarà maggiore nei vini sottoposti a macerazione. Perciò, è fondamentale comprendere le situazioni che possono provocare nella vite un momento di difficoltà con conseguente incremento nella produzione della quercetina, per porvi rimedio in campo.

Innanzitutto, i polifenoli, e più dettagliatamente i flavonoli, vengono sintetizzati perché proteggono dalle ossidazioni causate dalla luce UV, grazie agli anelli benzenici che assorbono tale luce. Non a

caso, il metodo analitico di determinazione dei polifenoli totali utilizza la spettrofotometria con una lunghezza d'onda di 280 nm (UV).

La varietà ha sicuramente un'importanza non trascurabile. Come riportato nell'introduzione, il Sangiovese ha una quantità di quercetina aglicone e glicosilata superiore alle altre varietà prese in esame (Vendramin et al. 2022), probabilmente dovuto a fattori genetici (Goldberg et al., 1998)

Andando ancora più in dettaglio, Iacopini e colleghi (2008) hanno voluto quantificare la quercetina in grappoli di differenti cloni Sangiovese, confrontandoli poi con i contenuti in grappoli di altre varietà (Tabella 1).

Catechin and epicatechin content of seeds and resveratrol, rutin and quercetin content of skin of grape genotypes studied

Variety/clone	Phenolic content (mg/100 g DM) ^a				
	Seeds		Skin		
	Catechin	Epicatechin	Resveratrol	Rutin	Quercetin
AP SG 1	96.9 ± 5.9 d	106.8 ± 1.6 d	0.7 ± 0.04 e	149.1 ± 15.1 b	1.05 ± 0.16 a
F9	74.4 ± 0.9 e	98.4 ± 9.9 de	0.8 ± 0.16 de	158.5 ± 3.3 ab	1.00 ± 0.18 a
ISV 2	72.9 ± 7.0 e	88.0 ± 0.7 e	0.8 ± 0.04 de	169.0 ± 7.3 a	1.07 ± 0.20 a
ISV RC1	60.3 ± 8.3 e	67.9 ± 6.2 f	0.6 ± 0.16 e	160.2 ± 16.2 ab	1.04 ± 0.10 a
Merlot	138.8 ± 0.4 bc	131.8 ± 9.7 c	10.5 ± 1.84 c	89.9 ± 10.2 c	0.69 ± 0.07 bc
Cabernet Sauv.	141.8 ± 7.9 b	127.6 ± 4.4 c	25.5 ± 1.16 a	88.6 ± 5.3 c	0.60 ± 0.01 bc
Canaiole	140.7 ± 2.2 bc	205.7 ± 3.1 a	2.8 ± 0.02 d	41.3 ± 2.3 e	nd
Colorino V.no	124.4 ± 0.1 c	89.0 ± 8.6 e	16.4 ± 1.57 b	40.3 ± 3.9 e	0.50 ± 0.01 de
Foglia Tonda	67.4 ± 5.1 e	47.2 ± 3.5 g	1.3 ± 0.07 de	60.4 ± 3.2 d	0.29 ± 0.06 d
Montepulciano	205.7 ± 19.0 a	164.6 ± 16.8 b	10.9 ± 0.59 c	53.2 ± 4.5 de	0.76 ± 0.05 b
PANOVA	***	***	***	***	***

^a Values are the means ± SD (n = 3). Data were analysed by ANOVA (***P < 0.001) and within each column different letters indicate statistically different values according to post-hoc comparison (LSD-test) at P = 0.05.

Tabella 1: contenuto fenolico in semi/bucce per varietà/clone; nel riquadro blu sono riportati 4 cloni di Sangiovese e i relativi quantitativi di quercetina rutinoside e aglicone espressi in mg/100g dry matter.

In questo caso è stata riscontrata la rutina, un flavonolo diglicosilato formato dalla quercetina e dal disaccaride rutinosio. La tabella evidenzia come vi siano differenze statisticamente significative tra due cloni di sangiovese in termini di quercetina rutinoside, segno che anche il tipo di clone può avere un impatto sulla produzione del flavonolo; in fase di scelta del clone da piantare se ne potrà tenere conto.

Si può altresì vedere come vi siano differenze statisticamente significative tra i vari cloni di sangiovese e le altre varietà prese in esame in termini di quercetina rutinoside, ciò conferma che la varietà Sangiovese ne è naturalmente più ricca.

È possibile anche notare una piccola quota di quercetina aglicone, con differenze statisticamente significative tra Sangiovese e le altre cultivar. Non è chiaro però se nell'acino fosse effettivamente già presente o se la de-glicosilazione fosse avvenuta in fase di ammostamento.

Anche un lavoro svolto da Price nel 1995 conferma come vi possa essere una quota di quercetina aglicone in estratti di bucce d'uva, e come questa vari a seconda dell'esposizione al sole.

ha formattato: Controllo ortografia e grammatica

Quercetin aglycone (360 nm) 26.4 b 15.2 ab 8.2 a

Figura 8: picco di quercetina aglicone (mAU sec) ottenuto con HPLC per mosto da grappoli rispettivamente esposti, moderatamente esposti e ombreggiati da sinistra a destra

Tale studio è stato fatto per valutare gli effetti che esposizione e ombreggiamento dei grappoli hanno sul contenuto fenolico, in particolare di quercetina, utilizzando uve di Pinot nero. Price ha dimostrato come la sintesi dei flavonoli sia positivamente correlata con l'esposizione dei grappoli alla luce diretta del sole. La sintesi di tali composti risulta pressoché nulla in grappoli oscurati artificialmente o semplicemente ombreggiati, dove il loro accumulo è limitato e lento. Mentre in grappoli direttamente irradiati dalla luce solare la sintesi di flavonoli è maggiormente spinta. Questo sottolinea il fatto che questa classe di molecole sono metaboliti secondari, prodotti all'occorrenza, e come la loro sintesi risulti strettamente correlata alla presenza più o meno intensa di radiazioni solari, con lo scopo proteggere le bacche dai raggi UV.

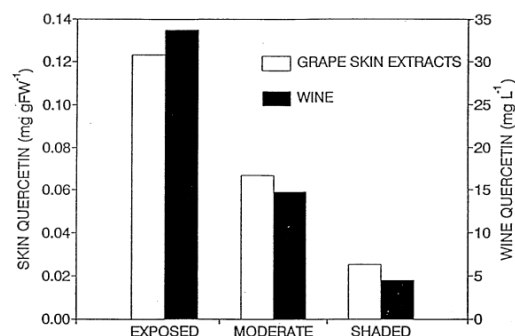


Figura 9: concentrazione di quercetina in estratti di bucce d'uva di Pinot nero e relativi vini in uve esposte, moderatamente esposte e ombreggiate alla luce solare; differenze significative con una $p = 0,01$.

Un lavoro di Keller e Hrazdina (1998) ha invece messo in relazione il rapporto di sintesi flavonoli-temperatura. Si è visto che a temperature elevate, funzione del grado di esposizione delle uve, le reazioni di degradazione dei flavonoli possono prevalere su quelle della loro sintesi. Al contrario, il mantenimento di temperature non eccessive con esposizione diretta alla luce del sole porta al massimo incremento di flavonoli negli acini.

Bisogna considerare che l'eccessiva esposizione dell'uva al sole e di conseguenza le elevate temperature possono impartire tutta una serie di caratteri gustativi all'uva (su tutti gusto di cotto, di marmellata) e aromatici (produzione di furfurale, aroma di pane, perdita di aromi varietali) spesso indesiderati. Per questo, non esporre eccessivamente i grappoli alla luce solare mantenendo conseguentemente un microclima meno secco potrebbe essere la scelta vincente. Ovviamente si

deve fare anche una valutazione rispetto ai patogeni soprattutto fungini che prediligono microclimi umidi o bagnati, è opportuno quindi trovare un compromesso.

Sicuramente poi gioca un ruolo centrale il territorio, in particolare l'orografia e l'esposizione dei vigneti. Assume in questo contesto una grande importanza anche il terreno su cui la vite si trova, e in particolare il colore dello stesso. Terreni biancastri favoriscono infatti una riflessione della luce, con indiretta esposizione dei grappoli alla radiazione.

Ne consegue che anche le pratiche agronomiche volte ad aumentare l'esposizione dei grappoli alla luce solare, su tutte la defogliazione, possano causare un incremento nella sintesi di flavonoli nelle bucce degli acini.

Uno studio svolto da Pastore e colleghi (2017) ha permesso di vedere gli effetti della defogliazione in invaiatura sulla produzione di antociani e flavonoli, utilizzando Cabernet-Sauvignon, Nero D'Avola, Raboso Piave e Sangiovese.

	C	D
Cabernet Sauvignon		
Total flavonols	0.20 b	0.48 a
Myricetin	0.10 b	0.21 a
Quercetin	0.09 b	0.23 a
Kaempferol	0.01 b	0.04 a
Nero d'Avola		
Total flavonols	0.32 b	0.77 a
Myricetin	0.20 b	0.38 a
Quercetin	0.11 b	0.33 a
Kaempferol	0.01 b	0.06 a
Raboso Piave		
Total flavonols	0.14 b	0.49 a
Myricetin	0.07 b	0.11 a
Quercetin	0.07 b	0.36 a
Kaempferol	0.00 b	0.03 a
Sangiovese		
Total flavonols	0.36 b	0.68 a
Myricetin	0.06 b	0.07 a
Quercetin	0.28 b	0.56 a
Kaempferol	0.02 b	0.05 a

Tabella 2: concentrazione flavonoli totali e singoli (mg/g buccia) per varietà alla raccolta. C = non defogliato, D = defogliato. I dati sono una media del biennio 2008-2009. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (Test Tukey, $p < 0,05$)

Concentrandosi sui flavonoli, i testimoni defogliati D hanno avuto incrementi significativi nella produzione di flavonoli totali rispetto ai controlli non defogliati C. In particolare, sono aumentate le produzioni di quercetina e miricetina in tutte le varietà, mentre il campferolo ha avuto un incremento molto modesto. Si noti come, ancora una volta, il Sangiovese abbia un maggior contenuto di quercetina rispetto alle altre varietà prese in esame, in entrambe le tesi.

Un lavoro di Romboli e colleghi (2018) ha invece messo in luce come l'epoca e la defogliazione più o meno spinta facciano variare il contenuto in flavonoli nelle uve, in particolare di quercetina. La defogliazione intensa in fioritura ha aumentato la quota di flavonoli totali e dei derivati glicosidici

della quercetina nelle uve. Al contrario le uve delle tesi defogliate in modo intenso e blando in allegagione non hanno mostrato differenze rispetto al controllo non defogliato per i suddetti parametri.

Anche la vendemmia meccanica gioca un ruolo indiretto in questo contesto. Tramite vendemmia meccanica si ha una parziale contaminazione del pigiato con foglie, che a loro volta possono essere una fonte di quercetina. Perciò, con tale tipo di raccolta, si può manifestare un incremento di quercetina glicoside nei mosti e nei relativi vini, come ipotizzato da Somers e Ziemelis (1985).

1.1.5 Fattori che influenzano il contenuto nel vino

Il contenuto di quercetina nel vino è ovviamente funzione della sua quantità nell'uva, ma le operazioni di cantina possono avere un ulteriore ruolo nel determinare la concentrazione finale

Come tutti i flavonoidi, anche la quercetina è situata nelle parti solide, specificatamente nella buccia; ne consegue che il tempo di macerazione è un aspetto centrale da considerare. I flavonoli e le catechine sono maggiormente estratti prolungando il contatto delle vinacce con il mosto in fermentazione, questo per via dell'azione estraente di un composto affine come l'alcol su tali composti.

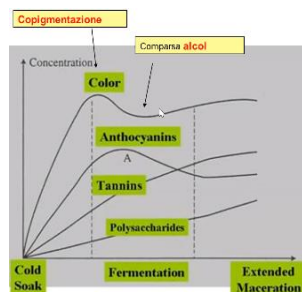


Figura 10: estrazione composti nelle bucce al variare del tempo durante la vinificazione

Il tempo di macerazione è funzione del vino che si vuole ottenere, di conseguenza non sempre è possibile modificare il periodo di contatto succo-bucce.

Vanno innanzitutto analizzati gli aspetti chiave che possono determinare un maggiore o minore rischio di depositi in bottiglia.

Il processo chiave è la conversione dei glicosidi, più stabili, nella forma aglicone, che è la forma effettivamente instabile.

Durante la fermentazione, un possibile rilascio di enzimi potrebbe favorire questa conversione. In questo caso diventano importanti: genere, specie, ceppi di lievito utilizzati. Durante la fermentazione tali microrganismi possono produrre enzimi glicosidasi, la cui sintesi può essere più o meno spinta a seconda del tipo di lievito (Terrier et al., 2009). Anche i batteri della fermentazione malolattica possono contribuire all'idrolisi della quercetina. In ogni caso, si tratta sempre di enzimi limitati dal pH e dalle temperature di esercizio.

A tal proposito, un lavoro di Romboli e colleghi (2015) non ha mostrato differenze significative sulla distribuzione delle varie forme di quercetina, miricetina e campferolo utilizzando diverse specie e ceppi di lievito (da sinistra a destra due ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, *Starmerella bacillaris*), come riportato in Tabella 3, mentre risultano esserci differenze in termini di contenuto di quercetina tra i due ceppi di *S. cerevisiae*.

	ES 454	ES 488	Sb 409	One-way ANOVA
Flavonoli tot (mg/L)	150,4±2,7	136,0±3,8	141,6±6,5	ns
Profilo dei flavonoli				
Quercetine (%)	79,0±3,0	79,3±2,6	79,7±3,1	ns
Miricetine (%)	18,4±2,9	17,3±2,1	17,6±2,9	ns
Campferoli (%)	2,6±0,1	3,4±0,5	2,7±0,3	ns
Quercetine (mg/L)	118,8±2,4a	107,7±0,5b	112,8±0,7ab	*
Profilo delle quercetine				
Quercetina-3-galattoside (%)	3,6±0,5	3,9±1,1	3,3±0,2	ns
Quercetina-3-glucuronide (%)	21,0±1,7	20,4±0,0	18,9±0,4	ns
Quercetina-3-glucoside (%)	49,6±1,9	48,4±0,8	51,5±4,6	ns
Quercetina aglicone (%)	25,9±0,7	27,4±0,3	26,3±4,0	ns

Tabella 3: contenuto flavonoli nei vini ottenuti con 3 diversi lieviti. Lettere diverse indicano differenze statisticamente significative (test Tukey, * $p < 0,05$)

L'utilizzo di lieviti con spiccata capacità di sintetizzare questi enzimi potrebbe divenire centrale in futuro, in quanto l'utilizzo di microrganismi con basse attività β -glicosidasiche potrebbe ritardare in modo non indifferente la comparsa del precipitato. Infatti, in assenza di attività glicosidasiche, la deglicosilazione avviene comunque, in particolare mediante il meccanismo dell'idrolisi acida. Si tratta di un processo chimico, lento e inesorabile, più basso è il pH più veloce è l'idrolisi chimica.

Un aspetto molto importante da considerare è la temperatura, che a valori elevati può accelerare sia le attività enzimatiche sia l'idrolisi acida dei derivati della quercetina.

L'ultimo fattore, ma non per importanza, è l'aggiunta di enzimi esogeni con attività glicosidasi secondaria. Essi possono lavorare in modo ottimale alle condizioni enologiche ed avere un effetto importante sull'idrolisi della quercetina. Il rischio è di de-glicosilare anche altre molecole (antociani, aromi...), problema in realtà molto limitato.

Anche su questo argomento è stato fatto uno studio da Gambuti e colleghi (2007), secondo cui vini ottenuti da mosti aggiunti di enzimi pectolitici e solfitati manifestano una maggior presenza di catechina, epicatechina, rutina, trans-resveratrolo e quercetina rispetto ai vini di controllo, come visibile in tabella. A tal proposito va ricordato che i flavonoidi sono presenti nelle parti solide come la buccia, ne consegue che un'attività pectolitica sulle medesime aumenta l'estrazione dei detti composti.

Wine	Ethanol (v/v%)	Sugar (g/L)	Total acidity (g/L)	pH	Vol. acidity (g/L)	Free SO ₂ (mg/L)	Total SO ₂ (mg/L)	Dry extract (g/L)
CW	13.18	1.98	6.45	3.60	0.6	22.4	56.2	32.38
SW	13.10	2.30	6.78	3.64	0.4	25.6	72	32
SEW	13.05	2.65	6.50	3.69	0.5	32	76	33.1

Chromatic characteristic							
	O.D. 420 nm	O.D. 520 nm	O.D. 620 nm	Color intensity	Color hue	dAI%	dTAT%
CW	3.40a	4.63a	1.15a	9.18a	0.74a	21.74a	54.57a
SW	3.60a	4.72a	2.01b	10.35b	0.76ab	25.62b	53.35a
SEW	4.16b	5.17b	2.04b	11.37c	0.81b	27.57c	61.47b

Polyphenols								
	(+)-Catechin (mg/L)	(-)-Epicatechin (mg/L)	Rutin (mg/L)	trans-Resveratrol (mg/L)	Quercetin (mg/L)	Total phenolics (Folin-Ciocalteu Index)	Tannins (g/L)	Total anthocyanins (mg/L of malvidin-3-monoglucoside)
CW	45.73a	75.80a	2.42a	1.54a	5.68a	67.21a	3.89a	329.98a
SW	79.17b	88.78a	2.97a	1.63a	6.54ab	66.00a	3.60a	380.67b
SEW	95.61b	121.03b	3.48b	1.74b	8.17b	72.13b	3.98a	428.73c

CW = control wines; SW = wines obtained from a must treated with SO₂; SEW = wines from a must treated with SO₂ and 5 g/L of pectolitic enzyme. Values followed by different letters on the column are significantly different ($P < 0.05$).

Tabella 4: effetti dell'enzimaggio e della solfitazione sul tenore di iso-quercetina in vini Aglianico. Sono riportati a sinistra il tipo di vino, a destra il contenuto in quercetina aglicone.

La tabella mostra come vi siano differenze statisticamente significative tra controllo e vini aggiunti di enzimi e solfitati su tutti i composti. Risulta particolarmente importante l'uso di enzimi pectolitici che permette di degradare le pareti della buccia, aumentando l'estrazione dei vari composti. Come sappiamo, gli enzimi hanno spesso attività secondaria, per esempio β -glucosidasi, questo potrebbe spiegare come mai sia presente quercetina aglicone.

Sono di seguito riportati altri fattori che potrebbero influire sulla stabilità della quercetina.

Un'operazione molto utile è l'ossigenazione dei mosti, pratica indispensabile sui rossi, grazie a cui la forma aglicone che si forma con il procedere della fermentazione si ossida, potendo polimerizzare e precipitare in vasca. In tal senso, l'utilizzo di solforosa piuttosto che di tannini idrolizzabili, ambedue con funzione antiossidante, deve essere gestito oculatamente. Sempre grazie allo stesso principio, in fase di *élevage* si ottiene un maggior deposito facendo affinare il vino in *barriques* piuttosto che in botte, perché le prime hanno un maggior rapporto superficie-volume e ciò permette un maggior apporto di ossigeno tramite la micro-ossigenazione; a questo proposito i travasi risultano fondamentali per ridurre problemi successivamente (Lanati et al., 2014).

In fase di pre-imbottigliamento, diventa fondamentale individuare e gestire separatamente le partite a rischio precipitazione. Si può alternativamente pensare di effettuare tagli con vini potenzialmente instabili e vini ricchi in polifenoli, che tramite la loro azione antiossidante e di complessazione potrebbero evitare la sedimentazione. Infine si può intervenire con PVPP, che ad oggi è l'unico coadiuvante che ha mostrato una certa affinità per la quercetina aglicone.

1.2 Colloidi protettori

Come accennato nell'introduzione, uno degli scopi del presente lavoro è valutare l'eventuale efficacia dei colloidi protettori sulla precipitazione della quercetina.

Il vino è un sistema colloidale complesso, contenente composti come polisaccaridi, proteine e polifenoli. Tali molecole rimangono in soluzione grazie a forze elettrostatiche repulsive e grazie allo strato di solvatazione; quando questi due fenomeni vengono meno l'aggregazione e la flocculazione sono inevitabili, come riportato sul trattato di enologia 2 di Ribereau-Gayon.

Innanzitutto, i colloidi sono molecole di dimensioni comprese tra 1 nm e 1 µm, grazie a cui hanno caratteri intermedi tra soluti e sospensioni. Si dividono in colloidi macromolecolari (polisaccaridi, proteine) e particellari (*casse* metalliche, precipitati polifenolici, *casse* proteiche, cristalli di bitartrato di potassio), a seconda che le dimensioni siano più prossime al nanometro o al micron, rispettivamente.

I colloidi sono composti in grado di proteggere il vino da instabilità interne come precipitazione di sali, *casse* proteiche e altri fenomeni di flocculazione e intorbidamento, in questo caso prendono il nome di colloidi protettori. Di particolare interesse sono i colloidi idrofili o macromolecolari (polisaccaridi), altamente solubili in soluzione idro-alcolica.

Allo stesso tempo possono anche divenire fonte di instabilità, come nel caso delle proteine, colloidi protettori che, in seguito a denaturazione parziale, formano dei complessi poco solubili con i tannini e successivamente precipitano.

Nel vino i colloidi protettori sono naturalmente presenti, basti pensare ai polisaccaridi che sono estratti dalle bucce, e in cui la macerazione gioca un ruolo chiave per esaltarne la fuoriuscita. Allo stesso modo l'affinamento sulle fecce di lievito di tre mesi minimo, tempo necessario per una parziale autolisi, aumenta il rilascio di mannoproteine.

Tali composti possono anche essere aggiunti al vino come coadiuvanti ad azione protettiva. Di particolare interesse sono i polisaccaridi e le mannoproteine di lievito, che hanno azione anti-flocculante.

I colloidali esogeni vengono aggiunti anche per mantenere in soluzione il potassio e il bitartrato, impedendo la fase di nucleazione (cristallizzazione) o l'accrescimento del germe. Un esempio di stabilizzante tartarico è il poliaspartato.

Un'altra applicazione riguarda la stabilità proteica, a seguito della formazione di complessi tanno-proteici, i polisaccaridi possono formare una sorta di *coating* attorno all'aggregato con formazione di un composto ternario proteina-polifenolo-polisaccaride. La solubilità del carboidrato in soluzione idro-alcolica diventa determinante poiché esso è a diretto contatto con tale soluzione. La buona solubilità dei polisaccaridi in vino aiuta ad avere una certa stabilità proteica, evitando indesiderate flocculazioni, come suggerito da Mateus e colleghi (2004).

Allo stesso modo, i colloidali protettori possono agire su altri polifenoli come tannini e proantocianidine diminuendone l'astringenza e l'amarezza; inoltre evitano aggregati e flocculazioni di materiale colorante.

Per tutte queste importanti proprietà stabilizzanti, anche e soprattutto verso i polifenoli, si è deciso di valutare gli effetti di tali composti sulla quercetina.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Vini

Un'azienda vitivinicola toscana ha fornito 4 vini Sangiovese di diverse annate, rispettivamente 2018, 2019, 2020, 2021, per valutarne il rischio di precipitazione della quercetina.

2.2 Fase preliminare: scelta del vino da testare

Si è effettuato un prelievo di 10 mL di vino per ogni annata, per valutarne la torbidità iniziale. A seguito di tale misurazione, i vini delle annate '19, '20, '21 sono stati filtrati poiché presentavano una torbidità maggiore di 3 NTU. Successivamente, si è proceduto con una nuova lettura tramite

nefelometro (Hanna Instruments). Fatto ciò, sono state preparate 5 provette contenenti 10 mL di vino per ogni annata. Delle 5 provette per annata, una è servita come controllo, nelle altre 4 si sono aggiunte dosi crescenti di quercetina (25, 50, 75, 100 mg/L). Per dosare la quercetina si è proceduto solubilizzando la stessa in una soluzione di etanolo pura, per raggiungere una concentrazione in quercetina della soluzione pari a 10 mg/mL. Facendo gli opportuni calcoli, si sono prelevati 25, 50, 75, 100 μ L di soluzione, aggiunti alle provette.

Dopo l'aggiunta di quercetina, abbiamo effettuato una lettura immediata (tempo = 0 min) della torbidità tramite nefelometro per ogni provetta di ogni annata (20 provette in tutto).

La medesima operazione si è svolta dopo 4 ore dall'aggiunta della quercetina alle provette (tempo = 4 ore) e il giorno seguente (tempo = 24 ore).

Viste le torbidità ottenute, si è scelto di procedere con il vino che a 50 mg/L (quantità leggermente maggiore di quella che si riscontra nei vini) di quercetina aggiunta manifestava la maggior torbidità, ossia il vino dell'annata 2018.

Seguendo lo stesso ragionamento precedente, si è effettuato in un secondo momento un test anche sul vino dell'annata 2019.

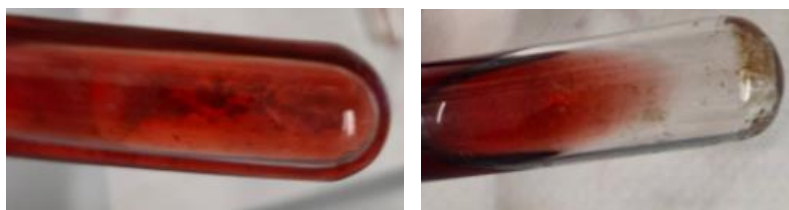


Immagine 1: sedimenti di quercetina in provetta su vino Sangiovese

2.3 Colloidi protettori utilizzati

Si sono utilizzati una serie di prodotti enologici forniti da *Oenofrance*, prevalentemente appartenenti alla famiglia dei colloidi protettori, per valutare l'eventuale efficacia degli stessi sulla stabilità della quercetina. I prodotti scelti sono di diversa origine e vengono proposti per diversi scopi in enologia. In particolare, si sono utilizzate gomme arabiche, polisaccaridi d'uva, poliaspartato di potassio, tannini enologici condensati, mannoproteine e proteine del lievito e pareti cellulari di lievito. In aggiunta sono stati anche testati dei prodotti sperimentali quali polisaccaridi di vinaccioli e mannoproteine di *Starmerella bacillaris*.

I prodotti sono stati preparati e successivamente aggiunti ai vini seguendo attentamente le indicazioni poste in etichetta. Per ogni colloidale protettore sono stati utilizzati i due dosaggi consigliati in etichetta, uno minimo e uno massimo, quest'ultimo coincidente con i limiti di legge, ove presenti.

2.4 Effetto dei colloidali protettori nel tempo su Sangiovese 2018 e 2019

Le aggiunte dei colloidali protettori sono state fatte in triplicato su aliquote di 10 ml di vino. Tre repliche di vino controllo sono state tenute come testimone.

Si è proceduto all'analisi della torbidità con nefelometro di ogni provetta appena terminate le aggiunte dei colloidali protettori (tempo = 0 minuti), per valutare l'eventuale torbidità data dagli stessi.

Fatto ciò, sono stati aggiunti 50 mg/L di quercetina ad ogni provetta.

Dopo 4 e 24 ore è stata eseguita l'analisi con nefelometro.

2.5 Effetto di composti fenolici sulla stabilità della quercetina

Queste prove sono state fatte in vino modello, che è stato preparato con 5 g/L di acido tartarico pH 3,2, 12% etanolo. Si è innanzitutto valutato se la quercetina è instabile anche in vino modello, aggiungendo 50 mg/L di quercetina e valutando la torbidità nel tempo con il nefelometro.

Una volta confermata l'instabilità della quercetina, sono state fatte aggiunte di antociani, tannini di vinacciolo (tannini condensati) e acido tannico (tannini idrolizzabili) tra 50 e 500 mg/L. Fatte le aggiunte, si è proceduto all'analisi della torbidità (tempo = 0 minuti), per vedere se tali composti causassero intorbidamento.

Sono stati quindi aggiunti 50 mg/L di quercetina a tutte le provette; dopo 30 minuti (tempo = 30 minuti) e successivamente a 4 ore (tempo = 4 ore) si sono fatte le letture con il nefelometro.



Immagine 2: provette con vino modello e antociani, tannini condensati e acido tannico a concentrazioni crescenti, rispettivamente.

2.6 Effetto copigmentazione tramite prove con vino modello a diversa % alcolica e antociani

Visto che la quercetina è un composto prevalentemente idrofobico, si è pensato di valutarne la precipitazione in vino modello in funzione della diversa gradazione alcolica. Inoltre, abbiamo voluto vedere se la componente antocianica ha un effetto sulla stabilità della quercetina, per via della co-pigmentazione. Si sono presi 4 becker in ognuno dei quali è stato costruito il vino modello, contenente sempre 0,5 g/100 mL di acido tartarico e dosi crescenti di etanolo (0%, 5%, 10%, 15%), portando a volume con acqua, il pH di ogni vino è stato portato a 3,2 aggiungendo soda 0,1 N.

Per ogni becker con diversa % di etanolo, si sono preparate tre provette, poi ne abbiamo valutato la torbidità (tempo = 0 minuti).

Si sono immediatamente preparate altrettante provette al medesimo modo, aggiungendovi 30 mg/L di antociani.

A tutte le provette sono stati aggiunti 50 mg/L di quercetina, dopo 30 minuti (tempo = 30 minuti) e 4 ore (tempo = 4 ore) sono state valutate le torbidità.



Immagine 3: sedimento di quercetina in vino modello

2.7 Valutazione componente polifenolica, antocianica e dei flavonoidi endogena nei vini 2018 e 2021.

Sono stati filtrati 100 mL dei Sangiovesi delle annate 2018 e 2021.

Per separare le diverse frazioni polifenoliche si sono utilizzate cartucce C18 (Waters, 10 g) previamente attivate con metanolo e lavate con acqua. Successivamente sono stati caricati 35 ml di vino (diluiti 4 volte con acqua + 0.1% HCl) sulla cartuccia, per permettere ai composti fenolici di legarsi. Dopo lavaggio con 2 volumi di acqua + 0.1% HCl, è stata eseguita una eluizione con 20 mL di metanolo per eluire tutti i polifenoli.

Su un'altra cartuccia, trattata allo stesso modo sono stati caricati altri 35 mL di vino, ma l'eluizione è stata eseguita prima con 20 mL di etil acetato per eluire la frazione di flavonoidi. Una successiva eluizione con 20 mL di metanolo ha invece permesso di eluire separatamente gli antociani.

Tutte le frazioni organiche sono state evaporate e concentrate con Rotavapor®. Ogni frazione è poi stata risospesa in 35 mL di vino modello (per ripristinare la concentrazione di iniziale nel vino di partenza).

Da ciascun campione sono state preparate 3 aliquote da 10 mL (sia per il vino 2018 che per il vino 2021) ed è stata misurata la torbidità iniziale (tempo = 0 minuti).

Quindi si sono aggiunti 50 mg/L di quercetina, e dopo mezz'ora (tempo = 30 minuti), 4 ore (tempo = 4 ore), 24 ore (tempo = 24 ore) e 48 ore (tempo = 48 ore) è stata nuovamente analizzata la torbidità.

2.8 Valutazione componente polisaccaridica endogena nei Sangiovesi 2018 e 2021

Dai vini 2018 e 2021 filtrati sono stati isolati i polisaccaridi mediante precipitazione con 4 volumi di etanolo. Dopo centrifugazione, il residuo è stato risospeso in un volume di vino modello pari al volume di partenza. Si è proceduto quindi a misurare la torbidità iniziale e poi, a tempi diversi, quella dopo aggiunta di quercetina a 50 mg/L.

2.9 Valutazione combinazione antociani-OPC-etanale sulla stabilità della quercetina.

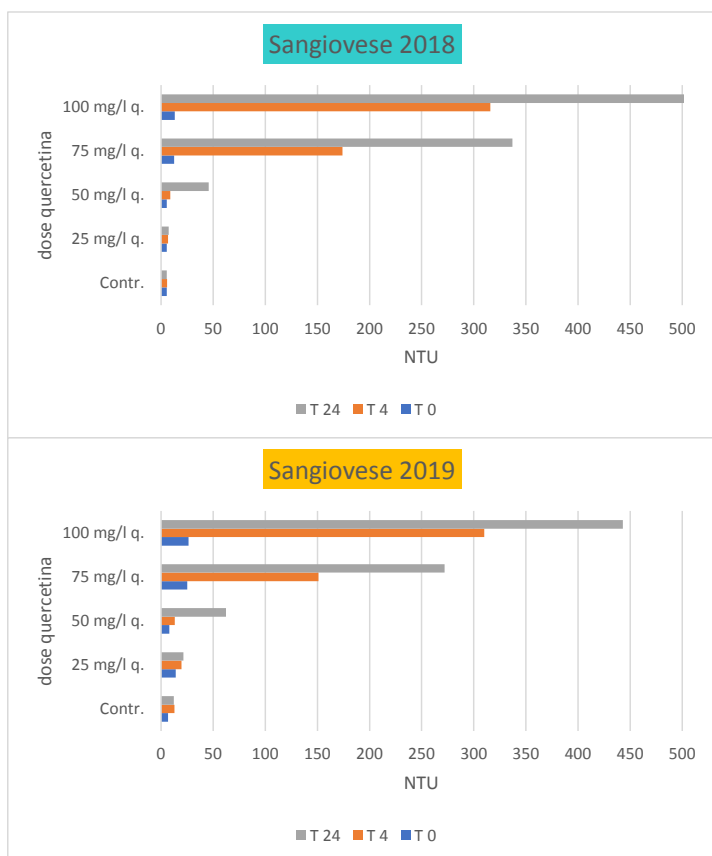
Si sono preparate 12 falcon, contenenti ognuna 35 mL di vino modello, a cui si sono aggiunti singolarmente antociani, tannini e una miscela antociani-tannini in dosi di 500 mg/L. Su una serie di falcon si è aggiunto etanale 50 mg/L per accelerare la formazione dei complessi tannini-antociani, il tutto è stato lasciato a temperatura ambiente per 7 giorni, al fine di permettere la formazione dei complessi fenolici con il ponte acetaldeide. Alla fine del periodo di incubazione, da ogni falcon sono state preparate 3 aliquote da 10 mL a cui sono stati aggiunti 50 mg/L di quercetina. E' stata eseguita la misurazione della torbidità a tempi diversi.

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Fase preparatoria

Per scegliere i vini su cui fare le prove di stabilità tramite colloidali protettori, è stato necessario svolgere una fase preliminare, così da sapere quali vini producessero la maggiore torbidità in seguito all'aggiunta di quercetina.

Le prove sono state svolte con dosaggi di 25, 50, 75 e 100 mg/L di quercetina aglicone pura aggiunta ai vini di ogni annata, tenendo anche i controlli senza quercetina aggiunta.



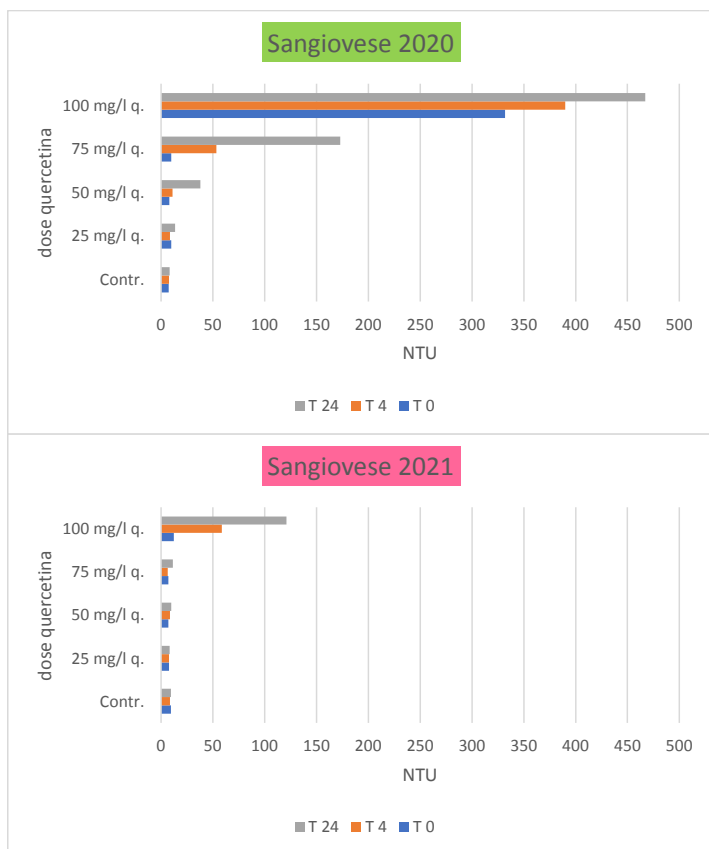


Grafico 1: torbidità dei vini Sangiovese (annate 2018, 2019, 2020, 2021) immediatamente dopo l'aggiunta di quercetina aglicone (T 0), dopo 4 ore (T 4) e 24 ore (T 24) dalla sua aggiunta.

Come si può vedere dai grafici, per ogni dosaggio di quercetina scelto e per i vini di ogni annata, la torbidità è andata via via aumentando nelle ventiquattr'ore successive all'aggiunta. Questo suggerisce, come già osservato da Vendramin e colleghi (2022), che la precipitazione della quercetina non è immediata, ma richiede comunque un certo tempo.

Come prevedibile, a dosi maggiori di quercetina aglicone esogena addizionata, le torbidità sono aumentate. Di contro, si notano torbidità anche molto differenti sui vari vini, soprattutto confrontando le annate più vecchie rispetto al vino del 2021. Al dosaggio più alto di quercetina, infatti, il vino più giovane ha sviluppato nelle 24 ore solo 120 NTU, contro i quasi 500 NTU sviluppati negli altri 3 vini. Questa differenza si mantiene anche ai dosaggi più bassi di quercetina,

tanto che nel vino 2021 al dosaggio di 50 mg/L si sviluppano meno di 10 NTU, che aumentano invece gradatamente all'aumentare dell'età del vino.

Questo diverso comportamento confermerebbe la presenza di un effetto matrice, cioè la presenza in alcuni vini di molecole che possono avere un effetto stabilizzante nei confronti della quercetina, limitandone la precipitazione.

Sulla base dei dati di letteratura i composti più probabili con queste caratteristiche sarebbero i cosiddetti colloidali protettori. Per questo motivo, su entrambi i vini più instabili è stato fatto un esperimento con aggiunta di diversi colloidali commerciali per verificare se qualcuno di questi potesse limitare o ritardare la precipitazione della quercetina aggiunta.

3.2 Effetti dell'aggiunta di colloidali protettori

3.2.1 Effetti dell'aggiunta di colloidali protettori su vino 2018

La prima prova è stata fatta con il vino che al dosaggio di 50 mg/L di quercetina aglicone esogena aggiunta ha manifestato la maggior torbidità. A questo vino sono stati addizionati vari colloidali protettori di diversa natura, per valutarne l'eventuale efficacia.

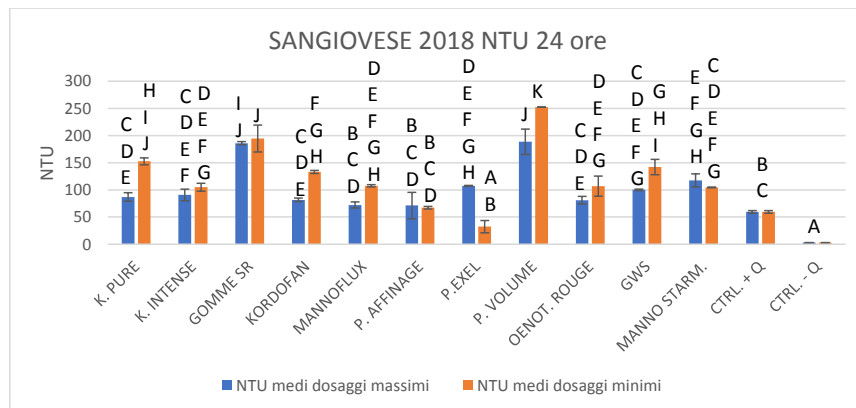


Grafico 2: torbidità del Sangiovese annata 2018 dopo 24 ore dall'aggiunta di quercetina aglicone e colloidali protettori addizionati con diversi dosaggi. Analisi statistica ANOVA, $p < 0,05$.

Come si può notare dal grafico, nell'arco delle 24 ore, gran parte dei prodotti ha fatto sviluppare una torbidità uguale o addirittura superiore rispetto al controllo con la sola quercetina aglicone. L'unico prodotto che ha permesso di ottenere una torbidità intermedia tra il controllo senza quercetina aggiunta e il controllo addizionato del flavonolo è il Phylia exel® (mannoproteine e

proteine di lievito) al dosaggio minimo (20 g/hL), la differenza non è però statisticamente significativa, per cui non si può parlare di effettiva riduzione della torbidità.

Di conseguenza, tra tutti i prodotti provati, nessuno ha fornito soddisfacenti riduzioni di torbidità sul vino dell'annata 2018. Risulta difficilmente spiegabile come il prodotto che ha dato i migliori risultati sia stato quello con dosaggio minimo, visto che lo stesso coadiuvante al dosaggio massimo ha dato una torbidità quasi più elevata rispetto al controllo con quercetina aglicone aggiunta. Questa aleatorietà in termini di torbidità rispetto al dosaggio si è manifestata in generale per tutti i prodotti, talvolta i dosaggi minimi hanno dato torbidità minori rispetto a quelli massimi e viceversa.

3.2.2 Effetti dell'aggiunta di colloidii protettori su vino 2019

Lo stesso esperimento, per conferma, è stato ripetuto sul vino 2019. In questo caso è stato aggiunto un polisaccaride di vinacciolo, ottenuto mediante estrazione basica dei vinaccioli e successiva precipitazione acida delle proteine.

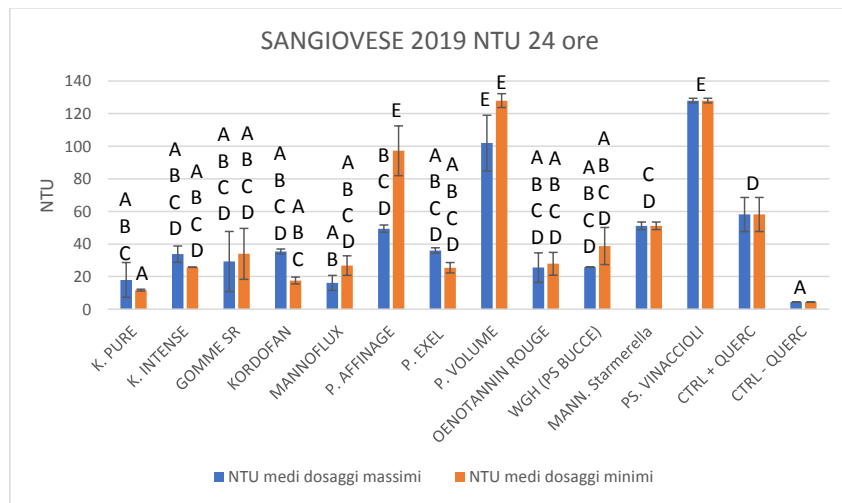


Grafico 3: torbidità del Sangiovese annata 2019 dopo 24 ore dall'aggiunta di quercetina aglicone e colloidii protettori addizionati con diversi dosaggi. Analisi statistica ANOVA, $p < 0,05$.

L'istogramma mostra in questo caso come la maggioranza dei prodotti abbia portato a torbidità inferiori rispetto al controllo addizionato con sola quercetina aglicone, seppur per molti di essi non vi siano differenze statisticamente significative rispetto al controllo.

I prodotti che hanno avuto un significativo effetto positivo sulla riduzione della torbidità sono stati Kordofan al dosaggio minimo (2,5 cL/hL) e Mannoflux al dosaggio massimo (80 mL/hL); mentre il prodotto Kylma pure ha funzionato sia al dosaggio massimo (5 cL/hL) che minimo (2,5 cL/hL), quest'ultimo ha dato i risultati migliori e paragonabili al controllo senza quercetina aggiunta. I polisaccaridi di vinaccioli hanno dato la torbidità più alta.

Su questo vino abbiamo avuto riscontri positivi con tre differenti prodotti di diversa natura quali Kordofan (gomma arabica d'acacia) al dosaggio minimo, Mannoflux (polisaccaridi di parete del lievito) al dosaggio massimo e Kylma pure (soluzione concentrata al 20% di poliaspartato di potassio) al dosaggio minimo. Anche in questo caso, vi è una certa discordanza tra il dosaggio dei prodotti e la torbidità, la quale talvolta è maggiore con dosi maggiori di coadiuvanti e viceversa.

I risultati ottenuti con i colloidali protettori sui due vini hanno ulteriormente confermato come l'effetto matrice abbia un'azione sul comportamento dei colloidali e sulla loro interazione con la quercetina. Dal confronto tra i due vini non è stato possibile nemmeno identificare un prodotto che abbia dato un comportamento costante e ripetibile.

Per semplificare il sistema e poter meglio indagare l'effetto delle singole componenti, alcune delle prove successive sono state eseguite su soluzione modello simil-vino.

3.3 Prove con polisaccaridi estratti da vini 2018 e 2021

Sempre sulla base della convinzione che il diverso comportamento dei vini nei confronti della quercetina fosse legato alla diversa composizione in colloidali protettori, i polisaccaridi dei due vini con comportamento diverso (2018 e 2021) sono stati precipitati con etanolo e riaggiunti ad una soluzione modello in presenza di quercetina.

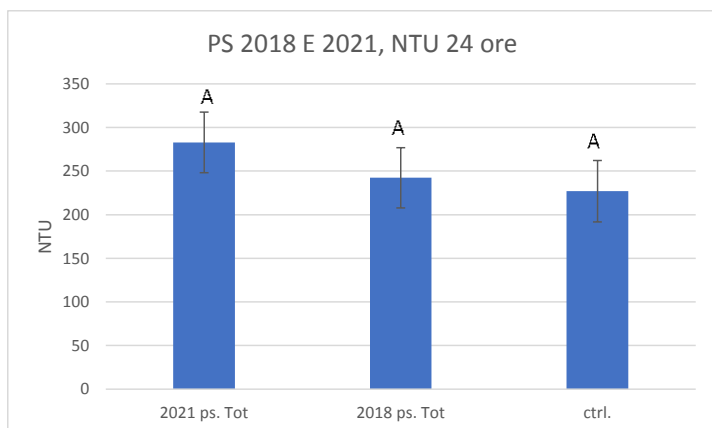


Grafico 4: torbidità sui vini dopo 24 ore dall'aggiunta di quercetina aglicone e l'addizione di polisaccaridi endogeni su vino modello. Analisi statistica ANOVA, $p < 0,05$.

L'istogramma mostra come i polisaccaridi estratti dal vino del 2021 abbiano dato torbidità maggiori rispetto al controllo addizionato di sola quercetina aglicone, mentre risultati intermedi si sono avuti con i polisaccaridi estratti dal vino 2018.

In questo caso, evidentemente, i polisaccaridi non sembrano essere i responsabili di una maggior stabilità della quercetina nel vino.

3.4 Effetti dell'aggiunta di polifenoli su vino modello

Un'altra componente che potrebbe complessare la quercetina modificando la sua solubilità è quella fenolica. È già noto, ad esempio, che la quercetina può interagire con altri composti fenolici, in particolare con gli antociani, mediante il fenomeno chiamato copigmentazione.

Tra le classi fenoliche più abbondanti nel vino rosso possiamo trovare oltre agli antociani, anche i tannini, sia condensati (di origine endogena) che idrolizzabili (derivati dal legno).

È stato quindi valutato lo sviluppo di torbidità della quercetina in presenza di diverse concentrazioni di queste molecole.

Secondo un lavoro di Mattivi et al. (2003) svolto su scala industriale; con una quantità di 1300 mg/kg di antociani estraibili dalle bucce, quelli effettivamente liberati nel vino sono circa 800 mg/L.

Il lavoro indica anche come, a fronte di 2300 mg/kg di proantocianidine estraibili dalle bucce, oltre 2000 mg/L delle stesse passano nel vino.

Uno studio di Puccioni et al. (2013) svolto su varietà autoctone toscane, mostra invece come solo alcune di esse raggiungano o superino i 500 mg/L di antociani, tra le quali non figura il Sangiovese; e concentrazioni di proantocianidine nei vini frequentemente superiori a 1500 mg/L.

Secondo diversi lavori citati in uno studio di He e colleghi (2012), il quantitativo di antociani nei vini rossi giovani varia da 500 mg/L a oltre 2000 mg/L.

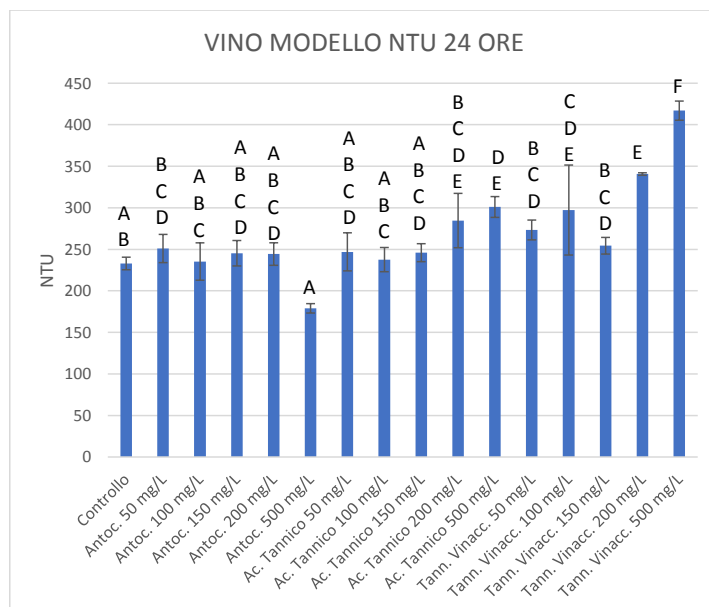


Grafico 5: torbidità su vino modello 24 ore dopo l'aggiunta di quercetina aglicone e di diversi composti fenolici addizionati in differenti concentrazioni. Analisi statistica ANOVA, $p < 0,05$.

Come mostra il grafico, tannini di vinaccioli e acido tannico a ogni dosaggio hanno dato risultati paragonabili o peggiori rispetto al controllo addizionato di quercetina aglicone (50 mg/L).

L'unico prodotto che ha mostrato un effetto significativo sono stati gli antociani al dosaggio di 500 mg/L, confermando la loro capacità di interagire con la quercetina.

3.5 Prove con frazioni polifenoliche estratte dai vini 2018 e 2021 su vino modello

Come ulteriore conferma del ruolo degli antociani nella stabilizzazione della quercetina, è stata eseguita una prova estraendo direttamente i polifenoli dai due vini con comportamento molto diverso (2018 e 2021). Sia i polifenoli totali che le frazioni separate di flavonoidi e antociani sono stati aggiunti a vino modello.

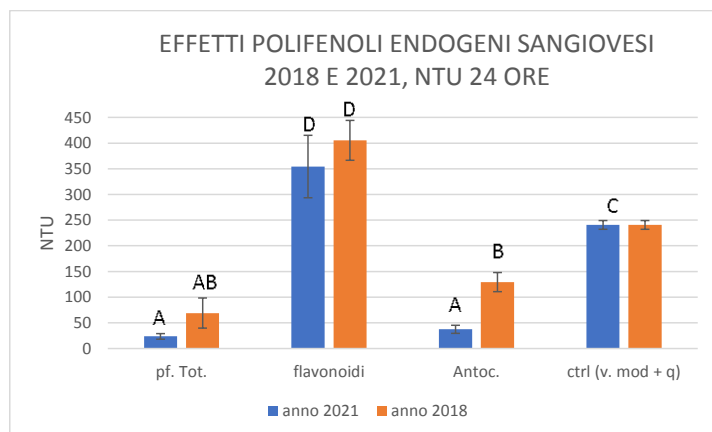


Grafico 6: torbidità sui vini dopo 24 ore dall'aggiunta di quercetina aglicone e l'addizione di diverse frazioni fenoliche purificate e ri-aggiunte ai medesimi vini. Analisi statistica ANOVA, $p < 0,05$.

L'istogramma mostra come le frazioni di polifenoli totali abbiano un effetto positivo riducendo in entrambi i casi in maniera significativa la torbidità rispetto al vino modello con sola quercetina esogena. Anche se in modo non significativo, i polifenoli del vino dell'annata 2021 hanno avuto un effetto migliore rispetto a quelli del vino 2018.

Andando più in dettaglio sulle due diverse classi che compongono i polifenoli totali, si è visto che i flavonoidi di entrambi i vini aumentano la torbidità in modo statisticamente significativo rispetto al controllo con solo quercetina aglicone aggiunta. Ciò ha senso, poiché in quella matrice di flavonoidi è presente una ulteriore quota di quercetina che è andata a sommarsi a quella esogena aumentando quindi la precipitazione.

Risultati positivi in termini di riduzione della torbidità si sono avuti invece con le frazioni di antociani estratti da entrambi i vini. In questo caso la differenza tra 2018 e 2021 è diventata anche statisticamente significativa, confermando che gli antociani sono probabilmente la frazione molecolare responsabile della maggiore stabilità della quercetina nel vino 2021 rispetto al vino 2018.

È necessario ricordare che gli antociani durante la maturazione del vino subiscono una importante evoluzione, che porta dalla presenza di antociani prevalentemente in forma libera, alla presenza di forme via via sempre più polimerizzate che risultano anche più stabili nei confronti dell'ossidazione. La differenza di comportamento delle frazioni dei due vini presi in esame, quindi, potrebbe essere quindi non solo quantitativa, ma anche qualitativa.

Come ulteriore verifica gli antociani presenti nelle frazioni (sia di polifenoli totali che di antociani purificati) risospesi nel volume di partenza sono stati analizzati e quantificati in HPLC.

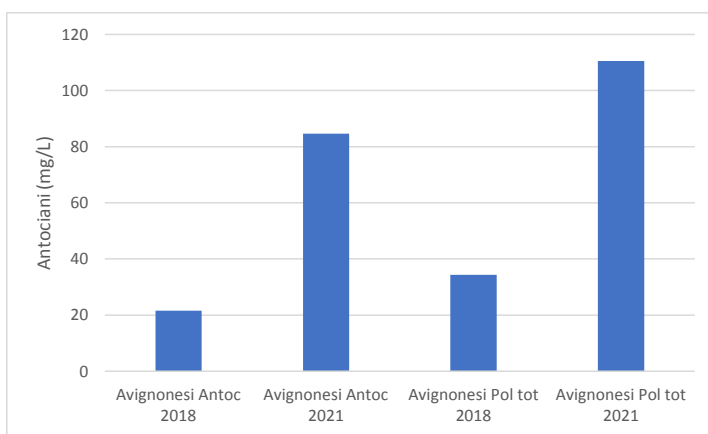


Grafico 7: quantità di antociani e polifenoli dei vini 2018 e 2021 analizzati con HPLC

Come si vede dal grafico, gli antociani presenti nel campione del 2021 sono molto più abbondanti rispetto a quelli del campione del 2018, e questo spiegherebbe la maggiore capacità stabilizzante della frazione estratta dal vino 2021. Da notare che l'HPLC permette di quantificare solo i monomeri glicosilati o agliconi, mentre le eventuali forme complessate, probabilmente più presenti nel campione del 2018, non sono visibili e quantificabili.

In ogni caso, da questa ulteriore analisi è evidente che la forma di antociani più efficace nei confronti della stabilizzazione della quercetina è quella cosiddetta "libera".

Questo farebbe presupporre che lo sviluppo così lento dell'instabilità nel tempo, potrebbe essere dovuto non solo all'aumento della quercetina aglicone che deriva dall'idrolisi acida dei precursori, ma anche ad una modificazione del mezzo stesso che diventerebbe meno capace di mantenere in soluzione la quercetina stessa.

3.6 Prove con vino modello a diversa gradazione alcolica aggiunto di antociani

Una volta stabilito che gli antociani sono i principali responsabili della stabilizzazione della quercetina, è interessante andare a valutare il tipo di legame coinvolto. Secondo i dati di letteratura, e come già anticipato nell'introduzione, il fenomeno più probabile è quello della copigmentazione. Secondo gli studi condotti da Gutierrez et al. (2003), la copigmentazione è una interazione di tipo non covalente che diventa via via sempre meno importante all'aumentare della concentrazione di etanolo.

Per valutare quindi il coinvolgimento della copigmentazione, sono state allestite delle prove con un vino modello preparato a diverse concentrazioni di etanolo (0, 5, 10 e 15%). Considerando che l'etanolo è un ottimo solvente per la quercetina e potrebbe quindi modificare direttamente anche la sua solubilità, è stato eseguito anche un controllo con sola quercetina senza antociani.

La stessa prova è poi stata eseguita in presenza di antociani. La torbidità è stata registrata dopo 24 ore.

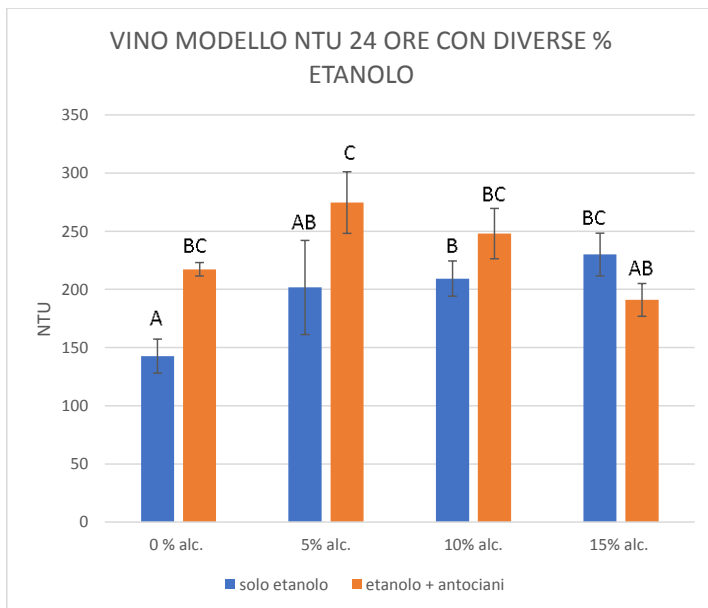


Grafico 2: valutazione dell'effetto di co-pigmentazione sulla torbidità di vino modello a diverse % alcoliche e di antociani aggiunti, 24 ore dopo l'aggiunta di quercetina aglicone. Analisi statistica ANOVA, $p < 0,05$.

Il grafico mostra un comportamento diverso da quello atteso. In particolare, aumentando il contenuto di etanolo ci si attendeva una diminuzione della torbidità, che invece è aumentata in maniera regolare con l'aumento della concentrazione di alcol.

In presenza di antociani si è osservato un ulteriore aumento di instabilità soprattutto alle basse concentrazioni di etanolo (dove, invece, ci si aspetterebbe un maggior contributo della copigmentazione) e solo a 15% di alcol si è potuto osservare un effetto stabilizzante degli antociani. Questi risultati sono stati del tutto inattesi, e sembrerebbero andare contro l'ipotesi di un coinvolgimento del fenomeno della copigmentazione. Il fatto, però, che anche la quercetina da sola aumenti la sua instabilità all'aumentare della presenza di etanolo, suggerisce di indagare più a fondo questo aspetto.

3.7 Prove con vino modello addizionato di antociani, tannini e acetaldeide a diversa concentrazione

Infine, per verificare l'ipotesi che gli antociani liberi siano più efficaci rispetto a quelli polimerizzati, tipici dei vini invecchiati, si è voluto simulare un processo di polimerizzazione degli antociani.

L'acetaldeide aiuta nel costituire dei complessi antociano-tannini fondamentali per la stabilità del colore e della matrice fenolica nei vini. L'etanale deriva sia dalla fermentazione che dalla fase post-fermentativa in botte o barrique, dove la micro-ossigenazione permette l'ossidazione dell'etanolo ad acetaldeide. Visto l'eccezionale contributo che svolge, abbiamo pensato di valutare l'effetto dell'etanale sulla stabilità della quercetina, ipotizzando che essa venisse più facilmente legata ad antociani o tannini per mezzo dell'acetaldeide, formando complessi stabili nel tempo.

La prova è stata eseguita in vino modello, aggiungendo tannini e antociani sia da soli che in combinazione, e aggiungendo diverse concentrazioni di acetaldeide (che dovrebbe promuovere la formazione di ponte etanale tra antociani e tannini condensati).

Dopo una settimana di sosta a temperatura ambiente, alle soluzioni è stata aggiunta la quercetina per verificare la sua insolubilizzazione nelle diverse matrici.

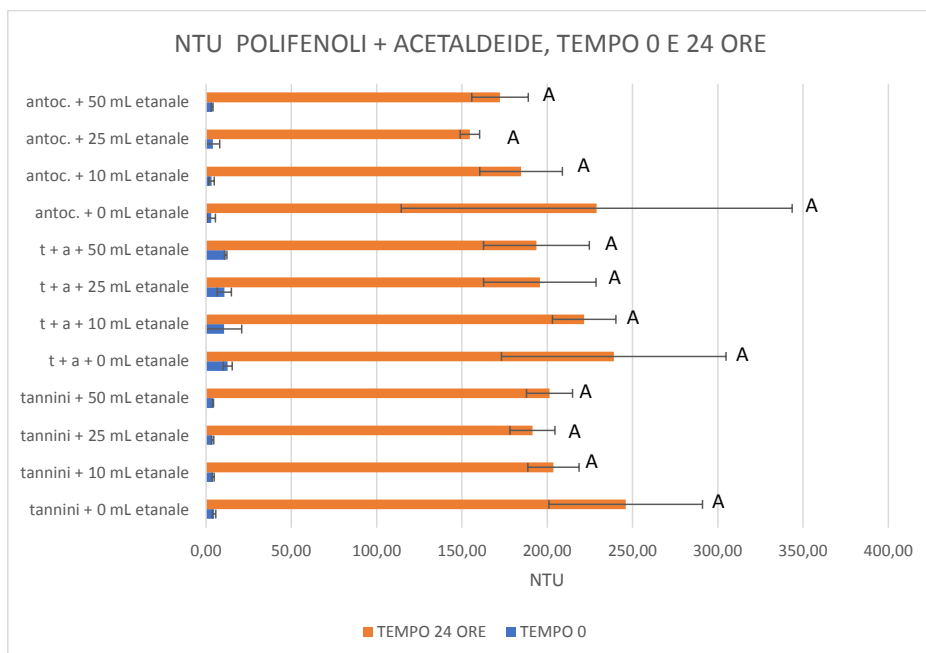


Grafico 10: valutazione dell'effetto di combinazione antociani e tannini con acetaldeide al tempo 0 e dopo 24 ore dall'aggiunta di quercetina aglicone. Analisi statistica ANOVA, $p < 0,05$.

Il grafico mostra come non vi siano in realtà differenze tra le diverse tesi, di conseguenza la formazione di derivati antociani-tannini sembrerebbe non avere un ruolo rispetto alla stabilità della quercetina. Ciò potrebbe però anche derivare dal fatto che sette giorni non sono stati sufficienti per indurre la formazione di complessi.

4 CONCLUSIONI

Il meccanismo di precipitazione della quercetina è piuttosto complesso, come suggeriscono i risultati presentati in questo elaborato di tesi.

Certamente un effetto fondamentale è svolto dalla matrice del vino, come visto confrontando il Sangiovese del 2018 rispetto a quello de 2021, che hanno grosse differenze nel riuscire a solubilizzare la quercetina.

Il lavoro mostra come la componente che ha effetti importanti sul meccanismo di precipitazione della quercetina sia quella polifenolica, ed in particolare la frazione antocianica, in grado di ridurre in modo sensibile il precipitato e quindi le torbidità.

Il meccanismo con cui gli antociani stabilizzano la quercetina non è ancora del tutto chiarito e, come riportato in questa tesi, richiede ulteriori approfondimenti.

Da un punto di vista pratico, andrebbero favorite quelle tecniche che promuovono l'estrazione degli antociani: però, sebbene una macerazione prolungata, anche post-fermentativa, possa permettere di estrarre più antociani con effetto stabilizzante, è anche vero che essa porterebbe ad un incremento dell'estrazione di quercetina presente anch'essa nelle bucce.

Un buon compromesso potrebbe essere, in quelle situazioni in cui il protocollo enologico lo consente, una macerazione pre-fermentativa più duratura, per favorire l'estrazione degli antociani, e poi svinare anticipatamente.

BIBLIOGRAFIA:

Boulton R. (2001) The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52:2, 67–87.

Col d'Orcia-ISVEA (2017). *Rivista infowine*, paragrafo 3.

Esperienze di stabilizzazione della quercetina su Brunello di Montalcino (2017), sedimento quercetina. *YouTube (minuto 04.57)*.

Gambuti et al. (2020), New insights into the formation of precipitates of quercetin in Sangiovese wines. *J Food Sci Technol.* 57(7): 2602–2611.

GAMBUTI et al., 2007. Effect of Winemaking Practices on Color Indexes and Selected Bioactive Phenolics of Aglianico Wine. *Journal of Food Science*, 72 (9), 623-628.

Gawel, R. (1998). Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 4, 74-95.

Goldberg, D.M., et al., 1998. Quercetin and *p*-Coumaric Acid Concentrations in Commercial Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49 (2), 142-151.

Gruppo Operativo VINTEGRO (2022), Le aspettative dei consumatori in materia di stabilità dei vini. *YouTube (minuto 09.00 in poi)*.

He et al., Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Journal Molecule. Volume 17(2): 1571–1601*.

IACOPINI et al., 2008. Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, *in vitro* antioxidant activity and interactions. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 589-598.

Keller et al. (1998), Interaction of Nitrogen Availability During Bloom and Light Intensity During Veraison. II. Effects on Anthocyanin and Phenolic Development During Grape Ripening. *Am. J. Enol. Vitic.* 49:3, 341-349.

Lanati et al. (2014), Precipitati di Quercetina nei vini. *OIV articolo 06007, discussione, pagina 3 paragrafo 2*.

Macheix, J.-J. et al. (2005): Les composés phénoliques dans les interactions entre la plante et son environnement. In *Les Composés Phénoliques des Végétaux, Presses Polytechniques et Universitaires Romandes: Lausanne, CH, 2005; pp 67–119.*

Manzo et al., SPA; Effetti delle tecniche di vinificazione sull'estrazione fenolica nel vino rosso, *Linkedin, paragrafi "termovinificazione", "effetti del biossido di zolfo", "criomacerazione".*

Martelli (2018), QUERCETINA E SANGIOVESE: IL PARADOSSO ENOLOGICO DEI VINI DI PREGIO, *paragrafo 2 "La sintesi nelle uve e i fattori che influenzano l'accumulo".*

Mateus et al., 2004; influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta, Volume 513, Issue 1, pp. 135-140.*

Mattivi et al. (2003), IL POTENZIALE POLIFENOLICO DELLE UVE ROSSE E LA SUA APPLICAZIONE IN ENOLOGIA. *L'enologo, pagina 3 figura 4.*

Mattivi et al. (2006), Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *J. Agric. Food Chem., 54(20):7692-702.*

Modalità di applicazione relative al vino biologico. *Regolamento di esecuzione (UE) n. 203/2012.*

Pastore et al. (2017) Anthocyanin and flavonol composition response to veraison leaf removal on Cabernet Sauvignon, Nero d'Avola, Raboso Piave and Sangiovese Vitis vinifera L. cultivars. Scientia Horticulturae, Volume 218, pagine 147-155.

PRICE, S.F., et al.,1995. Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot noir Grapes and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture, 46 (2), 187-194.*

Puccioni et al. (2013), CARATTERIZZAZIONE DELLA COMPOSIZIONE FENOLICA DI VINI ROSSI DA VARIETÀ AUTOCTONE TOSCANE. *Enoforum, Arezzo, 7-9 maggio 2013; pagina 3 figura 1.*

PVPP O.I.V. (2007), *paragrafo 1 e 4.*

Quattrocali, Sangiovese, *pagina 1 paragrafo 1 (Il vitigno Sangiovese e i suoi vini).*

Ribereau-Gayon, *trattato di enologia 2, 3° edizione, stabilizzazione-trattamenti.*

ROMBOLI et al., 2015. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida zemplinina* on quercetin, vitisin A and hydroxytyrosol contents in Sangiovese wines. *World Journal of Microbiology and Biotechnology, 31, 1137-1145.*

Romboli, Y. et al. (2018), Effetto della defogliazione precoce sulla composizione dei glicosidi della quercetina nelle uve Sangiovese. *Rivista Infowine.*

Somers T.C., Ziemelis G. (1985) Flavonol haze in white wines. *Vitis, 24, 43-50.*

Terrier et al. (2009); Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. *Wine Chemistry and Biochemistry (pp. 463-507).*

UNIONE ITALIANA VINI, *Vitigni d'Italia: chi sale e chi scende.*

Vendramin et al. (2022), Prevention of quercetin precipitation in red wines: a promising enzymatic solution. *OENO ONE Vol. 56 No. 1 (2022)*.