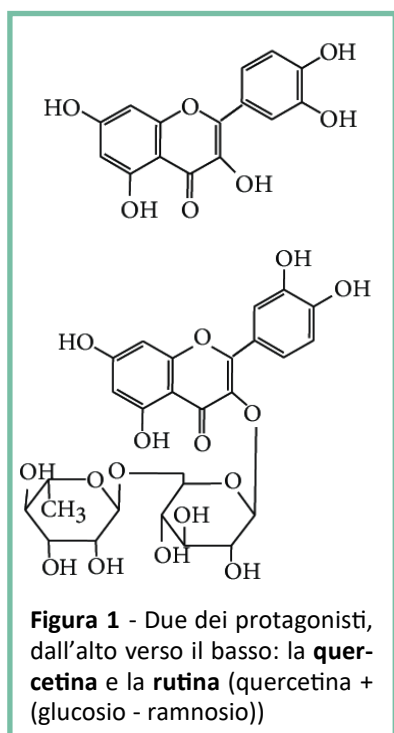


LA QUERCETINA

i più recenti lavori riguardo alla presenza di questo tetraossiflavonolo nei vini, le problematiche ingenerate, i possibili trattamenti specifici per la rimozione dei suoi eccessi - e quelli dei suoi glicosidi - dai vini da Sangiovese.



Aspetti generali

La quercetina, formula bruta $C_{15}H_{10}O_7$, massa molecolare 302,236 g/mol, è una molecola appartenente alla classe dei flavonoli largamente presente nel mondo vegetale (capperi, cipolle, the, camomilla, biancospino, fra gli altri, ne contengono importanti quantità). Presente nelle uve, sia nelle varietà a bacca bianca che a bacca rossa, tra vini è particolarmente riscontrabile nei rossi a seguito del processo di macerazione.

La quercetina e relativi glicosidi molto verosimilmente rivestono nel vegetale un ruolo fotoprotettore, essendo in grado di assorbire radiazioni UV-A (325-400 nm) e - soprattutto - UV-B (280-325 nm). Possono trovarsi nella pianta, come già accennato, sia in forma libera che glicosilata, potendo quindi agevolmente essere accumulate, traslocata-

te e rapidamente rese attive a mezzo opportuni processi di glicosilazione e deglicosilazione gestiti dalla pianta a livello enzimatico.

Per conseguenza le stagioni dal decorso caldo ed asciutto, con prolungati ed elevati livelli di irraggiamento, sono quelle che massimamente favoriscono l'accumulo dei flavonoli. Va da se dunque che l'attuale evoluzione climatica tende a favorire un sempre maggior innalzamento dei livelli di questi polifenoli nelle uve e di conseguenza nei vini da queste prodotti. Da un punto di vista agronomico e colturale pare confermato che tutte le pratiche volte a favorire l'esposizione dei grappoli portino ad una maggior sintesi dei flavonoli: se ne riscontrano livelli superiori anche di un fattore 10 nei grappoli in pieno sole rispetto a quelli in ombra. Parimenti le pratiche enologiche volte a massimizzare l'estrazione dei composti polifenolici dalle parti solide favoriscono l'accumulo di rilevanti quantitativi di flavonoli nel vino, dunque anche di quercetina.

Il contenuto di quercetina nei vini presenta - nelle sue varie forme - un notevole interesse nutrizionale, stante le molteplici proprietà a lei ascritte e riscontrate.

La più razionale strategia da adottare dovrebbe essere pertanto quella di modularne il contenuto entro il limite della sua permanenza in soluzione.

Macroscopicamente questo tetraossiflavonolo si presenta come un composto solido, di colore giallo, poco o nulla solubile in acqua, lo è in misura notevolmente maggiore in solventi non polari e se glicosilato (unito cioè ad uno o più zuccheri).

La questione della solubilità

Ed è proprio attorno a quanto appena detto riguardo la solubilità che si incentra la problematica quercetina nei vini.

La quercetina come tale possiede una configurazione molecolare caratterizzata da donatori (atomi di idrogeno) ed accettori (atomi di ossigeno) di legami dislocati in modo da favorirne la disposizione ordinata in cristalli (vedi fig. 2).

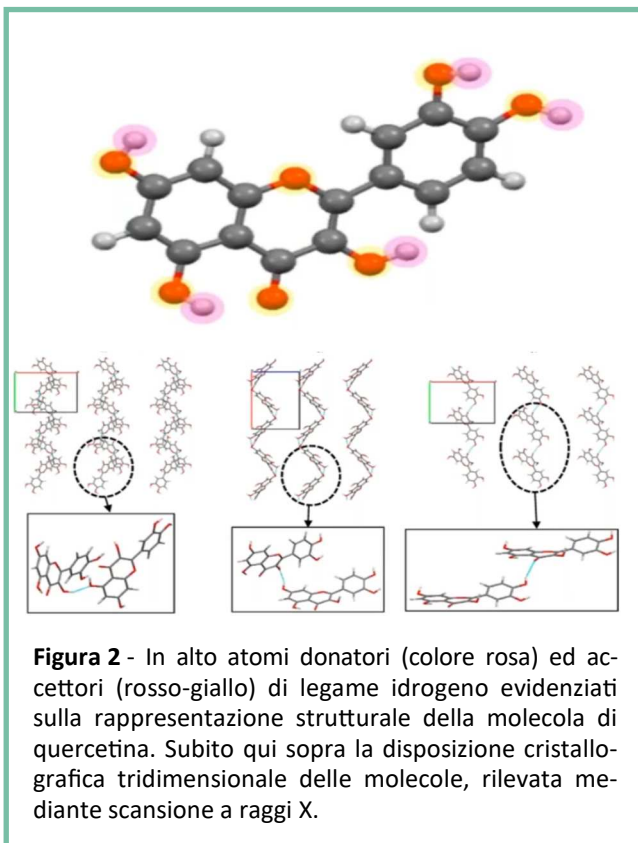
L'esame di tali cristalli effettuata ai raggi X ne evidenzia l'efficace ed efficiente impaccettamento nelle tre dimensioni, e la conseguente elevata stabilità.

Dunque le molecole di quercetina tendono ad organizzarsi stabilmente in strutture cristalline. Ciò rende il composto come tale scarsamente o per nulla biodisponibile, ed il vegetale, quando si trova in condizione di doverlo traslocare deve legarlo ad uno zucchero con legame glicosidico, "stratagemma" che lo rende solubile.

A questo proposito alla pagina <https://www.sciencephoto.com/media/539829/view/glucose-molecules-dissolving-in-water> viene visualizzata in maniera decisamente efficace la cinetica di formazione dei legami che contribuiscono a mantenere in soluzione acquosa una molecola polare come quella del glucosio: in chimica infatti vale la legge che afferma "il simile scioglie il simile".

La quercetina, molecola non polare, non presenta fenomeni di spiccata attrazione con le molecole d'acqua, e pertanto tende a restare isolata da esse e avvicinarsi ad altre molecole sue simili, con le quali presenta invece una decisamente maggior affinità, formando precipitati evidenti ed organizzati in strutture cristalline di forma peculiare, visibili, a differenti ingrandimenti e modalità di ripresa, in Fig. 3. E' possibile quindi apprezzare una solubilità della quercetina medesima marcatamente differente in varie situazioni, che possono innanzitutto differenziarsi in base ai differenti solventi - o miscela tra di essi.

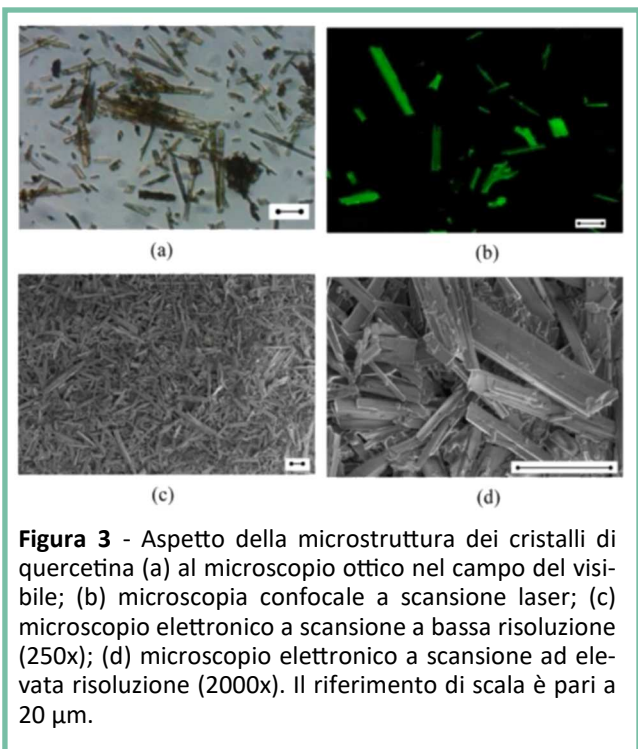
Ad esempio una soluzione a 1200 mg/L di quercetina in metanolo al 100% si presenta limpida, con precipitato totalmente assente; la medesima concentrazione di quercetina



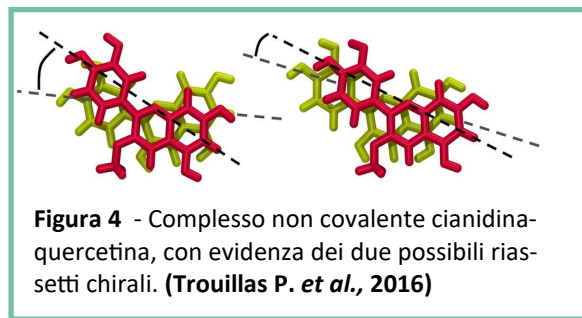
in acqua al 12% di etanolo appare opalescente, con notevole evidenza di precipitato.

Nell'ambito di una prova sperimentale condotta con concentrazioni crescenti di quercetina fra 3 e 60 mg/L, si è constatato che, in soluzione idroalcolica paragonabile al vino (12% vol), già alla concentrazione di 3 mg/L questa si mantiene stabile - senza comparsa di precipitato - solamente per un giorno, dopo di che appare il precipitato.

Nel corso delle stesse prove eseguite utilizzando come solvente al posto della soluzione idroalcolica vino Sangiovese, inizialmente praticamente privo di quercetina



e suoi glicosidi, il campione a 3 mg/L si è mantenuto stabile per 12 giorni, mostrando precipitato al 15°, il trattato a 5 mg/L si è mantenuto



stabile per 8 giorni, mostrandone al 12°, ed il trattato a 7 mg/L ha mostrato precipitato all'8° giorno. Dall'insieme di queste osservazioni si evince l'importanza del solvente e, per uno stesso solvente, la rilevanza del fattore tempo, oltre alla concentrazione, nel determinare la precipitazione. E' dunque legittimo domandarsi a questo punto quali possano essere gli altri fattori, oltre ad acqua ed alcol, che interferiscono sulla solubilità della quercetina nel vino. La presenza delle antocianine è sicuramente uno di questi: in seguito a fenomeni di copigmentazione tra quercetina ed antocianine vengono a formarsi una serie di "sandwich" antocianina-quercetina-antocianina che, grazie alla natura polare delle antocianine, (cariche positivamente) mantengono il complesso in soluzione in un solvente polare quale il vino. Questo fenomeno contribuisce al prolungarsi del tempo di permanenza della quercetina in soluzione nei vini (vedi fig. 4).

Posto poi che il vino è una matrice estremamente complessa che oltre all'acqua di vegetazione e all'etanolo derivato dalla fermentazione può contenere fino a 500 e più sostanze, e che ciascuna di queste può, almeno in linea teorica, esercitare un'influenza sulla matrice stessa, non è per nulla semplice esprimere *tout-court* un valore univoco di solubilità riferito alla quercetina (come anche per una qualsiasi altra specie chimica).

Infatti, a seguito di una ricerca mirata sull'argomento "solubilità della quercetina in vino" emergono dalla bibliografia una serie di valori che possono anche differire in maniera considerevole.

Posto un valore di solubilità in acqua < 2,63 mg/L, tenuto conto che la solubilità migliora in etanolo ma che quello contenuto nel vino (12 - 15% vol) non è sufficiente ad incrementarla in maniera sensibile, e che esiste accordo sulla dipendenza dal tempo per la formazione del precipitato, si riscontrano comunque valori che possono andare dai 5 mg/L riportati da Boulton, 2001, ai 15 mg/L (dati ISVEA, 2020 da Gorelli, 2020) fino agli addirittura 125 mg/L riferiti da Price et al., 2009.

Quindi se, in prima istanza, nel trattare i suaccennati limiti di solubilità vanno tenuti in considerazione i fattori compositivi del vino in questione, l'intervallo di variazione appena visto è così ampio perché subentra un'altra importante variabile quale è il metodo di analisi (ossia il "metro" che usiamo) per misurare tale concentrazione.

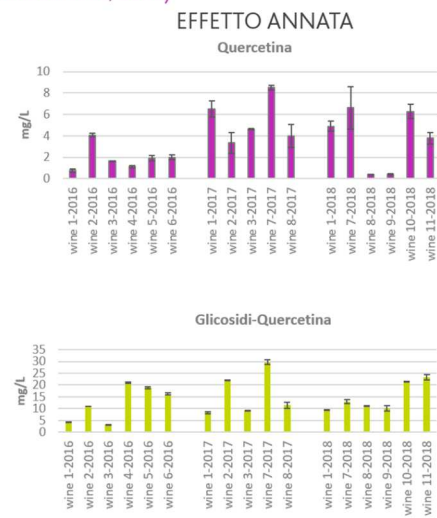
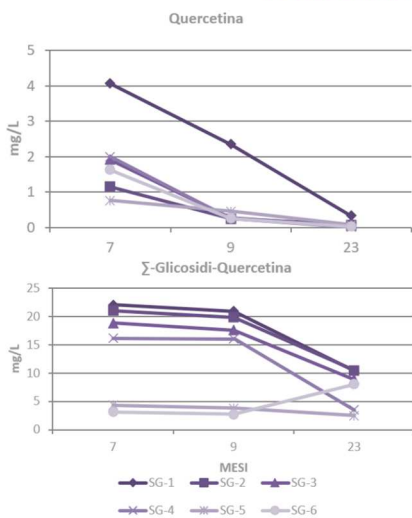
La questione analitica e la sua importanza

E' infatti necessario a questo punto considerare anche le sorgenti di variabilità legate alle differenti metodiche ed alle procedure analitiche adottate in laboratorio. Anche prendendo in considerazione, a mero titolo di esempio, una metodologia di analisi quantitativa semplice e diretta, eseguita cioè sulla molecola presente nella matrice "tal quale", non sottoposta cioè a procedure di estrazione, i risultati possono variare anche in maniera considerevole. Per fare un esempio pratico una semplice "acidità totale" di un vino, misurata per titolazione diretta degli acidi presenti nel campione, può variare dal valore di 4,74 g/L a quello di 7,25 g/L a seconda se si esprima il risultato in acido solforico piuttosto che in acido tartarico.

E quanto appena detto in conseguenza della mera adozione di una differente unità di misura a seguito di una misurazione diretta.

FLAVONOLI DEL SANGIOVESE NEL TEMPO

Metodo OIV all'HPLC (Gambuti et al., 2020)



L'idrolisi dei glicosidi: dopo 23 mesi più del 70% del contenuto iniziale di GQ è stata degradato

L'annata (2017=siccitosa) ha un impatto importante sul contenuto di quercetina.

LAFFORT® FINING

Le analisi di determinazione qualitativa e quantitativa relative ad un composto polifenolico come la quercetina vengono al momento attuale eseguite prevalentemente mediante strumentazioni **HPLC** (*High Performance Liquid Chromatography*), strumento - è *in primis* da sottolineare - nel quale non è quasi mai possibile procedere all'analisi sul tal quale della matrice in esame, ma si rende invece necessario procedere a prepararla tramite manipolazioni di varia invasività e complessità (es. estrazione del composto da analizzare in adeguato solvente, determinazioni di misura effettuate previa calibrazione eseguita mediante iniezioni successive di opportuni sistemi solvente/soluto a differenti concentrazioni note). Ed è pertanto evidente come le sorgenti di variabilità aumentino con il crescere del numero dei fattori in gioco: non è pertanto aderente alla realtà affermare l'esistenza di un valore "unico" per un parametro chimico quale la soglia di precipitazione della quercetina in vino, questione tanto più dibattuta e controversa visto che, al momento attuale, non è ancora stato definito dalla competente Commissione OIV un metodo ufficiale di analisi.

La diffusione della quercetina nei vitigni italiani

A seguito di una articolata ricerca condotta per iniziativa di BioLaffort, in collaborazione con l'Università di Napoli, sezione distaccata di Avellino, in diversi *terroir* della Toscana, nel corso di più annate, a partire dal 2016, sono stati ottenuti i dati relativi ai livelli del contenuto ed all'evoluzione nel tempo, di quercetina e suoi glicosidi, nei vini ottenuti da uve Sangiovese, in occasione di vinificazioni in scala di cantina (per i primi tre anni) e, successivamente, per l'approfondimento dei dettagli, in scala sperimentale.

Detti lavori hanno consentito di raccogliere una messe molto consistente di dati che in questa sede è ovviamente possibile riportare solamente in estrema sintesi. Per maggiori dettagli è possibile fare riferimento all'evento WEB disponibile online al seguente link: <https://www.youtube.com/watch?v=QKtTCtvzNE&t=7s>

Dato per assodato che dai vigneti coltivati in **zone luminose e termicamente esposte** provengono, *ceteris paribus*, uve a più elevato contenuto di quercetina, risultano essere, tra le varietà più diffuse, Sangiovese, Nebbiolo, Aglianico, Cabernet Sauvignon e Primitivo quelle a più elevato tenore in quercetina, assieme ad alcune a distribuzione prevalentemente locale quali Pallagrello, Casavecchia e Magliocco. Altrettanto rilevante, oltre alle variabili legate all'esposizione ed alla varietà, è risultata essere quella legata all'annata. Tutti noi possiamo ricordare il decorso stagionale 2017 come uno dei più luminosi, siccitosi e termicamente caratterizzati degli ultimi anni; ne appare evidente l'effetto sul contenuto dei vini nei diagrammi in alto alla pagina - parte destra della figura.

Sulla sinistra, nella medesima immagine, si evidenziano invece gli andamenti della quercetina e dei suoi glicosidi nel tempo, durante la conservazione del vino: trascorsi circa due anni dalla vinificazione più del 70% del contenuto originario in glicosidi è stato degradato, e praticamente il 100% della quercetina presente come tale non si ritrova più nella matrice, a seguito di una molto probabile precipitazione.

È stato anche possibile evidenziare nei vini una diminuzione del tenore in quercetina a seguito di fenomeni ossidativi secondari a micro-ossigenazione. Interessante notare al riguardo come, in altre matrici vegetali ricche in quercetina, siano stati riscontrati fenomeni di polimerizzazione ossidativa con formazione di dimeri e trimeri ed imbrunimento della matrice. Di questo fenomeno, al momento, non vi è peraltro alcun riscontro in vino.

Dal momento in cui abbiamo appurato di essere in grado di quantificare in maniera corretta e

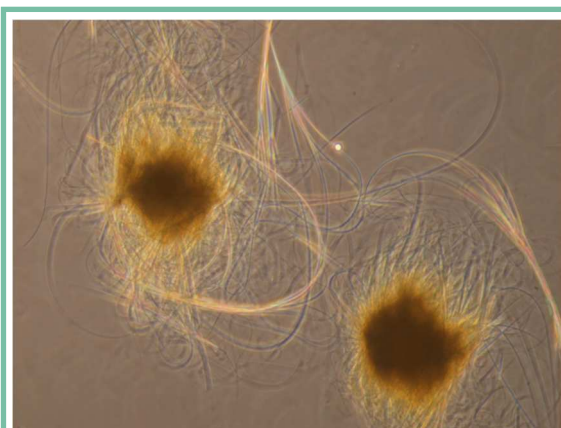


Figura 5 - Cristalli di quercetina in vino bianco imbottigliato (Vermentino, millesimo 2011). Notare l'aspetto filamentoso della struttura cristallina e la provenienza dell'uva da ambiente decisamente xerico. (cort. Lab. SARCO)

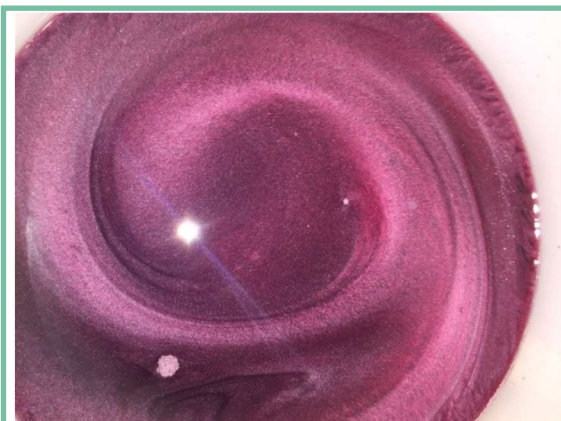


Figura 6 - Deposito post-svinatura di vino rosso (millesimo 2020) contenente cristalli di quercetina di recente formazione. Notare, evidente anche solo a livello macroscopico, la loro struttura meno complessa ed organizzata rispetto a quella nell'immagine qui sopra. (cortesia A. Rinaldi)

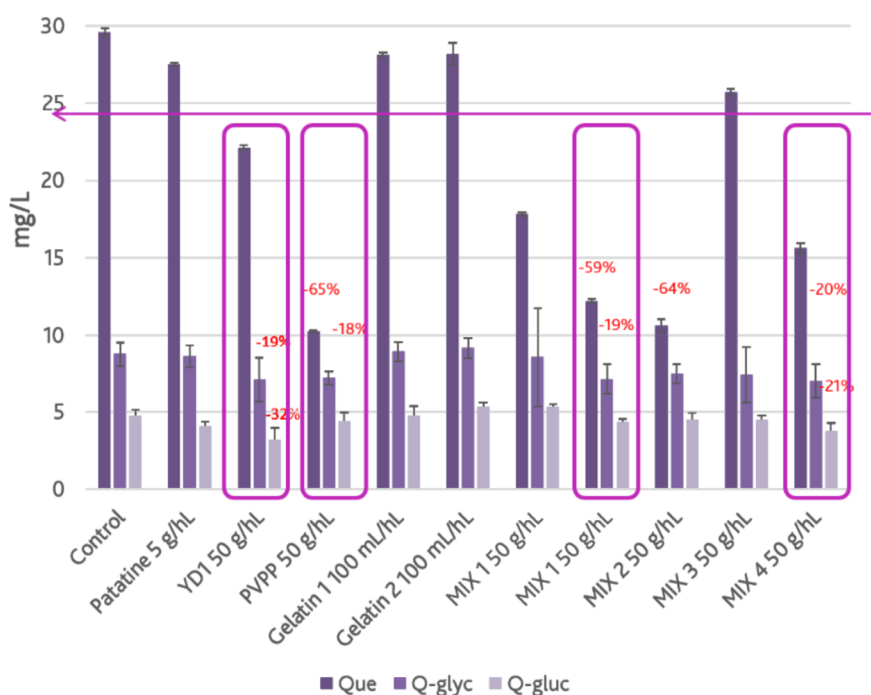
ripetibile quercetina e suoi precursori nel vino, si è riusciti a risalire a quali siano le cinetiche evolutive dei prima citati composti:

- *in primis* idrolisi sequenziale (dapprima rutina - il di-glicoside - indi i monoglicosidi) e conseguente aumento nel tempo della quercetina;
- progressiva diminuzione della quercetina per ossidazione; successivo decadimento per precipitazione e/o trasformazione chimica in altri composti;
- quercetina e quercetina glucuronide risultano essere i composti ritrovati nei precipitati di vini analizzati nelle prove (Sangiovese e Nebbiolo) instabili dal punto di vista polifenolico.

Al tecnico enologo è necessario quindi uno strumento in grado di limitare efficacemente il rischio di indesiderate precipitazioni, limitando convenientemente i quantitativi di quercetina in gioco. Nel corso dei lavori svolti al riguardo dal gruppo di ricerca Biolaffort sono stati testati numerosi prodotti di chiarifica di differente derivazione e tipologia, dalle gelatine alle proteine vegetali agli estratti di lievito al PVPP, sia puri che in miscela tra loro, *cfr.* istogrammi nella figura a fondo pagina.

L'obiettivo prefissato era quello di individuare un prodotto o formulato chiarificante idoneo alla rimozione della quercetina e dei suoi precursori, di elevata efficacia, utilizzabile a partire da dosi dell'ordine di 10 g/hL, agevole e rapida disperdibilità in acqua, di facile messa in opera, dotato di elevata velocità di precipitazione, minima produzione di feccia, rispettoso della materia colorante e caratterizzato da un buon potere di stabilizzazione della stessa. Nel corso delle prove sono stati anche valutati gli effetti di differenti preparati enzimatici utilizzati sia da soli che preliminarmente alla chiarifica: lo scopo dell'applicazione dell'enzima ad attività β -glicosidasi potrebbe essere quello di indurre una precoce e quanto più possibile completa idrolisi della frazione glicosidata della quercetina, con formazione di solo aglicone, insolubile e facilmente eliminabile. I risultati ottenuti a seguito dei test condotti non si sono però rivelati conformi alle attese. A questo punto ci siamo interrogati circa gli effetti che potrebbe avere l'impiego di un preparato enzimatico β -glicosidasi più performante sulla componente del colore. Le antocianine, infatti, sempre appartenenti alla famiglia dei polifenoli, si comportano in maniera del tutto simile alla quercetina, sono stabili e permangono in soluzione nella forma glicosidata, mentre vanno incontro a rapida precipitazione sotto forma di agliconi. Da qui il diffuso impiego, largamente attestato da anni nella pratica di cantina, in fase di vinificazione, di enzimi da estrazione purificati, ossia privati anche dell'attività β -glicosidasi, a garanzia della massima stabilità e protezione a lungo termine della materia colorante.

Le appena esposte osservazioni pratiche e considerazioni hanno indotto il nostro gruppo di ricerca a considerare la chiarifica non abbinata all'utilizzo di enzimi quale strumento principe per **ottimizzare** nei vini il **contenuto in quercetina e suoi glicosidi**, con massimi vantaggi a livello di efficacia, rapidità e precisione d'azione uniti al rispetto della matrice trattata.



Il formulato

Come risultato pratico dei lavori fin qui descritti è stata quindi realizzata POLY-MUST® QUERCETINE, preparazione a base di **PVPP, lieviti inattivati** (*Saccharomyces cerevisiae*) e proteina vegetale (**patatina**).

Si tratta di un agente chiarificante *allergen-free*, adatto all'utilizzo anche su vini idonei a profili di consumo vegetariano e vegano.

Il PVPP in particolare è stato inserito nella formulazione in quanto elemento necessario a garantire al prodotto l'adeguata efficacia chiarificante alle dosi considerate ottimali.

Pur nella consapevolezza dell'impossibilità d'uso del componente in regime BIO si è deciso per la realizzazione del prodotto al massimo della sua efficacia possibile, rimandando al buon esito delle ricerche attualmente in corso il perfezionamento di nuove formulazioni che abbinino garanzia di adeguata efficacia e compatibilità con il massimo numero possibile di disciplinari.

L'inserimento della componente di derivato di lievito è anch'essa funzionale ad ottimizzare la reattività del prodotto nei confronti della quercetina e dei suoi glicosidi.

La patatina, a dosi mirate, si è dimostrata d'altro canto decisamente efficace nel conseguimento e nel miglioramento della stabilità del colore, e nell'ottimizzare il coefficiente efficacia-dosaggio del formulato.

Tempi e modi di applicazione

Nei vini che presentano livelli critici di quercetina aglicone e suoi glicosidi è necessario innanzitutto prefigurare una strategia mirata in modo da poter effettuare i trattamenti necessari nella maniera più efficiente.

Circa il momento nel quale può essere opportuna tale chiarifica è possibile ipotizzarne l'effettuazione nella fase immediatamente successiva al termine della fermentazione malolattica: sarà in tal modo agevole abbinare il travaso di fine malolattica a quello per l'eliminazione delle fecce della chiarifica con Polymust Quercetine, la cui sedimentazione completa può essere attesa in 8 -15 giorni, in funzione della temperatura di cantina e della caratteristiche della matrice chiarificata.

