



## **Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina**

**Jordi Gombau Roigé**

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina

Jordi Gombau Roigé

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina

Jordi Gombau Roigé

Jordi Gombau Roigé

**Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina**

Tesis doctoral dirigida por:

Dr. Fernando Zamora Marín, Dr. Joan Miquel Canals Bosch y Dr. Sergio Gómez Alonso

Departament de Bioquímica i Biotecnologia



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona, 2020

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina

Jordi Gombau Roigé



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

C/Marcel·lí Domingo, 1

43007 Tarragona

Telf: 977 55 88 58

Fax: 977 55 84 46

El Dr. Fernando Zamora Marín y el Dr. Joan Miquel Canals Bosch, profesores titulares del Departamento de Bioquímica y Biotecnología de la Facultad de Enología de la Universitat Rovira i Virgili, y el Dr. Sergio Gómez Alonso, profesor del Departamento de Química Analítica y Tecnología de Alimentos de la Universidad de Castilla-La Mancha.

CERTIFICAN:

Que este trabajo titulado: **“Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina”** que presenta **Jordi Gombau Roigé** para la obtención del título de Doctor, ha sido realizado bajo nuestra dirección en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de esta Univesidad.

Tarragona, 28 de Febrero del 2020.

Dr. Fernando  
Zamora Marín

Dr. Joan Miquel  
Canals Bosch

Dr. Sergio  
Gómez Alonso

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina

Jordi Gombau Roigé

El desarrollo y los análisis de esta tesis doctoral han tenido lugar principalmente a los laboratorios de investigación del Departament de Bioquímica i Biotecnologia de la Universitat Rovira i Virgili y en los laboratorios del Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada de la Universidad de Castilla-La Mancha, bajo la dirección de los profesores Sergio Gómez Alonso, Joan Miquel Canals y Fernando Zamora, y con la colaboración del Dr. Pedro Nadal y de la Dra. Núria Canela del *Center for Omic Sciences*.

Asimismo, las microvinificaciones de los vinos elaborados se realizaron en la bodega experimental *Mas dels Frares* de la Facultat d'Enologia de la Universitat Rovira i Virgili.

Esta tesis doctoral se ha financiado mediante fondos públicos, principalmente por el proyecto de investigación: Innovaciones en el estudio de la astringencia del vino relacionadas con los métodos de análisis, la composición y estructura de los taninos, y los polisacáridos (AGL2014-56594-C2-1-R) siendo la entidad financiadora el Ministerio de Economía y Competitividad, DGIN - Dirección General de Investigación Científica y Técnica.

Durante el desarrollo de la tesis doctoral, el doctorando ha sido financiado gracias a una beca de la Organización Internacional de la Viña y el Vino OIV (2016) y por una beca dentro del programa Martí i Franquès de ayudas a la investigación (contratos de personal investigador predoctoral en formación 2017-2019) de la Universitat Rovira i Virgili.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina

Jordi Gombau Roigé

## Agraïments

En Primer lloc donar el meu més sincer agraïment als professors Fernando Zamora i Joan Miquel Canals per donar-me l'oportunitat d'introduir-me dins al món de la investigació i la innovació, així com donar-me l'oportunitat de realitzar la tesi doctoral al grup de recerca de Tecnologia Enològica.

En acabar la llicenciatura en química i estudiant el Màster en investigació enològica estava treballant a l'empresa privada. Moment on vaig rebre el correu del Fernando i del Joanmi donant-me l'oportunitat d'incorporar-me al seu grup de recerca, el qual sempre els hi hauré d'agrair. Ells buscaven un perfil químic, em van explicar el projecte i la veritat és que em van convèncer; no m'ho vaig pensar dos vegades. Em van aconsellar i em van dir que realitzar una tesi doctoral era una oportunitat única i una manera per créixer tant professionalment com personalment, i la veritat que així ha sigut perquè amb la més sincera humilitat crec que he crescut en aquestes dos vessants. El doctorat m'ha dotat de coneixement científic i d'aptituds tant professionals com personals. De fet, estic totalment convençut que tot això em serà de profit durant el meu futur professional i personal.

Moltes gràcies als meus directors de tesi, el Fernando, el Joanmi y el Sergio, per la vostra supervisió, els vostres consells, el vostre suport i tot el que m'heu ensenyat durant aquest temps. M'heu fet créixer en ciència, he après moltíssim amb vosaltres i heu fet que m'agradi d'allò més la recerca, la ciència, la química i l'enologia. També un agraïment a l'Isidro, que també ha sigut director de la meva tesi doctoral, i ens va deixar fa dos anys. Ell juntament amb el Sergio, m'han aportat i m'han ensenyat moltíssim en la part analítica de la tesi. La pèrdua de l'Isidro és una gran pèrdua per la ciència però jo personalment he tingut la sort de signar les publicacions científiques d'aquesta tesi doctoral juntament amb ell. Gracias por todo Isidro.

No puc deixar passar donar també les gràcies al Nico, professor del departament, per tot el que m'ha suggerit i aconsellat. Sempre té un suggeriment per a millorar qualsevol resultat i sempre té les portes obertes del seu despatx per a qualsevol aclariment. Les meves qüestions en bioquímica y estadística eren pel Nicolas. Ah, i per cert, ha sigut el meu company al sortir fora del laboratori a fumar.

També donar gràcies al COS (Centre de ciències òmiques) i als seus tècnics per la seva disposició en tot moment. Especialment m'agradaria donar les gràcies al Pedro Nadal per la seva gran ajuda amb tot el referent a la ressonància de plasmons de superfície, una tècnica difícilíssima, que sense ell no hagués pogut posar a punt.

També agrair als tècnics del departament tot el seu suport logístic i per aconsellar-me en tot moment. Especialment a la Rosa i al Braulio que m'han ajudat sempre amb tot el que he necessitat. Moltes gràcies.

Als meus companys de laboratori i de grup de recerca, l' Olga , l' Adeline, el Diego, el Pere, el Juan, la Maria, l' Elena, la Laura, el Pol, per compartir coneixements, laboratori i treballar junts en ciència. Ha sigut tot un plaer. També moltes gràcies pels moments fora del laboratori: congressos, sopars, Santa Tecla, cerveses, pàdel, festa etc... ens ho hem passat genial. A l' Olga y l'Adeline, companyes de projecte, un plaer el coneixement científic aportat juntament en tanins enològics. I un agraïment especial al Pere, un company fantàstic y a més a més un gran amic. Tots els resultats obtinguts durant la tesi no han sigut escrits i publicats sense abans ser comentats i exposats al Pere, tot discutint la jugada. Donar també les gràcies a tots els estudiants que han passat pel laboratori; el Daniel, la Lucie, el Corentin, el Rafa, l'Arnau, el Sergi, el Gabriel. També als altres companys del laboratori 120 y tots els professors i companys del departament. Tots ells han sigut part del meu dia a dia.

Agrair a tots els meus amics, i especialment al Pere i la Marina, per tot el seu suport. També a la meva família; avia, avi, tiets, tietes, cosins, cosines, per tot el seu recolzament imprescindible durant tot aquest temps.

Un agraïment immens i amb majúscules als meus pares, per fer-me costat en tota la meva etapa acadèmica, professional i personal. També pel seu recolzament en les decisions preses durant la tesi doctoral i pel seu suport incondicional tant anímic com econòmic durant tots els meus estudis universitaris. Sense ells no hagués pogut ser possible. A la meva germana Judit, de la qual vaig seguir els seus passos d'estudiar a la universitat i que més d'una vegada li he dit: - mira això que he publicat.

Agrair a la Miriam per ser la companya d'aquest gran viatge, el de la tesi, i per aguantar-me durant tot el temps que la tesi ha durat. Gracias Miriam, te quiero mucho.

Aquesta tesi us la dedico a tots vosaltres, i donar-vos moltes gràcies pel granet de sorra que tots heu aportat per a que pugui defensar-la i aconseguir la titulació de Doctor. Però, amb el permís de tots vosaltres voldria fer una dedicació especial a una persona molt important per a mi, que malauradament ja no la tenim entre nosaltres, el meu cosí Joaquim; mol més que un cosí. Ell ens ha deixat injustament a la part final de la tesi, i m'agradaria dedicar-li perquè sé que ell hagués estat molt content de que li hagués dit que ja soc Doctor. Va per tu Joaquim!

**Dedicada als meus pares, a la meva germana, a la  
Miriam i als meus amics.**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina

Jordi Gombau Roigé

# ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b>	15
<hr/>	
<b>1. Los compuestos fenólicos de la uva y el vino: Clasificación, Estructura química, propiedades e implicaciones sensoriales en el vino.....</b>	17
1.1 No Flavonoides .....	18
1.1.1 Ácidos fenólicos.....	18
1.1.2 Estilbenos.....	20
1.1.3 Taninos hidrolizables.....	20
1.1.3.1 Galotaninos.....	20
1.1.3.2 Elagitaninos.....	21
1.2 Flavonoides.....	22
1.2.1 Flavonoles.....	23
1.2.2 Flavononoles y Flavonas.....	23
1.2.3 Antocianos.....	24
1.2.4 Flavan-3-oles.....	26
<b>2. Morfología de la uva.....</b>	32
2.1 La pulpa.....	33
2.2 Las pieles.....	34
2.3 Las semillas.....	35
<b>3. Desarrollo y maduración de la baya.....</b>	36
3.1 Proceso de desarrollo de la baya.....	36
3.2 Biosíntesis de compuestos fenólicos: ruta metabólica.....	37
3.3 Evolución de los compuestos fenólicos durante la maduración de la uva.....	38
3.4 La madurez tecnológica y la madurez fenólica.....	40
3.5 Factores que influyen en la biosíntesis de compuestos fenólicos durante la maduración de la uva.....	41
<b>4. Evolución de los compuestos fenólicos durante la vinificación del vino tinto</b>	43
4.1 Vinificación del vino tinto.....	43
4.2 Extracción de los compuestos fenólicos durante la vinificación.....	44
4.3 Factores que influyen en la extracción de los compuestos fenólicos.....	47
4.4 Evolución de los compuestos fenólicos durante la crianza.....	49
<b>5. Taninos enológicos.....</b>	50
5.1 Características, uso y propiedades .....	50
5.2 Clasificación de los taninos enológicos.....	51
<b>6. El color del vino tinto.....</b>	52
6.1 Los antocianos y el color del vino tinto.....	52

# ÍNDICE

6.2 Copigmentación.....	58
6.3 Formación de nuevos pigmentos: pigmentos poliméricos y piranoantocianos	60
<b>7. La astringencia.....</b>	<b>65</b>
7.1 Definición de la astringencia.....	65
7.2 Factores que influyen en la percepción de astringencia .....	65
7.3 Metodologías para la determinación de la astringencia .....	67
7.4 Resonancia de plasmones superficiales.....	68
<b>Referencias.....</b>	<b>71</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>89</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>93</b>
<b>CAPÍTULO 1:</b> Influencia de las semillas de la uva sobre la composición y astringencia de vinos elaborados con las variedades Tempranillo, Garnacha, Merlot y Cabernet Sauvignon.....	95
<b>CAPÍTULO 2:</b> Influencia de los taninos enológicos sobre la copigmentación de la malvidina-3- <i>O</i> -monoglucósido en una solución de vino modelo.....	121
<b>CAPÍTULO 3:</b> Estudio de la interacción entre la mucina y los taninos enológicos mediante la resonancia de plasmones superficiales: relación con la astringencia...	149
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>175</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>187</b>

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina

Jordi Gombau Roigé



# INTRODUCCIÓN

---



## INTRODUCCIÓN

### 1. Los compuestos fenólicos de la uva y el vino: Clasificación, Estructura química, propiedades e implicaciones sensoriales en el vino

Los compuestos fenólicos son una familia de moléculas que se encuentran en la uva, además de encontrarse en muchos otros tejidos vegetales. Dichos compuestos son metabolitos secundarios de la vid, cuya biosíntesis parece estar relacionada con necesidades específicas como son la protección frente a la radiación ultravioleta y a los ataques fúngicos.

La estructura química de los compuestos fenólicos se caracteriza por contener como mínimo un anillo bencénico sustituido por uno o más grupos hidroxilo (Monagas et al., 2005), conocido como grupo fenol. Esta familia de compuestos se puede dividir en dos subclases según su estructura química: los flavonoides y los no flavonoides. A su vez estas dos subclases se dividen en diferentes familias de compuestos, tal y como se muestra en la Figura 1.

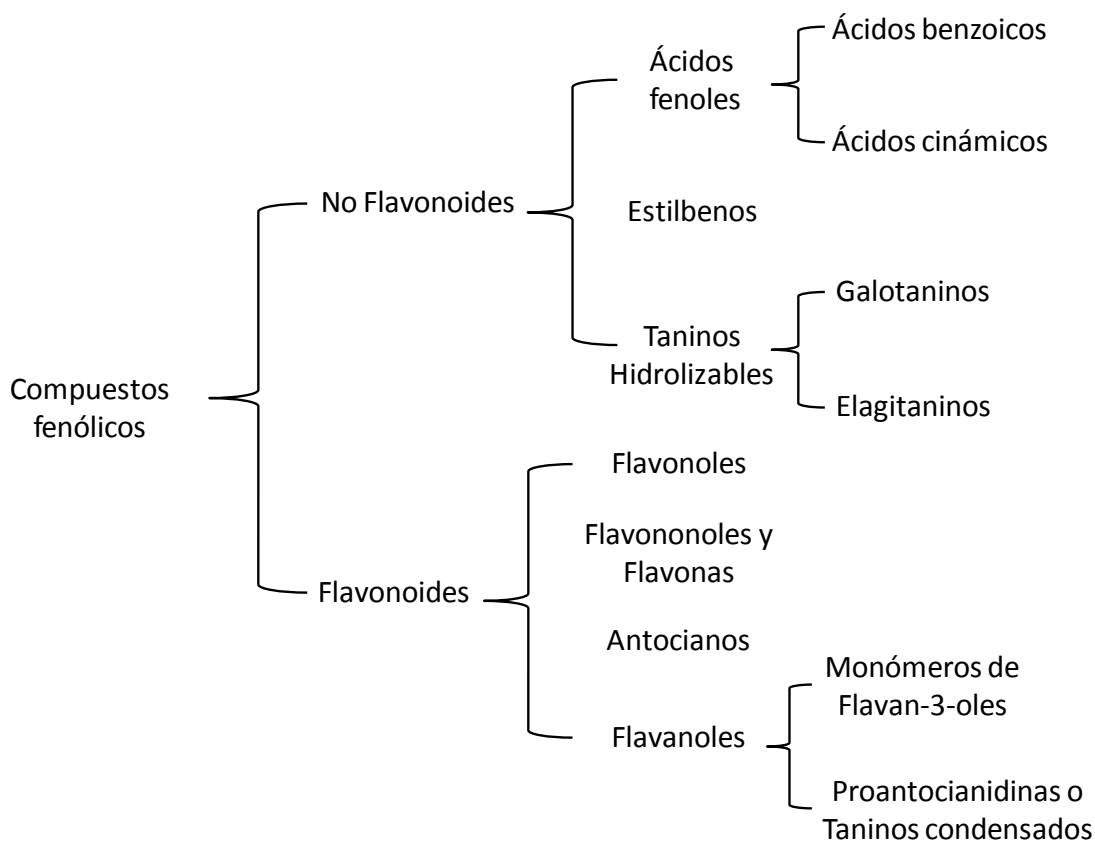


Figura 1: Clasificación de los compuestos fenólicos de la uva y el vino.

Los compuestos fenólicos de la uva se encuentran localizados en los hollejos, las semillas, el raspón y la pulpa. Éstos se liberan de las partes sólidas de la uva (pieles, semillas y raspón) al vino durante el proceso de fermentación/maceración (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Su concentración en el vino depende de muchos factores tales

## INTRODUCCIÓN

como la variedad de uva (Ortega-Regules et al., 2008b), su nivel de madurez (Gil et al., 2012) y el proceso de vinificación y crianza (Sacchi et al., 2006).

En el vino los compuestos fenólicos contribuyen a diferentes características organolépticas tales como el color, el cuerpo, la estructura, el sabor amargo y la astringencia (Kennedy, 2008). También participan en procesos de oxidación, en la estabilización del color y en el proceso de crianza proporcionándonos una idea de la capacidad de un vino para envejecer. Asimismo, varios estudios han atribuido a los compuestos fenólicos características beneficiosas para la salud debido a sus propiedades antioxidantes (Block, 1992; Ma et al., 2010).

### 1.1 No Flavonoides

Los principales compuestos fenólicos no flavonoides que encontramos en la uva son los ácidos fenoles, en su forma esterificada o no, y los estilbenos (Figura 1).

Dentro del grupo de los compuestos fenólicos no flavonoides también encontramos los taninos hidrolizables. Aunque éstos no se encuentran de forma natural en la uva, pueden hallarse en el vino durante el proceso de crianza por liberación de éstos por parte de la barrica de roble y/o por el uso de taninos enológicos comerciales en vinificación (Navarro et al., 2016b; Chira y Teissedre, 2013).

#### 1.1.1 Ácidos fenoles

Los ácidos fenoles son los compuestos fenólicos no flavonoides que se hallan en mayor concentración en la uva, encontrándose mayoritariamente en la pulpa y las pieles. La concentración de ácidos fenoles en el vino tinto es de alrededor de 100-200 mg/L, dependiendo de la variedad. Aunque éstos son incoloros, su oxidación es la causante del pardeamiento de los mostos y los vinos (Singleton, 1987). Además, los ácidos fenoles también pueden contribuir indirectamente al color del vino tinto mediante el proceso de la copigmentación, ya que se ha descrito que pueden actuar como eficaces copigmentos (Darias-Martín et al., 2001; Gómez-Míguez et al., 2006). Desde un punto de vista organoléptico los ácidos fenoles no parecen tener un impacto en el sabor y el aroma del vino, no obstante, son precursores de fenoles volátiles (4-etil-guaiacol y 4-etil-fenol) formados por algunos microorganismos del género *Brettanomyces* (Chatonnet et al., 1992).

Según su estructura química, caracterizada por tener solamente un anillo bencénico, se pueden clasificar en dos familias; los ácidos benzoicos, con un esqueleto C1-C6, y los ácidos cinámicos, con un esqueleto C3-C6 (Figura 1).

## INTRODUCCIÓN

Por un lado, referente a los ácidos benzoicos es preciso señalar que la uva contiene ácido gálico en la pulpa (Lu y Foo., 1999), sin embargo éste también puede encontrarse en las semillas esterificado con los flavan-3-oles (Su y Singleton, 1969). Además, el ácido gálico también forma parte de la estructura química de los galotaninos (Hagerman, 1998) y por tanto lo encontraremos en vinos que hayan sido suplementados con taninos enológicos comerciales de esta naturaleza. Sin embargo, en el vino se pueden encontrar otros ácidos benzoicos (Monagas et al., 2005), los cuales se muestran en la Figura 2.

Por otro lado, los ácidos cinámicos se localizan en las vacuolas de las células de la pulpa y las pieles (Ribéreau-Gayon, 1965), encontrándose mayoritariamente en su forma *trans* aunque éstos también se pueden encontrar en su forma *cis* (Adams, 2006). La estructura de los principales ácidos cinámicos presentes en la uva se muestra en la Figura 2. También es necesario mencionar que el ácido *p*-cumárico y el ácido cafeico se combinan con las antocianidinas monoglucosidadas para generar las antocianinas aciladas, vía esterificación de estos ácidos con la molécula de glucosa de la antocianina.

Sin embargo, los ácidos cinámicos suelen hallarse principalmente esterificados con el ácido tartárico siendo los más abundantes en la uva los ésteres tartáricos del ácido *p*-cumárico (ácido cutárico) y del ácido cafeico (ácido caftárico) (Ferrandino et al., 2012).

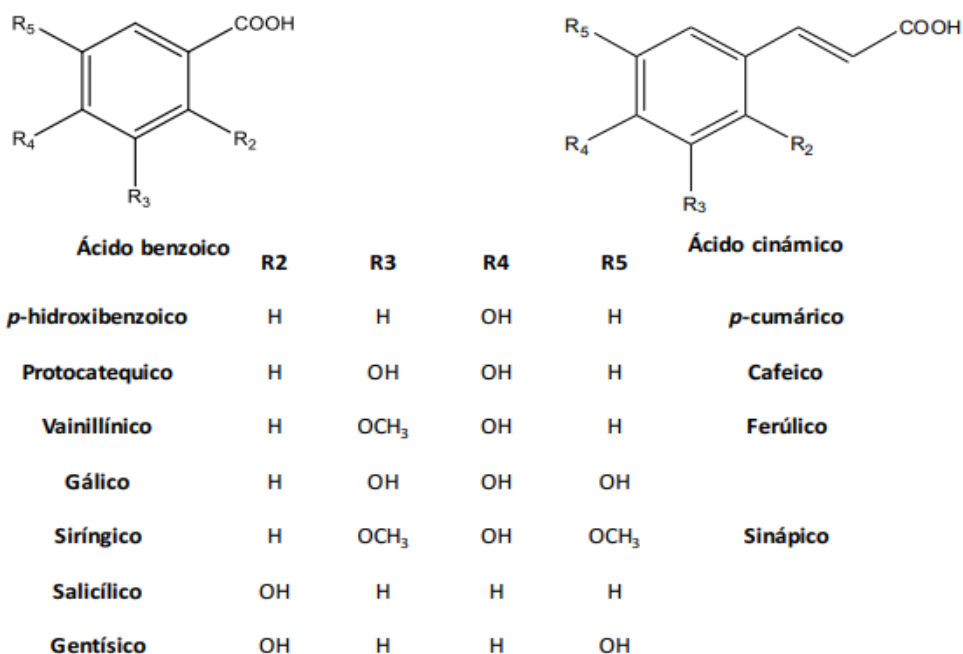


Figura 2: Estructura química de los principales ácidos fenoles; ácidos benzoicos y ácidos cinámicos.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1.2 Estilbenos

Los estilbenos tienen una estructura química basada en un doble enlace donde cada carbono de este doble enlace está enlazado a un anillo bencénico. Se encuentran en la piel de la uva en baja concentración con respecto a los otros compuestos fenólicos presentes. Aunque no tienen un papel importante en las características organolépticas de los vinos, se les atribuye propiedades beneficiosas para la salud humana. En este sentido, se ha descrito que tienen una gran capacidad antioxidante, características beneficiosas contra las enfermedades cardiovasculares y propiedades anti-cancerígenas (Athar et al., 2007; Savouret y Quesne, 2002; Block, 1992). El estilbeno que se encuentra en mayor cantidad en la uva es el *trans*-resveratrol, la estructura del cual se muestra en la Figura 3.

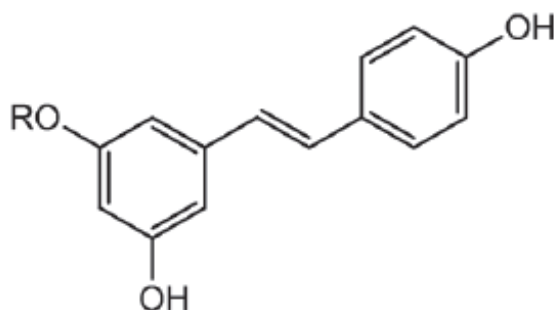


Figura 3: Estructura química del *trans*-resveratrol.

### 1.1.3 Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables no se encuentran de forma natural en la uva. Sin embargo, éstos los podemos encontrar en vino ya que pueden ser liberados por la madera de roble durante la crianza en barrica y/o por el uso de taninos enológicos como aditivos. Dentro de la familia de los taninos hidrolizables se encuentran dos grandes grupos; los galotaninos y los elagitaninos, que se caracterizan por liberar ácido gálico o ácido elágico respectivamente a través de su hidrólisis en medio ácido (Figura 1).

#### 1.1.3.1 Galotaninos

Los galotaninos son formados por esterificación del ácido gálico con los grupos hidroxilo de un carbohidrato, normalmente glucosa (Hagerman, 1998) (Figura 4). Los galotaninos se encuentran básicamente en vino por el uso de éstos como aditivos (taninos enológicos). Sensorialmente tienen un ligero sabor ácido y dan sensaciones muy amargas y astringentes (Delteil, 2000; Zamora, 2003).

## INTRODUCCIÓN

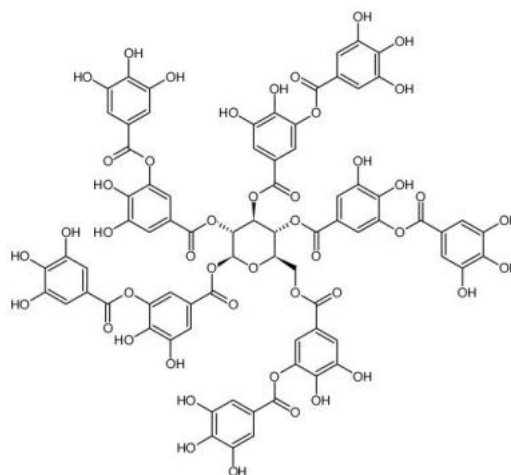


Figura 4: Estructura química de un galotanino.

### 1.1.3.2 Elagitaninos

La estructura química de los elagitaninos consiste en una cadena abierta de glucosa esterificada en las posiciones 4 y 6 por una unidad de hexahidroxidifenoil y en las posiciones 2, 3 y 5 por una unidad de nonahidroxiterfenoil mediante enlace C-glicosídico entre el carbono de la glucosa y la posición 2 de la unidad de trihidroxifenoil (Quideau et al., 2004).

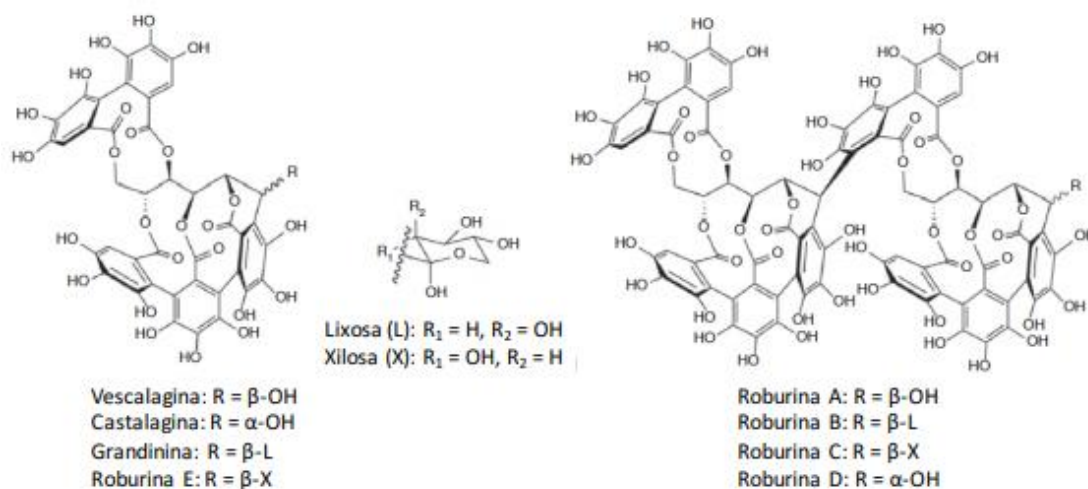


Figura 5: Estructura química de los principales elagitaninos.

Los elagitaninos provienen de la madera de roble y por tanto se encuentran en vinos que han pasado por el proceso de crianza en barrica (Navarro et al., 2016b; Chira y Teissedre, 2013). Se han identificado 8 elagitaninos en la madera de roble (Figura 5)

## INTRODUCCIÓN

siendo la vescalagina y la castalagina los más abundantes, los cuales representan entre un 40-60 % en peso del total de estos compuestos (Fernández de Simón et al., 1999). También podemos encontrar elagitaninos en el vino por el uso de taninos enológicos procedentes de la madera de roble y/o castaño.

Los elagitaninos son grandes antioxidantes por su capacidad de consumir oxígeno disuelto (Pascual et al., 2017; Navarro et al., 2016a; Vignault et al., 2018), por tanto parecen proteger el vino de los procesos de oxidación. Sensorialmente, los elagitaninos contribuyen a la sensación de astringencia y al sabor amargo (Glabasnia y Hofmann, 2006; Michel et al., 2011). También parecen acelerar la condensación de taninos y antocianos con el acetaldehído y ellos mismos pueden reaccionar con los antocianos para formar nuevos pigmentos, por tanto participan en la estabilización del color del vino tinto (Jordao et al., 2008; Chassaing et al., 2010). En este sentido, se han detectado aductos malvidina-elagitanino que se caracterizan por una tonalidad más azulada que sus correspondientes antocianos (Chassaing et al., 2010). Además, los elagitaninos pueden reaccionar con los flavanoles para generar las acutisiminas (Jourdes et al., 2011; Quideau et al., 2004).

### 1.2 Flavonoides

Los flavonoides son los compuestos fenólicos que se encuentran en mayor cantidad en la uva y el vino. Su estructura química se caracteriza por un esqueleto de 15 átomos de carbono (C6-C3-C6) formando una estructura del tipo 2-fenilbenzopirano, tal y como se muestra en la Figura 6. Como se puede observar en la Figura 1, los compuestos fenólicos flavonoides se dividen en 4 familias según el estado de oxidación del heterociclo tipo pirano: Flavonoles, Flavanonoles y Flavonas, Antocianos y Flavanoles (Cheynier et al., 2000). Los flavanoles, a su vez, se pueden clasificar en monómeros de flavan-3-oles y proantocianidinas o taninos condensados.

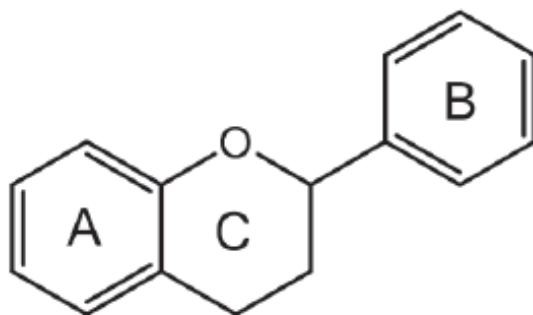


Figura 6: Esqueleto químico genérico de los compuestos fenólicos flavonoides. A: anillo aromático A; C: heterociclo tipo pirano; B: anillo aromático B.

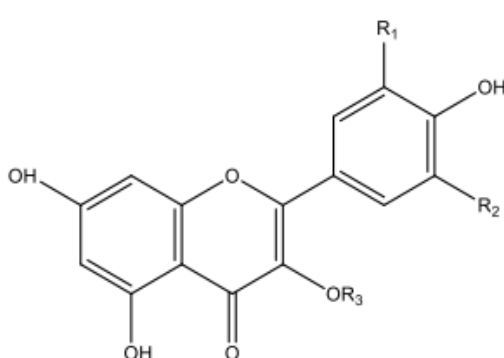


## INTRODUCCIÓN

### 1.2.1 Flavonoles

Los flavonoles son pigmentos de un ligero color amarillo que se encuentran en los hollejos de la uva (Cheynier y Rigaud, 1986), contribuyendo al color amarillo de los vinos blancos y a la componente amarilla del color de los vinos tintos. Su concentración en la uva se halla en el rango de 10 a 300 mg/Kg, dependiendo de la variedad (Ferrandino et al., 2012), y parecen estar estrechamente relacionados con la protección de la uva frente a la radiación ultravioleta (Flint et al., 1986). Se encuentran principalmente 3-*O*-glucosilados en la posición 3 del heterociclo, no obstante, éstos pueden hidrolizarse durante la fermentación alcohólica encontrándose en forma de aglicona (Cheinyer et al., 2000). La estructura química de los flavonoles se puede observar en la Figura 7.

Además, los flavonoles pueden contribuir indirectamente al color del vino tinto actuando como copigmentos, ya que debido a su estructura química plana se ha descrito que son muy eficaces formando complejos de copigmentación con los antocianos (Gómez-Míguez et al., 2006).



	R1	R2
<b>Kaempferol</b>	H	H
<b>Quercetina</b>	OH	H
<b>Miricetina</b>	OH	OH
<b>Isorhamnetina</b>	OCH <sub>3</sub>	H
<b>Laricitrina</b>	OH	OCH <sub>3</sub>
<b>Siringetina</b>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**R3 = Glucosa; Galactosa; Glucurónido**

Figura 7: Estructura química de los principales flavonoles de la uva y el vino.

### 1.2.2 Flavononoles y flavonas

Las flavonas y las flavononoles son pigmentos de color amarillo que tienen una estructura similar a los flavonoles, tal y como se puede observar en la Figura 8. Por un lado, los flavononoles que se encuentran en mayor cantidad en el vino son la astilbina y la engeletina, pudiendo encontrarlos en las pieles, la pulpa y el raspón de la uva (Trousdale y Singleton, 1983; Lu y Foo, 1999). Por otro lado, las principales flavonas que se han identificado en vino son la apigenina y la luteolina (Wang y Huang, 2004; Monagas et al., 2005).

## INTRODUCCIÓN

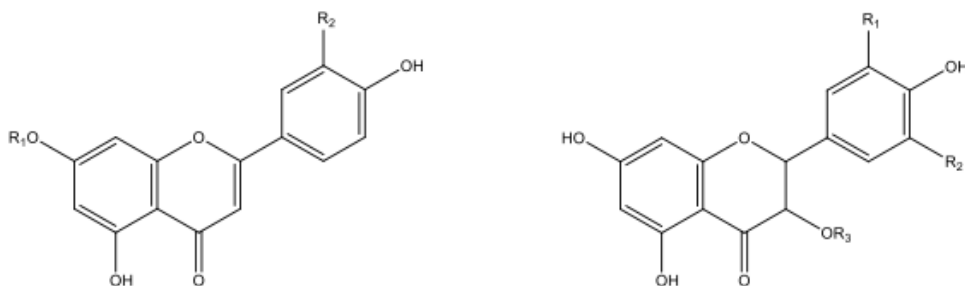


Figura 8. Estructura química genérica de las flavonas y de los flavonoles. A la izquierda de la figura se muestra la estructura genérica de las flavonas y a la derecha de la figura se muestra la estructura genérica de los flavonoles.

### 1.2.3 Antocianos

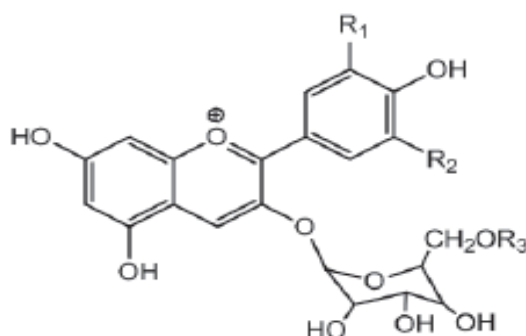
El término antociano (del griego anthos, flor y kyanos, azul) se utiliza para designar a una familia de pigmentos, ampliamente distribuidos en la naturaleza, que absorben la radiación visible y son responsables de ciertos colores de algunos tejidos de los vegetales. Éstos son los pigmentos responsables del color rojo/azulado de las pieles de las uvas tintas y de los vinos tintos que se elaboran (Zamora, 2003). Se encuentran en las vacuolas de las células de las pieles de las uvas tintas pero algunas variedades de uva tintoreras pueden contenerlos también en la pulpa (Castillo-Muñoz et al., 2009). Su concentración en la uva varía según la variedad, encontrándose en concentraciones entre 500 y 3000 mg /kg (Ferrandino et al., 2012).

Los antocianos se pueden encontrar en forma de aglicona, conociéndose como antocianidinas, o glicosilados en la posición 3 del heterociclo por una molécula de glucosa, conociéndose como antocianina, siendo químicamente más estable la estructura en forma de antocianina, la cual es la forma química que predomina en el vino.

La estructura química de las antocianidinas se basa en dos anillos bencénicos enlazados por un heterociclo insaturado oxigenado con carga positiva, formando una estructura química genérica del tipo 2-fenilbenzopirilio (Figura 9). En las variedades de *Vitis vinifera* se encuentran 5 estructuras químicas de antocianidinas-3-*O*-glucósidos que se muestran en la Figura 9, siendo la malvidina-3-*O*-glucósido la mayoritaria. Las diferentes estructuras químicas de las antocianidinas se diferencian por el número y la posición de los grupos hidroxilo y metoxilo localizados en el anillo aromático B de la molécula (Monagas y Bartolomé, 2009), tal y como se puede observar en la Figura 9.

A su vez, las antocianinas se pueden encontrar aciladas en la posición 6 de la molécula de glucosa por ácido acético, ácido *p*-cumárico o ácido cafeico (Mazza y Miniati, 1993), pudiendo encontrar en *Vitis vinifera* los 3-*O*-glucósidos de la malvidina, cianidina, delfinidina, petunidina y peonidina, y sus correspondientes antocianinas aciladas.

## INTRODUCCIÓN



Antocianidina-3-glucósido	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

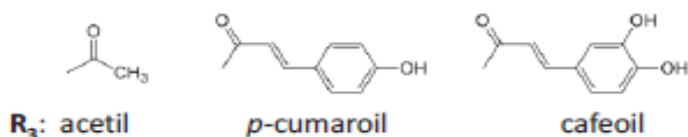


Figura 9: Estructura química de los antocianos de la uva y el vino.

Debido a que los antocianos son los principales pigmentos responsables del color del vino tinto es evidente que éste dependerá en gran medida de la concentración de antocianos en la uva.

La concentración de éstos pigmentos en la uva dependerá en gran medida de la variedad vinífera (Pérez-Navarro et al., 2019; Ortega-Regules et al., 2008b; Río-Segade et al., 2009), de su nivel de madurez, de las técnicas de viticultura aplicadas (Coletta et al., 2013) y de agentes externos tales como el clima (Rodríguez-Montealegre et al., 2006), el terreno y las condiciones del suelo (Matthews y Anderson, 1988), entre otros muchos factores. Además, el color del vino va depender de la extracción de antocianos de las pieles de la uva al vino durante la vinificación, que a su vez estará influenciada por la variedad de uva (Ortega-Regules et al., 2008b; Río-Segade et al., 2009; Romero-Cascales et al., 2005), su nivel de madurez (Gil et al., 2012) y las técnicas y condiciones enológicas empleadas en la vinificación (Busse-Valverde et al., 2011; Sacchi et al., 2005; Zamora et al., 1994; Pascual et al., 2016b; Canals et al., 2008; Lee et al., 2008; Koyama et al., 2007; Cassaca et al., 2013).

## INTRODUCCIÓN

Sin embargo, el color del vino depende de muchos otros factores. Por un lado, los antocianos están en equilibrio con diferentes estructuras químicas de diferente tonalidad en función del pH (Brouillard y Dubois, 1977). Por otro lado, los antocianos tienen varios centros reactivos, nucleófilos y electrófilos (Iacobucci y Sweeny, 1983), que hacen que estas moléculas puedan reaccionar con otras y generar nuevos pigmentos, lo que comportará cambios en el color del vino (He et al., 2012b; Malien-Auberg et al., 2002). Referente a su reactividad, pueden reaccionar con los flavan-3-oles monoméricos y las proantocianidinas formando pigmentos poliméricos, mecanismo que es de gran importancia para la estabilización del color del vino tinto durante el envejecimiento (He et al., 2012b; Francia-Aricha et al., 1997). Asimismo, el fenómeno de la copigmentación puede provocar un incremento y estabilización del color (He et al., 2012a; Boulton, 2001). Además, la temperatura y el nivel de exposición al oxígeno son factores que pueden influir en la oxidación y degradación de los antocianos, lo que comporta una evolución del color del vino tinto (Furtado et al., 1993). De todos estos aspectos se habla en más detalle en el apartado 6 de la introducción “El color del vino tinto”.

### 1.2.4 Flavan-3-oles

Los flavan-3-oles o flavanoles se encuentran en alta concentración en las semillas, los hollejos y el raspón de la uva (Escribano-Bailón et al., 1995; Prieur et al., 1994; Souquet et al., 2000). Son responsables de diferentes características sensoriales de los vinos tintos tales como el cuerpo, la estructura, el sabor amargo, la astringencia y también participan en la estabilización del color. Éstos se pueden encontrar en la uva y en el vino en forma de monómeros, oligómeros y/o polímeros (Zamora, 2003).

Los flavan-3-oles monoméricos tienen una estructura química basada en dos anillos aromáticos enlazados por un heterociclo tipo pirano, tal y como se puede observar en la Figura 10. En su estructura poseen dos carbonos asimétricos (C2 y C3), dando lugar a cuatro isómeros ópticos; (+)-catequina, (-)-catequina, (+)-epicatequina y (-)-epicatequina. La presencia de un tercer grupo hidroxilo en el anillo aromático B de la molécula da lugar a los monómeros de (+)-galocatequina, (-)-galocatequina, (-)-epigalocatequina y (+)-epigalocatequina. Además, estos monómeros pueden encontrarse esterificados en la posición 3 del heterociclo por una molécula de ácido gálico, dando lugar a monómeros galoilados del tipo 3-O-galato. En la Figura 11 se muestra la estructura química de un monómero galoilado tal como el galato de (-)-epicatequina.

En el vino los monómeros encontrados en mayor concentración son la (+)-catequina, la (-)-epicatequina y el galato de (-)-epicatequina (Cheynier et al., 2000) También se encuentran en menor concentración la (+)-galocatequina (Piretti et al., 1976) y la (-)-

## INTRODUCCIÓN

epigalocatequina (Escribano-bailón et al., 1995). Sin embargo, la mayor parte de los flavanoles del vino se encuentran en forma oligomérica y polimérica (Zamora, 2003).

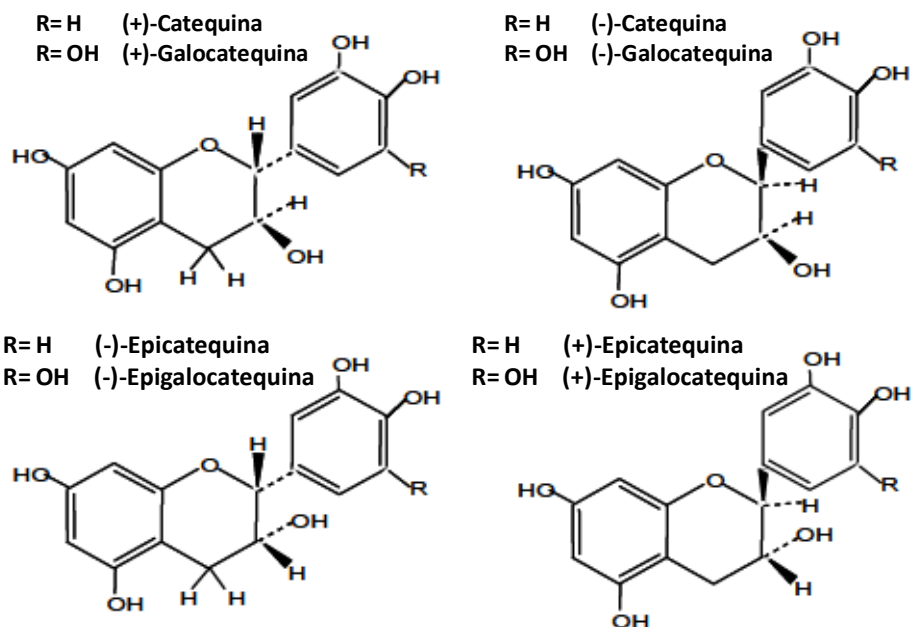


Figura 10: Estructura química de los flavan-3-oles monoméricos.

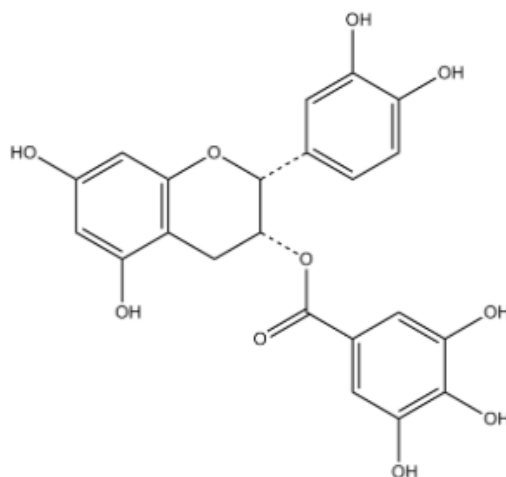


Figura 11: Estructura química del galato de (-)-epicatequina.

Los oligómeros y polímeros de flavan-3-oles, conocidos como proantocianidinas o taninos condensados, están formados por unidades de flavan-3-oles monoméricos enlazados por enlace interflavánico. El término tanino se refiere a las sustancias capaces de ligarse con las proteínas. Estas proantocianidinas pueden tener diversas

## INTRODUCCIÓN

estructuras químicas en función de su composición monomérica, la longitud de la cadena polimérica y su ramificación (Versari et al., 2013).

Las proantocianidinas o taninos condensados se pueden clasificar en diferentes subclases según el producto resultante de la reacción de Bate–Smith, caracterizada por su hidrólisis ácida a alta temperatura. En el caso de la uva y del vino hablamos de procianidinas que liberan cianidina y de prodelfinidinas que liberan delfinidina (Bate–Smith, 1973). En este sentido, las procianidinas están formadas por unidades estructurales de (-)-epicatequina, (+)-catequina o galato de (-)-epicatequina y las prodelfinidinas contienen unidades estructurales de (+)-galocatequina y especialmente de (-)-epigalocatequina. La Figura 12a muestra la estructura química de una proantocianidina.

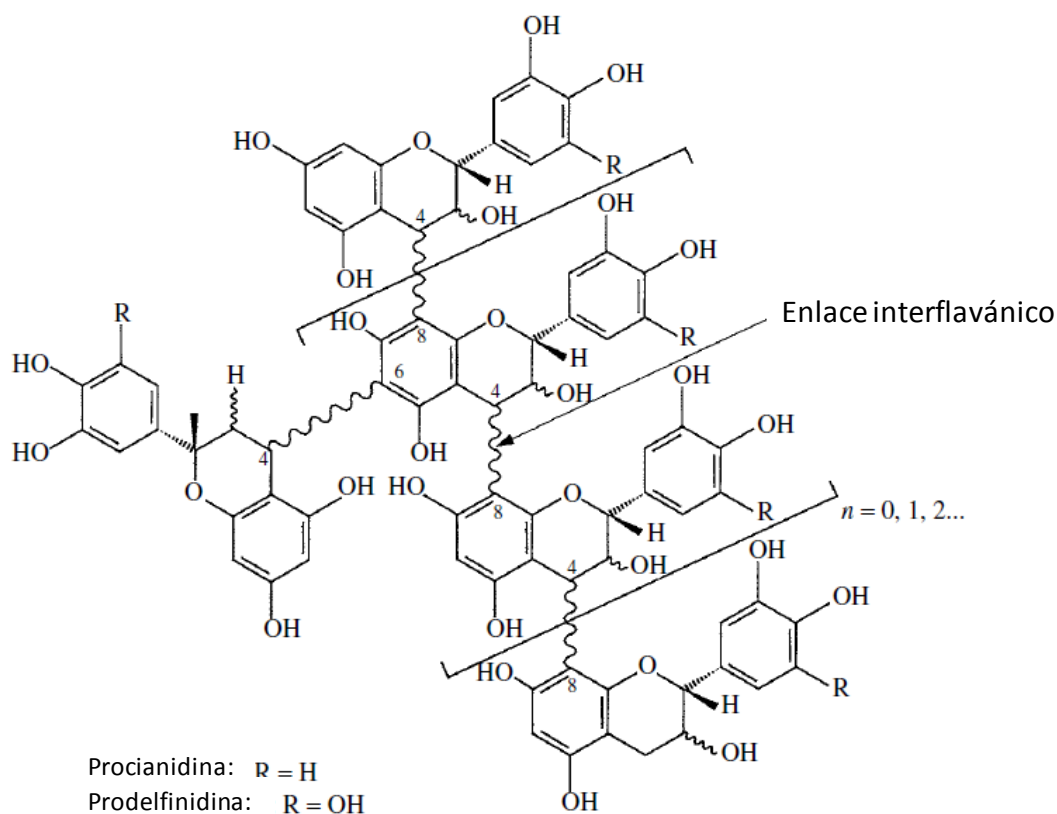


Figura 12a: Estructura química de una proantocianidina. Estraída de Ribéreau-Gayon et al., 2006.

Las proantocianidinas difieren en su estructura según provienen de las semillas o de las pieles, encontrando en las semillas solamente procianidinas mientras que en las pieles podemos encontrar tanto procianidinas como prodelfinidinas. Además, las proantocianidinas de las semillas se caracterizan por tener en su estructura un mayor porcentaje de unidades galoiladas (mayor proporción de galato de (-)-epicatequina) que las de las pieles (Souquet et al., 1996; Prieur et al., 1994), conociéndose esta

## INTRODUCCIÓN

proporción de unidades galoiladas como el porcentaje de galoilación de las proantocianidinas (% GAL). Asimismo, las proantocianidinas de las pieles se caracterizan por tener un grado medio de polimerización (Mean Degree of Polymerization - mDP) mayor que el de las semillas (Souquet et al., 1996). En este sentido, se ha descrito que el mDP de las proantocianidinas de las semillas es de alrededor de 11 (Prieur et al., 1994) y el de las pieles de alrededor de 30 (Souquet et al., 1996), siendo comúnmente el mDP de las proantocianidinas presentes en el vino de alrededor de 7 (Sarni-Manchado et al., 1999).

Respecto al raspón se ha descrito que contiene tanto procianidinas como prodelfinidinas (Pascual et al., 2016a). Además, Pascual et al., (2016a) detectaron que el mDP de las proantocianidinas del raspón era mayor que el de las semillas, sin embargo, no existe demasiada información sobre el mDP de las proantocianidinas del raspón.

Otros vegetales tienen otras subclases de proantocianidinas. Así el quebracho contiene profisetinidinas o la mimosa pro-robinetidinas ya que liberan fisetinidina o robinetidina respectivamente mediante la reacción de Bate-Smith (Celzard et al., 2015; Vignault et al., 2018).

Otra clasificación aceptada de las proantocianidinas es según la naturaleza del enlace interflavánico entre unidades monoméricas, pudiendo distinguir entre proantocianidinas de tipo A y de tipo B. Las proantocianidinas de tipo B contienen un enlace interflavánico entre el carbono 4 de una unidad de flavanol y el carbono 6 o 8 de otra unidad de flavanol (C4-C6 o C4-C8). En cambio, las proantocianidinas de tipo A contienen enlaces del tipo C4-C6 o C4-C8 (igual que las proantocianidinas tipo B) además de un enlace adicional tipo éter entre el carbono 2 de una unidad de flavanol y el carbono 5 o 7 de la otra unidad de flavanol (C2-C5 o C2-C7). En la Figura 12b se puede observar la estructura química de dos proantocianidinas tipo B, una con enlace C4-C8 y otra con enlace C4-C6, y de una proantocianidina de tipo A.

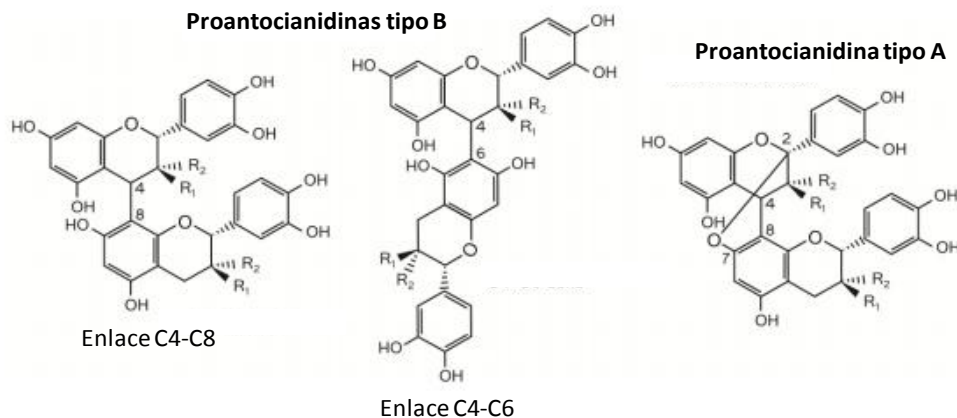


Figura 12b: Estructura química de dos proantocianidinas tipo B y una proantocianidina tipo A (Extraída de Terrier et al., 2009).

## INTRODUCCIÓN

Las proantocianidinas son moléculas muy reactivas ya que poseen centros reactivos nucleófilos (C6 y C8) y electrófilos (C4). Éstas en medio ácido, como son las condiciones del vino, pueden formar un carbocatión en la posición C4 por ruptura del enlace interflavánico, el cual puede ser atacado por las posiciones nucleófilas de los antocianos. A su vez sus centros nucleófilos, en posición C6 y C8, pueden atacar la posición electrófila de los antocianos. Estos dos mecanismos son de gran importancia para la formación de nuevos pigmentos poliméricos generados a partir de los antocianos y los flavanoles, y explicarían en parte la estabilización del color del vino tinto al largo del envejecimiento. Se hablará con más detalle de la reactividad de las proantocianidinas con los antocianos en el apartado 6 de la introducción “El color del vino tinto”.

Además de reaccionar con los antocianos y otras moléculas, las proantocianidinas debida a su alta reactividad evolucionan durante el envejecimiento del vino. Éstas reaccionan entre si, lo que comporta un aumento del tamaño de las moléculas produciéndose un aumento del mDP. Este aumento en el grado de polimerización da lugar a la formación de complejos tan grandes que se vuelven insolubles y precipitan (Cheynier et al., 2000; Haslam, 1989). Se han descrito tres mecanismos por los cuales los flavanoles polimerizan durante el envejecimiento y crianza de los vinos tintos (Zamora, 2003).

El primer mecanismo consiste en la polimerización mediante la formación de un carbocatión. En medio ácido las proantocianidinas pueden formar un carbocatión en la posición C4 por ruptura del enlace interflavánico. A su vez, este carbocatión puede ser atacado por la posición nucleófila de otra proantocianidina (C6 y C8) (Vidal et al., 2002; Jurd, 1969). A lo largo del tiempo se desarrollan toda una serie de procesos de ruptura y recombinación que producen un aumento del grado de polimerización de las proantocianidinas (Haslam, 1980).

El segundo mecanismo es la polimerización mediante la formación de un puente etilo con la participación del etanal (Drinkine et al., 2007; Fulcrand et al., 1996), producido en el vino durante la crianza a través de la oxidación del etanol en presencia de pequeñas cantidades de oxígeno, si bien éste también puede generarse a partir del metabolismo de las levaduras en la fermentación alcohólica (Morata et al., 2003a). En esta reacción de polimerización las posiciones nucleófilas de las proantocianidinas (C6 o C8) atacan el carbono carbonílico del etanal (de características electrófilas) mediante el mecanismo de adición nucleófila. Posteriormente, se produce el ataque de otra proantocianidina, vía sustitución nucleófila, produciéndose la pérdida de una molécula de agua y uniéndose ambas moléculas mediante un puente etilo. Este tipo de reacciones también pueden tener lugar entre monómeros de flavanol. El mecanismo de reacción se puede observar en la Figura 13.



## INTRODUCCIÓN

El tercer mecanismo de polimerización tiene lugar mediante la formación de semiquinonas. Este tipo de reacciones se producen por vía radicalaria y en ella participan semiquinonas formadas a partir de la oxidación de grupos *orto*-difeno, ya sea por vía enzimática o con la presencia de oxígeno y la presencia de hierro y/o cobre que participan como catalizadores (Guyot et al., 1996; Oliveira et al., 2011).

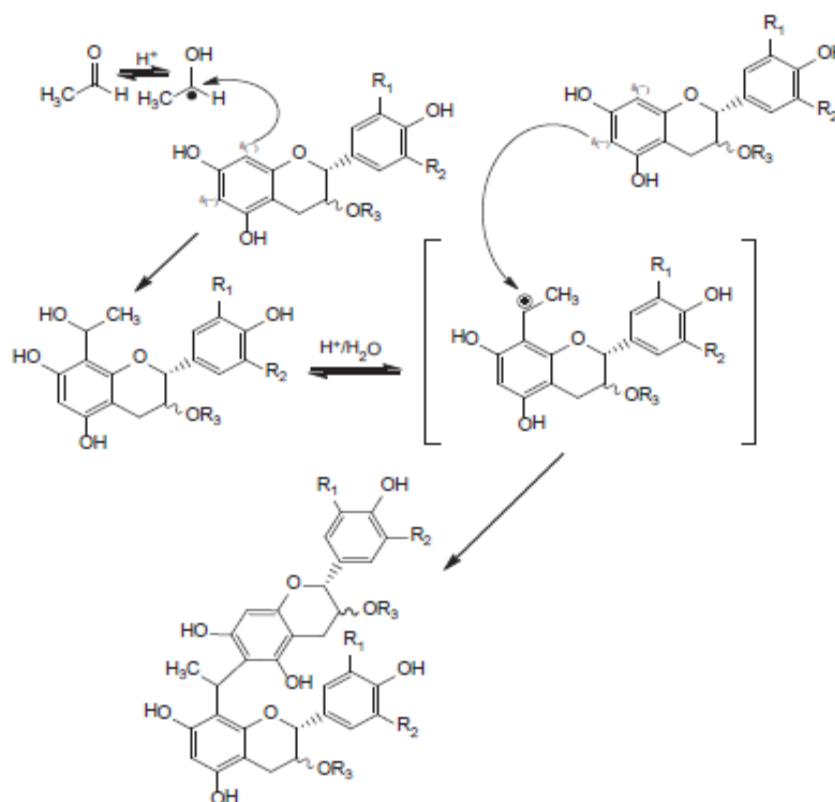


Figura 13: Mecanismo de reacción de la polimerización de proantocianidinas mediante la participación del etanal. Extraída de Fulcrand et al., 1996.

Además de la reactividad mencionada de los flavanoles, éstos contribuyen a varios aspectos sensoriales. En este sentido, los flavanoles tanto en su forma monomérica como polimérica, pueden contribuir indirectamente al color de los vinos tintos actuando como copigmentos (Gómez-Míguez et al., 2006; Berké y De Freitas, 2005). Gómez-Míguez et al., (2006) describieron que los monómeros de flavanol son copigmentos más eficaces que los oligómeros y polímeros. Además, como se ha comentado anteriormente, los flavanoles pueden ejercer también un efecto sobre el color reaccionando con los antocianos y originando nuevos pigmentos, siendo de gran importancia para la estabilización del color de los vinos tintos (Malien-Auberg et al., 2002; He et al., 2012b).

## INTRODUCCIÓN

También, los flavanoles son responsables de la sensación astringencia y del sabor amargo de los vinos tintos. En este sentido, se ha descrito que las proantocianidinas con un mayor porcentaje de galoilación son más astringentes (Vidal et al., 2003). Asimismo, también se ha descrito que las proantocianidinas de mayor mDP son más astringentes (Gawel, 1998; Sun et al., 2013). Por el contrario, los monómeros y las proantocianidinas de menor mDP contribuyen en mayor medida al sabor amargo de los vinos tintos (Peleg. et al., 1999; Lesschaeve et al., 2005).

### 2. Morfología de la uva

Las uvas son los frutos de la vid conocidos botánicamente como bayas. Éstas se agrupan en forma de racimo a través de un órgano herbáceo y leñoso conocido como raspón. Las bayas están unidas al raspón mediante el pedúnculo (Figura 14), que contiene unos vasos conductores por los cuales la vid les proporciona agua y nutrientes. El raspón, que adquiere su tamaño definitivo en el envero, se va lignificando a lo largo del proceso de maduración y representa entre un 3 y 7 % del peso total del racimo. Además, éste contiene una concentración importante de ácidos orgánicos, que se encuentran en forma de sales debido a la alta concentración de cationes presentes. También es muy rico en compuestos fenólicos conteniendo más del 20 % de su contenido total en el racimo de uva (Ribéreau-Gayon, 2006).

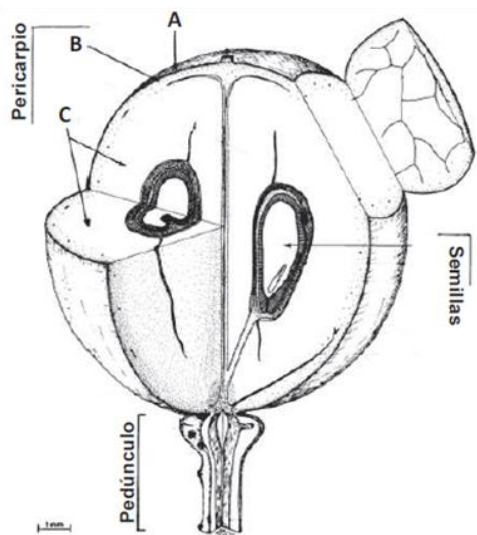


Figura 14: Ilustración de una baya mostrando sus partes: el pedúnculo, que une la baya a la planta, las semillas rodeadas por el pericarpio, en el cual se distinguen el mesocarpo (C) y el exocarpo (B). A: indica la parte más externa de la piel de la baya conocida como cutícula. Adaptado de Coombe, (1987).

## INTRODUCCIÓN

La Figura 14 muestra la ilustración de una baya. Las bayas están formadas por un conjunto de tejidos denominados pericarpio, el cual envuelve y protege las semillas. El pericarpio, a su vez, se puede dividir en tres zonas: el exocarpio (hollejos), el mesocarpio (pulpa) y el endocarpio (tejido de la parte central de la baya que recubre las semillas, sin distinguirse de la pulpa) (Ribéreau-Gayon et al., 2006). La morfología de la baya determinará en gran medida la proporción de pieles y semillas con relación al volumen de mosto durante la vinificación, lo que influirá en la liberación de compuestos fenólicos durante la maceración y consecuentemente en la composición fenólica del vino (Gil et al., 2015).

### 2.1 La pulpa

La pulpa es la parte de la baya que representa el mayor porcentaje en peso, representando entre un 75-85% del peso total de ésta. Está formada por 20 o 30 capas de células poligonales con una pared celular delgada en comparación con la pared celular de las células de las pieles. Una gran parte del volumen de las células de la pulpa está ocupado por las vacuolas celulares, las cuales contienen el mosto. Este mosto está formado principalmente por agua, azúcares (mayoritariamente D-glucosa y D-fructosa) y ácidos orgánicos (mayoritariamente ácido L(+)-tartárico, ácido L-málico y en menor medida el ácido cítrico) (Possner et al., 1985). Sin embargo, se han identificado también en mucha menos concentración azúcares tales como D-arabinosa, D-xilosa, D-rafinosa y maltosa entre otros. Asimismo, también se encuentran en baja concentración ácidos propios de la glucólisis y de la ruta metabólica del ácido siquímico (ácido pirúvico, ácido fumárico, ácido siquímico, etc.). Específicamente, la concentración de azúcares reductores en el mosto de uva madura oscila entre 150 y 260 g/L mientras que la concentración de ácidos expresada en g/L de ácido tartárico oscila entre 4 y 15.

La pulpa también es muy rica en cationes como el calcio, el magnesio y el potasio, siendo este último el mayoritario. Además contiene sustancias nitrogenadas, las cuales se encuentran en forma amoniacal u orgánica, así como también contiene aldehídos, alcoholes y ésteres, los cuales contribuyen al aroma del vino. No obstante, la mayoría de metabolitos secundarios tales como las sustancias aromáticas y los compuestos fenólicos se encuentran en las pieles. La composición fenólica de la pulpa en las variedades de *Vitis vinifera* consiste básicamente en ácidos cinámicos, que se encuentran principalmente esterificados con el ácido tartárico (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Todos estos componentes que contiene la pulpa no se encuentran distribuidos homogéneamente por toda la pulpa, sino que se encuentran en diferentes gradientes de concentración (Possner et al., 1985). Esta heterogeneidad tendrá un efecto

## INTRODUCCIÓN

importante en la vinificación del vino blanco, ya que el mosto extraído será diferente en su composición según la fracción de prensado.

### 2.2 Las pieles

La piel de la uva, que representa entre un 5 y un 10 % de su peso, actúa de barrera hidrófoba y protege la baya de la radiación ultravioleta y de las infecciones fúngicas (Pinelo et al., 2006). La piel de la uva es una región heterogénea formada por tres capas superpuestas: la cutícula, la epidermis y la hipodermis. La cutícula es la capa más externa de la piel formada básicamente de cutina, cuyo grosor va disminuyendo durante la maduración de la baya y puede ser de entre 1,5 y 10  $\mu\text{m}$ , dependiendo de la variedad (Ribéreau-Gayon et al., 2006). La cutícula está recubierta de una capa cerosa compuesta principalmente de ácido oleanólico.

La epidermis está formada por una o dos capas de células elongadas tangencialmente, cuyo grosor depende de la variedad (Ortega-Regules et al., 2008a). Por último, la hipodermis es la capa más interna de la piel y está formada por algunas capas de células, pudiendo distinguir dos regiones; una región con células rectangulares y una región interna con algunas capas de células poligonales.

Las células de la piel de la uva tienen una pared celular relativamente gruesa. Esta pared celular está formada básicamente por la lámina media, la pared celular primaria y la pared celular secundaria. La lámina media, que corresponde al espacio intercelular, está básicamente formada por pectina y une unas células con las otras. La pared celular primaria es más gruesa que la lámina media y está formada por tres partes estructurales independientes que interactúan entre ellas; las dos primeras partes son de naturaleza glucídica y se caracterizan por una matriz péctica, donde se hallan incrustadas unas microfibras de celulosa entrecruzadas con xiloglucanos. La tercera parte de esta pared celular primaria consiste en proteínas estructurales muy ricas en hidroxiprolina. Finalmente, la pared celular secundaria es mucho más delgada que la primaria y es la adyacente a la membrana plasmática. Ésta está compuesta principalmente de microfibras de celulosa que contienen también hemicelulosas, pectinas y algo de lignina (Pinelo et al., 2006; Hanlin et al., 2010).

Las células de las pieles tienen una concentración muy baja de azúcares reductores y una cantidad importante de ácidos orgánicos, normalmente salificados por la gran cantidad de cationes presentes. La piel también se caracteriza por tener cantidades significativas de metabolitos secundarios, tales como sustancias aromáticas y compuestos fenólicos, que se van acumulando durante la maduración de la baya. Estos metabolitos son de gran importancia enológica contribuyendo a la calidad del vino tinto.

## INTRODUCCIÓN

En las células de la epidermis y en la primera capa subepidérmica de las uvas tintas y blancas podemos encontrar ácidos fenólicos, flavonoles, estilbenos y taninos condensados. En variedades tintas se encuentran antocianos principalmente en las células de la hipodermis. Todos estos compuestos fenólicos pueden encontrarse enlazados interaccionando con los polisacáridos de la pared celular, en las vacuolas celulares y/o muy próximos al núcleo celular. De esta interacción con las paredes celulares de las pieles dependerá en gran medida la extracción de compuestos fenólicos durante la vinificación (Hanlin et al., 2010; Cadot et al., 2011; Bindon et al., 2010).

### 2.3 Las semillas

Las semillas corresponden al desarrollo de óvulos florales fecundados. Éstas constituyen el elemento encargado de perpetuar el individuo por vía sexual. Las semillas están formadas por tres tejidos: la envoltura externa o tegumento, el albumen y el embrión. A su vez, en la envoltura externa se encuentran cinco zonas: la cutícula, la epidermis y tres envolturas conocidas como tegumentos. La envoltura externa, lignificada y rica en taninos, recubre el albumen. Este albumen es un tejido blando formado de células uniformes poligonales que contienen una gran cantidad de aceite (ácido oleico y linoleico, que pueden llegar a representar entre un 13 y un 20 % del peso de la semilla) y otros elementos nutritivos que van alimentar a la pequeña planta en el comienzo de su desarrollo a partir del embrión, que situado a la parte central es el encargado de dar origen a los tejidos de tallo y raíz después de la germinación (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Jakson, 2008).

Las semillas representan normalmente entre un 0 y un 6% del peso de la baya. Los componentes principales de éstas son: agua (25-45 %), compuestos glucídicos (34-46%), aceites (13-20%), sustancias nitrogenadas (4-7%), minerales (2-4 %) y taninos (entre un 4 y 6%). Estos últimos son muy importantes en la elaboración del vino tinto ya que las semillas pueden contener entre un 20 y un 50 % del total de compuestos fenólicos de la baya (Santos-Buelga et al., 1995b). Éstos se encuentran básicamente en el tegumento externo y en la capa interior del tegumento interno (Thorngate y Singleton, 1994). El porcentaje en peso de semillas de la baya ejercerá un efecto claro en la liberación de tanino de semilla al vino, que debido a su alta galoilación (Souquet et al., 1996) influirá en gran medida sobre la percepción de astringencia (Vidal et al., 2003).

## INTRODUCCIÓN

### 3. Desarrollo y maduración de la baya

#### 3.1 Proceso de desarrollo de la baya

En el proceso de desarrollo del fruto y crecimiento de la baya se pueden diferenciar tres fases (I, II y III). La Figura 15 muestra la representación del volumen de la baya a lo largo de estas tres fases, donde se puede observar que las fases I y III se caracterizan por un mayor crecimiento del volumen de la baya mientras que la fase II se caracteriza por una parada del crecimiento de la misma (Coombe et al., 1992).

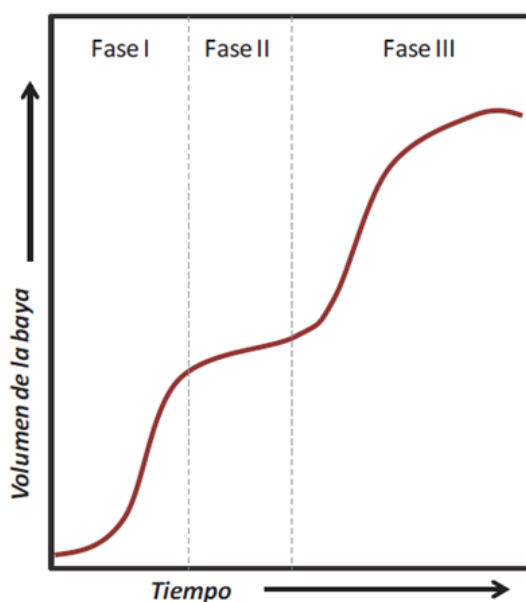


Figura 15: Evolución del volumen de la baya durante el proceso de su desarrollo. Adaptado de Coombe et al., 1992.

La fase I, que tiene una duración de alrededor de 45 y 65 días dependiendo de la variedad de uva y de las condiciones ambientales, se caracteriza por un crecimiento herbáceo de la baya. En esta fase de crecimiento herbáceo, la baya tiene una alta actividad metabólica y una elevada intensidad respiratoria acumulándose rápidamente una gran cantidad de ácidos (principalmente ácido L (+)-tartárico y ácido L-málico). Al inicio de esta etapa se forman los embriones de las semillas, de las cuales dependerá la intensidad de la multiplicación celular ya que la concentración de sustancias reguladoras del crecimiento (auxinas, citoquininas y giberelinas) es directamente proporcional al número de semillas. Este crecimiento de la baya se caracteriza inicialmente por una fase de división celular seguida por una elongación y expansión de las mismas. En esta fase I las semillas son verdes al igual que las bayas, que son duras y alcanzan al menos la mitad de su volumen y peso fresco total.

## INTRODUCCIÓN

La fase II corresponde al final del periodo herbáceo y se caracteriza por la ausencia de crecimiento de la baya. Durante esta fase se produce el fenómeno del envero, caracterizado por que las pieles de las uvas tintas empiezan a colorearse y la piel de la baya empieza a ablandarse por cambios metabólicos que producen modificaciones en la composición química de la pared celular. Durante esta etapa las semillas alcanzan su tamaño final (10 o 15 días antes del envero), además de empezar el proceso de lignificación de su cutícula (Cadot et al., 2006).

Posteriormente a la fase II tiene lugar la fase III, conocida propiamente como la maduración de la baya, la cual dura entre 5 y 10 semanas. En esta etapa de maduración existe un segundo periodo de crecimiento de la baya donde ésta prácticamente dobla su volumen. Este aumento del volumen de la baya es caracterizado por un crecimiento celular que se va estabilizando durante este periodo de maduración. En esta fase la baya sufre un cambio significativo en su composición química, acumulando azúcares, cationes, aminoácidos, compuestos fenólicos y aromáticos, mientras la concentración de ácido L (-)-málico y de amonio decrece.

### 3.2 Biosíntesis de compuestos fenólicos: ruta metabólica

Una de las características principales del desarrollo y maduración de la baya es la acumulación de compuestos fenólicos. Éstos son productos del metabolismo secundario de la planta, no obstante, su acumulación es de gran importancia enológica ya que de ello dependerá la calidad de la uva y del vino que se elabore. La Figura 16 muestra el esquema de las principales rutas metabólicas responsables de la biosíntesis de compuestos fenólicos por parte de la vid, donde se puede observar que a partir de la L-fenilalanina, sintetizada por la planta para la síntesis de proteínas, se forman todos los compuestos fenólicos que la uva contiene (Hiratzuka et al., 2001).

Por un lado, la ruta metabólica del ácido siquímico es la principal ruta de formación de fenoles simples tales como los ácidos cinámicos y ácidos benzoicos. En el inicio de esta ruta bioquímica tiene lugar la condensación de la D-eritrosa-4-fosfato, producto secundario del ciclo metabólico de las pentosas fosfato, con el ácido fosfoenolpirúvico procedente de la glicólisis. En esta ruta del ácido siquímico tiene lugar la formación de L-fenilalanina, sustrato utilizado para la biosíntesis de proteínas por parte de la planta (Umbarger, 1978).

La L-fenilalanina es el sustrato de partida de la biosíntesis de todos los compuestos fenólicos de la uva. En este sentido, la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) conduce la L-fenilalanina, mediante la eliminación de un grupo  $\text{NH}_3$ , hacia la formación de ácido *trans*-cinámico. Éste, a su vez, es transformado en ácido *p*-cumárico (Figura 16), a partir del cual se forman todos los ácidos hidroxicinámicos mediante diferentes reacciones enzimáticas (Shirley, 1998).

## INTRODUCCIÓN

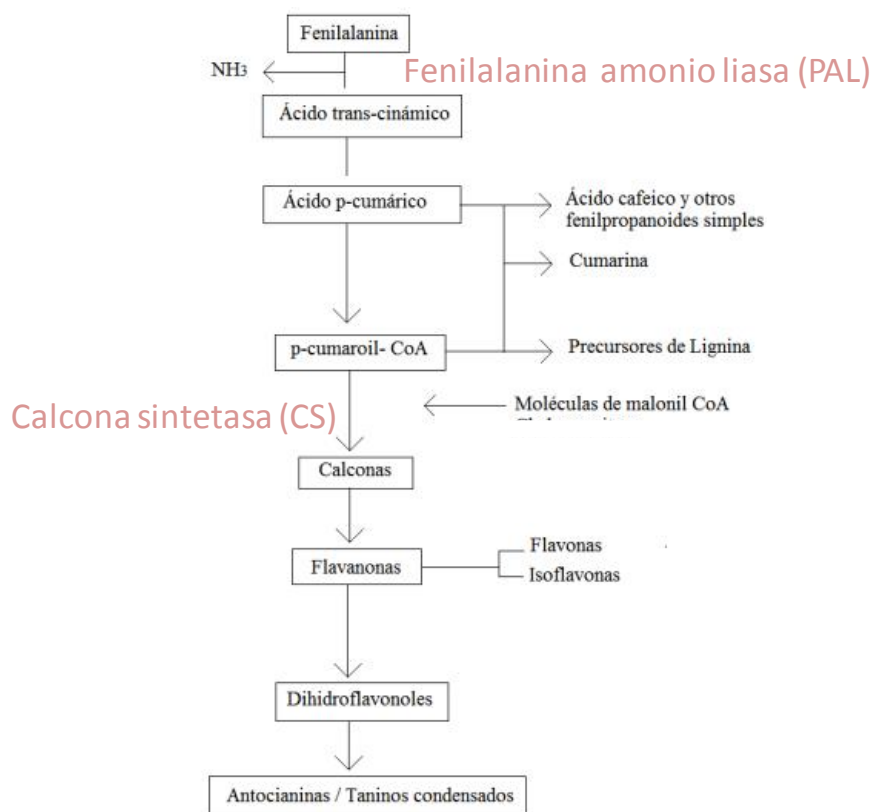


Figura 16: Esquema de las principales rutas biosintéticas de formación de compuestos fenólicos.

Por otro lado, la condensación de tres moléculas de malonil-CoA (formado a partir del Acetil-CoA procedente del ciclo de Krebs) con el ácido *p*-cumárico, formado a partir de la L-fenilalanina, es el punto de partida de la biosíntesis de los compuestos fenólicos flavonoides, siendo la enzima principal de esta condensación la calcona sintetasa (Shirley, 1998) (Figura 16).

### 3.3 Evolución de los compuestos fenólicos durante la maduración de la uva

La Figura 17 muestra la evolución de los antocianos y los taninos condensados durante el proceso de maduración de la uva. Tal y como se puede observar, los antocianos se acumulan en las vacuolas de las células de las pieles desde el momento del envero, incrementándose su concentración hasta alrededor de cuando se alcanza la madurez tecnológica. A partir de este momento su concentración puede disminuir por procesos de oxidación (Ryan y Revilla, 2003).



## INTRODUCCIÓN

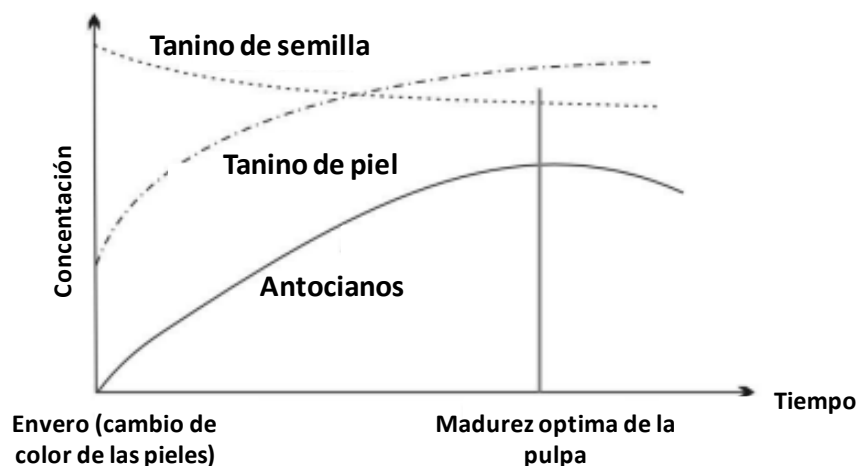


Figura 17: Evolución de los taninos condensados y los antocianos durante la maduración de la baya.

Adaptado de Ribéreau-Gayon, 2006.

Las proantocianidinas o taninos condensados se acumulan principalmente durante el crecimiento herbáceo de la baya (fase I) (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Sin embargo, a partir del envero y durante la maduración de la baya su evolución es diferente según éstas provienen de las semillas o las pieles. En este sentido, tal y como se muestra en la Figura 17, la concentración de proantocianidinas en las pieles ya es alta en el envero (en algunos casos supone más de la mitad de la concentración que éstas alcanzan en la madurez) (Ribéreau-Gayon et al., 2006). No obstante, a partir del envero las proantocianidinas de las pieles siguen acumulándose, incrementándose su concentración durante el proceso de maduración de la baya hasta alcanzar un máximo alrededor de cuando se alcanza la madurez tecnológica. Además, se ha descrito un aumento de su grado medio de polimerización (Kennedy et al., 2001). Por el contrario, las proantocianidinas de las semillas alcanzan su máxima concentración en el envero, disminuyendo ligeramente ésta durante el proceso de maduración (Czochanska, et al., 1979; Kennedy et al., 2000). Sin embargo, la concentración de proantocianidinas global de la uva aumenta durante la maduración de la baya al igual que su grado medio de polimerización (Gil et al., 2012; Kontoudakis et al., 2011).

Las semillas durante la maduración, además de la ligera disminución en su concentración de proantocianidinas, sufren un cambio de color pasando de un color verdoso en el envero a un color marrón cuando éstas han alcanzado su madurez óptima. Este cambio de color es debido a la lignificación de la cutícula (Cadot et al., 2006) y puede ser un indicador del proceso de maduración fenólica (Quijada-Morín et al., 2016). La lignificación de la cutícula suele comportar una disminución en la liberación de proantocianidinas de las semillas durante la vinificación (de Freitas et al., 2000), y por esta razón los enólogos suelen afirmar que la capacidad de las semillas para ceder taninos al vino disminuye al madurar la uva. Sin embargo, este cambio de

## INTRODUCCIÓN

color que sufren las semillas también se ha relacionado con procesos de oxidación (Kennedy et al., 2000). La evolución del color de las semillas a partir del envero y durante el proceso de maduración se muestra en la Figura 18.



Figura 18: Evolución del color de las semillas durante la maduración.

En cuanto a los otros compuestos fenólicos de la uva, los flavonoles tienen una evolución similar que la de los antocianos (Kennedy et al., 2002), mientras que los ácidos cinámicos se acumulan durante el periodo herbáceo empezando a disminuir su concentración a partir del envero. Esta disminución se ha relacionado con su catabolismo o con su utilización como sustrato para la biosíntesis de otros compuestos fenólicos (Adams et al., 2006).

### 3.4 La madurez tecnológica y la madurez fenólica

La madurez de la uva y el momento de su recolección es un aspecto crítico que influye sobre la calidad del vino que se va elaborar. El proceso de maduración es muy complejo y depende de muchos factores tales como el clima, las condiciones meteorológicas, el tipo de suelo, las técnicas de viticultura aplicadas a la vid, la variedad de uva, su rendimiento, etc. (Coletta et al., 2013; Rodríguez-Montealegre et al., 2006; Matthews y Anderson, 1988)

Generalmente, cuando nos referimos a la madurez de la uva podemos distinguir entre madurez tecnológica y madurez fenólica. Por un lado, la madurez tecnológica se refiere a la madurez de la pulpa y está relacionada con la concentración de azúcares, la acidez y el pH; ésta alcanza su nivel óptimo cuando la relación azúcar/acidez alcanza su nivel máximo. Por otro lado, la madurez fenólica está relacionada con la madurez de

## INTRODUCCIÓN

las pieles y las semillas, y define la madurez óptima de la uva para elaborar vinos de alta calidad. La madurez fenólica, que fue definida inicialmente por el profesor Glories en el 1993 (Glories y Agustin, 1993), mide el contenido en proantocianidinas y antocianos de las uvas y la capacidad de extracción de estos compuestos de las partes sólidas de la uva al vino durante la vinificación.

Las condiciones óptimas para la elaboración de vinos de calidad son que la madurez tecnológica y la madurez fenólica alcancen su nivel adecuado en el mismo momento. Sin embargo, en los tiempos actuales estos dos tipos de madurez no suelen tener lugar en el mismo momento. De hecho, debido a las altas temperaturas durante el proceso de maduración de la uva, relacionadas con el cambio climático, la adecuada madurez tecnológica tiene lugar antes que la madurez fenólica. Por tanto, cuando la relación de azúcares reductores y acidez es óptima, las semillas y pieles de las uvas todavía no han alcanzado su madurez fenólica adecuada.

En estas condiciones de desfase entre los dos tipos de madurez, nos encontramos que cuando se ha alcanzado la madurez tecnológica adecuada la concentración de proantocianidinas y de antocianos en las pieles así como la concentración de proantocianidinas de las semillas no es la adecuada para la elaboración de vinos tintos de calidad. Si las pieles están verdes, desde el punto de vista de la maduración fenólica, la concentración de antocianos y proantocianidinas no será máxima y la extractibilidad de éstos compuestos en la vinificación será menor (Gil et al., 2012). Por el contrario, se ha descrito que si las semillas están verdes y por tanto no están muy lignificadas, mayor es su concentración de proantocianidinas y su capacidad de cesión en vino (de Freitas et al., 2000), lo que puede dar lugar a vinos verdes, pesados y muy astringentes debido a la alta galoilación de las proantocianidinas de las semillas (Prieur et al., 1994). Por tanto, una vendimia que no ha alcanzado su madurez fenólica óptima dará lugar a vinos con poco color, astringentes, amargos, con poco cuerpo, poca estructura, no equilibrados y con un color poco estable.

### **3.5 Factores que influyen en la biosíntesis de compuestos fenólicos durante la maduración de la uva**

Los factores que influyen en el proceso de maduración de la baya y en la biosíntesis de compuestos fenólicos se pueden agrupar en factores edafoclimáticos, genéticos y culturales (Zamora, 2003). No obstante, existen una serie de factores conocidos como accidentales (heladas, granizadas, etc.) que también pueden influir.

Los factores edafoclimáticos son los relacionados con las condiciones climáticas, la composición del suelo y su capacidad de drenaje. Todos estos factores definen el concepto francés de *terroir* (terruño en castellano).

## INTRODUCCIÓN

El clima se refiere al conjunto de condiciones atmosféricas que caracterizan una región. En España encontramos una gran variedad de climas muy diferenciados en función de la latitud y la altitud respecto al nivel del mar. En general, la vid situada en climas cálidos produce vendimias ricas en azúcares y pobres en acidez, mientras que en climas fríos producen lo contrario.

La temperatura, determinada en gran medida por el clima de una región, influye en la maduración y la biosíntesis de compuestos fenólicos. En este sentido, temperaturas altas producen vendimias con mayor concentración de azúcar mientras que temperaturas bajas producen el efecto contrario. No obstante, temperaturas extremadamente altas o bajas perjudican el proceso de desarrollo de la baya y su maduración, aunque se ha observado que temperaturas diurnas altas y nocturnas bajas favorecen la biosíntesis de taninos y antocianos (Downey et al., 2006). Además, la exposición a la luz solar también ejerce un efecto en la biosíntesis de compuestos fenólicos, por lo que parece que a mayor exposición solar se produce en general un incremento en la biosíntesis de compuestos fenólicos flavonoides (Downey et al., 2006). En este sentido, se ha observado una relación entre el nivel de actividad de la enzima PAL, responsable de la biosíntesis de compuestos fenólicos, y la presencia de radiación solar (Roubelakis-Angelakis y Kliewer, 1986).

Referente al suelo, parece ser que aquéllos que tienen una débil habilidad de retención de la humedad suelen producir un adelanto de la maduración. Por el contrario, los suelos que tienen una gran capacidad de retener agua retrasan la maduración, consiguiendo vendimias muy abundantes. Además, la disponibilidad de agua por parte de la planta determinará en gran medida la biosíntesis de compuestos fenólicos, ejerciendo un efecto positivo en la biosíntesis el déficit moderado de agua por parte de la planta. (Esteban et al., 2001). Respecto a las características del suelo, la profundidad, su composición, su estructura y su fertilidad contribuirán a su capacidad para retener el agua.

Los factores genéticos son aquellos que hacen referencia al genotipo característico de cada una de las variedades viníferas. En este sentido, las diferentes variedades de *Vitis vinifera*, según su genotipo, tienen diferente potencial de acumulación y biosíntesis de compuestos fenólicos en la uva durante la maduración (Roson y Moutounnet, 1992; Zamora, 2003). La mayor diferencia existe obviamente entre las variedades de uva blanca y las de uva tinta, que se diferencian por la capacidad de acumular o no antocianos en las vacuolas celulares de las pieles.

Finalmente, los factores culturales son aquellos relacionados con las prácticas de viticultura aplicadas en la vid tales como la poda, el sistema de conducción, el espaciado entre cepas, el aclareo, el sistema de regadío, etc. Estos factores tienen un efecto claro en el rendimiento así como en la composición fenólica de la uva (Lee y Skinkis, 2013; Petrie et al., 2000; Howel, 2001).

# INTRODUCCIÓN

## 4. Evolución de los compuestos fenólicos durante la vinificación del vino tinto

### 4.1 Vinificación del vino tinto

La vinificación es un proceso complejo en el cual el mosto de uva es fermentado para su transformación en vino por acción de las levaduras, principalmente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*. En el proceso de vinificación del vino tinto tienen lugar dos fenómenos simultáneamente: la fermentación alcohólica y la maceración.

La fermentación alcohólica es la ruta metabólica de las levaduras por la cual se produce una oxidación parcial de los azúcares reductores (glucosa y fructosa) presentes en el mosto, formándose etanol, dióxido de carbono y otros productos secundarios aprovechando la levadura la energía contenida en dos moléculas de ATP por cada molécula de hexosa (Zamora, 2009). La maceración se caracteriza por el contacto de las partes sólidas de la uva (semillas y pieles) con el mosto-vino. Se puede distinguir entre maceración pre-fermentativa, maceración fermentativa y maceración post-fermentativa según tiene lugar antes, durante o después de la fermentación alcohólica respectivamente.

Cuando la uva es recolectada y entrada en bodega se despallilla para separar el raspón de la baya. Los vinos elaborados con la presencia del raspón son excesivamente ácidos, verdes, amargos y astringentes debido a la alta concentración de ácidos orgánicos y flavanoles que éste contiene (Pascual et al., 2016a). Seguidamente, las bayas son estrujadas para favorecer la extracción del mosto de su interior y así favorecer la extracción de los compuestos fenólicos de las partes sólidas (pieles y semillas) al vino. El mosto junto con las partes sólidas de la uva es bombeado hacia un tanque de fermentación donde se le añade rápidamente dióxido de azufre como agente antioxidante, antioxidásico y antiséptico. Este primer contacto del mosto con las partes sólidas de la uva se conoce como maceración pre-fermentativa, la cual tiene lugar en medio acuoso con una alta concentración de azúcar. Como veremos más adelante, en este medio acuoso los antocianos ya empiezan a ser extraídos mientras que la extracción de proantocianidinas necesita de la presencia de etanol. Normalmente la maceración pre-fermentativa es de poca duración pero en algunos vinos es buscada para mejorar la liberación de aromas varietales.

Inmediatamente después tiene lugar la fermentación alcohólica, llevada a cabo por las levaduras. La fermentación alcohólica puede ser efectuada por levaduras indígenas presentes en la uva y el mosto (fermentación espontánea) o puede ser efectuada por un inóculo comercial de levaduras seleccionadas. Para un buen control de la fermentación alcohólica es recomendable el uso de inóculos comerciales, sin embargo, hay una tendencia actual a volver a las fermentaciones espontáneas, especialmente en elaboradores orgánicos o biodinámicos.

## INTRODUCCIÓN

Simultáneamente a la fermentación alcohólica tiene lugar la maceración fermentativa, en medio hidroalcohólico a causa de la formación de etanol durante el proceso fermentativo. Durante esta etapa, gracias a la formación de etanol y al aumento de temperatura que tiene lugar en la fermentación alcohólica, se facilita la solubilización y por tanto la extracción de antocianos, proantocianidinas de las pieles y en menor medida de proantocianidinas de las semillas (Canals et al., 2005; Sacchi et al., 2005; Koyama et al., 2007; Casassa et al., 2013).

Durante la fermentación alcohólica, debido a la formación de dióxido de carbono en el proceso fermentativo, las partes sólidas de la uva (pieles y semillas) se desplazan a la parte superior del tanque de fermentación formando el que se conoce como *el sombrero*. Para favorecer la maceración y así la extracción de compuestos fenólicos (antocianos y proantocianidinas) se realizan los remontados, que consisten en bombear el mosto/vino sobre el sombrero. No obstante, existen otras técnicas para favorecer el contacto de las partes sólidas de la uva con el mosto/vino (Zamora, 2003; Fischer et al., 2000).

Cuando termina la fermentación alcohólica, al cabo de unos 10 -15 días (dependiendo de muchos factores), tiene lugar la maceración post-fermentativa. Ésta tiene lugar en medio hidroalcohólico y es decisión del enólogo su duración dependiendo del vino que se quiera elaborar. Normalmente los vinos destinados a crianza sufren una maceración post-fermentativa más larga ya que favorecemos la extracción de proantocianidinas, en mayor medida procedentes de las semillas, que ayudarán a la estabilización del color.

Después de la maceración post-fermentativa el vino es sangrado (separando el vino de las partes sólidas). El vino sangrado puede ser destinado como vino joven para su consumo inmediato después de un proceso de estabilización o destinado a la crianza en barricas de roble para elaborar un vino de crianza. Cabe destacar que en los vinos tintos, después del proceso de vinificación, tiene lugar la fermentación maloláctica. Las partes sólidas desechadas pueden ser prensadas para obtener un vino de prensa, el cual es de menor calidad, más duro, verde y poco equilibrado.

### **4.2 Extracción de los compuestos fenólicos durante la vinificación**

La extracción de los compuestos fenólicos de la uva al vino durante la vinificación es un factor clave que influye sobre la composición fenólica del vino y por tanto sobre su calidad. Dicha extracción depende en gran medida de la madurez de la uva (Canals et al., 2005; Gil et al., 2012), del contenido en etanol (Canals et al., 2005), de la temperatura en el proceso fermentativo (Pérez-Navarro et al., 2018; Koyama et al., 2007), del tiempo de maceración de las partes sólidas de la uva con el mosto/vino (Gil et al., 2012; Cassaca et al., 2013) y de las prácticas de bodega aplicadas en la

## INTRODUCCIÓN

vinificación (Busse-Valverde et al., 2011; Sacchi et al., 2006; Zamora et al., 1994; Pascual et al., 2016b; Canals et al., 2008; Lee et al., 2008). Sin embargo, se acepta generalmente como modelo cinético de extracción de compuestos fenólicos el que se muestra en la Figura 19.

Los antocianos se extraen relativamente rápido iniciándose su extracción en la maceración pre-fermentativa, debido a que éstos pueden ser extraídos en medio acuoso sin presencia de etanol. Su extracción se prolonga durante la maceración fermentativa, alcanzando su nivel máximo (González-Neves et al., 2008), para después decrecer su concentración debido a fenómenos de oxidación, polimerización, adsorción al tanque de fermentación y sobre las paredes celulares de las levaduras (Morata et al., 2003b). Sin embargo, la difusión de los antocianos de las pieles al vino parece estar influenciada por su estructura química, en concreto, por el número de grupos hidroxilo y metoxilo del anillo aromático B de la molécula. En este sentido, la cianidina y la peonidina parecen disfundirse más rápidamente que la malvidina, la delfinidina y la petunidina, siendo estas dos últimas más susceptibles a la oxidación. Asimismo, parece ser que la acilación de la molécula de glucosa influye en la eficacia de extracción, siendo los *p*-cumarilados los que se difunden más lentamente frente los no acilados o los derivados acetilados (Guidoni et al., 2012; García-Beneytez et al., 2002). Estas diferencias en la extracción de estas moléculas al vino parecen estar relacionadas con su polaridad y la habilidad de los antocianos para interactuar con las paredes celulares de la piel de la uva (Ortega-Regules et al., 2006).

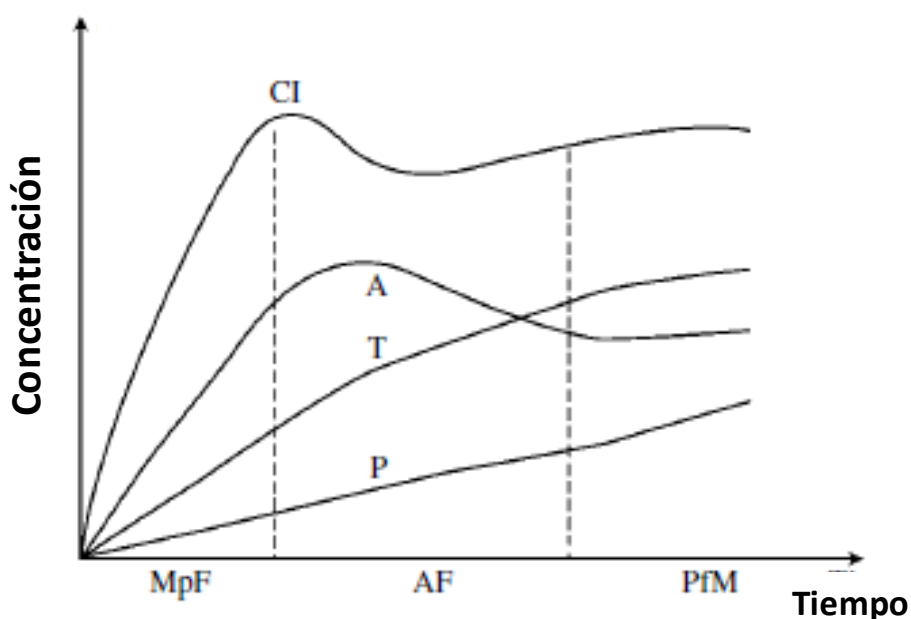


Figura 19: Cinética de extracción de los diferentes compuestos fenólicos durante la vinificación. CI: Intensidad colorante; A: Antocianos; T: Taninos; P: Polisacáridos.; MpF: Maceración pre-fermentativa; AF: Maceración fermentativa; PfM: Maceración post-fermentativa.

## INTRODUCCIÓN

La cinética de extracción de los antocianos en vinificación muestra el mismo comportamiento que la intensidad colorante, produciéndose un aumento de ésta a mayor cantidad de antocianos extraídos. Sin embargo, en la maceración post-fermentativa la intensidad colorante tiene una ligera subida, probablemente debida a la copigmentación o a la combinación entre los antocianos y las proantocianidinas formando nuevos pigmentos mucho más estables que los antocianos en forma libre.

Las proantocianidinas empiezan a extraerse más lentamente que los antocianos en la maceración pre-fermentativa, aumentando su extracción al largo de la maceración fermentativa y post-fermentativa debido a la presencia de etanol y al aumento de temperatura, lo que facilita su solubilización (Canals et al., 2005). Sin embargo, las proantocianidinas presentan diferentes cinéticas de extracción según su procedencia.

Por un lado, las proantocianidinas de las pieles empiezan a extraerse en medio acuoso durante la maceración pre-fermentativa, prolongándose su extracción hasta la maceración fermentativa y post-fermentativa, cuando el etanol está presente en el medio. Sin embargo, las proantocianidinas presentes en las vacuolas celulares de las pieles se extraen en medio acuoso (igual que los antocianos) mientras que la presencia de etanol y el aumento de la temperatura en el proceso fermentativo favorece la extracción de las proantocianidinas ligadas a las paredes celulares de las pieles. Por tanto, mientras parece que las proantocianidinas que se encuentran en las vacuolas celulares de la pieles se extraen rápidamente durante las primeras etapas de la maceración/fermentación, las que se encuentran ligadas a la pared celular se extraen más lentamente necesitando de la presencia de etanol para ser extraídas (Bindon et al., 2010).

Por otro lado, las proantocianidinas de las semillas, a diferencia de las que proceden de las pieles, se extraen más lentamente empezando su extracción iniciada la maceración fermentativa y prolongándose durante la maceración post-fermentativa. Éstas se solubilizan cuando el nivel de etanol es suficiente para disolver la cutícula de las semillas, lo que facilita su liberación (Canals et al., 2005; González-Manzano et al., 2004). Por este motivo, en vinificaciones de uvas que no han alcanzado su completa madurez fenólica es recomendable no alargar la maceración post-fermentativa ya que nos proporcionaría vinos con mucho tanino de semilla, los cuales serían verdes, duros, herbáceos y muy astringentes debido a la alta galoilación de las proantocianidinas de las semillas (Vidal et al., 2003; Gawel, 1998; Prieur et al., 1994).

Consecuentemente a todo lo expuesto, la extracción global de proantocianidinas o taninos condensados aumenta al largo de la vinificación, tal y como se observa en la Figura 19, aunque éstas tengan diferente cinética de extracción según provengan de las semillas o las pieles, y además según se encuentren en las vacuolas celulares o ligadas interaccionando con las paredes celulares de las pieles.



## INTRODUCCIÓN

En este sentido, Gil et al., (2012) comprobaron que el porcentaje de prodelfinidinas y el mDP de las proantocianidinas en el vino era mayor en las primeras etapas de la maceración y que luego disminuían ambos parámetros con el avance de la maceración, lo que corroboraría la cinética de extracción antes descrita. La disminución del porcentaje de prodelfinidinas y del mDP estaría relacionada con que la presencia de alcohol favorece la solubilización de las proantocianidinas de semilla, y éstas presentan menor mDP y no contienen prodelfinidinas.

### 4.3 Factores que influyen en la extracción de los compuestos fenólicos

Dada la importancia de los compuestos fenólicos en enología y el papel que juegan en la calidad del vino tinto nos centraremos en explicar los factores que influyen en la extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino durante el proceso de vinificación. La extracción de compuestos fenólicos de las partes sólidas de la uva al vino durante la vinificación dependerá principalmente del nivel de madurez de la uva, de la temperatura en el proceso fermentativo, del tiempo de maceración y de las técnicas enológicas empleadas durante la vinificación.

- **Madurez de la uva:** es un factor crítico en la extracción de compuestos fenólicos ya que de ésta va depender la cantidad de estos compuestos en la uva (Ortgea-Regules et al., 2008a). Sin embargo, el nivel de madurez va a tener también un efecto claro en la extractabilidad de los compuestos fenólicos durante la vinificación (Gil et al., 2012). Como se ha comentado anteriormente en el apartado 4.2 de esta introducción, la extracción de proantocianidinas presentes en las vacuolas celulares de las pieles tiene lugar relativamente rápido, no obstante, la cinética de extracción es mucho más lenta para las proantocianidinas que se encuentran interaccionando con las paredes celulares de las pieles. Por tanto, la efectividad de la extracción de estas últimas va depender en gran medida de su estructura así como de la estructura química de las paredes celulares de las pieles (Bindon et al., 2010). En este sentido, a medida que la maduración avanza se producen cambios estructurales en las paredes celulares de las pieles, favoreciendo una mayor extracción de proantocianidinas. Referente a las proantocianidinas de las semillas, como ya se ha comentado anteriormente también en el apartado 4.2, las uvas maduras producen una menor liberación de taninos de las semillas debido a la lignificación de la cutícula (De Freitas et al., 2000).
- **La temperatura:** es un factor determinante en la extracción de compuestos fenólicos en vinificación. Al aumentar la temperatura aumentamos la solubilidad de los compuestos fenólicos y la permeabilidad de las células de la epidermis, lo que favorece la liberación de estos compuestos (Pérez-Navarro et

## INTRODUCCIÓN

al., 2018; Canals et al., 2005). Además, al aumentar la temperatura durante la maceración también se observa un incremento del color del vino y de su estabilidad. Este fenómeno es debido a que al aumentar la temperatura favorecemos la cinética de las reacciones entre antocianos y proantocianidinas para la formación de nuevos pigmentos. Para conseguir una buena extracción se deben alcanzar temperaturas de 27-29 °C, ya que si la temperatura es más baja la extracción es pobre, y si por el contrario la temperatura es mucho más alta tendremos más extracción de tanino pero podemos tener una pérdida de color debida a la degradación de los antocianos (Zamora, 2003; Sacchi et al., 2005).

- Tiempo de maceración: Otro factor crítico en la extracción de compuestos fenólicos es el tiempo de maceración del mosto/vino con las partes sólidas de la uva (Cassaca et al., 2013). Tal y como se ha comentado anteriormente, la extracción de antocianos tiene lugar en las primeras etapas de la maceración mientras la extracción de proantocianidinas se alarga más allá en el tiempo. Por tanto, alargar el tiempo de maceración no comportará un aumento de la concentración de antocianos en el vino aunque sí de proantocianidinas (Yokotsuka et al., 2000; Gil et al. 2012). El tiempo de maceración será decisión del enólogo según el vino que se quiere elaborar. Para la elaboración de vinos tintos jóvenes las maceraciones son generalmente cortas ya que se busca la extracción necesaria de color y aromas, pero sin enriquecer el vino excesivamente en taninos, sobretodo de tanino de semilla que podrían conferirle demasiada dureza. Por el contrario, en los vinos destinados a crianza se realizan maceraciones largas para la obtención de más contenido de proantocianidinas, lo que dará lugar a vinos bien estructurados y con una buena estabilidad del color. Sin embargo, maceraciones muy largas pueden dar lugar a vinos duros, amargos y herbáceos, especialmente cuando la uva no esté lo suficientemente madura (Scudamore-Smith et al., 1990).

Además, existen diferentes técnicas de vinificación que influyen en la extracción de compuestos fenólicos (Busse-Valverde et al., 2011). Se pueden destacar las siguientes:

- Maceración prefermentativa en frío: se mantiene el mosto entre 5 y 10°C durante algunos días para frenar el inicio de la fermentación alcohólica. De esta forma favorecemos la extracción de antocianos y de taninos de la piel, en menor medida, antes de empezar la fermentación alcohólica. Además, se puede disminuir el tiempo de la maceración post-fermentativa y evitar la extracción excesiva de taninos de las semillas.
- El uso de dosis altas de dióxido de azufre: además de sus propiedades antioxidantes, antisépticas y antioxidásicas, este aditivo actúa degradando las

## INTRODUCCIÓN

paredes celulares de las pieles de la uva, facilitando de este modo una mejor extracción de antocianos (Pinelo et al., 2006; Sacchi et al., 2005; Amrani Joutei y Glories, 1995).

- Técnicas de sangrado parcial: consiste en sangrar una parte del mosto en la etapa pre-fermentativa, el cual puede ser usado para la elaboración de vino rosado. Para el mosto restante que queda junto con las partes sólidas de la uva se incrementa el porcentaje de semillas y pieles con relación a la cantidad de mosto, lo que permite obtener vinos con mayor concentración en compuestos fenólicos (Sacchi et al., 2005, Zamora et al., 1994).
- Técnicas de tratamiento mecánico del sombrero durante el proceso fermentativo: Existen diferentes técnicas tales como el remontado, el bazuqueo, el sombrero sumergido, el *délestage*, etc., que facilitan el contacto de las partes sólidas de la uva (pieles y semillas) con el mosto/vino favoreciendo la extracción de compuestos fenólicos (Zamora, 2003; Fischer et al., 2000; Pascual et al., 2016b).
- La cepa de levadura inoculada también puede tener influencia en el color final del vino tinto. Existen diferentes cepas de levadura que tienen capacidad de adsorber en sus paredes celulares antocianos y flavanoles, modificando la composición fenólica del vino (Morata et al., 2003b). Asimismo, se ha descrito que algunas cepa de levadura favorecen la formación de piranoantocianos (Morata et al., 2003a; Morata et al., 2007).

Es preciso señalar, que además de los factores previamente nombrados que ejercen un efecto en la extracción de compuestos fenólicos durante la vinificación, la morfología de la baya influirá también en gran medida en dicha extracción. En este sentido, Gil et al., (2015) describieron que vinificaciones elaboradas con bayas de menor tamaño producían vinos con mayor concentración de antocianos y proantocianidinas, dándonos lugar a vinos con un color más intenso. Esta mayor liberación durante la vinificación fue dedida a una mayor proporción de pieles con respecto al volumen de mosto durante la maceración/fermentación.

### 4.4 Evolución de los compuestos fenólicos durante la crianza

Durante el proceso de crianza en bodega los vinos sufren una evolución desde un punto de vista de su composición química y sensorial, la cual está muy influenciada por la composición fenólica del vino. Específicamente, ejercen un gran efecto los antocianos y las proantocianidinas procedentes de la misma uva así como los elagitaninos liberados por la bodega de roble.

## INTRODUCCIÓN

El proceso de crianza se desarrolla generalmente manteniendo el vino en el interior de barricas de roble, siendo el roble francés (*Q. petraea*) y el roble americano (*Q. alba*) los más comúnmente empelados (Guimberteau, 1992; Vivas, 1998). La barrica debido a su porosidad permite la entrada de pequeñas cantidades de oxígeno (Pontallier, 1992; Vivas, 1997), lo que provocará una serie de reacciones que tendrán un efecto claro en la composición química y sensorial del vino. Esta serie de reacciones incluyen las polimerizaciones de las proantocianidinas así como la formación de nuevos pigmentos entre flavanoles y antocianos, que ayudarán a la estabilización del color así como a la suavización de la astringencia (Pontallier, 1992). La barrica de roble también aportará elagitaninos, de los cuales se ha descrito que pueden participar en uniones covalentes con los antocianos estabilizando el color del vino tinto (Chassaing et al., 2010). Se ha descrito también que los elagitaninos son buenos antioxidantes y por tanto pueden proteger al vino de la oxidación (Navarro et al., 2016a; Pascual et al., 2017). Además, la barrica de roble aportará al vino muchos atributos sensoriales tales como aromas a vainilla, especias y tostados, entre muchos otros (Boidron et al., 1988). A este conjunto de sensaciones sensoriales aportadas por el proceso de crianza en barrica se le conoce con el nombre de *bouquet*.

### 5. Taninos Enológicos

#### 5.1 Características, uso y propiedades

El uso de taninos enológicos es una práctica habitual en vinificación. Su uso hasta hace muy poco estaba únicamente autorizado por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) para la clarificación de mostos y vinos (OIV, 2017), si bien es indiscutible que los taninos enológicos se utilizan principalmente para otros propósitos. En la bibliografía se les atribuye a los taninos enológicos diferentes propiedades tales como capacidad antioxidante (protección de los vinos de la oxidación) (Hangerman et al., 1998), habilidad para la captación de radicales peroxilo (Magalhaes et al., 2014), capacidad para consumir el oxígeno disuelto (Pascual et al., 2017; Vignault et al., 2018; Navarro et al., 2016b), efecto antioxidásico (actividad antilacasa) (Vignault et al., 2019b; Obradovic et al., 2005), mejora del cuerpo y la estructura de los vinos (Vivas, 2001), mejora y estabilización del color de los vinos (Canuti et al., 2012), efecto como copigmentos (Vignault et al., 2019a), formación directa de nuevos pigmentos (Versari et al., 2013), eliminación de aromas de reducción (Vivas, 2001) y efectos bacteriostáticos (Lampereur et al., 2002).

Muy recientemente y en parte gracias al trabajo desarrollado por nuestro grupo de investigación en colaboración con el dirigido por el profesor Teissedre en la Universidad de Burdeos ha permitido que se autorice su uso también para la protección de los mostos y vinos frente a la oxidación (química y enzimática) y también

## INTRODUCCIÓN

para favorecer el color de los vinos tintos (OIV, resoluciones OENO-TECHNO 17-612 and OENO-TECHNO 17-613).

En el mercado actual existe una gran variedad de extractos comerciales de taninos enológicos de diferente origen botánico, composición química y riqueza (Obreque-Slér et al., 2009; Malacarne et al., 2016). Su composición química y riqueza en tanino depende en gran parte de su origen botánico y del proceso de obtención y/o extracción (Viganult et al., 2018).

Generalmente los taninos enológicos los encontramos en el mercado en forma de extracto seco, en paquetes cerrados y etiquetados. Estos taninos pueden ser relativamente puros en el caso de que hayan sido extraídos de una sola especie, mientras que si proceden de la mezcla de varias especies pueden contener tanto taninos condensados como taninos hidrolizables (Obreque-Slér et al., 2009).

### 5.2 Clasificación de los taninos enológicos

Una clasificación aceptada para los taninos enológicos comerciales es según su origen botánico. En este sentido, podemos encontrar en el mercado elagitaninos procedentes de la madera de roble (*Quercus robur*, *Quercus petraea* y *Quercus alba*) y/o de castaño (*Castanea sativa*), galotáninos procedentes de las nueces de agalla (*Quercus infectoria* y *Rhus semillasalata*) y/o de tara (*Caesalpinia spinosa*), y taninos condensados procedentes de semilla de uva, de pieles de uva y de otros orígenes botánicos tales como el quebracho (*Aspidosperma quebracho-blanco* y *Schinopsis lorentzii*), mimosa (*Acacia dealbata*) y acacia (Versari et al., 2013). La coloración que presentan estos taninos enológicos comerciales es normalmente blanca cremosa para los galotáninos y marrón para los elagitaninos. Asimismo, los taninos condensados tienen una coloración con tonos marrones.

Sin embargo, los taninos enológicos se pueden clasificar según su estructura química, independientemente de su origen botánico, en dos grandes grupos: los taninos hidrolizables y los taninos condensados. Dentro de los taninos hidrolizables encontramos los elagitaninos y los galotáninos, caracterizándose por liberar ácido elágico y ácido gálico respectivamente mediante su hidrólisis ácida. Su estructura química es descrita en el apartado 1.1.3 de esta introducción.

El otro gran grupo de los taninos enológicos es el formado por los taninos condensados, que como se ha comentado anteriormente en el apartado 1.2.4 de esta introducción, son polímeros de flavan-3-oles monoméricos unidos covalentemente por enlace interflavánico. Se conocen también como proantocianidinas porque liberan antocianos mediante la reacción de Bate-Smith (Bate-Smith, 1973). Los taninos enológicos basados en taninos condensados se diferencian en su composición

## INTRODUCCIÓN

monomérica, su grado medio de polimerización, los niveles de galoilación y ramificación (Versari et al., 2013).

Por un lado, los taninos condensados procedentes de semilla de uva están formados por procianidinas, ya que mediante la reacción de Bate-Smith dan lugar únicamente a cianidina mientras que los taninos procedentes de piel de uva están formados por prodelfinidinas y procianidinas, ya que rinden cianidina y delfinidina mediante dicha reacción. Estos dos tipos de taninos ya se encuentran de forma natural en la uva, si bien existen en el mercado extractos comerciales de taninos procedentes de estas dos fuentes. Referente a su estructura química, los taninos condensados de semilla se caracterizan por tener un mDP menor y un porcentaje de galoilación mayor que los de las pieles (Souquet et al., 1996; Prieur et al., 1994; Vignault et al., 2018).

Por otro lado, los taninos condensados procedentes de quebracho son profisetinidinas ya que mediante la reacción de Bate-Smith dan lugar a fisetinidinas, además de caracterizarse por tener un alto nivel de ramificación (Celzard et al., 2015). Los taninos enológicos procedentes de mimosa contienen prorobinetidinas porque liberan robinetidina mediante dicha reacción (Celzard et al., 2015). Sobre los taninos condensados procedentes de acacia parece ser que son mezclas de profisetinidinas, prorobinetidinas y prodelfinidinas (Hoong et al., 2010).

Desafortunadamente no se posee información detallada por parte de las empresas suministradoras de taninos enológicos sobre la composición química y riqueza de los diferentes extractos de taninos enológicos presentes en el mercado. Ésto representa un gran hándicap científico ya que de su composición y riqueza dependerán en gran medida sus propiedades y efectos que ejercerán en el vino. En un estudio reciente de Vignault et al. (2018) fueron caracterizados 36 taninos enológicos comerciales de diferente origen botánico, pudiendo encontrar taninos del mismo origen botánico con diferente riqueza y composición química.

## 6. El Color del vino tinto

### 6.1 Los antocianos y el color del vino tinto

El color es uno de los parámetros organolépticos más importantes de un vino, ya que la vista es el primer sentido que interviene en la degustación (Parpinello et al., 2009). Además, el color del vino nos proporciona información adicional ya que a partir de éste se puede deducir su edad, su potencial tánico y estado de conservación.

El color del vino tinto está definido por su espectro de absorción en la región visible del espectro electromagnético. En la Figura 20 se puede observar un espectro de absorción característico de un vino tinto de un año y su evolución al largo del

## INTRODUCCIÓN

envejecimiento. Se puede observar un máximo de absorción a 520 nm en el espectro de absorción del vino de un año, correspondiente a la percepción del color rojo. También se puede observar una cierta absorción a la zona de 420 nm (color amarillo) y a la zona de 620 nm (color azul) del espectro electromagnético. Sin embargo, a medida que aumenta la edad del vino (5 y 25 años) las absorbancias a 520 nm y 620 nm disminuyen en favor de un incremento de la absorción en la región de 420 nm. Esta evolución en el espectro de absorción de un vino nos explica la inevitable evolución de su color. En este sentido, los vinos jóvenes tienen una tonalidad más roja/violácea mientras que los vinos a medida que son más añejos adquieren una tonalidad más roja/anaranjada (Boido et al., 2006), que comúnmente se conoce como tonalidad tipo *teja*.

Tradicionalmente una forma objetiva de medir el color del vino es mediante la metodología descrita por Glories, (1984) basándose en la determinación de la componente roja (absorbancia a 520 nm), la componente azul (absorbancia a 620 nm) y la componente amarilla (absorbancia a 420 nm) del color. Según Glories, (1984) también se define el concepto de intensidad colorante, relacionada con la cantidad de color de un vino, a partir de la suma de las absorbancias a estas longitudes de onda.

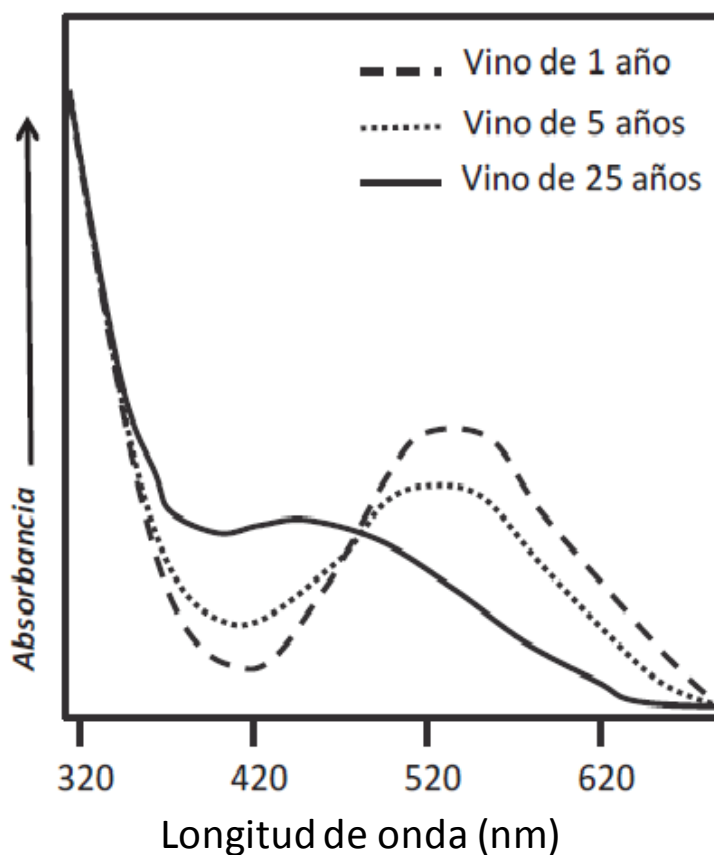


Figura 20: Espectro de absorción del vino tinto.

## INTRODUCCIÓN

Sin embargo, para una determinación más rigurosa del color del vino existe el espacio CIELab, que es una representación en tres dimensiones de la totalidad de colores del espectro electromagnético. En la Figura 21 se puede observar la representación del espacio CIELab.

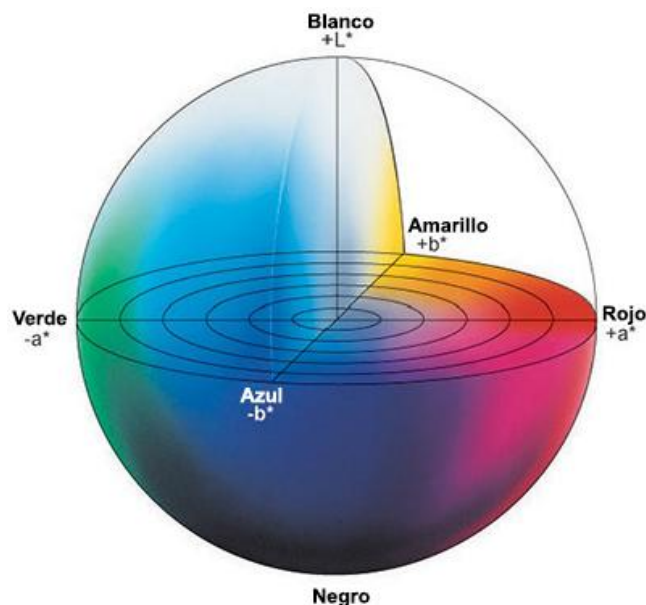


Figura 21: Representación del espacio CIELab del color.

El espacio CIELab, definido por la CIE (Commission Internationale de l'Éclairage) en 1976, es un sistema cartesiano definido por tres coordenadas rectangulares colorimétricas ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ). El eje de la  $L^*$  define la claridad del color, pudiendo esta coordenada tomar valores comprendidos entre 0, correspondiente al negro, y 100, correspondiente al blanco. Las coordenadas  $a^*$  y  $b^*$  definen la desviación del punto acromático de un estímulo a una misma claridad. Concretamente, la coordenada  $a^*$  corresponde al eje que va del color verde al color rojo mientras que la coordenada  $b^*$  corresponde al eje que va del color azul al color amarillo. Estos dos ejes forman un plano perpendicular a la claridad definiendo estas tres coordenadas ( $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ ) el color de un estímulo.

Además, a partir de  $a^*$  y  $b^*$  se pueden definir las coordenadas esféricas  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$ . En este sentido, la  $C_{ab}^*$  se conoce como la chroma o saturación del color y nos define el atributo de percepción visual en el cual un estímulo parece más o menos saturado con respecto a un mismo color o tonalidad. También se atribuye a la pureza de un color, y por ejemplo, un estímulo monocromático tendrá los valores más altos de chroma. En cambio, para objetos acromáticos la  $C_{ab}^*$  es 0.



## INTRODUCCIÓN

La  $h_{ab}$  nos define el color o tonalidad de un estímulo y está definida por la posición angular sobre el plano perpendicular a la claridad ( $L^*$ ). La  $h_{ab}$  comprende valores de entre 0 y 360 grados y para objetos acromáticos no está definida.

La  $C_{ab}^*$  y la  $h_{ab}$  juntamente con la  $L^*$  nos determinan las coordenadas esféricas del espacio CIELab.

Los principales pigmentos responsables del color del vino tinto joven son los antocianos. Como se ha mencionado en el apartado 1.2.3 de esta introducción, la concentración de antocianos en el vino dependerá en gran medida de la variedad de uva, de su nivel de madurez y de las prácticas y condiciones enológicas usadas en la vinificación, ya que estos factores van a influir en su extracción durante la vinificación. No obstante, el color del vino dependerá no solo de la concentración de antocianos, sino también de otros factores como son el pH (Brouillard y Dubois, 1977), la presencia de copigmentos (Gómez-Míguez et al., 2006; He et al., 2012a), los niveles de dióxido de azufre libre (Glories, 1984) y de la formación de nuevos pigmentos (He et al., 2012b).

Los antocianos en su forma química de catión flavilio contienen una carga positiva la cual se encuentra deslocalizada y estabilizada por resonancia a lo largo de su estructura química (Figura 22) (Iacobucci y Sweeny, 1983), lo que hace que el color del vino sea estable al largo del tiempo. La estructura química en forma de catión flavilio tiene un sistema de electrones  $\pi$  conjugados que permite la deslocalización y estabilización de esta carga positiva por resonancia. Desde un punto de vista de los orbitales moleculares, este sistema de electrones  $\pi$  conjugados permite la transición energética de los electrones localizados en los orbitales  $\pi$  a los orbitales  $\pi^*$  de antienlace, produciéndose la absorción de radiación electromagnética en la región visible del espectro y por tanto la percepción del color rojo por parte del ojo humano.

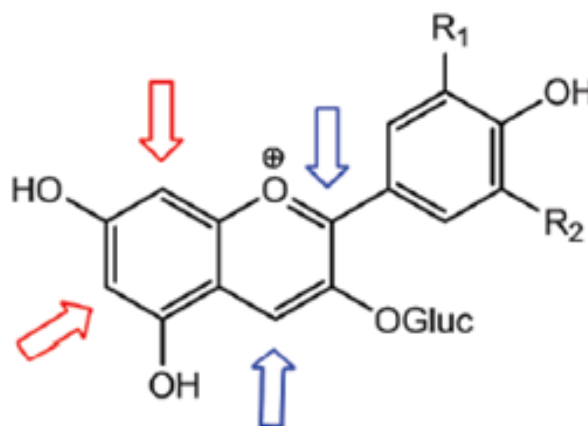


Figura 22: Estructura química de los antocianos en forma de catión flavilio. Las flechas azules indican sus centros electrófilos y las flechas rojas indican sus centros nucleófilos.

## INTRODUCCIÓN

Sin embargo, los antocianos tienen muchos centros reactivos, electrófilos y nucleófilos, y por tanto pueden reaccionar con otras moléculas, tanto nucleofílicas como electrofílicas (Iacobucci y Sweeny, 1983). La Figura 22 muestra la estructura química del catión flavilio, indicándose las posiciones electrófilas (C2 y C4) y nucleófilas de su estructura (C6 y C8).

Las posiciones electrófilas de los antocianos pueden ser atacadas por un nucleófilo produciendo la ruptura del sistema conjugado de electrones  $\pi$  del heterociclo, lo que comporta la pérdida del color. Asimismo, un electrófilo (como puede ser el carbocatión formado en medio ácido por ruptura del enlace interflavánico de las proantocianidinas) puede reaccionar con las posiciones nucleófilas del antociano. Esta reactividad de los antocianos tiene una gran importancia en la evolución y estabilidad del color del vino tinto.

Además, el color del vino tinto depende del pH ya que los antocianos coexisten en equilibrio en 4 estructuras químicas de distinta tonalidad en función del pH (Brouillard y Dubois, 1977): el catión flavilio ( $A^+$ ), de color rojo, la base anhidra quinoidal (AO), de color azul, la pseudo-base carbinol o hemiacetal (AOH), incolora, y la calcona (C), de color amarillo, la cual podemos encontrarla en su configuración *cis* o *trans*. En la Figura 23 se puede observar los equilibrios químicos de los antocianos en función del pH.

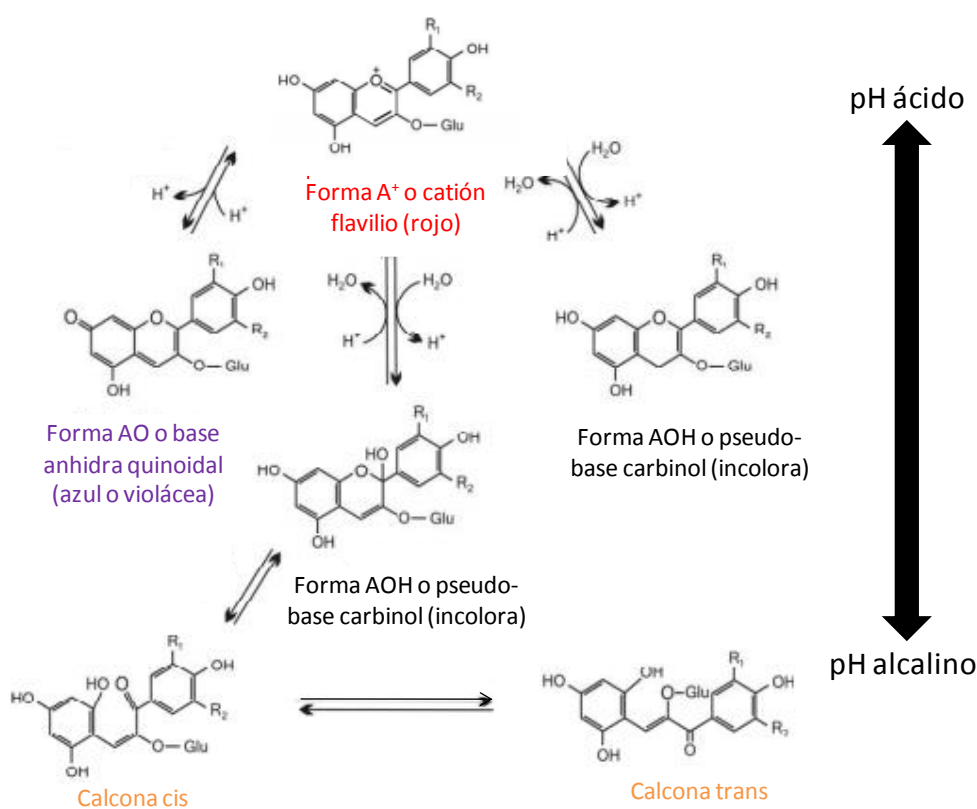


Figura 23: Equilibrios químicos de los antocianos en función de pH.

## INTRODUCCIÓN

Por tanto, tal y como se observa en la Figura 23, la cantidad relativa de cada una de las estructura químicas dependerá del pH. En este sentido, a pH muy bajos (pH menor de 2) los antocianos predominan en forma de catión flavilio, el cual es de color rojo. Cuando el pH se incrementa, la concentración de catión flavilio disminuye para dar lugar mediante desprotonación a la base anhidra quinoindal (azul). Simultáneamente a la desprotonación tiene lugar la hidratación del catión flavilio, dando lugar a la pseudo-base carbinol (incolores). La hidratación tiene lugar mediante el ataque nucleófilo de una molécula de agua a la posición electrófila del antociano (posición C2 del heterociclo), rompiéndose la conjugación de los orbitales  $\pi$  y produciendo la pérdida del color. A pH altos y altas temperaturas, la estructura química carbinol puede transformarse en la estructura tipo calcona (amarilla) produciéndose la apertura del heterociclo. Esta estructura calcona se encuentra en equilibrio con las configuraciones *cis* y *trans*. A su vez, la calcona *trans* puede oxidarse con presencia de oxígeno dando lugar a ácidos fenoles, los cuales son incoloros. Esta última reacción es irreversible y consecuentemente los vinos expuestos a altas temperaturas y al oxígeno pueden tener una pérdida irreversible del color.

También es necesario mencionar que el dióxido de azufre, añadido en vinificación como antioxidante, antiséptico y antioxidásico, puede reaccionar como nucleófilo (en su forma química  $\text{HSO}_3^-$ ) con el catión flavilio mediante el mecanismo de adición nucleófila (igual que lo hace el agua mediante la reacción de hidratación), rompiendo la conjugación de los electrones  $\pi$  y provocando la decoloración del catión flavilio. Sin embargo, esta reacción es reversible y el color se recupera ya que el dióxido de azufre se combina con otros componentes del vino (Glories, 1984).

Al pH del vino tinto (3,5-4,2) las cuatro formas químicas de los antocianos coexisten en equilibrio predominando las formas incolores (pseudo-base carbinol), que representan entre un 65 y un 85 % del total. El catión flavilio representa entre un 5 y un 30 % del total mientras que la forma base quinoindal representa entre un 2 y un 5 %. Por tanto, al pH del vino el color de éste debería ser menos intenso de lo que lo encontramos. Esto es debido a que existen otros factores que influyen en el color del vino. Por un lado tenemos el proceso de la copigmentación, del cual se ha descrito que produce un incremento del color, y por otro lado, la formación de nuevos pigmentos, que tiene lugar gracias a la reactividad de los antocianos antes mencionada de sus centros nucleófilos y electrófilos. Se ha descrito que éstos pueden reaccionar con los flavan-3-oles originando una evolución en el color del vino, ya sea por vía directa o mediante la formación de puentes etilo (He et al., 2012b; Francia-Aricha et al., 1997). Sin embargo, también se ha descrito que pueden formar nuevos pigmentos por cicloadición con el etanal, el piruvato, el vinil-4-fenol o vinil-flavanoles originando diferentes piranoantocianos (De Freitas y Mateus, 2011). También se ha descrito que pueden combinarse con los elagitaninos procedentes de la crianza en bodega o por el uso de taninos comerciales (Chassaing et al., 2010; Vignault et al 2019a).

## INTRODUCCIÓN

En resumen, el color del vino dependerá por una parte de la concentración de antocianos en la uva, que en gran medida estará influenciada por la variedad de uva, de su nivel de madurez, de factores ambientales y de las técnicas de viticultura aplicadas, entre otros muchos factores. Así también, el color del vino dependerá de su concentración en antocianos, determinada por la extracción de éstos durante la vinificación, que a su vez dependerá de la madurez de la uva, de la temperatura durante el proceso fermentativo, del tiempo de maceración y de las técnicas enológicas aplicadas en la vinificación. No obstante, otros factores tales como el pH (Brouillard y Dubois, 1977), los niveles de dióxido de azufre libre, la temperatura de almacenamiento y la exposición al oxígeno (Furtado et al., 1993) ejercerán un efecto claro sobre el color. Asimismo, el proceso de copigmentación y la formación de nuevos pigmentos contribuyen en gran medida al color y a su estabilización (Bouton, 2001; He et al., 2012b).

### 6.2 Copigmentación

La copigmentación es un mecanismo físico-químico basado en la formación de complejos moleculares en que el antociano bajo una de sus formas coloreadas se asocia a otra molécula, conocida como copigmento, dando lugar a estructuras de tipo *sandwich* con un número de capas de entre 2 y 10 (Boulton, 2001; de Freitas et al., 2017; Mazza y Bouillard, 1990). La formación de estos complejos tiene lugar mediante interacciones débiles no covalentes de tipo Van der Waals, basándose en interacciones tipo *pi-pi stacking* entre los anillos aromáticos del antociano y del copigmento (Brouillard y Dangles, 1994).

La formación de los complejos de copigmentación crea un entorno hidrofóbico alrededor del antociano, en forma de catión flavilio, protegiéndolo de la adición nucleófila por parte de una molécula de agua (hidratación) y por tanto de la desaparición de la deslocalización de la carga positiva de su estructura y de la pérdida del color (Santos-Buelga y de Freitas, 2009; He et al., 2012a). Consecuentemente, el equilibrio químico se desplaza hacia la formación de catión flavilio disminuyendo la concentración de formas incoloras (hemiacetal) y produciéndose así un incremento del color (Liao et al., 1992). Este fenómeno, que provoca que haya una mayor concentración de catión flavilio de la que correspondería según las constantes de equilibrio al pH del vino y por tanto un incremento de la intensidad del color, es conocido como efecto hipercrómico y es uno de los mecanismos de estabilización del color en los vinos tintos jóvenes (Brouillard y Dangles, 1994; Boulton, 2001; Asen et al., 1972). Además, la formación de estos complejos de copigmentación puede comportar un desplazamiento batocrómico en el espectro de absorción del antociano (desplazamiento del máximo de absorción en el espectro electromagnético hacia longitudes de onda mayores) comportando la evolución hacia tonalidades más

## INTRODUCCIÓN

azuladas del color del vino (Brouillard y Dangles, 1994; Boulton, 2001; Asen et al., 1972).

En función de la naturaleza del copigmento implicado en la formación de estos complejos, la copigmentación puede subdividirse en tres categorías (Hermosín-Gutiérrez, 2007; He et al., 2012a):

- Copigmentación intermolecular: el copigmento es una molécula de naturaleza distinta al antociano.
- Copigmentación intramolecular: el copigmento es una porción de la propia molécula de antociano (por ejemplo; la molécula de ácido *p*-cumárico de los antocianos cumarilados).
- Auto-asociación: el copigmento es otra molécula de antociano.

Hay distintos factores que influyen en la estabilidad de los complejos de copigmentación entre los que destacan la estructura y la concentración relativa de antocianos y copigmentos. Respecto a la estructura de los antocianos, parece que los complejos de copigmentación son más estables cuando mayor es el grado de glicosilación y de acilación de éstos (Boulton, 2001). En cuanto a los copigmentos parece que los más efectivos son los flavonoles, seguidos de los ácidos hidroxicinámicos debido a su estructura química plana, aunque debido a sus bajas concentraciones en vino su contribución en la copigmentación es menor. En cambio, los flavan-3-oles (monómeros y polímeros) parecen ser copigmentos menos efectivos que los anteriores (Gómez-Míguez et al., 2006), sin embargo, llegan a contribuir significativamente al color del vino tinto joven actuando como copigmentos gracias a su mayor concentración en el vino (González-Manzano et al., 2009). También se ha descrito que los monómeros de flavan-3-oles son copigmentos más efectivos que las proantocianidinas (Gómez-Míguez et al., 2006; Berké y de Freitas, 2005).

Además, existen muchos otros factores que pueden influir al fenómeno de la copigmentación, tales como la temperatura, la fuerza iónica, el pH y el grado alcohólico del vino (Boulton, 2001; Hermosín-Gutiérrez, 2003; Vignault et al., 2019a). En este sentido, se ha descrito que a mayor grado alcohólico la eficacia de la copigmentación disminuye, ya que la mayor hidrofobicidad del etanol con respecto al agua dificulta la formación de estos complejos. Por otra parte, parece ser que las bajas temperaturas favorecen la copigmentación al provocar un aumento de las interacciones de tipo hidrofóbico. Finalmente, a menor pH la mayoría de antocianos se encuentran en forma de catión flavilio, teniendo por tanto menos importancia el fenómeno de la copigmentación.

En el vino tinto joven alrededor del 30-40 % de los antocianos se encuentran en forma copigmentada (Hermosín-Gutiérrez et al., 2005). Sin embargo, este proceso va perdiendo efecto a lo largo del envejecimiento del vino para dar lugar a interacciones

## INTRODUCCIÓN

estables covalentes entre los antocianos y los flavan-3-oles, lo que origina nuevos pigmentos que producirán cambios en el espectro visible del vino. Hay autores que describen que la copigmentación es el primer paso para la formación de uniones covalentes entre los antocianos y los flavanoles (Hermosín-Gutiérrez et al., 2005; Liao et al., 1992).

En el vino encontramos varias moléculas que pueden actuar como copigmentos tales como los flavonoles, los ácidos fenólicos, los flavanoles, los aminoácidos, los polisacáridos, etc. (He et al., 2012a; Mazza y Brouillard, 1990). Asimismo, a los taninos enológicos comerciales se les ha atribuido funciones como copigmentos. No obstante, en la bibliografía hay pocas evidencias claras sobre esta función. En ese sentido, Vignault et al., (2019a) observó un efecto sobre el color en soluciones sintéticas de malvidina-3-*O*-gucósido suplementadas con taninos enológicos de diferente origen botánico. En el capítulo 2 de los resultados se estudia la influencia de diferentes taninos enológicos sobre el color de la malvidina-3-*O*-glucósido y su efecto como posibles copigmentos.

### 6.3 Formación de nuevos pigmentos: pigmentos poliméricos y piranoantocianos

En la bibliografía existen numerosos estudios que evidencian la formación de nuevos pigmentos a partir de los antocianos y los flavanoles en el vino tinto (He et al., 2012b; Francia-Aricha et al., 1997; Timberlake y Bridle, 1976; Es-Safi et al., 1999; Santos-Buelga et al., 1995a; Malien-Auberg et al., 2002; Dueñas et al., 2006; Alcalde-Eon et al., 2006; Salas et al., 2003; Cheynier et al., 2006). Generalmente se conocen tres mecanismos de reacción mediante los cuales se forman aductos entre los antocianos y los flavanoles. Específicamente estos mecanismos de reacción son: la adición antociano-flavanol, la adición flavanol-antociano y la adición antociano-flavanol mediante puentes etilo.

Se conoce que estos nuevos pigmentos son más estables a las variaciones de pH y a la decoloración por el dióxido de azufre en comparación con los antocianos libres (Cheynier et al., 2000; Ribéreau-Gayon et al., 2006). Por tanto, la formación de estos nuevos pigmentos es uno de los mecanismos de estabilización del color del vino tinto durante el envejecimiento.

La formación de aductos antociano-flavanol tiene lugar mediante el ataque de la posición nucleófila de un flavanol (C6 o C8) a la posición electrófila de un antociano, en su forma de catión flavilio. Inicialmente se forma un aducto antociano-flavanol (A-F) que es incoloro. No obstante, una posterior oxidación mediante la acción del oxígeno da lugar a la forma flavilio combinada (A<sup>+</sup>-F), recuperándose la deslocalización de la carga positiva de la unidad de antociano del nuevo pigmento y así el color rojo. Estos pigmentos pueden formarse tanto por los polímeros como los monómeros de flavanol

## INTRODUCCIÓN

(Figura 24 A) (Francia-Aricha et al., 1997). Sin embargo según Dueñas et al., (2006), cuando la formación de estos aductos tiene lugar con la participación de los monómeros de flavanol, este nuevo pigmento puede transformarse dando lugar a estructuras tipo xantilium, de coloración amarilla (Figura 24 B). En cambio las proantocianidinas, probablemente debido a su configuración estérica, tienen dificultad para la formación de este tipo de pigmentos xantilium, lo que sugiere que éstas estabilizan mejor el color rojo mediante la formación de aductos flavanol-antociano (de tonalidad roja), mientras que los monómeros de flavanol son más propensos a la formación de estructuras tipo xantilium que producen un viraje en el color del vino hacia tonalidades más amarillentas. La Figura 24 muestra el mecanismo de reacción de la formación de aductos antociano-flavanol y de estructuras tipo xantilium. En esta misma Figura también se puede observar que cuando la formación de éstos aductos tienen lugar con la participación de los monómeros de flavanol se puede formar un aducto bicíclico incoloro, sin embargo, según Dueñas et al., (2006) la formación de esta estructura química bicíclica es favorecida a pH de alrededor de 2.

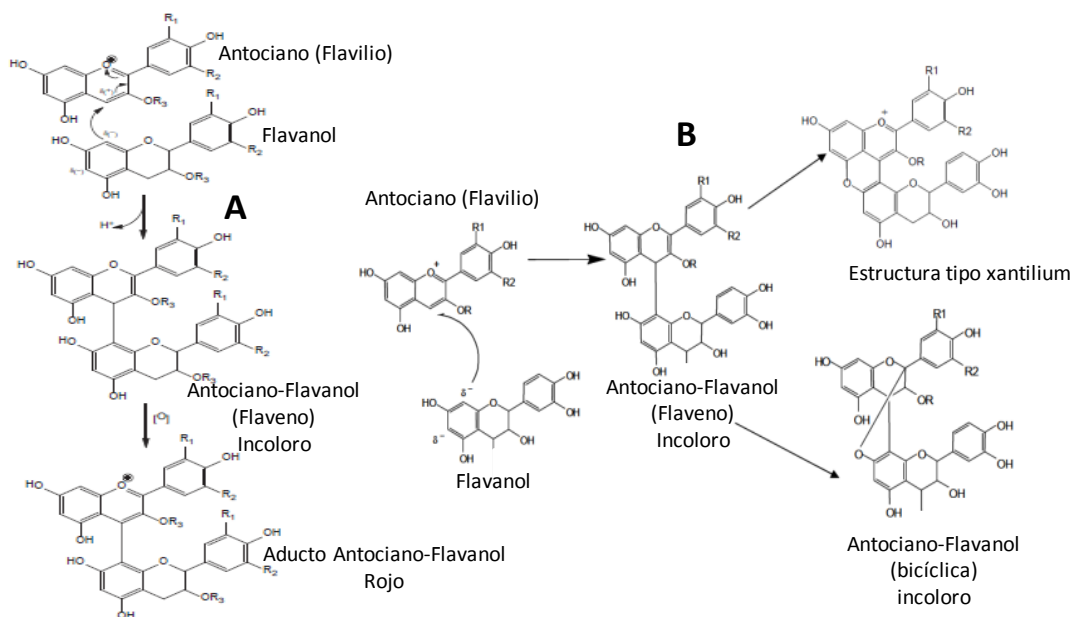


Figura 24: Mecanismos de reacción de la formación de aductos Antociano-Flavanol. A: mecanismo de reacción de los aductos Antociano-Flavanol (rojo). B: Mecanismo de reacción de la formación de estructuras xantilium y de aductos bicíclicos.

La formación de aductos flavanol-antociano tiene lugar mediante el ataque de la posición nucleófila del antociano, en su forma química pseudo-base carbinol o hemiacetal, a la posición electrófila de un flavanol formándose un aducto flavanol-antociano en su forma pseudo-base carbinol (F-AOH), el cual es incoloro. La posición electrófila del flavanol corresponde al carbocatión formado en posición C4 por ruptura del enlace interflavánico de una proantocianidina en medio ácido. Este nuevo pigmento inicialmente incoloro, según la constante de equilibrio en función del pH, es

## INTRODUCCIÓN

transformado en su forma flavilio combinada ( $F-A^+$ ), de color rojo, recuperándose la conjugación por resonancia de la carga positiva de la unidad de antociano del nuevo pigmento. Cabe señalar que este tipo de aductos no pueden ser formados por los flavan-3-oles monoméricos ya que éstos no pueden formar el carbocatión. La Figura 25 muestra el mecanismo de reacción de la formación de aductos flavanol-antociano.

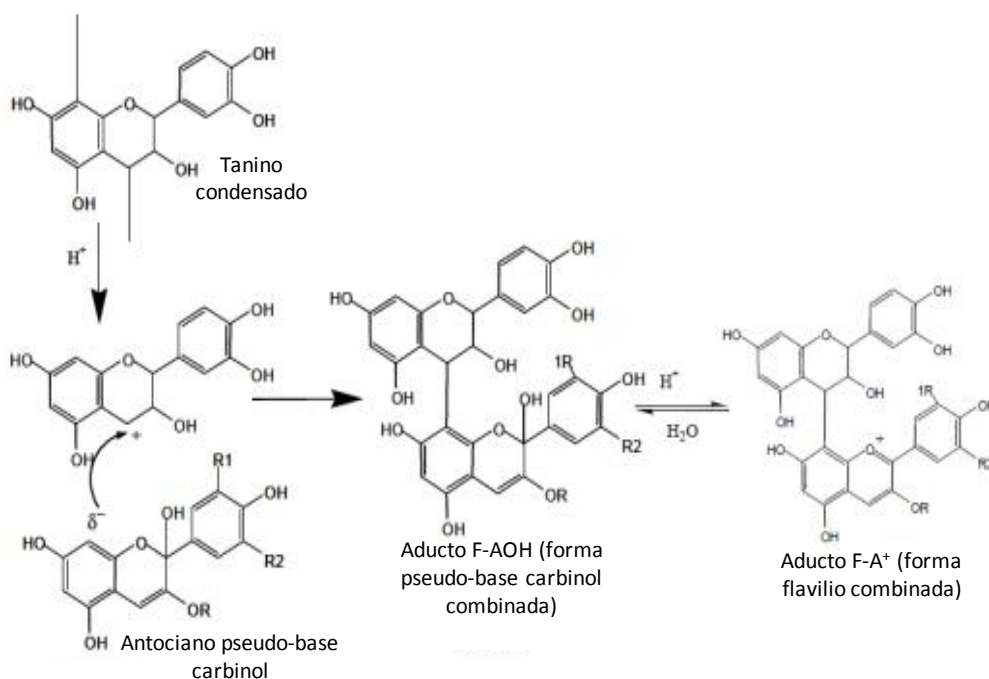


Figura 25: Mecanismo de reacción de la formación de aductos Flavanol-Antociano.

Los aductos flavanol-etil-antociano son formados gracias a las pequeñas cantidades de oxígeno presentes en el vino durante la crianza que provocan la formación de etanal a partir de la oxidación del etanol. Sin embargo, el etanal también puede ser formado a partir del metabolismo de las levaduras en la fermentación alcohólica (Morata et al., 2003a). El mecanismo de reacción se caracteriza por el ataque nucleófilo de un flavanol al carbono carbonílico del etanal. Posteriormente, el antociano ataca la especie intermedia formada a través de sus centros nucleófilos, vía sustitución nucleófila, produciéndose la pérdida de una molécula de agua y uniéndose el antociano y el flavanol mediante un puente etilo (Es-Safi et al., 1999). El aducto resultante corresponde a un flavanol-etil-antociano que se caracteriza por tener tonalidades violáceas o azuladas y por el requerimiento de pequeñas cantidades de oxígeno para su formación.



## INTRODUCCIÓN

Este tipo de aductos flavanol-etil-antociano pueden ser formados tanto por los monómeros como por los polímeros de flavanol (Es-Safi et al., 1999). Además, es necesario señalar que estos puentes etilo pueden formarse también entre flavanoles mediante el mismo mecanismo de reacción (Figura 13), lo que comportaría un aumento de su tamaño (Drinkine et al., 2007; Fulcrand et al., 1996). También, estos aductos mediados por puentes etilo pueden romperse generando un carbocatión flavanol-etilo que, al ser muy reactivo, volverá a formar nuevas uniones. Asimismo, pueden dar lugar a vinil-flavanoles que como se comentará más adelante pueden generar una cicloadición con los antocianos generando un tipo de piranoantocianos (Cheynier et al., 2006; De Freitas y Mateus, 2011; Mateus et al., 2006).

Además de los pigmentos poliméricos previamente nombrados se ha descrito la formación de otra familia de pigmentos, conocidos como piranoantocianos (Cheynier et al., 2006; He et al., 2012b; Freitas y Mateus, 2011; Mateus et al., 2006). La formación de piranoantocianos tiene lugar mediante reacciones de cicloadición, en las que los antocianos reaccionan con distintos compuestos de baja masa molecular presentes en el vino formando un anillo de tipo pirano adicional que define la estructura básica de los piranoantocianos, la cual es mostrada en la Figura 26.

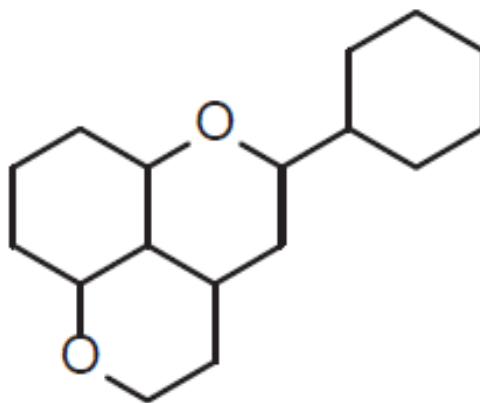


Figura 26: Esqueleto químico característico de los piranoantocianos.

Los compuestos que reaccionan con los antocianos para la formación de este tipo de pigmentos son el acetaldehído y el ácido pirúvico, ambos metabolitos producidos por la levadura en la fermentación alcohólica (Morata et al., 2003a), si bien el acetaldehído además puede formarse por oxidación del etanol durante la crianza en barrica. La cicloadición del acetaldehído con el antociano da lugar a la Vitisina B mientras que la cicloadición con el ácido pirúvico da lugar a la Vitisina A (Morata et al., 2003a), tal y como se muestra en la Figura 27.

## INTRODUCCIÓN

Otras moléculas presentes en vino también pueden generar la formación de piranoantocianos (Figura 27). Se trataría del vinil-fenol producido por ciertas levaduras (*Brettanomyces pp*) por descarboxilación del ácido parahidroxicinámico (Morata et al., 2007), y de los vinil-flavanoles generados a partir de los polímeros mediados por puentes etilo antes descritos (De Freitas y Mateus, 2011; Schwarz et al., 2003).

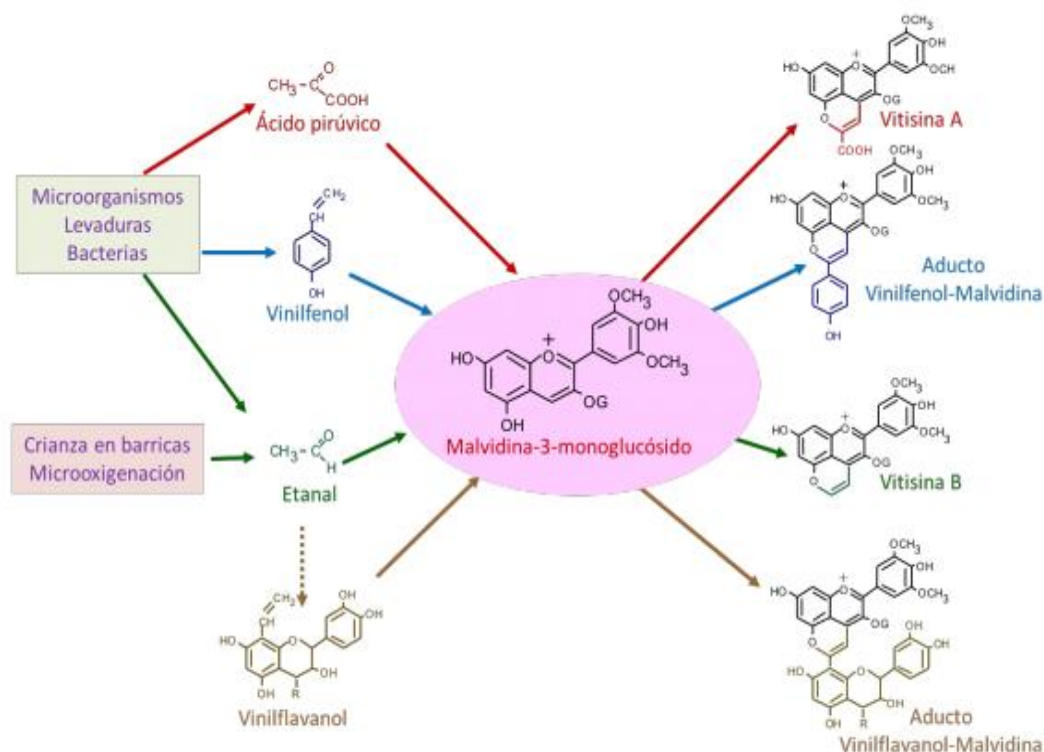


Figura 27: Principales piranoantocianos formados en el vino.

La formación de piranoantocianos se inicia durante la fermentación alcohólica y sigue durante el proceso de vinificación y crianza de los vinos. Éstos se caracterizan por ser muy estables frente a la decoloración por dióxido de azufre, a las variaciones de pH, a la degradación oxidativa y a la temperatura (Ribéreau-Gayon et al., 2006; Cheynier et al., 2000). Además, son cromóforos más débiles que los antocianos libres y poseen muchos de ellos tonos rojos-anaranjados. Por tanto, a pesar de su baja concentración son buenos candidatos para contribuir significativamente al color de los vinos añejos y explicarían en parte el viraje en el tono de los vinos añejos hacia tonalidades tipo teja.

# INTRODUCCIÓN

## 7. La astringencia

### 7.1 Definición de la astringencia

La astringencia fue definida en el 1989 por la “American Society for Testing and Materials” como un complejo de sensaciones de sequedad y rugosidad en el epitelio causada por la exposición a sustancias tales como taninos y alumbre (Llaudy et al., 2004). La astringencia suele ser definida una sensación negativa en el vino, sin embargo, es ampliamente conocido que los vinos de alta calidad tienen un nivel equilibrado de astringencia. En este sentido, el reconocido enólogo Emile Peynaud afirmó que la armonía, el equilibrio y la elegancia de la astringencia son signos de excelentes vinos tintos (Peynaud y Blouin, 1980). Peynaud también describió que el exceso de astringencia en el vino afecta su equilibrio y calidad, pero por el contrario, un vino que carece de astringencia parece plano, insípido y sin interés.

La astringencia del vino es causada por la capacidad de algunos compuestos fenólicos para unirse con las proteínas salivares (Gawel, 1998; Llaudy et al., 2004). Los principales compuestos fenólicos responsables de la sensación de astringencia son las proantocianidinas de la uva. No obstante, la crianza en barrica y la adición de taninos enológicos comerciales en el vino pueden dar un aporte adicional de taninos hidrolizables (galotaninos y elagitaninos), los cuales también pueden contribuir a la sensación de astringencia del vino (Navarrito et al., 2016b).

La sensación de astringencia se atribuye a la presencia en la cavidad bucal de un complejo macromolecular tanino-proteína que comporta la pérdida de efecto lubricante de la saliva así como una sensación de rugosidad, aspereza y sequedad en la boca. En este sentido, tanto la saliva y su composición proteica, como la composición y la estructura química de los taninos presentes en el vino influirán en la sensación de astringencia, además de muchos otros factores.

### 7.2 Factores que influyen en la percepción de astringencia

Como se ha comentado al apartado 7.1, los principales compuestos responsables de la astringencia de un vino son las proantocianidinas, aunque también pueden contribuir a la sensación de astringencia otros tipos de taninos, ya sean elagitaninos liberados por la barrica de roble durante la crianza o galotaninos que junto con los anteriores pueden estar presentes en el vino por la adición de taninos enológicos comerciales. Estos taninos interactúan con las proteínas de la saliva formando complejos que acaban precipitando dándonos esta sensación de sequedad y rugosidad en la cavidad bucal. Por tanto, la fracción proteica de la saliva y la composición en taninos del vino influirán sobre las interacciones de estos taninos con las proteínas de la saliva y consecuentemente en la sensación de astringencia. Se ha descrito que estas

## INTRODUCCIÓN

interacciones son de tipo hidrofóbico y de tipo puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de los taninos y los de las proteínas (Gawel, 1998).

Por un lado, la saliva está compuesta principalmente de agua (95.5%) y el resto son sustancias inorgánicas y orgánicas, principalmente glicoproteínas como las mucinas, proteínas ricas en prolina (PRPs) y algunos péptidos de bajo peso molecular como son las histatinas (Van Nieuw Amerongen et al., 2004). Se ha observado que la percepción de astringencia no está ligada solamente a un tipo de proteína, sino que todas las proteínas salivares juegan un papel importante (Lee et al., 2012; Soares et al., 2012).

Las propiedades intrínsecas de las proteínas salivares como son su hidrofobicidad, su tamaño o masa molecular y su flexibilidad influyen en su capacidad para ligarse con los taninos. Sin embargo, en esta interacción también influyen factores externos tales como el pH, la temperatura, la fuerza iónica del medio, la presencia de solventes orgánicos y de carbohidratos, así como el flujo salival, la viscosidad de la saliva o la presencia de ácidos, edulcorantes o minerales (Gawel, 1998). En este sentido, se ha descrito que la astringencia aumenta con la disminución del pH (Obrique-Slier et al., 2012) y del grado alcohólico (Fontoin et al., 2008). Asimismo, también se ha descrito que los polisacáridos pueden modular la percepción de la astringencia mediante la formación de complejos proteína-polifenol-polisacárido que se mantienen solubles y por tanto pueden contribuir a la disminución de la astringencia (Watrelet et al., 2017).

En lo que respecta a los taninos, la interacción entre éstos y las proteínas salivares depende en gran medida de su estructura química. En este sentido, las proantocianidinas, los elagitaninos y los galotaninos tendrán probablemente diferente capacidad para interactuar con las proteínas y a su vez dicha interacción será probablemente de diferente naturaleza química. En este sentido, Hangerman et al., (1998) describieron que el penta-galoil-glucosa (tanino hidrolizable), de características más bien no polares, interactúa con las proteínas principalmente mediante interacciones de tipo hidrofóbico mientras que la proantocianidina (-)epicatequina<sub>16</sub>- (+)catequina, de características más bien polares con respecto al anterior, interactúa con las proteínas principalmente mediante puentes de hidrógeno. A su vez, dentro de las diferentes familias de taninos (taninos condensados y taninos hidrolizables), las diversas especies químicas que existen y las características de estas moléculas tales como polaridad, flexibilidad y masa molecular, determinarán también su interacción con las proteínas.

Las proantocianidinas parece que actúen como ligandos multidentados con participación de sus anillos aromáticos y sus grupos hidroxilo mediante interacciones de tipo hidrofóbico y de puentes de hidrógeno. Por tanto, la astringencia dependerá no solo de la concentración de proantocianidinas en el vino sino también de su estructura. En este sentido, se ha descrito que las proantocianidinas con un mayor mDP y un mayor porcentaje de galoilación (%GAL) son más astringentes (Gawel, 1998).

## INTRODUCCIÓN

Al actuar como ligandos multidentados es lógico que a mayor longitud de cadena existan más puntos de unión entre éstas y las proteínas. Además, un mayor %GAL de las proantocianidinas implica que éstas tengan una proporción mayor de moléculas de ácido gálico, lo que confiere a su estructura más grupos hidroxilo, los cuales pueden formar puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo de las proteínas.

### 7.3 Metodologías para la determinación de la astringencia

La evaluación objetiva de la astringencia del vino tinto se determina generalmente por análisis sensorial. Sin embargo, el análisis sensorial necesita un panel de cata formado por catadores expertos y entrenados. Incluso, en estas condiciones existe una cierta subjetividad asociada en el proceso de evaluación de la astringencia (Valentova et al., 2002). Además, la percepción de la astringencia también aumenta con la exposición repetida, lo que puede conducir a la fatiga de los catadores y alterar el resultado de la degustación (Colonna et al., 2004). Asimismo, la percepción de la astringencia varía ampliamente entre los individuos (Fisher et al., 1994), lo que hace su evaluación objetiva extremadamente complicada.

En la bibliografía existen varios estudios basados en la interacción tanino-proteína, no obstante, muchos de ellos utilizan proteínas no salivares tales como la ovoalbúmina, la albumina de suero bovino (BSA), la gelatina o la poliprolina para estudiar el mecanismo de la astringencia y como métodos analíticos para determinar la intensidad de esta sensación. En este sentido, existe el método del índice de gelatina, descrito por Glories et al., (1984), y el índice de astringencia descrito por Llaudy et al., (2004) entre los más habitualmente utilizados.

También existen varios estudios donde se evalúa la interacción tanino-proteína usando proteínas salivares. En este sentido, estos estudios donde se estudia la interacción tanino-proteína salivar se basan en diferentes técnicas analíticas tales como la nefelometría (de Freitas y Mateus, 2001), la viscosidad (Prinz y Lucas, 2000), la electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS) (Gambutí et al., 2006), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Schwarz y Hofmann, 2008), la dispersión dinámica de la luz (dynamic light scattering-DLS) (Pascal et al., 2008), la espectroscopía de infrarojo (FT-MIR) (Simoës-Costa et al., 2015), la espectrometría de masas (ESI-MS) (Canon et al., 2009), la resonancia magnética nuclear (RMN) (Cala et al., 2010) y la microcalorimetría (McRae et al., 2010). Más recientemente se han utilizado técnicas tales como la microscopia de fuerzas atómicas (AFM-Atomic Force microscopic) (Ma et al., 2016) y la resonancia de plasmones superficiales (SPR- surface plasmon resonance)(Rafaela et al., 2012; Watrelot et al., 2016; Guerreiro et al., 2012; Guerreiro et al., 2017).

## INTRODUCCIÓN

En el siguiente apartado nos centraremos en la resonancia de plasmones superficiales, ya que es la técnica utilizada en esta tesis doctoral para estudiar la interacción entre los taninos y la mucina como una novedosa aproximación al estudio de la astringencia.

### 7.4 Resonancia de plasmones superficiales

La primera observación documentada de plasmones de superficie se remonta al 1902, cuando Wood iluminó una lámina metálica con una superficie en forma de dientes de sierra (Wood, 1902). La fuente de luz tenía un espectro ancho, y se observó que en el espectro reflejado había ciertas bandas oscuras, lo que se asoció a que no habían sido reflejadas. Más tarde, en 1941 el trabajo teórico de Fano asoció estas bandas oscuras, debido a la no reflexión, a la excitación de ondas electromagnéticas en la superficie del metal (Fano, 1941). Thurbadar, en 1959, observó una caída importante en la reflectividad cuando iluminaba una lámina fina de metal encima de un sustrato (Thurbadar, 1959). En 1968, Otto demostró los resultados obtenidos por Thurbadar y asoció la caída en la reflectividad a la excitación de plasmones de superficie (Otto, 1968). Asimismo, en el mismo año Kretschmann y Raether consiguieron excitar plasmones de superficie con diferentes configuraciones. Los trabajos de Otto, Kretschmann y Raether establecieron métodos para excitar e investigar los plasmones de superficie y los introdujeron en la óptica moderna (Homola, 2006).

La resonancia de plasmones de superficie (SPR) es un fenómeno físico que tiene lugar cuando una onda plana de luz incide a un determinado ángulo de incidencia en una interfaz de dos medios con partes reales de su permitividad eléctrica de distinto signo. Específicamente, una lámina fina de un metal noble, siendo el oro el más comúnmente utilizado, y un dieléctrico. Cuando la energía del campo eléctrico de los fotones de la luz incidente cumple unas condiciones determinadas se produce la interacción de estos fotones con los electrones libres de la superficie del metal. Entonces, los fotones de la luz incidente son absorbidos transfiriendo la energía a los electrones que se convierten en plasmones de superficie, conociéndose el fenómeno como resonancia de los plasmones de superficie.

El plasmón, según la teoría cuántica, es el nombre de partícula de una onda de densidad de electrones (Sarid y Challener, 2010). Los plasmones tienen un momento característico definido por factores tales como el metal utilizado y las propiedades de los medios en cada lado de la lámina metálica. La resonancia ocurre cuando el momento de la luz incidente es igual al momento de los plasmones. Por tanto, la energía y el ángulo de la luz incidente deben coincidir para crear la resonancia de plasmones de superficie. El ángulo de resonancia de los plasmones de superficie depende principalmente de las propiedades del metal, la longitud de onda incidente y el índice de refracción de los medios a ambos lados del metal.

## INTRODUCCIÓN

Además, la luz incidente debería ser monocromática y con una polarización paralela al plano de la superficie metálica para obtener una buena respuesta. Controlando estas variables, y manteniendo constante la temperatura (ya que afecta el índice de refracción de los medios), la señal SPR dependerá directamente del cambio de índice de refracción del medio por encima de la lámina de oro, que será la superficie del sensor.

Kretschmann desarrolló una configuración para excitar los plasmones de superficie, que es la que se utiliza en la mayoría de aplicaciones. Esta configuración consiste en una fuente láser que apunta con un cierto ángulo de incidencia a un prisma de algún tipo de cristal. La capa de oro está depositada en una de las caras del prisma, y el rayo de luz se refleja en ella y sale por el otro lado del prisma, llegando a un detector. La Figura 28 muestra la configuración mediante el cual se excitan los plasmones de la superficie.

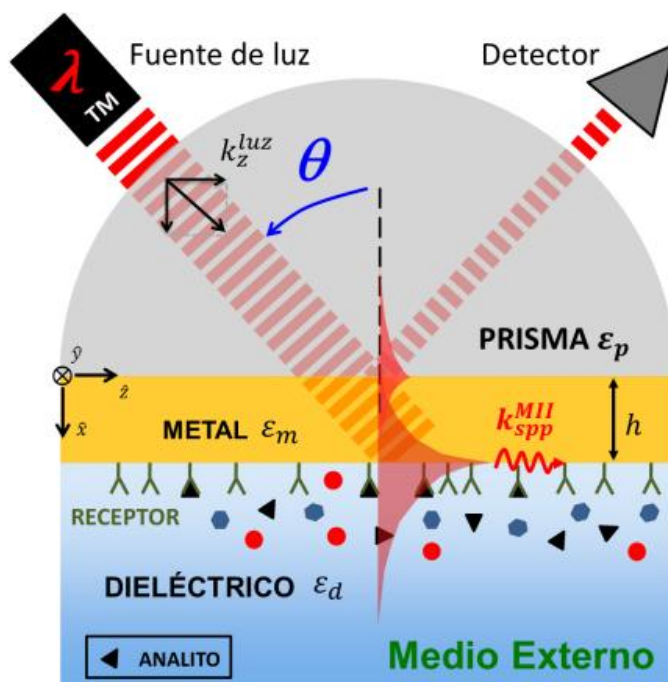


Figura 28: Configuración de la excitación de plasmones superficiales.

Como hemos visto, los plasmones de superficie se excitan para un ángulo de incidencia de la luz y un índice de refracción determinado, por ello, la variación de este ángulo en función de un cambio en el índice de refracción del dieléctrico encima de la lámina de oro (la muestra a analizar) puede utilizarse como medida (expresado en unidades de resonancia-UR). Concretamente, podemos usar la variación de la reflexión (que está directamente relacionada con el ángulo) que se produce al variar el índice de refracción.

## INTRODUCCIÓN

El fenómeno SPR es conocido desde hace mucho tiempo, no obstante su aplicación como sensores es relativamente nueva. En 1983, Liedberg demostró el uso de el SPR como sensor (Liedberg et al., 1983) y a partir de allí se ha desarrollado la tecnología de sensores como detector, y más tarde como una herramienta efectiva para mediciones en tiempo real y concretamente para analizar interacciones biomoleculares (proteína-proteína, droga-proteína, proteína-ADN, etc.).

Más recientemente se ha utilizado en el ámbito enológico para estudiar la interacción tanino-proteína, principal determinante de la sensación de astringencia. En este sentido, a partir de la técnica de resonancia de plasmones superficiales podemos determinar en tiempo real la interacción entre los taninos y las proteínas salivares para el estudio de la percepción de la astringencia.

Más concretamente, se puede fijar la proteína salivar en la superficie metálica de oro del sensor para posteriormente proceder a la inyección de tanino en la misma lámina metálica, donde hay la proteína fijada, pudiendo así estudiar la interacción del tanino con la proteína fijada en tiempo real. Si el tanino tiene afinidad por la proteína fijada quedará depositado sobre la lámina metálica (ligado con la proteína), lo que provocará un cambio en el índice de refracción y por tanto, según lo explicado anteriormente, un cambio en la respuesta expresada en unidades de resonancia (UR). A partir de esta respuesta obtenida por el equipo de SPR se pueden determinar las constantes de asociación y disociación, tanto cinéticas como termodinámicas, de la interacción tanino-proteína, lo que nos permite estudiar la afinidad entre estas dos moléculas (Rafaela et al., 2012; Watrelot et al., 2016; Guerreiro et al., 2012; Guerreiro et al., 2017).



## INTRODUCCIÓN

### Referencias

- Adams, D. O. Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, 57, 249-256.
- Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailon, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing - A comprehensive study. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 563, 238-254.
- Amrani Joutei, K.; Glories, Y. Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Rev. Fran. Oenol.* **1995**, 35, 28-31.
- Asen, S.; Stewart, R. N.; Norri, K. H.; Copigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry* **1972**, 11, 1139-1144.
- Athar, M.; Back, J. H.; Tang, X.; Kim, K. H.; Kopelovich, L.; Bickers, D. R.; Kim, A. L. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, 224, 274-283.
- Bate-Smith, E. C. Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochemistry* **1973**, 12, 907-912.
- Berké, B., De Freitas, V. A. P. Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chem.* **2005**, 90, 453-460.
- Bindon, K. A.; Smith, P. A.; Holt, H.; Kennedy, J. A. Interaction between Grape-Derived Proanthocyanidins and Cell Wall Material. 2. Implications for Vinification. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 10736-10746.
- Block, G. A role for antioxidants in reducing cancer risk. *Nutricion Reviews* **1992**, 50 (7), 207-213.
- Boido, E.; Alcalde-Eon, C.; Carrau, F.; Dellacassa, E.; Rivas-Gonzalo, J. C. Aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. cv. Tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color. *J. Agric. Food Chem.* **2006** 54, 6692-6704.
- Boidron, J. N.; Chattonnet, P.; Pons, M. Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Conn. Vigne Vin* **1988**, 22, 275-294.
- Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, 52, 67-87.
- Brouillard, R.; Dangles, O. Anthocyanins molecular interactions: The first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chem.* **1994**, 51, 365-371.

## INTRODUCCIÓN

- Brouillard, R.; Dubois, J. E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in aqueous media. *J Am Chem Soc.* **1977**, 99, 1359–1364.
- Busse-Valverde, N.; Gomez-Plaza, E.; López-Roca, J.M.; Gil-Muñoz, R.; Bautista-Ortin, A.B. The Extraction of Anthocyanins and Proanthocyanidins from Grapes to Wine during Fermentative Maceration Is Affected by the Enological Technique. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 5450-5455.
- Cadot, Y.; Chevalier, M.; Barbeau, G. Evolution of the localisation and composition of phenolics in grape skin between veraison and maturity in relation to water availability and some climatic conditions. *J. Sci. Food Agric.* **2011**, 91, 1963-1976.
- Cadot, Y.; Minana-Castello, M. T.; Chevalier, M. Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv of Cabernet Franc during fruit development. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 29, 9206–9215.
- Cala, O.; Fabre, S.; Fouquet, E.; Dufour, E. J.; Pianeta, I. NMR of human saliva protein/wine tannin complexes. Towards deciphering astringency with physicochemical tools. *Comptes Rendus Chimie* **2010**, 13, 449–452.
- Canals, R.; Llaudy, M. C.; Canals, J. M.; Zamora, F. Influence of the elimination and addition of seeds on the color, phenolic composition and astringency of red wine. *Eur. Food Res. Tech.* **2008**, 226(5), 1183-1190.
- Canals, R.; Llaudy, M. C.; Valls, J.; Canals, J. M.; Zamora, F. Influence of Ethanol Concentration on the Extraction of Color and Phenolic Compounds from the Skin and Seeds of Tempranillo Grapes at Different Stages of Ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53(10), 4019-4025.
- Canon, F.; Paté, F.; Meudec, E.; Marlin, T.; Cheynier, V.; Giuliani, A.; Sarni-Manchado, P. Characterization, stoichiometry, and stability of salivary protein-tannin complexes by ESI-MS and ESI-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2009**, 395, 2535–2545.
- Canuti, V.; Puccioni, S.; Giovani, G.; Salmi, M.; Rosi, I.; Bertuccioli, M. Effect of oenotannin addition on the composition of sangiovese wines from grapes with different characteristics. *Am. J. Enol. Vitic.* **2012**, 63, 220-231.
- Cassaca, L.F.; Beaver, C.W.; Mireles, M.S.; Harbertson, J.F. Effect of extended maceration and ethanol concentration on the extraction and evolution of phenolics, color components and sensory attributes of Merlot wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2013**, 19, 25-39

## INTRODUCCIÓN

- Castillo-Muñoz, N.; Fernández-González, M.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinífera* L.) grapes and red wines. *J. Agric. Food. Chem.* **2009**, 57 (17), 7883–7891.
- Celzard, A.; Szczurek, A.; Jana, P.; Fierro, V.; Basso, M. C.; Bourbigot, S.; Pizzi, A. Latest progresses in the preparation of tannin-based cellular solids. *Journal of Cellular Plastics* **2015**, 51, 89–102.
- Chassaing, S.; Lefeuvre, D.; Jacquet, R.; Jourdes, M.; Ducasse, L.; Galland, S.; Grelard, A.; Saucier, C.; Teissedre, P. L.; Dangle, O.; Quideau, S. Physicochemical studies of new anthocyano-ellagitannin hybrid pigments: About the origin of the influence of oak C-glycosidic ellagitannins on wine color. *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 1, 55–63.
- Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J.; Pons, M. The origin of ethylphenols in wines. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, 60, 165-178.
- Cheynier V.; Dueñas-Paton, M.; Salas, E.; Maury, C.; Souquet, J.M.; Sarni-Manchado, P.; Fulcrand, H. Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, 57, 298–305.
- Cheynier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Machado, P. Los compuestos fenólicos. In: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos* Ed. C. Flancy, AMV Ediciones, Madrid, Spain. 2000, pp. 114-136.
- Cheynier, V.; Rigaud, J. HPLC Separation and Characterization of Flavonols in the Skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *Am J. Enol. Vitic.* **1986**, 37, 248-252.
- Chira, K. ; Teissedre, P. L. Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with French wine woods subjected to different toasting methods: Behaviour during storage. *Food Chem.* **2013**, 140, 168–177.
- Coletta, A.; Trani, A.; Faccia, M.; Punzi, R.; Dipalmo, T.; Crupi, P.; Antonacci, D.; Gambacorta, G. Influence of viticultural practices and winemaking technologies on phenolic composition and sensory characteristics of Negroamaro red wines. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2013**, 48(11).
- Colonna, A. E.; Adams, D. O.; Noble, A. C. Comparison of procedures for reducing astringency carry-over in evaluation of red wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2004**, 10, 26–31.
- Coombe, B.G. Research on Development and Ripening of the Grape Berry. *Am. J. Enol. Vitic.* **1992**, 43, 101-110.
- Coombe, B.G. Distribution of Solutes within the Developing Grape Berry in Relation to its Morphology. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, 38, 120-127.

## INTRODUCCIÓN

- Czochanska, Z., Foo, L.Y., Porter, L. J. Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry* **1979**, 18, 1819-1822.
- Darias-Martín, J.; Carrillo, M.; Diaz, E. Boulton, R. B. Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chem.* **2001**, 73, 217-220.
- De Freitas, V.; Glories, Y.; Monique, A. Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2000**, 51, 397-403.
- De Freitas, V.; Mateus, N. Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 401, 1463-1473.
- De Freitas, V.; Mateus, N. Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, 82, 113-119.
- De Freitas, V.; Fernandes, A.; Oliveira, J.; Teixeira, N.; Mateus, N. A. Review of the current knowledge of red wine colour. *OENO One* **2017**, 51.
- Delteil, D. Utilisation des tanins œnologiques sur les raisins et les vins rouges méditerranéens. *Rev. Fran. Œnol.* **2000**, 181, 20-22.
- Downey, M.O.; Dokoozlian, N.K.; Krstic, M.P. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, 57, 257- 268.
- Drinkine, J., Lopes, P., Kennedy, J. A., Teissedre, P., Saucier, C. Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 6292-6299.
- Dueñas, M.; Fulcrand, H.; Cheynier V. Formation of anthocyanidin – flavanol adducts in model solutions. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 563, 15-25.
- Escribano-Bailón, M.T.; Guerra, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C; Santos-Buelga, C. Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung and Forschung* **1995**, 200 (3), 221-224.
- Es-Safi, N. E.; Fulcrand H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Studies on the acetaldehyde induced condensation of (-)-epicatechin and malvidin-3-O-glucoside in a model solution system. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 2096-2102.
- Esteban, M.A.; Villanueva, M. J; Lissarrague, J. R. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis Vinifera* L.) grape berries during ripening. *J. Sci. Food Agric.* **2001**, 81, 409-420.

## INTRODUCCIÓN

- Fano, U. U. The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld's Waves). *Journal of the Optical Society of America* **1941**, 31, 213-222.
- Fernández de Simón, B.; Cadahía, E.; Conde, E.; García-Vallejo, M. C. Evolution of phenolic compounds of Spanish oak wood during natural seasoning. First results. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 1687-1694.
- Ferrandino, A.; Carra, A.; Rolle, L.; Schneider, A.; Schubert, A. Profiling of Hydroxycinnamoyl Tartrates and Acylated Anthocyanins in the Skin of 34 *Vitis vinifera* Genotypes. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 4931-4945.
- Fischer, U.; Boulton, R. B.; Noble, A. C. Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Qual Prefer.* **1994**, 5, 55-64.
- Fischer, U.; Strasser, M.; Gutzler, K. Impact of fermentation technology on the phenolic and volatile composition of German red wines. *Int. J. Food Sci. Tech.* **2000**, 35, 81-94.
- Flint, S.D.; Peter, W.; Jordan, P.W.; Caldwell, M. M. Plant protective response to enhanced uv-b radiation under field conditions: leaf optical properties and photosynthesis. *Photochemistry and Photobiology* **1986**, 41, 95-99.
- Fontoin, H.; Saucier, C; Teissedre P. L. ; Glories, Y. Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Qual. Prefer.* **2008**, 19, 286-291.
- Francia-Aricha, E.; Guerra, M. T.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. New anthocyan pigments formed after condensation with flavanols. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 2262-2266.
- Fulcrand, H.; Doco, T.; Es-Safi, N. E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography ion spray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **1996**, 752, 85-91.
- Furtado, P.; Figueiredo, P.; Chaves Das Neves, H.; Pina, F. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **1993**, 75, 113-118.
- Gambutì, A.; Rinaldi, A.; Pessina, R.; Moio, L. Evaluation of aglianico grape skin and seed polyphenol astringency by SDS-PAGE electrophoresis of salivary proteins after the binding reaction. *Food Chem.* **2006**, 97, 614-620.
- Garcia-Beneytez, E.; Revilla, E.; Cabello, F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 215, 32-37

## INTRODUCCIÓN

- Gawel, R. Red wine astringency: A Review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1998**, 4, 73-95.
- Gil, M.; Kontoudakis, N.; González, E.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J. M.; Zamora F. Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of cabernet sauvignon and tempranillo wines. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, 60, 7988–8001.
- Gil, M.; Pascual, O.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Canals, J. M.; Zamora, F. Influence of berry size on red wine color and composition. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2015**, 21, 200–212.
- Glabasnia, A.; Hofmann, T. Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whiskey and oak-matured red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 3380-3390.
- Glories, Y. La couleur des vins rouges. 2ème partie: Mesure, Origine et Interpretation. *Connaiss. Vigne Vin* **1984**, 18, 253–271.
- Glories, Y.; Agustin, M. Maturité phénolique du raisin, conséquences technologiques; application aux millésimes 1991 et 1992. Actes du Colloque “Journé technique du CIVB” 21 janvier 1993, Bordeaux, 1993, pp 56-61.
- Gómez-Míguez, M.; González-Manzano, S.; Escribano-Bailón, M.; Heredia, F.; Santos-Buelga, C. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin-3-glucoside. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 5422-5429.
- González-Manzano, S.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buega, C. Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chem.* **2009**, 114, 649-656.
- González-Manzano, S.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 513, 283-289.
- González-Neves, G.; Gil, G.; Barreiro, L. Influence of grape variety on the extraction of anthocyanins during the fermentation on skins. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 226, 1349- 1355.
- Guerreiro, J. R. L.; De Freitas, V.; Sutherland, D. S.; Sales, M. G. F. SPR based studies for pentagalloyl glucose binding to  $\alpha$ -amylase. *Proc. Eng.* **2012**, 47, 498-501.
- Guerreiro, J. R. L.; Teixeira, N.; De Freitas, V.; Sales, M. G. F.; Sutherland, D. S. A saliva molecular imprinted localized surface Plasmon resonance biosensor for wine astringency estimation. *Food Chem.* **2017**, 233, 457–466.

## INTRODUCCIÓN

- Guidoni, S.; Hunter, J.J. Anthocyanin profile in berry skins and fermenting must/wine, as affected by grape ripeness level of *Vitis vinifera* cv. Shiraz/R99. *Eur. Food Res. Technol.* **2012**, 235, 397-408.
- Guimberteau, G. Le bois et la qualité des vins et des eaux-de-vie. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, **1992**.
- Guyot, S.; Vercauteren, J.; Cheynier, V. Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry* **1996**, 42, 1279-1288.
- Hagerman, A. E. In Tannin Handbook; Miami University Oxford (Ed.), USA, 1998.
- Hagerman, A. E.; Riedl, K. M.; Jones, G. A.; Sovik, K. N.; Ritchard, N. T.; Hartzfield, P. W.; Riechel T. L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1887-1892.
- Hanlin, R.L.; Hrmova, M.; Harbertson, J.F.; Downey, M.O. Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2010**, 16, 173-188.
- Haslam, E. In vino veritas: oligomeric procyanidin and the ageing of wines. *Phytochemistry* **1980**, 19, 2577-2582.
- He, F.; Liang, N. N.; Mu, L.; Pan, Q. H.; Wang, J.; Reeves, M. J.; Duan, C. Q. Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules* **2012a**, 17, 1571-1601.
- He, F.; Liang, N. N.; Mu, L.; Pan, Q. H.; Wang, J.; Reeves, M. J.; Duan, C. Q. Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules* **2012b**, 17, 1483-1519.
- Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Copigmentación y piranoantocianos: el papel de los flavonoles y los ácidos hidroxicinámicos en el color del vino tinto. *ACE. Rev. Enol.*
- Hermosín-Gutiérrez, I. Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a cencibel young red wine. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51, 4079-4083.
- Hermosín-Gutiérrez, I.; Sánchez-Palomo Lorenzo, E.; Vicario Espinosa, A. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chem.* **2005**, 92, 269-283.
- Hiratsuka, S.; Onodera, H.; Kawan, Y.; Kubo, T.; Itoh, H.; Wada, R. Enzyme activity changes during anthocyanin synthesis in Olympia grape berries. *Scientia-Horticulturae* **2001**, 90, 255-264.

## INTRODUCCIÓN

Homola, J. Surface Plasmon Resonance Based Sensors, Vol. 4. Praga, Republica Checa: Springer, 2006.

Hoong, Y. B.; Pizzi, A.; Tahir, P.; Md., Pasch, H. Characterization of Acacia mangium polyflavonoid tannins by MALDI-TOF mass spectrometry and CP-MAS <sup>13</sup>C NMR. *European Polymer Journal* **2010**, 46, 1268–1277.

Howell, G.S. Sustainable grape productivity and the growth-yield relationship: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, 52, 165-174.

Iacobucci, G. A.; Sweeny, J. G. The Chemistry of Anthocyanins; Anthocyanidins and Related Flavylum Salts. *Tetrahedron* **1983**, 39, 3005-3038.

International Organisation of Wine and Vine (OIV), (2017). International Oenological Codex

Jakson, R.S. Grapevine structure and function, In Wine science, 3rd ed.; Elsevier, 2008, pp. 50-107.

Jordão, A. M.; Da Silva, J. M. R.; Laureano, O.; Mullen, W.; Crozier, A.; Effect of ellagitannins, ellagic acid and volatile compounds from oak wood on the (+)-catechin, procyanidin B1 and malvidin-3-glucoside content of model wines. *Aust. J. Grape Wine Res.*, **2008**, 14, 260–270.

Jourdes, M.; Michel, J.; Saucier, C.; Quideau, S.; Teissedre, P. L. Identification, amounts and kinetics of extraction of C-glucosidic ellagitannins during wine aging in oak barrels or in stainless steel tanks with oak chips. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, 401, 1531-1539.

Jurd, L. Review of polyphenol condensation reactions and their possible occurrence in aging of wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **1969**, 20, 191-195.

Kennedy, J. A. Grape and wine phenolics: observations and recent findings. *Cien. Inv. Agr.* **2008**, 35, 77-90.

Kennedy, J. A.; Matthews, M. A.; Waterhouse, A. L.; Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* **2000**, 55, 77-85.

Kennedy, J. A.; Matthews, M. A.; Waterhouse, A. L. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, 53, 268-274.

Kennedy, J.A.; Hayasaka, Y.; Vidal, S.; Waters, E.J.; Jones, G.P. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 5348-5355.



## INTRODUCCIÓN

- Kontoudakis, N.; Esteruelas, M.; Fort, F.; Canals, J.M.; De Freitas, V.; Zamora, F. Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chem.* **2011**, 124, 767-774.
- Koyama, K.; Nami, G.Y.; Hashizume, K. Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*). *Biosci. biotechnol. biochem.* **2007**, 71, 958-965.
- Lee, J.; Kennedy, J. A.; Devlin, C.; Redhead, M.; Rennaker, C. Effect of early seed removal during fermentation on proanthocyanidin extraction in red wine: A commercial production example. *Food Chem.* **2008**, 107, 1270-1273.
- Lee, J.; Skinkis, P.A. Oregon 'Pinot noir' grape anthocyanin enhancement by early leaf removal. *Food Chem.* **2013**, 139, 893-901.
- Lempereur, V.; Blayteyron, L.; Labarbe, B.; Saucier, C.; Klebek, H.; Glories, Y. Groupe National de travail sur les tanins œnologiques: Premiers résultats. *Revue Française d'Oenologie* **2002**, 196, 23-26.
- Lesschaeve, I.; Noble, A. C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, 81, 330S-335S.
- Liao, H.; Cai, Y.; Haslam, E. Polyphenol interactions. Anthocyanins-Copigmentation and colour changes in red wines. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, 59, 299-330.
- Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* **1983**, 4, 299-304.
- Llaudy, M.; Canals, R.; Canals, J. M.; Rozes, N.; Arola, L.; Zamora, F. New method for evaluating astringency in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 742-746.
- Lu, Y.; Foo, L. The polyphenol constituents of grape pomace. *Food Chem.* **1999**, 65, 1-8.
- Ma, L.; Cao, T. T.; Kandpal, G.; Warren, L.; Fred Hess, J.; Seabrook, G. R.; Ray, W. J. Genome-Wide Microarray Analysis of the Differential Neuroprotective Effects of Antioxidants in Neuroblastoma Cells Overexpressing the Familial Parkinson's Disease  $\alpha$ -Synuclein A53T Mutation. *Neurochemical Research* **2010**, 35 (1), 130-142.
- Ma, S.; Lee, H.; Liang, Y.; Zhou, F. Astringent mouthfeel as a consequence of lubrication failure. *Angewandte Chemie-International Edition* **2016**, 55, 5793-5797.
- Magalhaes, L. M.; Ramos, I. I.; Reis, S.; Segundo, M. A. Antioxidant profile of commercial oenological tannins determined by multiple chemical assays. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2014**, 20, 72-79.

## INTRODUCCIÓN

- Malacarne, M.; Nardin, T.; Bertoldi, D.; Nicolini, G.; Larcher, R. Verifying the botanical authenticity of commercial tannins through sugars and simple phenols profiles. *Food Chem.* **2016**, 206, 274–283.
- Malien-Auberg, C.; Dangles, O.; Amiot, M. J. Influence of Procyanidins on the color stability of oenin solution. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 59, 3299-3305.
- Mateus, N.; Oliveira, J.; Pissarra, J.; Gonzalez-Paramas, A. M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C.; Silva, A. M. S.; de Freitas, V. A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wine. *Food Chem.* **2006**, 97, 689-695.
- Matthews, M. A.; Anderson, M. M. Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: responses to seasonal water deficits. *Am. J. Enol. Vitic.* **1988**, 39 (4), 313-320.
- Mazza, G.; Brouillard, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry* **1990**, 50, 901-904.
- Mazza, G.; Miniati, E. Anthocyanidins in Fruits, Vegetables, and Grains. Ed. Mazza G and Miniati E., CRS Press, Boca Raton, Florida, USA., 1993.
- McRae, J. M.; Falconer, R. J.; Kennedy, J. A. Thermodynamics of grape and wine tannin interaction with polyproline: Implications for red wine astringency. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 12510–12518.
- Michel, J.; Jourdes, M.; Silva, M. A.; Giordanengo, T.; Mourey, N.; Teissedre, P. Impact of Concentration of Ellagitannins in Oak Wood on Their Levels and Organoleptic Influence in Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 5677–5683.
- Monagas, M.; Bartolomé, B. Anthocyanidins and anthocyanidins-derived compounds. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*. Eds. Moreno Arribas, M. V. and Polo, C. M. Springer, New York, USA., 2009, pp. 114-136.
- Monagas, M.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. Updated Knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2005**, 45, 85-118.
- Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Colomo, B.; Suárez, J. A. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with Vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003a** 51(25), 7402-7409.
- Morata, A.; Gómez-Cordovés, M. C.; Suberviola, J.; Bartolomé, B.; Colomo, B.; Suárez, J. A. Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. *J. Agric. Food Chem.* **2003b**, 51, 4084-4088.

## INTRODUCCIÓN

- Morata, A.; González, C.; Suárez-Lepe, J. A. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape must supplemented with hydroxycinnamic acids. *Int. J. Food Microbiology* **2007**, 116(1), 144-152.
- Navarro, M.; Kontoudakis, N.; Giordanengo, T.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Fort, F.; Canals, J. M.; Zamora, F. Oxygen consumption by oak chips in a model wine solution; influence of the botanical origin, toast level and ellagitannin content. *Food Chem.* **2016a**, 199, 822–827.
- Navarro, N.; Kontoudakis, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Canals, J. M.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Zamora, F. Influence of the botanical origin and toasting level on the ellagitannin content of wines aged in new and used oak barrels. *Food Res. Int.* **2016b**, 87, 197–203.
- Obradovic, D.; Schulz, M; Oatey M. Addition of natural tannins to enhance the quality of red wine. *Australian and New Zealand Grape Grower and Winemaker* **2005**, 493, 52–54.
- Obrique-Slier, E.; Pena-Neira, A.; López-Solis R, Interaction of oenological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are effected by pH. *LWT-Food Sci .Technol.* **2012**, 45, 88-93.
- Obrique-Slíer, E.; Peña-Neira, A.; López-Solis, R.; Ramírez-Escudero, C.; Zamora-Marín F. Phenolic characterization of commercial enological tannins. *Eur. Food Res. Technol.* **2009**, 229, 859–866.
- Oliveira, C. M.; Silva-Ferreira, A. C.; De Freitas, V.; Silva, A. M. S. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res. Int.* **2011**, 44, 1115-1126.
- Ortega-Regules, A.; Maria Ros-García, J.; Belen Bautista-Ortín, A.; Maria López-Roca, J.; Gómez-Plaza, E. Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera* L.): technological implications. *Eur. Food Res. Technol.* **2008a**, 227, 223-231.
- Ortega-Regules, A.; Romero-Cascales, I.; Ros-García, J. M.; Bautista-Ortín, A. B.; López-Roca, J. M.; Fernández-Fernández, J. I.; Gómez-Plaza, E. Anthocyanins and tannins in four grape varieties (*Vitisvinifera* L.). Evolution of their content and extractability. *Oeno One*, **2008b**, 42, 3.
- Ortega-Regules, A.; Romero-Cascales, I.; Ros-García, J.M.; Lopez-Roca, J.M.; Gómez-Plaza, E. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 563, 26-32.
- Otto, A. Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection. *Zeitschrift für Physik* **1968**, 216, 398-410.

## INTRODUCCIÓN

- Parpinello, G. P.; Versari, A.; Chinnici, F.; Galassi, S. Relationship among sensory descriptors, consumer preference and color parameters of Italian Novello red wines. *Food Res. Int.* **2009**, 42, 1389–1395.
- Pascal, C.; Poncet-Legrand, C.; Cabane, B.; Vernhet, A. Aggregation of a prolinerich protein induced by epigallocatechin gallate and condensed tannins: Effect of protein glycosylation. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 6724–6732.
- Pascual, O.; González-Royo, E.; Gil, M.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Canals, J. M.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Zamora, F. Influence of Grape Seeds and Stems on Wine Composition and Astringency. *J. Agric. Food Chem.* **2016a**, 64, 6555-6566.
- Pascual, O.; Ortiz, J.; Roel, M.; Kontoudakis, N.; Gil, M.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Canals, J. M.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Zamora, F.; Influence of grape maturity and prefermentative cluster treatment of the Grenache cultivar on wine composition and quality. *Oeno One* **2016b**, 50(4), 169-181.
- Pascual, O.; Vignault, A.; Gombau, J.; Navarro, M.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Canals, J. M.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Teissedre, P. I.; Zamora, F. Oxygen consumption rates by different oenological tannins in a model wine solution. *Food Chem.* **2017**, 234, 26-32.
- Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A. C. Bitterness and astringency of flavan-3-ols monomers, dimmers and trimers. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 1123-1128.
- Pérez-Navarro, J.; García-Romero, E.; Gómez-Alonso, S.; Izquierdo-Cañas, P. M. Comparison between the phenolic composition of Petit Verdot wines elaborated at different maceration/fermentation temperatures. *Int. J. Food Prop.* **2018**, 21(1), 996-1007.
- Pérez-Navarro, J.; Izquierdo-Cañas, P. M.; Mena-Morales, A.; Martínez-Gascueña, J.; Chacón-Vozmediano, J. L.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I.; Gómez-Alonso, S.; Phenolic compounds profile of different berry parts from novel *Vitis vinifera* L. red grape genotypes and Tempranillo using HPLC-DAD-ESI-MS/MS: A varietal differentiation tool. *Food Chem.* **2019**, 295, 350-360.
- Petrie, P.R.; Trought, M.C.T.; Howell, G.S. Fruit composition and ripening of Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) in relation to leaf area. *Austr. J. Grape Wine Res.* **2000**, 6, 46-51.
- Peynaud, E.; Blouin, J. Le goût du vin: Le grand livre de la dégustation. Paris, France: DUNOD. 1980.
- Pinelo, M.; Arnous, A.; Meyer, A. S. Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends Food Sci. Technol.* **2006**, 17, 579-590.

## INTRODUCCIÓN

- Piretti M. V.; Guedini M.; Serrazanetti G. P. Isolation and identification of the polyphenolic and terpenoid constituents of *Vitis vinifera* V. trebbiano Variety. *Ann. Chim. (Rome)* **1976**, 66, 429-437.
- Pontallier, P. The intervention of oak wood in the making of great red wines. *J. Wine Res.* **1992**, 3, 241-247.
- Possner, D. R. E.; Kliewer, W. M. The Localization of Acids, Sugars, Potassium and Calcium in Developing Grape Berries. *Vitis* **1985**, 24, 229-240.
- Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **1994**, 36(3), 781-784.
- Prinz, J. F. ; Lucas, P. W. Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation* **2000**, 27, 991-994.
- Quideau, S.; Varadinova, T.; Karagiozova, D.; Jourdes, M.; Pardon, P.; Baudry, C.; Genova, P.; Diakov, T.; Petrova, R. Main structural and stereochemical aspects of the antiherpetic activity of nonhydroxyterphenoyl-containing C-glycosidic ellagitannins. *Chemistry & Biodiversity* **2004**, 1, 247-258.
- Quijada-Morín, N.; García-Estévez, I.; Nogales-Bueno, J.; Rodríguez-Pulido, F. J.; Heredia, F. J.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M. T.; Hernández-Hierro, J. M. Trying to set up the flavanolic phases during grape seed ripening: A spectral and chemical approach. *Talanta* **2016**, 160, 556-561.
- Rafaela, J.; Guerreiro, L.; De Freitas, V.; Sutherland, D. S.; Goreti, M.; Sales, F. SPR based studies for pentagalloyl glucose binding to  $\alpha$ -amylase. *Procedia Engineering* **2012**, 47, 498-501.
- Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donèche, B.; Lonvaud, A. The Microbiology of Wine and Vinifications. Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. The chemistry of wine stabilization and treatments. In P. Ribéreau-Gayon (Ed.), Handbook of enology. Eds.; John Wiley and Sons, LTD: Chinchester, UK; 2006: Vol.1 & Vol.2.
- Ribereau-Gayon, R. Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de *Vitis vinifera*. *Comptes Rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* **1965**, 260, 341-343.
- Río-Segade, S.; Orriols, I.; Gerbi, V.; Rolle, L. Phenolic characterization of thirteen red grape cultivar from Galicia by anthocyanin profile and flavanol composition. *J. Int. Sci. Vigne Vin.* **2009**, 43, 189-198.

## INTRODUCCIÓN

- Rodríguez-Montealegre, R.; Romero-Peces, R.; Chacon-Vozmediano, J. L.; Gascueña, J. M.; García-Romero, E. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Composition and Analysis* **2006**, *19*, 687-693.
- Romero-Cascales, I.; Ortega-Regules, A.; López-Roca, J. M; Fernández, J.; Gómez-Plaza, E. Differences in Anthocyanin Extractability from Grapes to Wines According to Variety. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*(3), 212-219.
- Roson, J .P.; Moutounet, M. Quantités d'anthocyanes en des tannins des raisins de quelques cépages du Sud-Ouest en 1988 et 1989. *Oenologi* **1992**, *155*, 17-24.
- Roubelakis-Angelakis, K. A.; Kliewer, W. M. Effects et exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries, *Am. J. Enol. Vitic.* **1986**, *37*, 17-24.
- Ryan, J. M.; Revilla, E. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 3372-3378.
- Sacchi, K. L.; Bisson, L. F.; Adams, D. O. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 197-206.
- Salas, E.; Fulcrand, H.; Meudec, E.; Cheynier, V. Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7951-7961.
- Santos-Buelga, C.; Bravo-Haro, S.; Rivas-Gonzalo J. C Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in model solutions. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* **1995a**, *201*(3), 269-274.
- Santos-Buelga, C.; De Freitas, V. Influence of phenolics on wine organoleptic properties. In M.V. Moreno-Arribas and M.C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* New York, NY, USA: Springer. 2009, pp. 529-570.
- Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E.M.; Escribano-Bailón, M.T. Comparative Flavan-3-ol Composition of Seeds from Different Grape Varieties. *Food Chem.* **1995b**, *53*, 197-201.
- Sarid, D.; Challener, W. *Modern Introduction to Surface Plasmons*. Cambridge, Reino Unido: Cambridge University Press, 2010.
- Sarni-Manchado, P.; Deleris, A.; Avallone, S.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by protein used as fining agent in enology. *Am. J. Enol. Vitic.* **1999**, *50*, 81-86.

## INTRODUCCIÓN

- Savouret, J.F.; Quesne, M. Resveratrol and cancer: a review. *Biomed. Pharmacother.* **2002**, 56, 84-87.
- Schwarz, B.; Hofmann, T. Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, 227, 1693–1698.
- Schwarz, M.; Wabnitz T. C.; Winterhalter P. Pathway leading to the formation of anthocyanin vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *J. Agri. Food Chem.* **2003**, 51, 3682–3687.
- Scudamore-Smith, P.D.; Hooper, R.L.; McLaran, E. D. Color and Phenolic Changes of Cabernet Sauvignon Wine Made by Simultaneous Yeast/Bacterial Fermentation and Extended Pomace Contact. *Am. J. Enol. Vitic.* **1990**, 41, 57-67.
- Shirley, B. W. Flavanoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Sci. Res.* **1998**, 8, 415-422.
- Simoës-Costa, A. M.; Costa-Sobral, M. M.; Delgadillo, I.; Cerdeira, A.; Rudnitskaya, A. Astringency quantification in wine: Comparison of the electronic tongue and FT-MIR spectroscopy. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2015**, 207, 1095–1103.
- Singleton, V. L. Oxygen with phenols and related reactions in must, wines and model systems: observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, 38, 69-76.
- Souquet, J. M.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* **1996**, 43, 509-512.
- Souquet, J. M.; Labarbe, B.; Le Guenervé, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Phenolic composition of grape stems. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1076-1080.
- Su, C. T.; Singleton, V. L. Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry* **1969**, 8, 1553-1558.
- Sun, B.; de Sa, M.; Leandro, C.; Caldeira, I.; Duarte, F.L.; Spranger, I. Reactivity of Polymeric Proanthocyanidins toward Salivary Proteins and Their Contribution to Young Red Wine Astringency. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61, 939-946.
- Terrier, N.; Poncet-Legrand, C; Cheynier, V. Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. In: Wine Chemistry and Biochemistry. Eds. Moreno-Arribas, M. V. and Polo, C. M. Springer, NY, USA. 2009, pp. 463-507.
- Thorngate, J. H.; Singleton, V. L. Localization of Procyanidins in Grape Seeds. *Am. J. Enol. Vitic.* **1994**, 45, 259-262.
- Timberlake, C. F.; Bridle, P. The effect of processing and other factors on the colour characteristics of some red wines. *Vitis* **1976**, 15, 37-49.

## INTRODUCCIÓN

- Trousdale, E. K.; Singleton, V. L; Astilbin and engeletin in grape and wine. *Phytochemistry* **1983**, 22(2), 619-620.
- Turbadar, T. T. Complete Absorption of Light by Thin Metal Films. *Proceedings of the Physical Society* **1959**, 73, 40-44.
- Umbarger, H. E. Amino acid and biosynthesis and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 533-606.
- Valentova, H.; Skrvánková, S.; Panovská, Z.; Pokorný, J. Time-intensity studies of astringency taste. *Food Chem.* **2002**, 78, 29–37.
- Van Nieuw Amerongen, A.; Bolscher, J. G. M.; Veerman, E. C. I. Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? *Caries Research* **2004**, 38, 247–253.
- Versari, A.; du Toit, W.; Parpinello, G. P. Oenological tannins: a review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2013**, 19, 1–10.
- Vidal, S.; Cartalade, D.; Souquet, J. M.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. Changes in a proanthocyanidin chain length in winelike model solution. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 2261-2266.
- Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E.J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.* **2003**, 83, 564-573.
- Vignault, A.; Gombau, J.; Pascual, O.; Jourdes, M.; Moine, V.; Canals, J. M.; Zamora, F.; Teissedre P. L. Copigmentation of malvidin-3-O-monoglucoside by oenological tannins: Incidence on wine model color in function of botanical origin, pH and ethanol content. *Molecules* **2019a**, 24, 1448.
- Vignault, A.; González-Centenoa, M. R.; Pascual, O.; Gombau, J.; Jourdes, M.; Moine, V.; Iturmendi, N.; Canals, J. M.; Zamora, F.; Teissedre, P. L. Chemical characterization, antioxidant properties and oxygen consumption rate of 36 commercial oenological tannins in a model wine solution. *Food Chem.* **2018**, 268, 210-219.
- Vignault, A.; Pascual, O.; Jourdes, M.; Moine, V.; Fermaud, M.; Roudet, J.; Canals, J. M.; Teissedre, P. L.; Zamora, F. Impact of enological tannins on laccase activity. *Oeno One* **2019b**, 53, 1.
- Vivas, N. (1997) Recherches sur la qualité de chêne français de tonnellerie et sur les mécanismes d'oxidoréduction des vins rouges au cours de leur élevage en barriques. Tesis Doctoraal. Universidad de Boudeos II.



## INTRODUCCIÓN

- Vivas, N. Manuel de Tonnellerie à l'usage des utilisateurs de futailles. Feret Ed., Burdeos. 1998.
- Vivas, N. Les tanins oenologiques, d'hier à aujourd'hui: Une révolution discrète que nous devons assimiler dans les pratiques de chais. *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques* **2001**, 28(98), 11–14.
- Wang, S. P.; Huang, K. J. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatography: A.* **2004**, 1032, 273-279.
- WatreLOT, A. A.; Schulz, D. L.; Kennedy J, A. Wine polysaccharides influence tannin-protein interactions. *Food Hydrocol.* **2017**, 63, 571-579
- WatreLOT, A. A.; Tran, D. T.; Buffeteau, T.; Deffieux, D.; Le Bourvellec, C.; Quideau, S.; Renard, C. Immobilization of flavan-3-ols onto sensor chips to study their interactions with proteins and pectins by SPR. *Applied Surface Science*, **2016**, 371, 512–518.
- Wood, R. W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **1902**, 21, 396-402.
- Yokotsuka, K.; Sato, M.; Ueno, N.; Singleton, V.L. Colour and Sensory Characteristics of Merlot Red Wines Caused by Prolonged Pomace Contact. *J. Wine Res.* **2000**, 11, 7-18.
- Zamora, F. Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. AMV & Mundi-Prensa: Madrid, 2003.
- Zamora, F.; Luengo, G.; Margalef, P.; Magrina, M.; Arola, L. Effect of drawing off on color and phenolic-compounds composition of red wine. *Rev. Esp. Cien. Tec. Ali.* **1994**, 34, 663-671.
- Zamora, F. Biochemistry of Alcoholic Fermentation. In “Wine Chemistry and Biochemistry”. Ed. M.V. Moreno-Arribas & M.C. Polo. Springer, New York, USA. 2009. pp 3-26.

## INTRODUCCIÓN

# HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Los taninos del vino tinto son determinantes de su calidad ya que ejercen una gran influencia sobre el color, la astringencia, el cuerpo, su capacidad para el envejecimiento y en general la textura del vino. De forma tradicional los taninos del vino proceden de forma natural de las bayas, liberándose de las semillas y las pieles durante la vinificación. No obstante, la crianza del vino en barricas de roble, la suplementación con alternativos de roble o incluso la suplementación del vino con taninos enológicos comerciales implica que el vino se enriquezca en taninos de diversa composición y origen botánico.

Dado que el uso de taninos enológicos del vino se ha convertido en una práctica muy habitual en el sector enológico, nos planteamos la siguiente hipótesis:

**“La morfología de la baya, especialmente la proporción en peso de semilla, determina en gran medida la concentración de taninos del vino tinto y consecuentemente su astringencia. Asimismo, la suplementación del vino tinto con taninos enológicos comerciales ejerce una influencia sobre la astringencia, sobre el color, ya que los taninos pueden actuar como copigmentos, y sobre su estabilización, ya que pueden combinarse con los antocianos para formar nuevos pigmentos”**

A partir de esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto de la proporción en peso de semillas de la baya sobre la composición fenólica y astringencia del vino tinto.
2. Determinar el efecto de la suplementación con taninos enológicos comerciales de diferente origen botánico sobre el color y su estabilización, analizando especialmente su posible efecto como copigmentos.
3. Estudiar las interacciones tanino-mucina mediante la aplicación de la resonancia de plasmones superficiales (Surface Plasmon Resonance – SPR) y su relación con la astringencia.



# RESULTADOS

---





## RESULTADOS: Capítulo 1

### **CAPÍTULO 1: Infuencia de las semillas de la uva sobre la composición y astringencia de vinos elaborados con las variedades Tempranillo, Garnacha, Merlot y Cabernet Sauvignon**

Los resultados de este capítulo han sido enviados para su publicación en la revista *Food Science & Nutrition*, en el artículo titulado: ***Influence of grape seeds on wine composition and astringency of Tempranillo, Garnacha, Merlot and Cabernet Sauvignon wines.***

**Submitted to** Food Science & Nutrition

**Manuscript ID** FSN3-2020-03-0391

**Title** Influence of grape seeds on wine composition and astringency of Tempranillo, Garnacha, Merlot and Cabernet Sauvignon wines

**Authors** Gombau, Jordi  
Pons-Mercadé, Pere  
Conde, Marta  
Asbiro, Lucie  
Pascual, Olga  
Gomez-Alonso, Sergio  
García-Romero, Esteban  
Canals Bosch, Joan-Miquel  
Hermosin-Gutierrez, Isidro  
Zamora, Fernando

**Date Submitted** 16-Mar-2020

## RESULTADOS: Capítulo 1

## RESULTADOS: Capítulo 1

### **Influence of grape seeds on wine composition and astringency of Tempranillo, Garnacha, Merlot and Cabernet Sauvignon wines.**

Jordi Gombau,<sup>a</sup> Pere Pons-Mercadé,<sup>a</sup> Marta Conde,<sup>a</sup> Lucie Asbiro,<sup>a</sup> Olga Pascual,<sup>a</sup> Sergio Gómez-Alonso,<sup>b</sup> Esteban García-Romero,<sup>c</sup> Joan Miquel Canals,<sup>a</sup> Isidro Herмосín-Gutiérrez,<sup>b</sup> Fernando Zamora<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d' Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, C/Marcel·li Domingo s/n, 43007 Tarragona, Spain.

<sup>b</sup> Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus Universitario s/n, 13071 Ciudad Real, Spain.

<sup>c</sup> Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, Ctra. Toledo-Albacete s/n, 13700 Tomelloso, Ciudad Real, Spain.

#### **ABSTRACT**

**Background:** The aim of this work was to study the influence of grape berry morphology, especially the seed weight percentage, on the tannin concentration and astringency of red wine. Clusters of Tempranillo, Garnacha, Merlot and Cabernet Sauvignon were characterized and their seeds were extracted and macerated in a model wine solution. In parallel, we elaborated three types of wines of each cultivar. One wine was made with only grape juice, one wine was made adding the appropriate proportion of seeds to the grape juice and the last wine was elaborated with the complete destemmed and crushed berries.

**Results:** Merlot and Cabernet sauvignon grapes, which have higher percentage of seed weight with respect to the berry weight than Tempranillo and Garnacha grapes, originated wines with higher tannin concentration and astringency than Tempranillo and Garnacha wines.

**Conclusion:** The main conclusion of this study is that the seed weight percentage with respect to the berry weight is one of the main determinants of the final tannin concentration and astringency of red wines.

**Keywords:** Berry morphology, seeds, proanthocyanidins, astringency.

# RESULTADOS: Capítulo 1

## INTRODUCTION

Phenolic compounds are a large family of molecules that are mainly present in the solid parts of grapes (seed, skin and stems). These compounds are generally considered to be major determinants of the quality of red wines. Most of the main sensory attributes of wine, such as color, body, mouthfeel, bitterness and astringency are associated with their phenolic compound composition.<sup>1</sup>

The color of red wine is mainly due to anthocyanins<sup>2</sup> and is strongly conditioned by pH, the presence of sulfur dioxide and the copigmentation phenomena. Anthocyanins in turn can react with other molecules, especially flavanols (flavan-3-ol monomers and proanthocyanidins), to produce new and more stable pigments.<sup>3,4</sup> In addition, cycloaddition reactions between anthocyanins and other small molecules can produce a new family of anthocyanin-derived pigments called pyranoanthocyanins.<sup>5,6</sup> Other phenolic compounds, such as phenolic acids, flavonols and flavanols, can also greatly influence wine color because they act as copigments.<sup>7</sup>

Flavanols (which include flavan-3-ol monomers and proanthocyanidins) are the main determinants of the astringency and bitterness perception in red wine.<sup>8</sup> It has been described that the higher the mDP and higher the proportion of (-)-epicatechin-3-*O*-gallate of the proanthocyanidins the greater the astringency perception.<sup>9,10</sup> It is generally accepted that seed proanthocyanidins are more astringent than skin proanthocyanidins because they have a higher proportion of epicatechin-3-*O*-gallate. In contrast, flavanol-3-ols monomers and proanthocyanidins with lower mDP seem to enhance bitterness perception.<sup>8</sup>

Anthocyanins are released from grape skins whereas proanthocyanidins, also called condensed tannins, are released from skins and seeds during the fermentation/maceration process. However, the chemical composition of the proanthocyanidins from seeds and skins is not identical. Grape-seed proanthocyanidins are polymers composed of (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-gallate.<sup>11</sup> Grape-Skin proanthocyanidins are composed of the same monomers but also contain (-)-epigallocatechin, and the proportion of (-)-epicatechin-3-gallate is much lower.<sup>12</sup> Consequently grape-skin tannins are composed of procyanidins and prodelphinidins because their acidic cleavage gives cyanidin and delphinidin, whereas grape-seed tannins are composed only of procyanidins. In addition, seed proanthocyanidins have a lower degree of polymerization (mDP) than skin proanthocyanidins.<sup>11</sup> Consequently, grape-skins release procyanidins and prodelphinidins with a higher mDP, whereas grape-seeds only release procyanidins with a higher proportion of galloylation and a lower mDP.

The composition of phenolic compounds and consequently the quality of red wine depends on several factors, including, the cultivar,<sup>13</sup> grape maturity,<sup>14</sup> ethanol

## RESULTADOS: Capítulo 1

content,<sup>15</sup> fermentation temperature,<sup>16</sup> maceration length<sup>14</sup> and the winemaking techniques applied.<sup>17,18,19</sup> However, the grape variety used to obtain the wine is probably one of the main factors affecting the composition of phenolic compounds in the wine. In that sense, the morphology of bunches and grapes, which depends largely on the grape cultivar, should play a very important role in the final wine composition. The weight of the bunches, the proportion of the grape weight regardless of the bunch weight, the grape size (weight and volume), and the proportion of seeds regardless of the grape weight, have a great influence on the final red wine composition. All these parameters are mainly conditioned by the grape cultivar. Other external factors such as the composition and fertility of the soils, the height of the vineyard, the climatic conditions of the vintage (water availability, sunlight exposure and temperature), and viticulture practices can also influence these parameters but to a lesser extent than the genotypic characteristics.

In a relatively recent article, Gil et al.<sup>20</sup> reported that the berry size greatly influences the color and composition of phenolic compounds of Cabernet Sauvignon wines. Specifically, the smaller the berry size the more intense the color and the higher the concentration of anthocyanins and proanthocyanidins. Moreover, Gil et al.<sup>20</sup> reported that the wines obtained from small berries have a higher proportion of prodelfphinidins and lower proportion of galloylated subunits than wines obtained with larger berries. These data suggest that small berries have a higher proportion of skin proanthocyanidins and a lower proportion of seed proanthocyanidins than large berries because prodelfphinidins are only present in skins, and seed proanthocyanidins are richer in galloylated subunits. In fact, these data can be considered as very logical since the smaller berries have a higher skin-to-flesh ratio<sup>21</sup> and usually also have a lower number of seeds.<sup>22,23</sup>

It is generally considered that not-well-ripened grapes may produce more astringent and bitter wines because their seeds can release a larger amount of proanthocyanidins, which are highly galloylated.<sup>14</sup> Therefore, winemakers usually consider the phenolic maturity of the grapes, and especially of the grapes seeds, as a major parameter for deciding the harvest date. Some approaches have even been proposed to eliminate seeds during the winemaking process when the grape-seeds are not well lignified.<sup>17,18</sup>

The objective of this research was to study the relationship between the morphology of bunches and grapes, especially the seed-to-flesh ratio, of four different red *Vitis vinifera* cultivars (Tempranillo, Garnacha, Merlot and Cabernet Sauvignon) with similar maturity levels and the final composition and astringency of the wines obtained with these grapes.

## RESULTADOS: Capítulo 1

### MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Methanol, formic acid, and acetic acid were of HPLC grade and were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Acetaldehyde, phloroglucinol, sodium acetate, ammonium acetate, sodium hydroxide, tannic acid, methylcellulose, albumin from chicken egg, ascorbic acid, and ammonium formate were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Absolute ethanol and hydrochloric acid were purchased from Panreac. Malvidin-3-O-glucoside chloride (95%), (-)-epicatechin (99%) were purchased from Extrasynthese (Genay, France).

**Grapes and wines.** The experiment was carried out with *Vitis vinifera* cv. grapes of Tempranillo Tinto (Variety Number VIVC: 12350<sup>24</sup>) and Garnacha Tinta (Variety Number VIVC: 4461<sup>24</sup>) from the Cal Bessó estates at *Els Guiamets* (AOC Montsant, Tarragona, Spain; 41°6' 15.2893" (N) and 0°45'47.9652" (E); at a height of 230 m above sea level) and Merlot Noir (Variety Number VIVC: 7657<sup>24</sup>) and Cabernet Sauvignon (Variety Number VIVC: 1929<sup>24</sup>) from the Juvé & Camps estates at *Mediona* (AOC Penedès, Barcelona, Spain; 41°31' 30.1080" (N) and 1°42'47.4516" (E); at a height of 590 m above sea level). The grapes were harvested manually when they had reached the appropriate maturity to obtain high quality red wines (between 23.5 and 24.5 °Brix). One hundred kg of grapes of each cultivar were harvested.

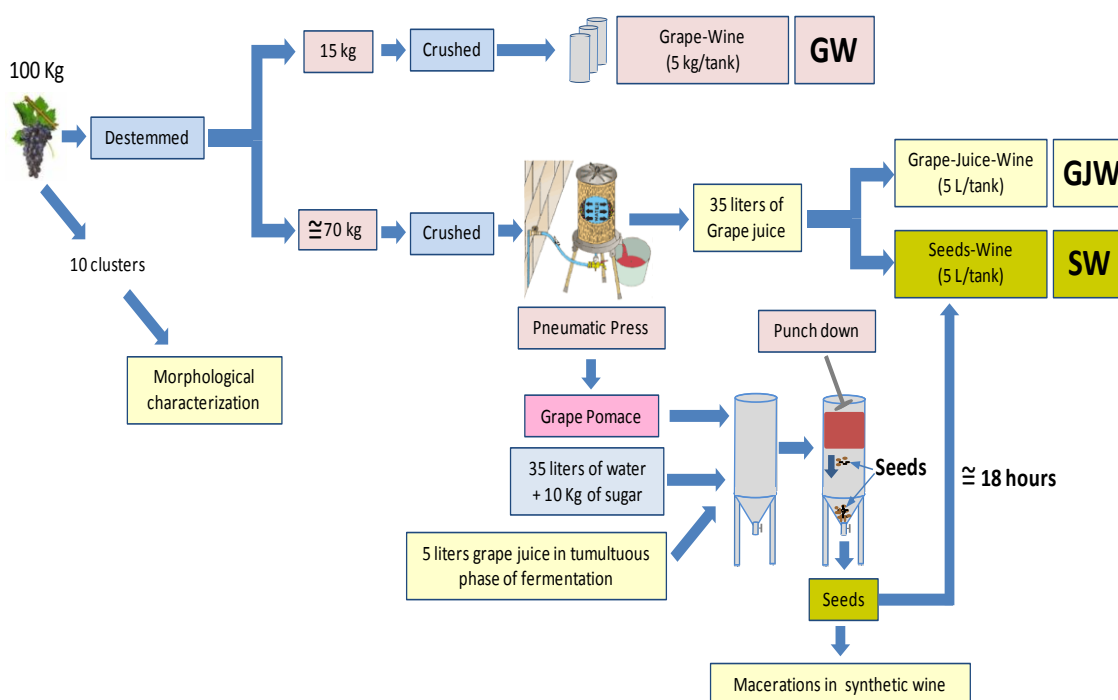
**Morphologic characterization of the grape clusters.** Ten clusters were used for the morphologic characterization. Specifically, the following parameters were determined: cluster weight (CW), stem weight of a cluster (SCW), the weight of all the berries in a cluster (BCW), the percentage of stem weight with respect to cluster weight (%SC), the percentage of berry weight with respect to cluster weight (%BC) and the number of berries per cluster (NBC). The weight (100BW) and volume (100BV) of 100 berries were also measured in triplicate. The seeds of 100 berries were then extracted and used for determining in triplicate the number of seeds per berry (NSB) and the weight of 100 seeds (100SW). These data were used to calculate the percentage of seed weight with respect to berry weight (%SB).

**Microvinifications.** Figure 1 shows a schematic diagram of the experimental design. 100 kg of clusters of each variety were carefully destemmed (Delta V2, Bucher Vaslin SA, Chalonnès sur Loire, France) without affecting the integrity of the berries. First, 15 kg of destemmed berries were grouped into three batches of 5 kg of berries that were immediately crushed, sulfited (100 mg of K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/kg) and placed in three fermentation tanks for conventional microvinifications in triplicate (Grape-Wine; GW). Second, 70 kg of destemmed grapes were crushed and immediately pressed in a pneumatic press. Around 35 liters of grape juice were extracted and sulfited (100 mg of K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/kg). Six batches of 5 liters of this grape juice were poured into 6 fermentation tanks. Three of them were fermented to obtain a wine originated only from the grape juice without the presence of any other part of the cluster (Grape-Juice-Wine; GJW). The other three

## RESULTADOS: Capítulo 1

batches were supplemented with the adequate proportion of seeds (%SB) that had been determined previously (Seed-Wine; SW).

All tanks were immediately inoculated with 200 mg/kg selected yeast (EC1118, Lallemand Inc., Montreal, Canada). All tanks were kept at  $27 \pm 1$  °C. After 14 days of maceration, the wines from the tanks were racked. All wines were sulfited (100 mg  $K_2S_2O_5/L$ ) and kept at 4 °C for 1 month for tartaric stabilization. Malolactic fermentation was therefore inhibited so as to prevent it from causing any variations. The wines were finally bottled and stored in a dark cellar at 15 °C until analysis. The wines were analyzed between 3 and 6 months after bottling.



**Figure 1: Experimental design.**

**Seeds isolation.** The remaining pomace obtained in the pressing process was placed in a conical bottom tank with an extraction tap just at the apex of the cone. This tank was immediately supplemented with 35 liters of water, 10 kg of commercial sucrose and 5 liters of white grape juice in the tumultuous fermentation step to induce the rapid beginning of alcoholic fermentation. A few hours later, when the cap was already formed, several manual punch downs were vigorously performed so the seeds would fall to the bottom of the tank. This process was repeated 5 times during the day. The following morning, around 18 hours later, the extraction tap was opened and the seeds were taken out using a colander. This was done as quickly as possible to minimize the extraction of phenolic compounds from the seeds. The seeds were then

## RESULTADOS: Capítulo 1

washed in cold water (4 °C) and the small proportion of skins was manually separated. The seeds were then dried using a hair dryer until their weight was stable.

**Seeds maceration.** A volume of 240 mL of a model wine solution (ethanol 13.5% v/v, tartaric acid 4.0 g/L adjusted at pH 3.50 with sodium hydroxide) was used to macerate the seeds of each cultivar. The seed weight was calculated using the percentage of seed weight with respect to the berry weight (%SB) considering that the theoretical volume of the grape juice was 80% of the grape berry weight for all cultivars. Macerations were performed in triplicate in closed dark flasks of 250 mL at 27 °C. After 15 days of maceration, the seeds were separated and the wine model solution was centrifuged (5 minutes at 8,500 rpm). The macerated solutions were stocked at 4 °C until analysis.

**Standard grape juice analysis.** The analytical methods recommended by the International Organization of Vine and Wine (OIV, 2014)<sup>25</sup> were used to determine the sugar concentration expressed as BRIX, the potential ethanol content (% v/v), titratable acidity and pH of the grape juice. These measurements were taken in triplicate using the grape berries obtained by manually destemming the clusters used for morphological characterization of the clusters.

**Standard wine analysis.** The ethanol content, titratable acidity and pH of wines were determined by the methods recommended by OIV (OIV, 2014).<sup>25</sup> The total polyphenol index (TPI) was determined by measuring the 280 nm absorbance of a 1:100 wine dilution, with a spectrometer, using a 10 mm quartz cuvette according to Ribéreau-Gayon et al.<sup>26</sup> The total anthocyanin content was determined by spectrophotometry using the method described by Niketic-Aleksic et al.<sup>27</sup> The total tannin content was determined by methyl cellulose method described by Sarneckis et al.<sup>28</sup>

**Color parameters.** The color intensity (CI) was determined by the method described by Glories et al.<sup>29</sup> The CIEL\*a\*b\* coordinates were determined by the method described by Ayala et al.<sup>30</sup>

**Anthocyanin analysis by HPLC.** Reversed-phase HPLC analyses of the anthocyanidins were carried out by injecting 40 µL of wine into an Agilent 1200 series liquid chromatograph (HPLC-DAD) and using an Agilent Zorbax Eclipse XDBC18, 4.6 × 250 mm, 5 µm column (Agilent Technologies). The solvents used were 10% aqueous formic acid (solvent A) and a mixture of 45% methanol, 45% water, and 10% formic acid (solvent B) in accordance with the method described by Gil et al.<sup>20</sup> Chromatograms were recorded at 530 nm, and anthocyanin standard curves were made using malvidin-3-*O*-glucoside chloride. Compounds were identified by recording their UV spectra with the diode array detector and comparing these with the UV spectra reported in the literature.



## RESULTADOS: Capítulo 1

**Analysis of proanthocyanidins following acid catalysis with phloroglucinol.** Acid-catalyzed depolymerization of proanthocyanidins in the presence of an excess of phloroglucinol was used to analyze the content of proanthocyanidins, their monomeric composition, and their mean degree of polymerization (mDP), as described by Kennedy and Jones.<sup>31</sup> A 10 mL sample of wine was evaporated under a low-pressure vacuum (Univapo 100 ECH, Uni Equip, Germany). It was subsequently resuspended in 6 mL of distilled water and then applied to Set Pak Plus tC18 Environmental cartridges (Waters, Milford, MA, USA) that had previously been activated with 10 mL of methanol and 15 mL of water. The samples were washed with 15 mL of distilled water. The proanthocyanidins were then eluted with 12 mL of methanol, immediately evaporated under a vacuum, and re-dissolved in 2 mL of methanol. Finally, 100  $\mu$ L of this sample was reacted with a 100  $\mu$ L phloroglucinol solution (0.2 N HCl in methanol, containing 100 g/L phloroglucinol and 20 g/L ascorbic acid) at 50 °C for 20 min. The reaction was stopped by adding 1000 mL of 40 mM aqueous sodium acetate. Reversed-phase HPLC analysis (Agilent series 1200 HPLC-DAD) was carried out with an Agilent Zorbax Eclipse XDBC18, 4.6  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m column (Agilent Technologies) as described below, and the injection volume was 30  $\mu$ L. The solvents used were 1% aqueous acetic acid (solvent A) and methanol (solvent B) at a flow rate of 1 mL/min. The elution conditions were 1.0 mL/min. Elution was performed with a gradient starting at 5% B for 10 min, a linear gradient from 5 to 20% B in 20 min, and a linear gradient from 20 to 40% B in 25 min. The column was then washed with 90% B for 10 min and re-equilibrated with 5% B for 5 min before the next injection. The monomers (+)-catechin, (-)-epicatechin, and (-)-epicatechin-3-O-gallate were identified by comparing their retention times with those of the pure compounds. The phloroglucinol adducts of (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, and (-)-epicatechin-3-O-gallate were identified by their retention time (described in the literature) and confirmed through an HPLC-MS analysis.

This assay was also carried out without adding phloroglucinol to measure the flavan-3-ol monomers that are naturally present in wine. The number of terminal subunits was considered to be the difference between the total monomers measured in normal conditions (with phloroglucinol and acid) and the monomers measured when the analysis was performed without adding phloroglucinol and acid. The number of extension subunits was considered as the addition of all the phloroglucinol adducts. The mDP was calculated by adding the terminal and extension subunits (in moles) and dividing by the terminal subunits. The percentage of galloylation (%GAL) was calculated considering the molar percentage of the monomer (-)-epicatechin-3-O-gallate. The percentage of prodelphinidins (%PD) was calculated considering the molar percentage of the monomer (-)-epigallocatechin. This last parameter was only measured in the GW since prodelphinidins are only present in the skins.<sup>12</sup>

## RESULTADOS: Capítulo 1

**Astringency Index.** The astringency of the wines and the model wine solutions were determined by the Astringency Index method described by LLaudy et al.<sup>32</sup>

**Statistical analysis.** All of the chemical and physical data for the samples are expressed as the arithmetic average  $\pm$  standard deviation of three replicates. One-factor univariate analysis of variance (ANOVA) was carried out with the SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

### RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the morphologic characterization of the clusters and berries of each variety. The weights of the Cabernet Sauvignon and Merlot clusters (CW) were significantly lower than those of the Garnacha and Tempranillo clusters. However, in the Tempranillo and Garnacha varieties around 4% of the cluster weight was due to stems (%SC), whereas for Cabernet Sauvignon and Merlot stem weight was around 7%. The percentage of berry weight with respect to cluster weight (%BC) was only slightly, but significantly, higher in Garnacha and Tempranillo than in Merlot and Cabernet Sauvignon. Moreover, the number of berries per cluster (NBC), the weight of all the berries in a cluster (BCW), and the weight (100BW) and the volume (100BV) of 100 berries were the higher for the Tempranillo and Garnacha than for Merlot and Cabernet Sauvignon.

**Table 1: Morphologic characterization of the grape clusters.**

Parameter	Garnacha	Tempranillo	Merlot	Cabernet Sauvignon
<b>CW (g)</b>	298.8 $\pm$ 89.5 <b>B</b>	350.1 $\pm$ 92.6 <b>B</b>	121.3 $\pm$ 39.2 <b>A</b>	128.6 $\pm$ 44.0 <b>A</b>
<b>SCW (g)</b>	11.53 $\pm$ 2.49 <b>A</b>	12.50 $\pm$ 3.92 <b>A</b>	8.14 $\pm$ 2.57 <b>A</b>	9.54 $\pm$ 3.99 <b>A</b>
<b>BCW (g)</b>	286.7 $\pm$ 3.4 <b>C</b>	337.4 $\pm$ 0.3 <b>D</b>	113.1 $\pm$ 3.0 <b>A</b>	119.1 $\pm$ 0.5 <b>B</b>
<b>%BC</b>	95.97 $\pm$ 0.85 <b>B</b>	96.36 $\pm$ 0.22 <b>B</b>	93.19 $\pm$ 1.23 <b>A</b>	92.58 $\pm$ 1.89 <b>A</b>
<b>%SC</b>	4.03 $\pm$ 0.85 <b>A</b>	3.64 $\pm$ 0.31 <b>A</b>	6.81 $\pm$ 1.09 <b>B</b>	7.42 $\pm$ 0.75 <b>B</b>
<b>NBC</b>	173.0 $\pm$ 18.7 <b>C</b>	177.5 $\pm$ 5.1 <b>C</b>	99.4 $\pm$ 16.1 <b>A</b>	122.9 $\pm$ 8.3 <b>B</b>
<b>100BW</b>	165.7 $\pm$ 17.9 <b>B</b>	190.1 $\pm$ 5.4 <b>B</b>	113.8 $\pm$ 18.4 <b>A</b>	96.9 $\pm$ 6.6 <b>A</b>
<b>100BV</b>	151.2 $\pm$ 16.2 <b>B</b>	172.8 $\pm$ 5.2 <b>B</b>	103.4 $\pm$ 16.3 <b>A</b>	88.3 $\pm$ 6.1 <b>A</b>
<b>NSB</b>	1.37 $\pm$ 0.12 <b>A</b>	1.71 $\pm$ 0.12 <b>B</b>	2.07 $\pm$ 0.21 <b>B</b>	1.83 $\pm$ 0.10 <b>B</b>
<b>100SW (g)</b>	2.44 $\pm$ 0.07 <b>A</b>	3.48 $\pm$ 0.41 <b>B</b>	3.58 $\pm$ 0.43 <b>B</b>	3.08 $\pm$ 0.49 <b>B</b>
<b>%SB</b>	2.03 $\pm$ 0.13 <b>A</b>	3.14 $\pm$ 0.40 <b>B</b>	6.53 $\pm$ 1.43 <b>C</b>	5.82 $\pm$ 0.62 <b>C</b>

All data are expressed as the average values  $\pm$  standard deviation. Different letters indicate the existence of statistical differences ( $p < 0.05$ ). CW: cluster weight; SCW: stem weight of a cluster, BCW: weight of all the berries in a cluster; %SC: percentage of stem weight with respect to cluster weight; %BC: percentage of berry weight with respect to cluster weight; NBC: number of berries per cluster; 100BW: weight of 100 berries; 100BV: volume of 100 berries; NSB: number of seeds per berry; 100SW: weight of 100 seeds; %SB: percentage of seed weight with respect to berry weight. 100BW are expressed as g. ; 100 BV are expressed as mL.

## RESULTADOS: Capítulo 1

Table 1 also shows the number of seeds per berry (NSB), the weight of 100 seeds (100SW) and the percentage of seed weight with respect to berry weight (%SB) for each variety. The number of seeds per berry (NSB) and the weight of 100 seeds (100SW) were significantly lower in Garnacha than in the other three cultivars, which had similar values. Therefore, the percentage of seed weight with respect to berry weight (%SB) was the lowest in Garnacha followed in increasing order by Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot, although the difference between these two last cultivars was not statistically significant.

It has been reported that the berry size greatly influences the phenolic composition of Cabernet Sauvignon wines.<sup>20</sup> In brief, the smaller the berry size the higher the anthocyanin and proanthocyanidin concentrations. These data can probably be extrapolated to other cultivars. If this hypothesis is true it would be expected that wines of Garnacha and Tempranillo would have a lower concentration of anthocyanins and proanthocyanidins than wines of Merlot and Cabernet Sauvignon since their berries are significantly bigger than those of these last two cultivars. However, other factors such as the genetic characteristics<sup>13</sup> and the grape maturity<sup>14</sup> also have a major influence on the final amount of anthocyanins and proanthocyanidins and also on their extractability. In addition, the proportion of seeds with respect to grape-juice differs widely between varieties, which may also be determinant of the amount of phenolic compounds released by seeds. Consequently, this could have a non-negligible effect on the color and the final chemical composition of red wine elaborated with each of these varieties.

Table 2 shows the grape juice composition of the wines. The four cultivars were harvested with a total soluble solid content between 23.5 and 24.5 °Brix, which represent a potential ethanol content between 13.6 and 14.4% (v/v).

**Table 2: Grape juice composition of the four cultivars.**

Parameter	Garnacha		Tempranillo		Merlot		Cabernet Sauvignon	
Soluble solids (°Brix)	23.8 ± 0.2	A	23.5 ± 0.1	A	24.5 ± 0.2	B	24.5 ± 0.2	B
Potential ethanol content (% v/v)	13.8 ± 0.1	A	13.6 ± 0.2	A	14.3 ± 0.2	B	14.4 ± 0.1	B
Titrateable acidity (g/L)	5.87 ± 0.23	B	5.96 ± 0.12	B	5.37 ± 0.17	A	5.15 ± 0.21	A
pH	3.04 ± 0.02	A	3.10 ± 0.03	B	3.14 ± 0.02	B	3.35 ± 0.02	C

All data are expressed as the average values of 3 replicates ± standard deviation. Different letters indicate the existence of statistical differences ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS: Capítulo 1

The titratable acidity of the four varieties was between 5.15 and 5.96 g/L (expressed as tartaric acid) and the pH was between 3.04 and 3.35. In general, these parameters indicate that the maturity level of the different grape cultivars was similar and adequate for the elaboration of quality red wines, although some small but sometimes significant differences were found.

**Table 3: Wine general parameters.**

Parameter		Garnacha		Tempranillo		Merlot		Cabernet Sauvignon	
Ethanol Content (%)	GW	14.0 ± 0.2	A α	13.9 ± 0.1	A α	14.5 ± 0.1	B α	14.5 ± 0.1	B α
	GJW	13.8 ± 0.1	A α	13.6 ± 0.1	A α	14.7 ± 0.1	B α	14.7 ± 0.1	B α
	SW	13.7 ± 0.1	A α	13.7 ± 0.1	A α	14.5 ± 0.1	B α	14.4 ± 0.2	B α
Titratable acidity (g/L)	GW	6.05 ± 0.03	D α	5.88 ± 0.04	C α	5.63 ± 0.07	B α	5.25 ± 0.05	A α
	GJW	6.25 ± 0.05	D β	6.00 ± 0.05	C β	5.40 ± 0.10	B α	5.25 ± 0.05	A α
	SW	6.30 ± 0.05	C β	6.03 ± 0.06	B β	5.50 ± 0.15	A α	5.30 ± 0.06	A α
pH	GW	3.15 ± 0.01	A β	3.41 ± 0.01	C β	3.37 ± 0.01	B β	3.76 ± 0.02	D β
	GJW	3.05 ± 0.01	A α	3.11 ± 0.02	B α	3.16 ± 0.03	B α	3.42 ± 0.03	C α
	SW	3.04 ± 0.02	A α	3.09 ± 0.02	A α	3.18 ± 0.01	B α	3.45 ± 0.01	C α

All data are expressed as the average values of 3 replicates ± standard deviation. Different capital letters indicate the existence of statistical differences between the different varieties and Greek letters indicate the existence of statistical differences between the different wines ( $p < 0.05$ ). GW: Grape wine; GJW: Grape juice wine; SW: Seed wine.

Table 3 shows the general parameters of the different wines obtained from the four varieties. As explained above, three different wines were obtained for each variety depending on whether the whole crushed grapes were macerated and fermented (Grape wine; GW), only the grape juice was fermented (Grape juice wine; GJW) or the grape juice was macerated and fermented with the appropriate proportion of seeds (Seed wine; SW). The ethanol content of the different wines was between 13.7 and 14.0% (v/v) in the case of Garnacha, between 13.6 and 13.9% in the case of Tempranillo, between 14.5 and 14.7% in the case of Merlot and between 14.4 and 14.7% in the case of Cabernet Sauvignon. In all the cases these ethanol content levels were similar between the different winemaking types for each variety and also very similar to the potential ethanol content of the corresponding grapes (Table 2). Titratable acidity was between 6.05 and 6.30 g/L for Garnacha, between 5.88 and 6.03 g/L for Tempranillo, between 5.45 and 5.63 g/L for Merlot and between 5.25 and 5.30 g/L for Cabernet Sauvignon. Once again these values are similar to values obtained in their corresponding grapes. However, titratable acidity seems to be significantly lower when the skins are present in the fermentation media for Garnacha and Tempranillo. The pH values were between 3.04 and 3.15 for Garnacha, between 3.09 and 3.41 for Tempranillo, between 3.18 and 3.37 for Merlot, and between 3.45 and 3.76 for Cabernet Sauvignon. The pH values of GJW and SW wines were similar to those of their

## RESULTADOS: Capítulo 1

corresponding grapes (Table 2). However, the pH of GW wine was significantly higher than in GJW and SW wines in all the varieties. The decrease in the titratable acidity of Garnacha and Tempranillo wines and the increase in pH of all cultivars observed in the GW wines is probably related to the release of potassium from the skins.<sup>33</sup>

Table 4 shows the phenolic compounds of the model wine solutions obtained by maceration of the seeds of each variety. Evidently, these maceration conditions do not reproduce exactly what happens during alcoholic fermentation where ethanol is produced progressively; however, it provides an approximate idea of the releasing capacity of the seeds of each variety under the same media conditions.

**Table 4: Total polyphenol index, tannin concentration, proanthocyanidin concentration and astringency index of the different seed maceration samples.**

Parameter	Garnacha	Tempranillo	Merlot	Cabernet Sauvignon	
IPT	18.3 ± 0.7 <b>A</b>	16.9 ± 0.8 <b>A</b>	69.4 ± 3.8 <b>C</b>	54.2 ± 0.9 <b>B</b>	
Tannins	(g/L)	0.93 ± 0.10 <b>A</b>	1.00 ± 0.16 <b>A</b>	4.68 ± 0.32 <b>C</b>	3.54 ± 0.24 <b>B</b>
	(mg/g of seeds)	45.8 ± 4.9 <b>B</b>	31.8 ± 5.0 <b>A</b>	71.7 ± 5.0 <b>D</b>	60.8 ± 4.1 <b>C</b>
Proanthocyanidins	Concentration (mg/L)	464 ± 28 <b>A</b>	451 ± 55 <b>A</b>	1503 ± 82 <b>C</b>	1144 ± 120 <b>B</b>
	mDP	3.9 ± 0.3 <b>A</b>	4.0 ± 0.2 <b>A</b>	4.2 ± 0.5 <b>A</b>	3.9 ± 0.3 <b>A</b>
	% Galloylation	18.2 ± 0.6 <b>B</b>	19.9 ± 0.2 <b>C</b>	19.4 ± 0.3 <b>C</b>	16.8 ± 0.4 <b>A</b>
Astringency Index	(mg Tannic acid/L)	158 ± 49 <b>A</b>	330 ± 40 <b>B</b>	1031 ± 50 <b>D</b>	640 ± 32 <b>C</b>
	(mg Tannic acid/g of seeds)	23.4 ± 2.4 <b>B</b>	17.4 ± 2.0 <b>A</b>	57.9 ± 1.2 <b>D</b>	39.9 ± 1.7 <b>C</b>

All data are expressed as the average values of 3 replicates ± standard deviation. Different letters indicate the existence of statistical differences ( $p < 0.05$ ).

The highest values of the total polyphenol index and the tannin concentration were obtained by Merlot followed in decreasing order by Cabernet Sauvignon, Garnacha and Tempranillo. Merlot and Cabernet Sauvignon seeds released much more tannins than Garnacha or Tempranillo seeds. Specifically, Merlot seeds released around 5 times more and Cabernet Sauvignon released around 3.5 times more than the other two seed varieties.

In general, the proanthocyanidin concentration showed a similar trend as the tannin concentration, although the values were lower. These differences are probably related to the different method used for each analysis. Tannins were determined using the methyl-cellulose precipitation method<sup>28</sup> whereas proanthocyanidins were measured by acid depolymerization in the presence of an excess of phloroglucinol.<sup>31</sup> This last analytical method cannot cleave all the interflavanic bonds of the proanthocyanidins and therefore may underestimate the real concentration.<sup>34</sup> No significant differences

## RESULTADOS: Capítulo 1

were found in the mean degree of polymerization (mDP) of the proanthocyanidins between the different varieties. However, some differences were observed in their galloylation percentages (%GAL). Specifically, the galloylation percentage was higher for the proanthocyanidins extracted from Tempranillo and Merlot seeds. In contrast, the lowest galloylation percentage was observed in Cabernet Sauvignon seeds, while Garnacha seed proanthocyanidins showed an intermediate galloylation level.

According to these data, it seems that the extraction of phenolic compounds, tannins and proanthocyanidins from seeds was mainly influenced by the percentage of seed weight respect to berry weight (%SB) of each variety, since Merlot and Cabernet Sauvignon grapes, which have a higher SB%, released more of these compounds than the other two varieties. However, Merlot and Cabernet Sauvignon grape berries showed statistically similar %SB but Merlot seeds released higher amounts of tannins and proanthocyanidins. This indicates that Merlot seeds can release higher amounts of these phenolic compounds than Cabernet Sauvignon. In contrast, Garnacha and Tempranillo seeds released similar amounts of these compounds, although Tempranillo had a significantly greater %SB. These data suggest that Garnacha seeds can release a higher amount of tannins than Tempranillo seeds by weight unit.

These different tannin releasing capacities of the seeds of the different varieties can be observed in Table 4, which shows the tannin concentration in relation to the seed weight. Specifically, Merlot seeds had the highest tannin releasing capacity followed, in decreasing order by Cabernet Sauvignon, Garnacha and Tempranillo seeds. It seems, therefore, that the tannin (and proanthocyanidin) concentration, which can be released from the seeds of the different cultivars, depends not only on the percentage of seed weight with respect to berry weight but also on the genetic characteristics of each cultivar, which probably condition the phenolic compound content of their seeds. In addition, the lignification level of the seeds, which is related to the grape maturity level, also affects the extractability of these phenolic compounds.<sup>14,35</sup>

Table 4 also shows the Astringency Index of the model wine solutions obtained by maceration of the seeds of each variety. Merlot seeds had the highest Astringency Index followed, in decreasing order, by Cabernet Sauvignon, Tempranillo and Garnacha seeds. In general it seems that the astringency index of solutions was in line with the amount of phenolic compounds and tannin released. However, the Astringency Index of the Tempranillo seeds macerated solution was significantly higher than that of the Garnacha seed solution, although its tannin and proanthocyanidin concentration were statistically similar. This could be due to a higher galloylation percentage of the proanthocyanidins extracted from Tempranillo seeds. When the Astringency Index was normalized by the seed weight of each variety, this parameter showed a similar trend as the tannin concentration normalized by gram of seeds. These data suggest that the percentage of seed weight with respect to the berry weight was the main determinant

## RESULTADOS: Capítulo 1

of the final tannin concentration and astringency of the solutions. However, the galloylation percentage also seems to contribute to the Astringency Index.

Table 5 shows the TPI and tannin concentration of the different wines elaborated for each variety: Grape Juice Wine (GJW), Seed Wine (SW) and Grape Wine (GW). To obtain the theoretical value of TPI released by seeds, the values corresponding to GJW were subtracted from those of SW in order to eliminate the influence of the phenolic compounds present in the grape juice after pressing. The same strategy was performed for tannins to determine the tannins released per seed under the real media conditions of each cultivar (pH, ethanol content and titratable acidity characteristic of each cultivar) and under real alcoholic fermentation conditions. Evidently, these data should be considered with some precaution since they correspond to a theoretical calculation.

**Table 5: Total polyphenol index, tannin concentration and astringency index.**

Parameter		Garnacha	Tempranillo	Merlot	Cabernet Sauvignon
TPI	GJW	11.7 ± 0.1 A	13.0 ± 0.2 B	10.9 ± 0.5 A	10.9 ± 0.8 A
	SW	23.9 ± 0.3 A	25.5 ± 1.2 B	59.0 ± 1.5 D	43.9 ± 2.5 C
	Theoretically released by seeds	12.2 ± 0.3 A	12.5 ± 1.2 A	48.1 ± 1.5 C	33.0 ± 2.5 B
	GW	48.6 ± 0.4 A	63.8 ± 2.3 B	96.5 ± 0.9 D	90.4 ± 0.4 C
Tannins (mg/L)	GJW	99 ± 23 A	419 ± 40 C	140 ± 28 AB	168 ± 13 B
	SW	840 ± 91 A	1085 ± 127 B	3241 ± 122 D	1835 ± 82 C
	Theoretically released by seeds	741 ± 91 A	667 ± 110 A	3101 ± 122 C	1667 ± 48 B
	GW	1979 ± 163 A	2605 ± 100 B	4057 ± 129 D	3479 ± 147 C
Astringency index (mg/L Tannic Acid)	GJW	80 ± 20 A	130 ± 30 A	80 ± 20 A	70 ± 30 A
	SW	220 ± 20 A	280 ± 20 B	590 ± 20 D	510 ± 40 C
	Theoretically released by seeds	140 ± 10 A	150 ± 20 A	510 ± 20 C	440 ± 30 B
	GW	480 ± 10 A	510 ± 20 A	640 ± 20 B	660 ± 20 B

All data are expressed as the average values of 3 replicates ± standard deviation. Different letters indicate the existence of statistical differences between different cultivars ( $p < 0.05$ ). GW: Grape wine; GJW: Grape juice wine; SW: Seed wine.

Considering these theoretical values, Merlot seeds released the highest TPI and tannin concentration followed in decreasing order by Cabernet Sauvignon, Tempranillo and Garnacha seeds, although these last two varieties released similar amounts of tannins. In general, the theoretical concentration of tannin released by seeds in fermentation conditions showed a similar trend as that obtained in the model wine solution (Table 4) for all the varieties, although the values were lower. This was probably due to the presence of ethanol in the media. In the model wine solutions, alcoholic fermentation was not carried out and the ethanol content was high (13.5% v/v) during the entire

## RESULTADOS: Capítulo 1

maceration time. In contrast, SWs were obtained by real alcoholic fermentation and consequently the high ethanol content was only reached in the last steps of the fermentation. In addition, the ethanal produced by yeasts during alcoholic fermentation could also have originated the polymerization of proanthocyanidins causing the precipitation of the higher molecular weight polymers.<sup>36,37</sup> According to these data, it seems that the amount of tannin released from seeds was mainly determined by the %SB, as in the model wine macerations.

In the case of grape wines (GW), the TPI and the tannin concentration were also higher for Merlot wine followed in decreasing order by Cabernet Sauvignon, Tempranillo and Garnacha wines. It seems that the varieties that released more phenolic compounds and tannin from seeds, also released more tannin and phenolic compounds when skins and seeds were present in conditions of real winemaking. This fact is probably related with the berry size<sup>20</sup> and especially with the %SB.

Table 5 also shows the Astringency Index of the different wines of the different varieties. As it was proposed above for the TPI and tannin concentration, the Astringency Index of GJW was subtracted from that of the SW to determine the theoretical Astringency Index values of the substances released by seeds. In general, the astringency index obtained for the seeds showed a similar trend as that obtained for the model wine solutions (Table 4); however, the index was lower, probably because the amount of tannin released was also lower. Consequently, the highest Astringency Index was again obtained for Merlot seeds followed in decreasing order by Cabernet Sauvignon, Tempranillo and Garnacha seeds. The Astringency Index of the model wine solution macerations of Tempranillo seeds was higher than that of Garnacha seeds, whereas for the wines the theoretical astringency index of seeds for both cultivars was similar. These differences are probably because factors other than the phenolic compounds also play a role in the astringency. For example, the polysaccharide concentration<sup>38,39</sup>, ethanol content<sup>40</sup> and pH<sup>41</sup>, which are very low in Garnacha wines, have been reported to be key factors for modulating wine astringency. In any case, the theoretical astringency index of seeds seems to be mainly determined by the amount of tannin released by seeds, and the %SB is probably the main determinant of the astringency of the wines of the different varieties. Nevertheless, other media conditions, such as pH, ethanol and polysaccharide content, may also affect wine astringency.

The Astringency Index of Merlot and Cabernet Sauvignon wines in conditions of real winemaking (GWs) were similar and significantly higher than those of Tempranillo and Garnacha wines. As expected, the astringency of all GWs was higher than the astringency of SWs because skins also contribute to the tannin release. However, the increase in astringency of Merlot and Cabernet Sauvignon wines due to the presence of skins was lower than in the Tempranillo and Garnacha wines. This minor increase in



## RESULTADOS: Capítulo 1

astringency in Merlot and Cabernet Sauvignon GWs could be due to the extraction of other compounds that can decrease the astringency perception, such as polysaccharides.<sup>38,39</sup>

Table 6 shows the proanthocyanidin concentration of the different wines elaborated with the four varieties. Once again the proanthocyanidin concentration of the GJW was subtracted from that of the SW to calculate the theoretical concentration of proanthocyanidins released by seeds. Similar calculations were performed to determine their theoretical values of mDP and %GAL considering the individual chromatograms. In general, the theoretical concentration of proanthocyanidin released by seeds showed a similar trend to the tannin concentration (Table 5). Specifically, the highest theoretical proanthocyanidin concentration value was obtained for Merlot followed in decreasing order by Cabernet Sauvignon, Garnacha and Tempranillo, and the last two varieties had statistically similar values.

**Table 6: Proanthocyanidins and related parameters.**

Parameter		Garnacha	Tempranillo	Merlot	Cabernet Sauvignon
Proanthocyanidins (mg/L)	GJW	69 ± 1 <b>A</b>	285 ± 3 <b>D</b>	115 ± 3 <b>C</b>	73 ± 1 <b>B</b>
	SW	297 ± 5 <b>A</b>	498 ± 7 <b>B</b>	1204 ± 23 <b>D</b>	837 ± 47 <b>C</b>
	Theoretically released by seeds	265 ± 8 <b>A</b>	258 ± 7 <b>A</b>	1139 ± 24 <b>C</b>	803 ± 49 <b>B</b>
	GW	920 ± 105 <b>A</b>	921 ± 83 <b>A</b>	1393 ± 64 <b>B</b>	1600 ± 39 <b>C</b>
mDP	GJW	5.4 ± 0.1 <b>C</b>	12.3 ± 0.1 <b>D</b>	3.4 ± 0.2 <b>A</b>	5.0 ± 0.1 <b>B</b>
	SW	3.7 ± 0.2 <b>A</b>	5.0 ± 0.3 <b>B</b>	4.0 ± 0.3 <b>A</b>	4.7 ± 0.1 <b>B</b>
	Theoretically released by seeds	3.6 ± 0.2 <b>B</b>	3.0 ± 0.2 <b>A</b>	3.9 ± 0.3 <b>B</b>	4.6 ± 0.1 <b>C</b>
	GW	6.8 ± 0.1 <b>B</b>	7.1 ± 0.1 <b>C</b>	5.8 ± 0.7 <b>A</b>	7.4 ± 0.2 <b>C</b>
% GAL	GJW	18.5 ± 0.2 <b>D</b>	5.8 ± 0.1 <b>A</b>	12.6 ± 1.0 <b>B</b>	19.4 ± 0.5 <b>C</b>
	SW	19.0 ± 0.4 <b>D</b>	10.8 ± 0.4 <b>A</b>	16.5 ± 0.3 <b>C</b>	13.0 ± 0.1 <b>B</b>
	Theoretically released by seeds	20.6 ± 0.7 <b>D</b>	18.6 ± 0.6 <b>C</b>	17.3 ± 0.3 <b>B</b>	13.4 ± 0.3 <b>A</b>
	GW	10.2 ± 0.6 <b>C</b>	6.0 ± 0.3 <b>A</b>	9.7 ± 0.6 <b>BC</b>	8.6 ± 0.7 <b>B</b>
% Prodelphinidins	GJW	n.d	n.d	n.d	n.d
	SW	n.d	n.d	n.d	n.d
	Theoretically released by seeds	n.d	n.d	n.d	n.d
	GW	22.3 ± 0.5 <b>B</b>	16.5 ± 0.5 <b>A</b>	22.6 ± 1.1 <b>B</b>	25.5 ± 0.7 <b>C</b>

All data are expressed as the average values of 3 replicates ± standard deviation. Different letters indicate the existence of statistical differences between different cultivars ( $p < 0.05$ ). GW: Grape wine; GJW: Grape juice wine; SW: Seeds wine.

Some significant differences were observed in the theoretical values of mDP and %GAL of the proanthocyanidins from the seeds of the different varieties. The proanthocyanidins released by Tempranillo seeds had the lowest mDP followed in

## RESULTADOS: Capítulo 1

increasing order by Garnacha, Merlot and Cabernet Sauvignon seeds. Moreover, the %GAL was also different for the proanthocyanidins extracted from each cultivar. The highest %GAL was obtained for the proanthocyanidins extracted from Garnacha seeds followed in decreasing order by those of Tempranillo, Merlot and Cabernet Sauvignon. These mDP and %GAL values differ somewhat from those reported for the seeds macerated in the model wine solution. This is probably because the different compositions of the grape juices (pH, ethanol content, titratable acidity, among others) may affect the proanthocyanidin extraction and also their structural changes. It has been described that higher ethanol content causes higher extraction of the proanthocyanidins with higher mDP.<sup>42</sup> It has also been reported that at a very acidic pH, the interflavan bonds are expected to rupture more easily due to the nucleophilic character of the molecules<sup>43</sup>.

In general, the proanthocyanidin concentration of the GWs of the four cultivars showed a similar trend as that observed for the tannin concentration, although this time the highest value was obtained for Cabernet Sauvignon followed in decreasing order by Merlot, Tempranillo and Garnacha, with the last two varieties having statistically similar values. As expected, the mDP of the proanthocyanidins of GWs was significantly higher and the %GAL significantly lower than in the SWs. These differences are because skin proanthocyanidins have higher mDP and lower %GAL than seed proanthocyanidins.<sup>11,12</sup> Table 6 also shows the %PD of the grape wines. The highest %PD was obtained in Cabernet Sauvignon followed in decreasing order by Merlot, Garnacha and Tempranillo.

Table 7 shows the anthocyanin concentration of the different GWs measured by spectrophotometry. The wines elaborated with Merlot grapes showed the highest anthocyanin concentration followed in decreasing order by Cabernet Sauvignon, Tempranillo and Garnacha wines. This table also shows the anthocyanin concentration analyzed by HPLC.

As a general rule, anthocyanidin-3O-monoglucosides and the total anthocyanin concentrations determined by HPLC-DAD showed a similar trend as that measured by spectrophotometry, although the concentrations were lower. This is logical because the spectrophotometric analysis includes the contribution from other pigments in the measurement and therefore overestimates the total anthocyanin concentration, whereas the HPLC-DAD methods only detect free anthocyanins.<sup>44</sup>

## RESULTADOS: Capítulo 1

**Table 7: Anthocyanin concentration and color parameters of grape wines.**

Parameter	Garnacha	Tempranillo	Merlot	Cabernet Sauvignon
Anthocyanins (spectrophotometry)	110 ± 15 <b>A</b>	461 ± 31 <b>B</b>	762 ± 6 <b>D</b>	532 ± 28 <b>C</b>
Total anthocyanins	35 ± 7 <b>A</b>	121 ± 40 <b>B</b>	285 ± 14 <b>D</b>	177 ± 2 <b>C</b>
Anthocyanidins-3- <i>O</i> -monoglucosides	33 ± 7 <b>A</b>	108 ± 38 <b>B</b>	239 ± 8 <b>C</b>	120 ± 10 <b>B</b>
HPLC				
Acetylated anthocyanins	0.3 ± 0.1 <b>A</b>	1.5 ± 0.5 <b>B</b>	43.0 ± 2.0 <b>C</b>	52.0 ± 9.0 <b>C</b>
Coumarylated anthocyanins	1.7 ± 0.4 <b>A</b>	10.5 ± 5.1 <b>B</b>	20.0 ± 2.0 <b>C</b>	5.0 ± 1.0 <b>B</b>
Piranoanthocyanins	6.0 ± 3.0 <b>A</b>	13.4 ± 2.8 <b>B</b>	17.0 ± 3.0 <b>B</b>	32.0 ± 4.0 <b>C</b>
Color intensity	9.1 ± 0.1 <b>A</b>	18.1 ± 0.5 <b>B</b>	25.1 ± 0.7 <b>C</b>	25.0 ± 1.2 <b>C</b>
CIEL*a*b* Coordinates				
L*	55.0 ± 0.4 <b>D</b>	32.5 ± 0.2 <b>C</b>	29.2 ± 0.6 <b>B</b>	25.8 ± 1.5 <b>A</b>
C*	49.2 ± 0.4 <b>A</b>	57.2 ± 1.1 <b>B</b>	63.8 ± 0.1 <b>C</b>	58.6 ± 0.9 <b>B</b>
H*	3.2 ± 0.5 <b>A</b>	9.5 ± 0.5 <b>B</b>	22.0 ± 0.7 <b>C</b>	22.4 ± 0.3 <b>C</b>

All data are expressed as the average values of 3 replicates ± standard deviation. Anthocyanin concentrations are expressed in mg/L. Different letters indicate the existence of statistical differences between the different cultivars ( $p < 0.05$ ).

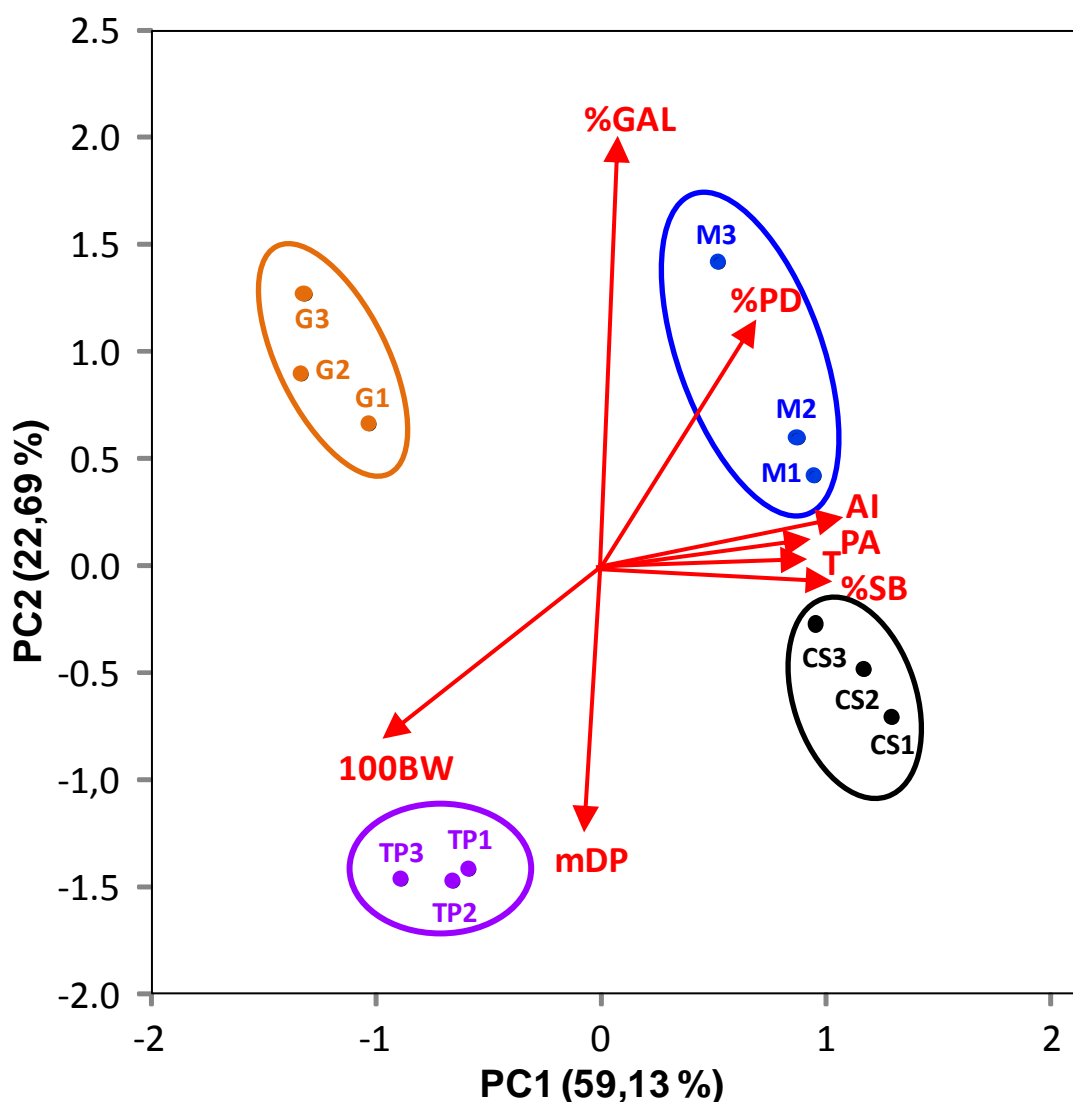
It stands out that Cabernet Sauvignon and Merlot wines have a higher concentration of acetylated anthocyanins than coumarylated anthocyanins whereas Garnacha and Tempranillo wines have higher concentration of coumarylated anthocyanins than acetylated anthocyanins. These differences in the proportion of acetylated and coumarylated anthocyanins have been described previously by other authors for Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines.<sup>14, 45</sup> Moreover, the pyranoanthocyanin concentration was highest for Cabernet Sauvignon wines, followed in decreasing order by Merlot, Tempranillo and Garnacha wines.

Table 7 also shows the color intensity and the CIEL\*a\*b\* coordinates L\*, C\* and H\*. In general, the color intensity and C\* were in accordance with the anthocyanin concentration of the different wines. The only exception was the Cabernet Sauvignon wine, which had a similar color intensity as the Merlot wine although its anthocyanin concentration was significantly lower. This could be related to the higher concentration of pyranoanthocyanins observed in Cabernet Sauvignon wine and also to the copigmentation phenomena. As expected, L\* showed the opposite trend to color intensity and C\* although some minor differences were observed. The greater differences were found in H\*. Specifically, Garnacha wines had the lowest H\* value followed in increasing order by Tempranillo, Merlot and Cabernet Sauvignon, and these last two values were statistically similar. In general this behavior of H\* can be related to the pH and pyranoanthocyanin concentration of the different wines since the lower the pH and the lower the pyranoanthocyanin concentration the lower the

## RESULTADOS: Capítulo 1

yellowish nuances.<sup>46,47</sup> Moreover, the copigmentation phenomena can also produce a decrease in  $H^*$ .<sup>48,49</sup>

Merlot and Cabernet Sauvignon, which have the smallest berry size (berry weight and and berry volume), resulted in wines with the deepest color and the richest anthocyanin concentration, whereas Garnacha and Tempranillo, which have the largest berry size, resulted in the opposite. It seems, therefore, that the berry size is related to the anthocyanin concentration and the color intensity, although this relation is not lineal.



**Figure 2: Plot of varimax-rotated principal components analysis for the different grape wines.**

AI: Astringency Index; T: Tannins; PA: Proanthocyanidins; mDP: mean degree of polymerization; %PD: Percentage of prodelphinidins; %GAL: Percentage of galloylation; 100BW: Weight of 100 berries; %SB: Percentage of seed weight with respect to the weight of a berry; M: merlot; CS: Cabernet Sauvignon; G: Garnacha; TP: Tempranillo.

## RESULTADOS: Capítulo 1

A principal component analysis was performed to better understand which factors are the main determinants of the astringency of the grape wines (GW) of each cultivar. Figure 2 shows the plot of varimax-rotated principal components analysis. This statistical analysis was performed with the parameters Astringency Index, tannins, proanthocyanidins, mDP, %GAL, %PD, %SB and 100BW. Tannins and proanthocyanidins were included because they correlate very well with the Astringency Index. The mDP, %GAL and %PD were included because they have been reported to be key factors in determining the astringency of proanthocyanidins.<sup>9,10</sup> Finally %SB and 100BW were included to study the influence of the grape morphology. Other parameters were not considered in order to simplify the conclusions of the PCA. The first component explains 59.13% of the variance, and the second explains 22.69%, and therefore the aggregate variance explained by the first two components was 81.82%.

The PCA enabled us to separate the different varieties. PC1 placed Merlot and Cabernet Sauvignon wines on the right and Garnacha and Tempranillo on the left. In contrast, PC2 placed Merlot and Garnacha wines at the top of the graph, whereas Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines were placed at the bottom.

The loadings are shown as arrows, the length and direction of which indicate the contribution made by the two components. The arrow corresponding to the Astringency Index is directed towards the right, indicating that the samples placed further towards the right have higher astringency. As expected, the arrows corresponding to proanthocyanidins and tannins are also directed to the right, nearly overlapping with the astringency index arrow, confirming that these compounds are the main determinants of astringency perception. The %SB arrow is also directed to the right, in a very similar way to the arrows for the astringency index, tannins and proanthocyanidins. Hence, all these parameters mainly contribute to PC1 and it seems that they are closely and positively correlated. These data indicate that the percentage of seed weight with respect to berry weight is determinant of the wine's final tannin concentration and consequently also of its astringency. The mDP and the %GAL arrows are directed downwards and upwards respectively, contributing mainly to PC2, with angles close to 90 degrees with respect to the Astringency Index arrow. These data are somewhat surprising since both parameters have been described as factors that condition the astringency of the proanthocyanidins.<sup>9,10</sup> These data seem to indicate that wine astringency is more conditioned by the proanthocyanidin concentration than by the %GAL or mDP. The %PD arrow is directed towards the upper right of the graph and has a contribution from both axes. In contrast, the 100BW arrow is directed to the lower left of the graph in the opposite direction to the Astringency Index arrow. These data confirm that there is a negative correlation between the berry size and the tannin concentration of the wines<sup>20</sup> and consequently with their astringency. It seems that

## RESULTADOS: Capítulo 1

tannin concentration and astringency index correlates better with %SB than with the berry weight.

### CONCLUSIONS

It can be concluded that the morphology of the berry and more specifically the percentage of seed weight per berry and the berry weight, had a clear effect on the chemical composition of the wines and consequently on their astringency perception. Therefore, Merlot and Cabernet Sauvignon wines, which showed the highest percentage of seed weight with respect to berry weight and smallest berry size (100BW and 100BV), were the wines with highest tannin concentration and consequently they had higher astringency. In contrast, Garnacha and Tempranillo wines, which showed a lower percentage of seed weight with respect to berry weight and larger berry size (100BW and 100BV), were the wines with the lowest tannin, and consequently they had lower astringency. It is evident that the genetic characteristics of each variety as well as environmental factors, viticulture practices and oenological procedures also affect the tannin concentration and astringency. Nevertheless, according to our results the seed weight percentage with respect to berry weight (%SB) seems to be one of the main determinants of the final tannin concentration and astringency of red wines.

### REFERENCES

- (1). Vidal S, Francis L, Noble A, Kwiatkowski M, Cheynier V and Waters EJ, Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Anal Chim Acta* **513**:57–65, (2004).
- (2). He F, Liang NN, Mu J, Pan QH, Wang J, Reeves MJ and Duran CQ, Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, **17**:1571–1601, (2012).
- (3). Francia-Aricha E, Guerra MT, Rivas-Gonzalo JC and Santos-Buelga C, New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J Agric Food Chem* **45**: 2262–2266, (1997).
- (4). He F, Liang NN, Mu J, Pan QH, Wang J, Reeves MJ and Duran CQ, Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, **17**:1483-1519, (2012).
- (5). Bakker J and Timberlake CF, Isolation, identification, and characterization of new color stable anthocyanins occurring in some red wines. *J Agric Food Chem* **45**:35–43, (1997).

## RESULTADOS: Capítulo 1

- (6). Cheynier V, Dueñas-Paton M, Salas E, Maury C, Souquet JM, Sarni-Manchado P and Fulcrand H, Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am J Enol Vitic* **57**:298–305, (2006).
- (7). Boulton R, The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A Critical review. *Am J Enol Vitic* **52**:67-87, (2001).
- (8). Peleg H, Gacon K, Schlich P and Noble AC, Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimmers and trimers. *J Sci Food Agric* **79**(3):1123-1128, (1999).
- (9). Vidal S, Francis L, Guyot S, Marnet N, Kwiatkowski M, Gawel R, Cheynier V and Waters EJ, The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J Sci Food Agric* **83**:564-573, (2003).
- (10). Sun B, de Sa M, Leandro C, Caldeira I, Duarte FL and Spranger I, Reactivity of Polymeric Proanthocyanidins towards salivary proteins and their Contribution to Young Red Wine Astringency. *J Agric Food Chem* **61**:939-946, (2013).
- (11). Prieur C, Rigaud J, Cheynier V and Moutounet M, Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **36**(3):781-784, (1994).
- (12). Souquet JM, Cheynier V, Brossaud F and Moutounet M, Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, **43**:509-512, (1996).
- (13). Ortega-Regules A, Romero-Cascales I, Ros-García JM, Bautista-Ortín AB, López-Roca JM, Fernández-Fernández JI and Gómez-Plaza E, Anthocyanins and tannins in four grape varieties (*Vitis vinifera* L.). Evolution of their content and extractability. *J Int Sci Vigne Vin* **42**:147-156, (2008).
- (14). Gil M, Kontoudakis N, González E, Esteruelas M, Fort F, Canals JM and Zamora F, Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of cabernet sauvignon and tempranillo wines. *J Agric Food Chem* **60**:7988–8001, (2012).
- (15). Canals R, Llaudy MC, Valls J, Canals JM and Zamora F, Influence of Ethanol Concentration on the Extraction of Color and Phenolic Compounds from the Skin and Seeds of Tempranillo Grapes at Different Stages of Ripening. *J Agric Food Chem* **53**: 4019-4025, (2005).
- (16). Pérez-Navarro J, García-Romero E, Gómez-Alonso S and Izquierdo-Cañas PM, Comparison between the phenolic composition of Petit Verdot wines elaborated at different maceration/fermentation temperatures. *Int J Food Properties* **21**:996-1007, (2018).

## RESULTADOS: Capítulo 1

- (17). Canals R, Llaudy MC, Canals JM and Zamora F, Influence of the elimination and addition of seeds on the color, phenolic composition and astringency of red wine. *Eur Food Res Technol* **226**:1183-1190, (2008).
- (18.) Lee J, Kennedy JA, Devlin C, Redhead M and Rennaker C, Effect of early seed removal during fermentation on proanthocyanidin extraction in red wine: A commercial production example. *Food Chem* **107**:1270-1273, (2008).
- (19). Pascual O, Ortiz J, Roel M, Kontoudakis N, Gil M, Gómez-Alonso S, García-Romero E, Canals JM, Hermosín-Gutiérrez I and Zamora F, Influence of grape maturity and prefermentative cluster treatment of the Grenache cultivar on wine composition and quality. *Oeno One* **50**:169-181, (2016).
- (20). Gil M, Pascual O, Gómez-Alonso S, García-Romero E, Hermosín-Gutiérrez I, Canals JM and Zamora F, Influence of berry size on red wine color and composition. *Aust J Grape Wine Res* **21**:2000–212, (2015)
- (21). Bindon K, Myburgh P, Oberholster A, Roux K and Du Toit C, Response of Grape and Wine Phenolic Composition in *Vitis vinifera* L. cv. Merlot to Variation in Grapevine Water Status. *South African J Enol and Vitic* **32**:71-88, (2011).
- (22). Barballado MG, Guidoni S and Hunter JJ, Berry size and qualitative characteristics of *Vitis vinifera* L. cv. Syrah. *Am J Enol Vitic* **32**:129-136, (2011).
- (23). Shellie KC, Water Deficit Effect on Ratio of Seed to Berry Fresh Weight and Berry Weight Uniformity in Wine grape cv. Merlot. *Am J Enol Vitic* **61**: 414-418, (2010).
- (24). Vitis International Variety Catalogue (<http://www.vivc.de>)
- (25). Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Methods of analysis of wines and must; <http://www.oiv.int/oiv/info/enmethodesinternationalesvin>, 2014.
- (26). Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D, Chapter 6: Phenolic compounds. In Handbook of Enology. The Chemistry of Wine Stabilisation and Treatments; Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D, Eds.; Wiley: Chichester, UK, 2006; Vol. 2, pp 141–203.
- (27). Niketic-Aleksic GK and Hrazdina G, Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wines. *Lebensm Wiss Technol* **5**:163–165, (1972).
- (28). Sarneckis CJ, Dambergs RG, Jones P, Mercurio M, Herderich MJ and Smith PA, Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimized tool for grape and wine analysis. *Aust J Grape Wine Res* **12**:39–49, (2006).



## RESULTADOS: Capítulo 1

- (29). Glories Y, La couleur des vins rouges. 2ème partie: Mesure, Origine et Interpretation. *Connaiss Vigne Vin* **18**: 253–271, (1984)
- (30). Ayala F, Echavarri JF and Negueruela AI, A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rose wines. *Am J Enol Technol* **48**:357-363, (1997).
- (31). Kennedy JA and Jones GP, Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J Agric Food Chem* **49**:1740–1746, (2001).
- (32). Llaudy MC, Canals R, Canals JM, Rozés N, Arola L and Zamora F, New method for evaluating astringency in red wine. *J Agric Food Chem* **52**:742-746, (2004).
- (33). Harbertson JF and Harwood ED, Partitioning of potassium during commercial - scale red wine fermentations and model wine extractions. *Am J Enol Vitic* **60**:43-49, (2009).
- (34). Foo LY, Lu Y, Howell AB and Vorsa N, The structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated Escherichia coli in vitro. *Phytochemistry* **54**:173-181, (2000).
- (35). Cadot Y, Minana-Castello MT and Chevalier M, Anatomical, histological, and histochemical changes in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during fruit development. *J Agric Food Chem* **29**:9206–9215, (2006).
- (36). Es-Safi NE, Fulcrand H, Cheynier V and Moutounet M, Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde: Induced polymerization of flavanols. *J Agric Food Chem* **47**:2088-2095, (1999).
- (37). Fulcrand H, Doco T, Es-Safi, NE, Cheynier V and Moutounet M, Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *J Chromatogr A* **752**:85-91, (1996).
- (38). De Freitas V, Carvalho E and Mateus N, Study of carbohydrate influence on protein- tannin aggregation by nephelometry. *Food Chem* **81**:503-509, (2003).
- (39). Watrelot AA, Schulz DL and Kennedy JA, Wine polysaccharides influence tannin-protein interactions. *Food Hydrocoll* **63**:571-579), (2017).
- (40). Fontoin H, Saucier C, Teissedre PL and Glories Y, Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Qual Prefer* **19**:286-291, (2008).
- (41). Obreque-Slír E, Peña-Neira A and López-Solis R, Interaction of oenological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *LWT- Food SciTechnol* **45**:88-93, (2012).

## RESULTADOS: Capítulo 1

- (42). Henández-Jiménez A, Kennedy JA, Bautista-Ortín AB and Gómez-Plaza E, Effect of Ethanol on Grape Seed Proanthocyanidin Extraction. *Am J Enol Vitic* **63**:857-861, (2012).
- (43). Dallas C, Hipólito-Reis P, Ricardo-da-Silva J and Laureano O, Influence of acetaldehyde, pH, and temperature on transformation of procyanidins in model wine solutions. *Am J Enol Vitic* **54**: 119-124, (2003).
- (44). Rivas-Gonzalo JC, Gutierrez Y, Hebrero E and Santos-Buelga C, Comparisons of methods for the determination of anthocyanins in red wines. *Am J Enol Vitic* **43**:210–214, (1992).
- (45). Otteneder H, Holbach B, Marx R and Zimmer M, Identification of the grape variety in red wine by means of the anthocyanin composition. In 26th World Congress and 81st General Assembly of the Office International de la Vigne et du Vin, Adelaide, South Australia, 2001; pp 181–191.
- (46). De Freitas V and Mateus N, Formation of pyranoanthocyanins in red wines: A new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Anal Bioanal Chem* **401**:1463–1473, (2011).
- (47). Brouillard R and Dubois JE, Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in aqueous media. *J Am Chem Soc* **99**:1359–1364, (1997).
- (48). Brouillard R and Dangles O, Anthocyanins molecular interactions: The first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chem* **51**:365–371, (1994).
- (49). Gombau J, Vignault A, Pascual O, Gómez-Alonso S, García-Romero E, Hermosín I, Canals JM, Teissedre PL and Zamora F, Influence of oenological tannins on malvidin-3-O-monoglucoside copigmentation in a model wine solution. *Oeno One* **53**:3, (2019).

## RESULTADOS: Capítulo 2

## CAPÍTULO 2: Influencia de los taninos enológicos sobre la copigmentación de la malvidina-3-*O*-monoglucósido en una solución de vino modelo

Los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista *Oeno One*, en el artículo titulado: *Influence of oenological tannins on malvidin-3-O-monoglucoside copigmentation in a model wine solution*.

Received: 4 March 2019 | Accepted: 18 May 2019 | Published: 6 August 2019  
DOI:10.20870/oenone.2019.53.3.2412



### Influence of oenological tannins on malvidin-3-*O*-monoglucoside copigmentation in a model wine solution

Jordi Gombau<sup>1</sup>, Adeline Vignault<sup>1,2</sup>, Olga Pascual<sup>1</sup>, Sergio Gomez-Alonso<sup>3</sup>, Esteban García-Romero<sup>4</sup>, Isidro Hermosin<sup>3</sup>, Joan Miquel Canals<sup>1</sup>, Pierre-Louis Teissedre<sup>2</sup> and Femando Zamora<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Carrer de Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona (Tarragona), Spain

<sup>2</sup>Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université de Bordeaux, EA 4577 Œnologie, 210 Chemin de Leyssotte, 33140 Villenave d'Omon, France

<sup>3</sup>Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus Universitario s/n, 13071 Ciudad Real (Castilla-La Mancha), Spain

<sup>4</sup>Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, Carretera Toledo-Albacete s/n, 13700 Tomelloso (Ciudad Real), Spain

Corresponding author: femando.zamora@urv.cat

#### ABSTRACT

**Aim:** The aim of the study was to evaluate the effects of five different oenological tannins on the color of a malvidin-3-*O*-monoglucoside solution, and thereby assess the effectiveness of these tannins as copigments.

**Methods and Results:** Solutions containing malvidin-3-*O*-glucoside and different doses of copigments were prepared. The malvidin-3-*O*-glucoside concentration of the solutions, and color parameters, were measured after 1 and 7 days.

**Conclusions:** On days 1 and 7, a decrease in lightness and hue, and an increase in chroma, absorption at 520 nm and wavelength of maximal absorption were observed in solutions containing the oenological tannins. A decrease in malvidin-3-*O*-glucoside concentration in the tannin-containing solutions compared with the control solution was detected on day 7. The extent of this decrease depended on the specific tannin. Some changes in color parameters on day 7 compared with day 1 were observed, which were probably due to the formation of new pigments. The total color difference between the different malvidin-3-*O*-glucoside solutions and a pure white solution was calculated to estimate the effectiveness of the different tannins as copigments.

**Significance and impact of the study:** These results prove that supplementation with oenological tannins is a viable option for improving the color of red wines. A copigmentation index is proposed for measurement of the effectiveness of copigments.

## RESULTADOS: Capítulo 2

## RESULTADOS: Capítulo 2

### Influence of oenological tannins on malvidin-3-*O*-monoglucoside copigmentation in a model wine solution.

Jordi Gombau <sup>1</sup>, Adeline Vignault <sup>1,2</sup>, Olga Pascual <sup>1</sup>, Sergio Gómez-Alonso <sup>3</sup>, Esteban García-Romero <sup>4</sup>, Isidro Hermosín <sup>3</sup>, Joan Miquel Canals <sup>1</sup>, Pièrre-Louis Teissedre <sup>2</sup> and Fernando Zamora <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d' Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Carrer de Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona (Tarragona), Spain.

<sup>2</sup> Institut des Sciences de la Vigne et du Vin, Université de Bordeaux, EA 4577 Œnologie, 210 Chemin de Leysotte, 33140 Villenave d'Ornon, France.

<sup>3</sup> Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Universidad de Castilla-La Mancha, Campus Universitario s/n, 13071 Ciudad Real (Castilla-La Mancha), Spain.

<sup>4</sup> Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, Carretera Toledo-Albacete s/n, 13700 Tomelloso (Ciudad Real), Spain.

#### ABSTRACT

**Aim:** The aim of the study was to evaluate the effects of five different oenological tannins on the color of a malvidin-3-*O*-monoglucoside solution, and thereby assess the effectiveness of these tannins as copigments.

**Methods and Results:** Solutions containing malvidin-3-*O*-glucoside and different doses of copigments were prepared. The malvidin-3-*O*-glucoside concentration of the solutions, and color parameters, were measured after 1 and 7 days.

**Conclusions:** On days 1 and 7, a decrease in lightness and hue, and an increase in chroma, absorption at 520 nm and wavelength of maximal absorption were observed in solutions containing the oenological tannins. A decrease in malvidin-3-*O*-glucoside concentration in the tannin-containing solutions compared with the control solution was detected on day 7. The extent of this decrease depended on the specific tannin. Some changes in color parameters on day 7 compared with day 1 were observed, which were probably due to the formation of new pigments. The total color difference between the different malvidin-3-*O*-glucoside solutions and a pure white solution was calculated to estimate the effectiveness of the different tannins as copigments.

**Significance and impact of the study:** These results prove that supplementation with oenological tannins is a viable option for improving the color of red wines. A copigmentation index is proposed for measurement of the effectiveness of copigments.

**Keywords:** color improvement, copigmentation, malvidin-3-*O*-glucoside, oenological tannins, pigments.

## RESULTADOS: Capítulo 2

### INTRODUCTION

The use of oenological tannins is common practice in winemaking. Although the use of tannins is authorized by the International Organisation of Vine and Wine (OIV) only for facilitating the clarification of wines and musts (OIV, 2017), it is unquestionable that they are also used for many other purposes. Indeed, several other properties have been attributed to oenological tannins, such as antioxidant activity (for protection of wines against oxidation) (Hagerman *et al.*, 1998), direct consumption of dissolved oxygen (Pascual *et al.*, 2017), the ability to scavenge peroxy radicals (Magalhaes *et al.*, 2014), the ability to chelate iron(II), prevention of oxidative damage mediated by Fenton-based reactions (Pérez *et al.*, 2009), antioxidasic activity (antilaccase activity) (Obradovic *et al.*, 2005), improvement of wine structure and mouthfeel (Vivas, 2001), color improvement and stabilization of red wines (Canuti *et al.*, 2012), copigmentation effect (Neves *et al.*, 2010), direct formation of new pigments (Versari *et al.*, 1998), elimination of reduction odors (Vivas, 2001) and even bacteriostatic effects (Lempereur *et al.*, 2002a).

Many commercial tannins of different botanical origins and chemical compositions are currently available on the market (Obrique-Slíer *et al.*, 2009; Malacarne *et al.*, 2016). The so-called oenological tannins include ellagitannins from oak or chestnut, gallotannins from gall nuts, and condensed tannins from grape seeds and skins or from other plant sources, such as tara, quebracho and mimosa (Versari *et al.*, 2013).

The chemical structure of ellagitannins consists of an open-chain glucose esterified at positions 4 and 6 by a hexahydroxydiphenoyl unit and a nonahydroxyterphenoyl unit esterified at positions 2, 3 and 5 with a C-glycosidic bond between the carbon of the glucose and position 2 of the trihydroxyphenoyl unit (Quideau *et al.*, 2004; Okuda *et al.*, 2009). The structure of various ellagitannins have been described, but castalagin and vescalagin are the most abundant in oak wood, accounting for between 40% and 60% of the total by weight (Fernandez de Simon *et al.*, 1999).

Gallotannins are formed by the esterification of gallic acid with the hydroxyl group of a polyol carbohydrate such as glucose (Hagerman, 1998). Gallotannin extracts, which are also commercially known as tannic acid, are mixtures of polygalloyl glucose or polygalloylquinic acid esters with a number of galloyl moieties per molecule ranging from 2 to 12, depending on the plant source used to extract the tannic acid (Sylla *et al.*, 2015).

Condensed tannins are polymers of flavan-3-ol units; they are also called proanthocyanidins, because they release anthocyanins by acidic cleavage in accordance with the Bate-Smith reaction (Bate-Smith, 1973). Their composition, which depends on their botanical origin, varies mainly as regards the monomer released after

## RESULTADOS: Capítulo 2

acidic cleavage, the mean degree of polymerization, and their levels of galloylation and ramification (Versari *et al.*, 2013).

Grape-skin tannins are composed of procyanidins and prodelphinidins, because their acidic cleavage produces cyanidin and delphinidin. In contrast, grape-seed tannins comprise only procyanidins, because they release only cyaniding (Bate-Smith, 1973). Additionally, grape-skin proanthocyanidins have a high mean degree of polymerization and a low level of galloylation, whereas grape-seed proanthocyanidins have a lower mean degree of polymerization and a high level of galloylation (Souquet *et al.*, 1996). Regarding tannins from non-grape sources, quebracho tannins have a high level of ramification and are profisetinidins, because their acidic cleavage produces fisetinidin, whereas mimosa tannins are prorobinetidins, because they release robinetinidin (Celzard *et al.*, 2015).

Of the various properties attributed to oenological tannins, their ability to improve the color intensity and stability of red wines is probably one of the main reasons why they are widely used in winemaking. The color of red wines is without doubt one of their main quality parameters, because it is the first sensory attribute experienced by consumers (Parpinello *et al.*, 2009). Indeed, poor color can be an indicator of possible wine deficiencies, such as insufficient grape phenolic maturity, infection of grapes by grey rot, and inadequate winemaking and stabilization processes. Because it evolves over time, the color of a wine also gives information about its age, its conservation status and its aging ability.

Anthocyanins are the main compounds that determine red wine color, the visible expression of which depends, among other factors, on pH. They are mainly present in the form of the flavylium cation (which is red) at very acidic pH, but its proportion decreases progressively as pH increases, and this in turn generates the appearance of the quinoidal base (which is blue) and the hemiketal form (which is colorless) (Brouillard and Dubois, 1977). The hemiketal form can in turn give rise, via the opening of its heterocyclic ring, to the chalcone form (which is slightly yellow), and this may later be degraded in the presence of oxygen. This degradation is greatly favored by light and high temperature (Furtado *et al.*, 1993).

Wine color is also strongly determined by copigmentation, a phenomenon based on interactions between anthocyanins and either other anthocyanins or other molecules acting as copigments (Boulton, 2001). This comes about through the formation of vertical  $\pi$ - $\pi$  stacking non-covalent complexes (van der Waals interactions) between the planar polarizable nuclei of anthocyanins and the colorless copigment (de Freitas *et al.*, 2017). The resulting complexes adopt a sandwich-like structure that protects the flavylium cation against nucleophilic attack by water, thus avoiding formation of the colorless hemiketal (Santos-Buelga and de Freitas, 2009). Copigmentation therefore

## RESULTADOS: Capítulo 2

increases wine color intensity (i.e. it has a hyperchromic effect), but it can also change the color hue through bathochromic shift (Brouillard and Dangles, 1994).

Red wine contains several substances that can play a role as copigments, such as some amino acids, phenolic acids, flavanols, flavan-3-ol monomers, proanthocyanidins and even anthocyanins themselves (He *et al.*, 2012). It has also been suggested that oenological tannins may contribute as copigments to improve the color of red wines (Lempereur *et al.*, 2002b), although to our knowledge no direct scientific evidence for this effect has been reported.

Anthocyanins can also react with other molecules, especially flavanols (flavan-3-ol monomers and proanthocyanidins), to produce new pigments (Francia-Aricha *et al.*, 1997; He *et al.*, 2012). Different mechanisms have been proposed to explain the formation of these new pigments. Some of these involve the direct condensation of anthocyanins and flavanols without the participation of oxygen (Santos-Buelga *et al.*, 1995), but the most important reactions are probably those involving oxygen (Timberlake and Bridle, 1976). During winemaking and aging, the presence of small quantities of oxygen leads to the formation of ethanal from ethanol. The ethanal can in turn react with flavanols to induce the formation of a very reactive carbocation that quickly reacts with either another flavanol molecule or an anthocyanin, thus producing ethyl-bridged flavanol–flavanol or flavanol–anthocyanin oligomers (Es-Safi *et al.*, 1999).

Additionally, cycloaddition reactions between anthocyanins and other small molecules can produce a new family of anthocyanin-derived pigments called pyranoanthocyanins. Specifically, the reaction with pyruvic acid or ethanal generates vitisin A or B, respectively (Bakker and Timberlake, 1997). The reaction between anthocyanins and vinylphenol can also generate vinylphenol adducts (Schwarz *et al.*, 2003), and the previously formed ethylidene-bridged compounds can dissociate and generate vinylflavanol adducts (Cheynier *et al.*, 2006). More recently, it has been reported that anthocyanins can also react with ellagitannins to form new pigments (Chassaing *et al.*, 2010).

It is generally accepted that copigmentation is responsible for a substantial proportion (32–43%) of the color of young red wines (Hermosín-Gutiérrez *et al.*, 2005). It has also been suggested that copigmentation may be the first step in the formation of covalent bonds between anthocyanins and flavanols (flavan-3-ol monomers and proanthocyanidins), thus creating new anthocyanin-derived pigments either directly or through the participation of ethanal (Francia-Aricha *et al.*, 1997; de Freitas *et al.*, 2017). Indeed, during storage or aging, copigmentation decreases and the concentration of polymerized structures increases, with consequent changes in the wine (Brouillard and Dangles, 1994; Gutiérrez *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 1992).



## RESULTADOS: Capítulo 2

In previous studies, some researchers have shown the effectiveness as copigments of different pure phenolic compounds in model wine solutions. However, to our knowledge very little scientific information exists about the effectiveness as copigments of these commercial tannins, which are evidently not pure substances. As previously mentioned, the use of commercial oenological tannins is a common practice in modern winemaking, and for this reason the OIV is now reconsidering the properties of oenological tannins in order to rewrite the OIV *International Oenological Codex* and authorize their use for other purposes.

Considering all the above, the aim of the present research was to study the effect of diverse oenological tannins on the color of the anthocyanin malvidin-3-*O*-monoglucoside in a model wine solution, and to propose a new index to measure the actual effectiveness as copigments of the different commercial products.

### MATERIALS AND METHODS

#### 1. Chemicals

Methanol and formic acid were high-performance liquid chromatography (HPLC) grade and purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Tartaric acid and sodium hydroxide were also purchased from Panreac. Absolute ethanol was purchased from MerckGAA (Darmstadt, Germany). Malvidin-3-*O*-glucoside chloride and (–)-epicatechin were purchased from Extrasynthese (Genay, France).

#### 2. Oenological tannins

Five different oenological tannins were used in this study: seed tannin, skin tannin, quebracho tannin, gallotannin and ellagitannin. They were provided by AEB Ibérica S.A. (Castellbisbal, Barcelona, Spain), Agrovin (Alcazar de San Juan, Ciudad Real, Spain), Institut Oenologique de Champagne (Épernay, France) and Laffort (Bordeaux, France), all members of Oenoppia, an international ly-minded association of producers of oenological products. Each of the tannins has been analyzed using the OIV official method (OIV, 2017) to determine its richness in phenolic compounds. The results (expressed as % w/w) were seed tannin,  $73.1 \pm 0.7\%$ ; skin tannin,  $61.1 \pm 2.4\%$ ; quebracho tannin,  $79.5 \pm 6.9\%$ ; gallotannin,  $84.2 \pm 2.4\%$ ; and ellagitannin,  $66.7 \pm 4.3\%$ .

#### 3. Sample preparation

All the samples were prepared in a model wine solution (ethanol 12% v/v, with tartaric acid 4 g/L, adjusted to pH 3.5 with sodium hydroxide) previously purged with nitrogen to remove dissolved oxygen. A solution containing only 50 mg/L of malvidin-3-*O*-glucoside (i.e.the pigment) was prepared; samples of this solution, with no added tannin, served as positive controls. Simultaneously, solutions containing 50 mg/L of malvidin-3-*O*-glucoside and 100, 200 or 400 mg/L of (–)-epicatechin or each of the

## RESULTADOS: Capítulo 2

various commercial oenological tannins (i.e. the copigments) were also prepared to give a copigment-to-pigment weight ratio (CP:P) of 2, 4 and 8, respectively. Finally, solutions containing only 100, 200 or 400 mg/L of (–)-epicatechin or each tannin were prepared as negative controls.

Aliquots of 1.5 mL of each of these solutions were introduced into Eppendorf tubes previously saturated with nitrogen. Solutions were kept in the dark at 20°C for 7 days. All samples were prepared in triplicate. All the subsequent analyses were carried out 1 and 7 days after the beginning of the experiment.

### 4. Color analysis

One and seven days after sample preparation, the full absorption spectrum in the visible range (400–800 nm) of all the samples was measured with a spectrophotometer (Helios Alpha UV-vis, Thermo Fisher Scientific, Waltman, MA, USA) using a quartz cell with a path length of 10 mm). The visible spectra of the solutions containing only the copigments (i.e. (–)-epicatechin and the oenological tannins) were subtracted from the spectra of the samples containing the pigment (i.e. malvidin-3-*O*-glucoside) and the corresponding concentration of copigment (i.e. the oenological tannins or (–)-epicatechin) to eliminate the color contribution of each of the copigments. CIELab coordinates were determined following Ayala et al. (1997), and the data were processed using MSCV software (Ayala *et al.*, 2001).

The effectiveness of the hyperchromic and bathochromic effects of the different copigments was evaluated by comparing the absorption at 520 nm and the CIELab coordinates (chroma, C\*; lightness, L\*; and hue, h\*) of the samples containing only malvidin-3-*O*-glucoside (i.e. the positive controls) with those of the samples also containing the copigments, after subtracting the values for the negative controls. The total color difference ( $\Delta E_{ab^*}$ ) between each solution and a pure white solution, and the wavelength of maximal absorption ( $\lambda_{max}$ ) of the different spectra, were also determined to evaluate the effectiveness as copigments of the different oenological tannins.

### 5. Malvidin-3-*O*-monoglucoside quantification

Malvidin-3-*O*-monoglucoside concentration was determined 1 and 7 days after sample preparation by reverse-phase HPLC analyses with an Agilent 1200 series liquid chromatograph (HPLC–diode array detection) using an Agilent ZorbaxEclipse XDB-C18, 4.6 × 250 mm 5 μm column (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), in accordance with the method described by Gil et al. (2012). Malvidin-3-*O*-glucoside was used to produce anthocyanin standard curves. The aim of this quantification was to estimate the possible losses of malvidin-3-*O*-monoglucoside due to oxidation or the possible formation of polymeric pigments between malvidin and the oenological tannins.

## RESULTADOS: Capítulo 2

### 6. Copigmentation effectiveness index

The following equation is proposed to provide an index of effectiveness as copigments, for use when comparing different commercial tannins.

$$\text{Copigmentation \acute{I}ndex (\%)} = 100 \times \frac{\Delta E_{ab}^{*TS} - \Delta E_{ab}^{*CS}}{\Delta E_{ab}^{*CS}}$$

In the equation,  $\Delta E_{ab}^{*CS}$  is the total color difference between the positive control solution (containing malvidin-3-*O*-monoglucoside without copigment) and a pure white color solution, and  $\Delta E_{ab}^{*TS}$  is the total color difference between the solution of malvidin-3-*O*-monoglucoside containing 400 mg/L of tannin and a pure white solution. The CIELab coordinates of a pure white color solution are  $L^* = 100.00$ ,  $a^* = 0.00$  and  $b^* = 0.00$ .

### 7. Statistics

All data are expressed as the arithmetic mean  $\pm$  the standard deviation from three replicates. One-factor ANOVA was carried out using XLSTAT software (Addinsoft, Long Island City, NY, USA). Comparison of the slopes of the regression lines was carried out using ULC 2.0.1 Univariate Linear Calibration software (University Rovira I Virgili, Tarragona, Spain).

## RESULTS AND DISCUSSION

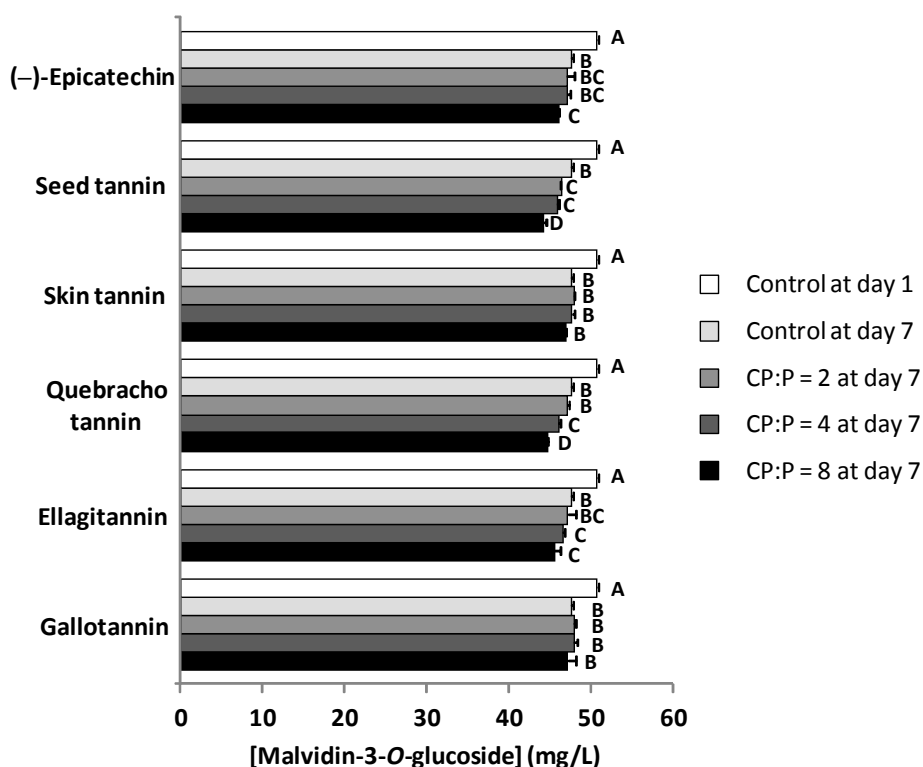
### 1. Effects on malvidin-3-*O*-glucoside concentration

Figure 1 shows the concentration of malvidin-3-*O*-monoglucoside on days 1 and 7 in the positive control solution and the solutions containing malvidin-3-*O*-glucoside and different doses of (–)-epicatechin and the various oenological tannins. On day 1, the concentration of malvidin-3-*O*-glucoside was  $50.8 \pm 0.2$  mg/L in all samples. After 7 days of stockage, the concentration of malvidin-3-*O*-glucoside of the control solution containing only this anthocyanin decreased significantly to  $47.6 \pm 0.3$  mg/L. This reduction (about 6.3%) was probably due to oxidation (Furtado *et al.*, 1993). Similar results were obtained by Jordao *et al.* (2008) with malvidin-3-*O*-glucoside in a model wine solution without the presence of any other phenolic compounds.

Figure 1 also shows how the solutions of malvidin-3-*O*-glucoside were affected by the presence in the media of the copigments, (–)-epicatechin and the oenological tannins, at different concentrations after 7 days. The presence of all copigments except skin tannin and gallotannin brought about a slight but significant decrease in the concentration of malvidin-3-*O*-glucoside, and this reduction tended to be greater at

## RESULTADOS: Capítulo 2

higher concentrations of copigment. However, the decrease in malvidin-3-*O*-glucoside concentration was small and may be related to its oxidation or transformation; it has been reported that proanthocyanidins, flavan-3-ol monomers (Francia-Aricha *et al.*, 1997) and even ellagitannins (Jordão *et al.*, 2008; Chassaing *et al.*, 2010) can react with malvidin-3-*O*-glucoside to produce new pigments.



**Figure 1: Malvidin-3-*O*-glucoside concentration of the model wine solution supplemented with increasing concentrations of (-)-epicatechin and diverse oenological tannins.**

All data are the mean  $\pm$  SD of three replicates. Different letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between different copigment/pigment ratios (CP:P).

The absorption spectra of these new pigments differ from those of malvidin-3-*O*-glucoside, and the degree of difference depends greatly on the nature of the new pigment. Pigments created by direct unions between malvidin-3-*O*-glucoside and flavanols have a red hue, for example, whereas those created by unions between malvidin-3-*O*-glucoside and flavanols via an ethyl bridge have a purple hue and the different products of cycloaddition (pyranoanthocyanins) have an orange hue (Francia-Aricha *et al.*, 1997; de Freitas *et al.*, 2017). Consequently, the formation of these new pigments can change the absorption spectrum of the solution. However, the variations in malvidin-3-*O*-glucoside concentration brought about by the presence of the

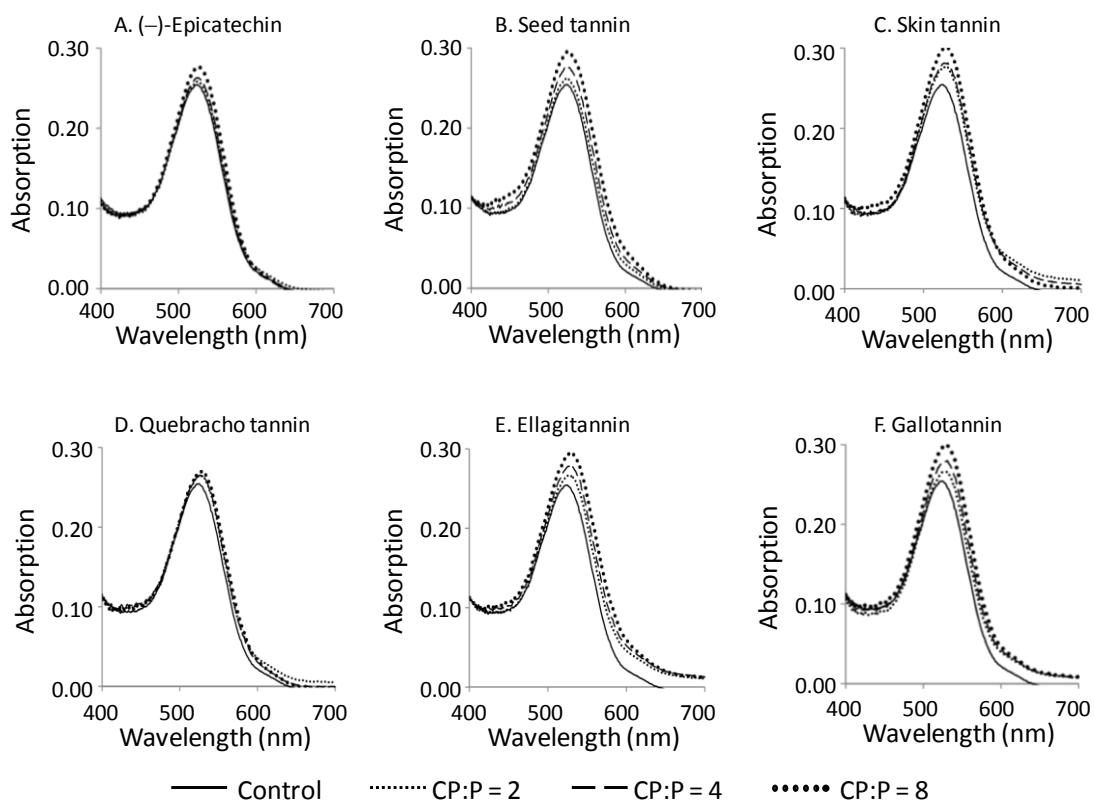
## RESULTADOS: Capítulo 2

different copigments were not very important, with values ranging from 0 (low doses of skin tannin or gallotannin) to 6.6% (in the case of the highest dose of seed tannin), and a global mean value below 2%. For this reason, changes in the absorption spectrum of the different samples are attributable mainly to copigmentation phenomena, although in some cases it could be hypothesized that a small and unknown proportion may be due to the presence of very low amounts of new pigments derived from malvidin-3-*O*-glucoside.

### 2. Effects on absorption spectra and CIELab color parameters

#### *Effects on absorption spectra*

Figure 2 shows the full spectrum in the visible range (400–800 nm) on day 7 of the malvidin-3-*O*-glucoside control sample and solutions containing also different doses of (-)-epicatechin and the various oenological tannins. In all cases, the presence of copigments increased the height and the surface of the absorption spectrum in the visible range, and this effect was dose-dependent. These results confirm that all the oenological tannins investigated can improve the color of a malvidin-3-*O*-glucoside solution and probably also the color of red wines. Similar results have been reported previously (Lempereur *et al.*, 2002b; Vignault *et al.*, 2019).

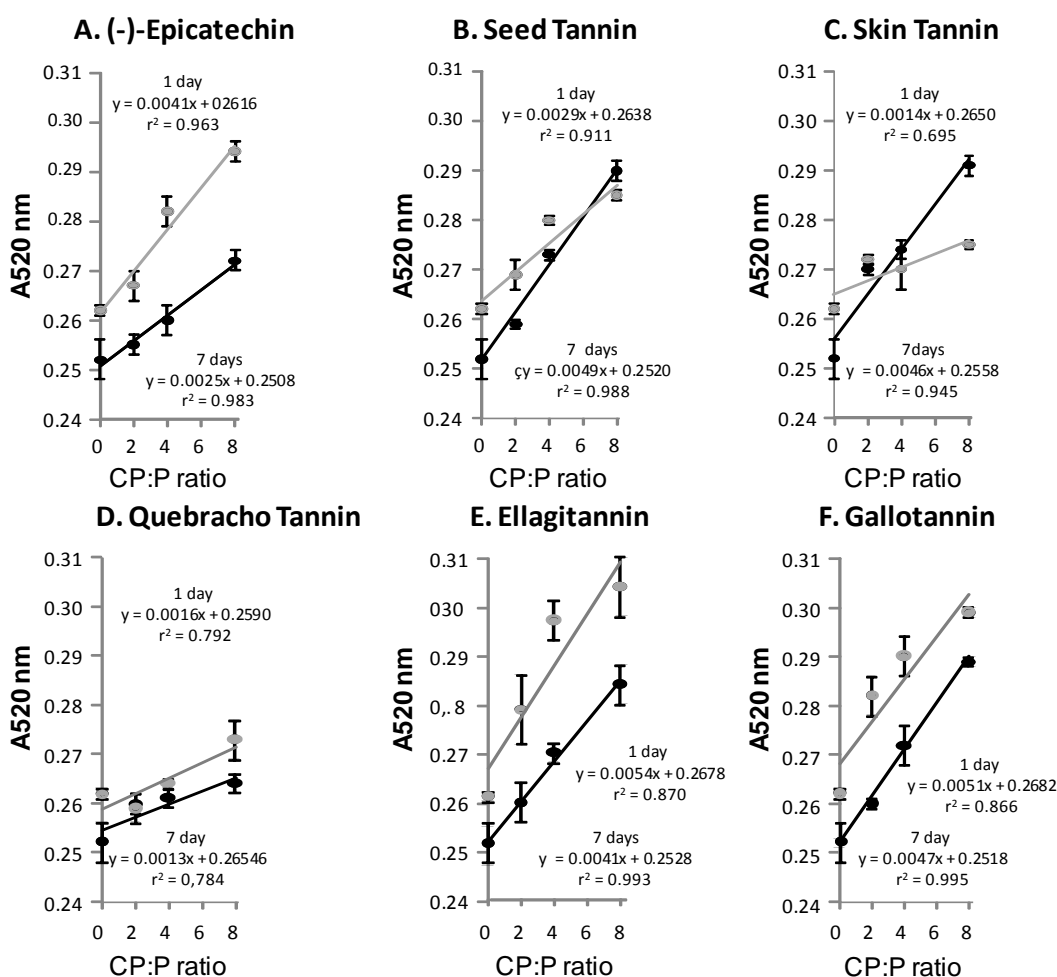


**Figure 2: Visible spectra of a model wine solution of malvidin-3-*O*-glucoside (50mg/L) supplemented with increasing concentrations of (-)-epicatechin and diverse oenological tannins at seventh day of experimentation.**

## RESULTADOS: Capítulo 2

Because the absorption spectrum results give only a general idea of the effects of (–)-epicatechin and the various oenological tannins on color, the effects on the red color specifically (absorption at 520 nm,  $A_{520\text{nm}}$ ) and the CIELab coordinates were measured to better understand the copigmentation phenomenon:  $A_{520\text{nm}}$ , lightness ( $L^*$ ) and chroma ( $C^*$ ) describe quantitative attributes of the color, whereas hue ( $h^*$ ) describes qualitative attributes. The evaluation of these parameters makes it possible to determine the hyperchromic and bathochromic effects produced by the presence of the various copigments.

Figure 3 shows the  $A_{520\text{nm}}$  on days 1 and 7 of the solutions of malvidin-3-*O*-glucoside containing the different doses of (–)-epicatechin and the various oenological tannins. As shown in each graph, the  $A_{520\text{nm}}$  of the solution clearly decreased between day 1 and day 7, when no copigments were present. This decrease was undoubtedly related to the reduction in malvidin-3-*O*-glucoside concentration shown in Figure 1.



**Figure 3: Influence of the copigment/pigment ratio on the absorbance at 520 nm of a model wine solution of malvidin-3-*O*-glucoside (50 mg/L) supplemented with (–)-epicatechin and diverse oenological tannins.**

All data are the mean  $\pm$  SD of three replicates. CP:P ratio correspond to the quotient between the copigment and pigment concentrations expressed as g/L.  $\text{---}\bullet\text{---}$ : day 1;  $\text{---}\bullet\text{---}$ : day 7.

## RESULTADOS: Capítulo 2

**Table 1: Slopes of the regression lines corresponding to the red color (A520), Lightness (L\*), Chroma (C\*) total color difference ( $\Delta E_{ab}^*$ ) in function of the copigment/pigment ratio after 1 or 7 days of the supplementation with (-)-epicatechin and diverse oenological tannins.**

Copigment	Time (days)	A520	Lightness (L*)	Chroma (C*)	$\Delta E_{ab}^*$
(-)-Epicatechin	1	0.0041 ± 0.0004 <b>C</b> $\beta$	-0.066 ± 0.011 <b>B</b> $\beta$	0.108 ± 0.007 <b>C</b> $\beta$	0.118 ± 0.009 <b>C</b> $\beta$
	7	0.0025 ± 0.0003 <b>b</b> $\alpha$	-0.038 ± 0.005 <b>a</b> $\alpha$	0.058 ± 0.005 <b>b</b> $\alpha$	0.073 ± 0.006 <b>b</b> $\alpha$
Seed Tannins	1	0.0029 ± 0.0003 <b>B</b> $\alpha$	-0.080 ± 0.010 <b>B</b> $\alpha$	0.043 ± 0.003 <b>A</b> $\alpha$	0.069 ± 0.006 <b>B</b> $\alpha$
	7	0.0049 ± 0.0002 <b>c</b> $\beta$	-0.088 ± 0.006 <b>b</b> $\alpha$	0.068 ± 0.005 <b>b</b> $\beta$	0.102 ± 0.004 <b>c</b> $\beta$
Skin Tannins	1	0.0014 ± 0.0006 <b>A</b> $\alpha$	-0.026 ± 0.011 <b>A</b> $\alpha$	0.044 ± 0.005 <b>A</b> $\alpha$	0.043 ± 0.010 <b>A</b> $\alpha$
	7	0.0046 ± 0.0004 <b>c</b> $\beta$	-0.071 ± 0.013 <b>b</b> $\beta$	0.086 ± 0.004 <b>c</b> $\beta$	0.111 ± 0.008 <b>cd</b> $\beta$
Quebracho Tannins	1	0.0016 ± 0.0005 <b>A</b> $\alpha$	-0.021 ± 0.007 <b>A</b> $\alpha$	0.049 ± 0.002 <b>A</b> $\beta$	0.057 ± 0.005 <b>AE</b> $\beta$
	7	0.0013 ± 0.0004 <b>a</b> $\alpha$	-0.037 ± 0.011 <b>a</b> $\alpha$	0.014 ± 0.004 <b>a</b> $\alpha$	0.034 ± 0.005 <b>a</b> $\alpha$
Ellagitannins	1	0.0054 ± 0.0010 <b>C</b> $\alpha$	-0.095 ± 0.022 <b>B</b> $\alpha$	0.074 ± 0.005 <b>B</b> $\beta$	0.100 ± 0.018 <b>C</b> $\alpha$
	7	0.0041 ± 0.0004 <b>c</b> $\alpha$	-0.094 ± 0.009 <b>b</b> $\alpha$	0.054 ± 0.008 <b>b</b> $\alpha$	0.096 ± 0.009 <b>c</b> $\alpha$
Gallotannins	1	0.0051 ± 0.0010 <b>C</b> $\alpha$	-0.068 ± 0.015 <b>B</b> $\alpha$	0.081 ± 0.004 <b>B</b> $\alpha$	0.098 ± 0.014 <b>C</b> $\alpha$
	7	0.0047 ± 0.0002 <b>c</b> $\alpha$	-0.082 ± 0.007 <b>b</b> $\alpha$	0.082 ± 0.005 <b>c</b> $\alpha$	0.115 ± 0.006 <b>d</b> $\beta$

All data are the mean ± SD of three replicates. Different capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the different tannins at day 1. Lowercase letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the different tannins at day 7. Different Greek letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between times of treatment.

The  $A_{520nm}$  of the malvidin-3-*O*-glucoside solutions increased with the presence of (-)-epicatechin and each of the oenological tannins, showing a reasonably linear correlation with copigment-to-pigment ratio (CP:P) (see Figure 3). The slopes of the regression lines obtained, along with their statistical significance, are shown in Table 1. The values of the slopes indicate the effectiveness of (-)-epicatechin and the various oenological tannins in improving the red color of the solution; the steeper the slope, the greater their effectiveness. Berké and de Freitas, (2005) have reported a similar slope for (-)-epicatechin, although under different experimental conditions. As shown by the slopes obtained, ellagitannin produced the greatest hyperchromic effect on day 1, followed in decreasing order by gallotannin and (-)-epicatechin (the slopes for these two tannins were statistically similar). In contrast, the smallest hyperchromic effects were produced by seed tannin, skin tannin and quebracho tannin.

No significant differences were observed between the slopes of the regression lines for day 1 and day 7 in the case of quebracho tannin, ellagitannin and gallotannin; the lines were nearly parallel (see Figure 3D–F). However, some differences were observed in the case of (-)-epicatechin, seed tannin and skin tannin (see Figure 3A–C). Specifically,

## RESULTADOS: Capítulo 2

the slopes for the seed and skin tannins became significantly steeper, whereas the slope of (–)-epicatechin did the opposite. The steeper slopes of the regression lines for the seed and skin tannins on day 7, crossing and passing the regression line for day 1 at the highest CP:P ratio, suggest that the copigmentation phenomenon needs time to reach its maximal effect, or that new pigments with a greater contribution to the red color were being formed. Oligomeric and polymeric proanthocyanidins have been reported to react with malvidin-3-*O*-glucoside to form new red pigments (Malien-Auberg *et al.*, 2002).

The significantly less steep slope of the regression line for (–)-epicatechin on day 7 compared to that on day 1 suggests that the maximal copigmentation effect had already been reached on the first day. There are a number of possible explanations for the decrease in the incline of the slope. On the one hand, it may be due to the formation of new pigments with a lesser effect on the intensity of the red color. According to Dueñas *et al.* (2006), (–)-epicatechin and malvidin-3-*O*-glucoside can react to form an adduct anthocyanin–flavanol, which in turn is quickly transformed into a xanthylium cation with a yellow color. On the other hand, (–)-epicatechin can also form other compounds. Indeed, it has been reported that (–)-epicatechin can form adducts in the presence of glyoxylic acid produced by oxidation of tartaric acid and later form xanthylium pigments (Gómez-Míguez *et al.*, 2006). These new compounds are probably less effective copigments than (–)-epicatechin; however, further studies are needed to verify this.

### **Effects on lightness**

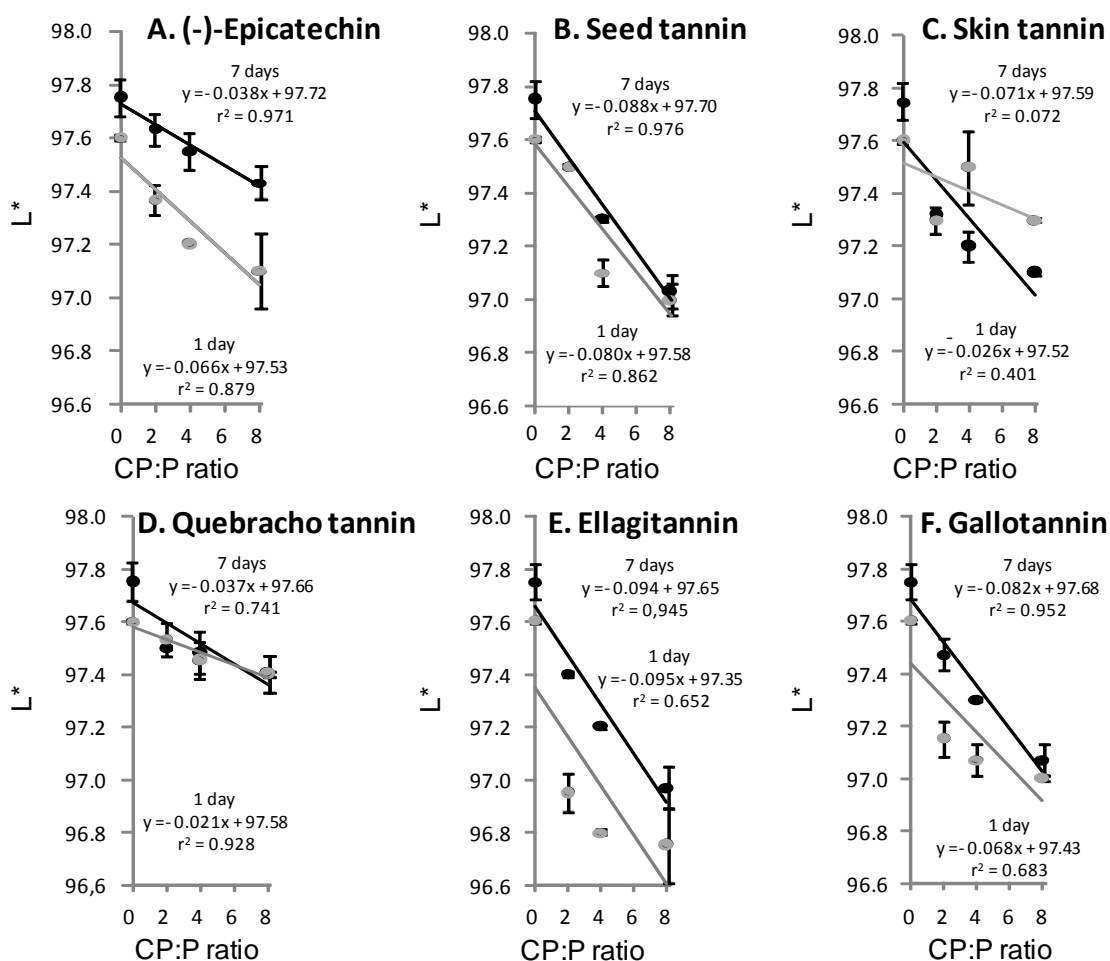
Figure 4 shows the relation between  $L^*$  and CP:P for (–)-epicatechin and each of the oenological tannins. A decrease in  $L^*$  was brought about by the presence in the media of each of the copigments. This indicates that their presence increased the color intensity of the resultant solution. It should be highlighted that a decrease in  $L^*$  better indicates the existence of a hyperchromic effect than an increase in  $A_{520\text{nm}}$ , because  $L^*$  refers to all the visible range of the spectrum and not just to a single wavelength.

The value of  $L^*$  on day 7 was significantly higher than on day 1, when no copigments were present. This significant increase in  $L^*$  is to be expected, because the malvidin-3-*O*-glucoside concentration and the  $A_{520\text{nm}}$  on day 7 were significantly lower than on day 1.

The decrease in  $L^*$  showed a linear relation with CP:P. However, in this case the regression coefficients were not as clear as in the case of  $A_{520\text{nm}}$ , probably because  $L^*$  relates to the whole absorption spectrum, not just absorption at a single wavelength. The slopes for each copigment were negative (see Table 1), therefore the higher the absolute value, the greater the hyperchromic effect.



## RESULTADOS: Capítulo 2



**Figure 4: Influence of the copigment/pigment ratio on the Lightness ( $L^*$ ) of a model wine solution of malvidin-3-O-glucoside (50 mg/L) supplemented with (-)-epicatechin and diverse oenological tannins.**

All data are the mean  $\pm$  SD of three replicates. CP:P ratio correspond to the quotient between the copigment and pigment concentrations expressed as g/L.  $\bullet$  : day 1;  $\circ$  : day 7.

On day 1, the highest absolute slope value and consequently the greatest hyperchromic effect was produced by ellagitannin (see Figure 4E), followed in decreasing order by seed tannin, gallotannin, (-)-epicatechin, skin tannin and quebracho tannin (see Figures 4A–D, F). The only significant difference was found between quebracho tannin and skin tannins with all the other copigments.

The slope for the  $L^*$  of the solutions containing (-)-epicatechin was significantly less steep on day 7 than on day 1 (see Figure 4A), which suggests, as mentioned earlier, that the copigmentation effect of this compound tends to decrease overtime, probably because of the formation of xanthylium cations (Dueñas *et al.*, 2006; Gómez-Míguez *et al.*, 2006). In contrast, the  $L^*$  slope for skin tannin increased significantly in absolute value (see Figure 4C), showing a similar pattern to that observed for  $A_{520\text{ nm}}$ . No

## RESULTADOS: Capítulo 2

significant differences were found between the slopes for day 1 and day 7 for any of the other oenological tannins. Consequently, on day 7 the greatest hyperchromic effect was produced by ellagitannin, followed by seed tannin, skin tannin and gallotannin, which exert a similar effect. The least effective copigments in terms of hyperchromic effect were (–)-epicatechin and quebracho tannin.

### **Effects on chroma**

Figure 5 shows the relation between  $C^*$  and CP:P for (–)-epicatechin and each of the oenological tannins. As expected,  $C^*$  values were significantly lower on day 7 than on day 1, when no copigments were present. Again, the decrease in malvidin-3-*O*-glucoside concentration explains this result. Generally, the graphs show a similar pattern to that obtained for  $A_{520\text{nm}}$ . The results confirm that (–)-epicatechin and each of the tannins exert a hyperchromic effect, because the higher the CP:P, the higher the  $C^*$ . The  $C^*$  values were more in line with CP:P, showing reasonably clear regression coefficients and confirming that the color of the malvidin-3-*O*-glucoside solution was more vivid in the presence of these copigments.

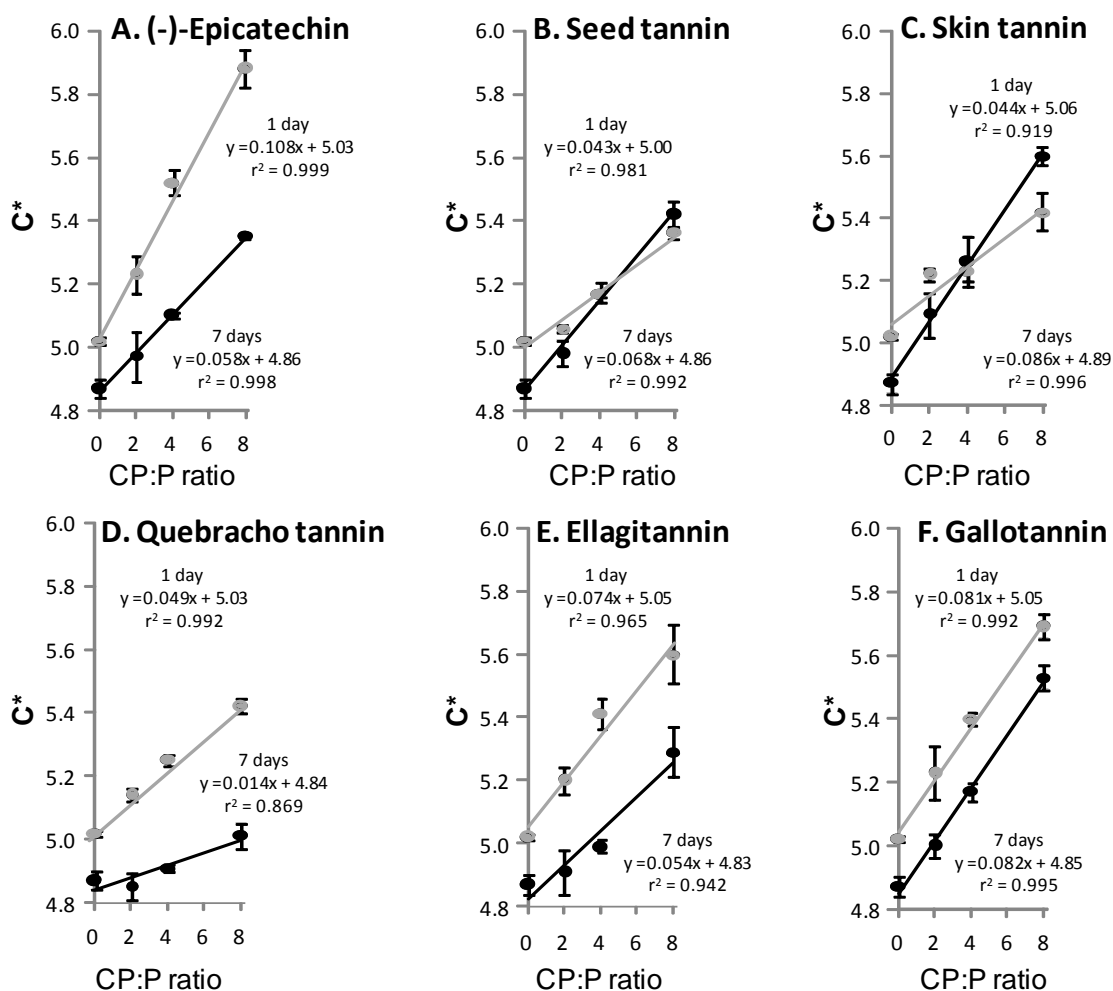
On day 1, the steepest slope was obtained with (–)-epicatechin (see Figure 5A), followed in decreasing order by gallotannin, ellagitannin, quebracho tannin, skin tannin and seed tannin (see Figure 5B–F). In contrast, on day 7 some interesting changes in the slopes were observed. Specifically, the slopes were significantly steeper in the case of seed tannin and skin tannin, and significantly less steep in the case of (–)-epicatechin, ellagitannin and quebracho tannin. No differences were observed in the case of gallotannin.

An increase in the steepness of the  $C^*$  slope between days 1 and 7 suggests that the copigmentation effect had increased or that new red pigments had been formed (Malien-Auberg *et al.*, 2002). In the case of skin tannin, the steeper slope on day 7 was probably due to an increase in the copigmentation effect, because there was no significant decrease in malvidin-3-*O*-glucoside concentration compared with the control solution for the same day. In contrast, the increase in incline of the  $C^*$  slope on day 7 for the solutions containing seed tannin was probably due to both an increase in copigmentation and the formation of new pigments, because the malvidin-3-*O*-glucoside concentration was significant lower than that of the control solution on day 7.

In the case of (–)-epicatechin, ellagitannin and quebracho tannin, the decrease in the incline of the  $C^*$  slope between days 1 and 7 suggests that their copigmentation effect is lower or that malvidin-3-*O*-glucoside had reacted to form new compounds with a different hue. Such a hypothesis seems probable, because a decrease in the malvidin-3-*O*-glucoside concentration was observed in the solutions containing (–)-epicatechin, ellagitannin and quebracho tannin compared with the concentration in the control

## RESULTADOS: Capítulo 2

solutions without these compounds. It has been reported that colorless molecules are formed in solutions containing malvidin-3-*O*-glucoside and oak extract, and that the ellagitannin concentration decreases over time (Jordão *et al.*, 2008).



**Figure 5: Influence of the copigment/pigment ratio on the Chroma (C\*) of a model wine solution of malvidin-3-*O*-glucoside (50 mg/L) supplemented with (-)-epicatechin and diverse oenological tannins.**

All data are the mean  $\pm$  SD of three replicates. CP:P ratio correspond to the quotient between the copigment and pigment concentrations expressed as g/L.  $\text{---}\bullet\text{---}$  : day 1;  $\text{---}\bullet\text{---}$  : day 7.

### Effects on wavelength of maximal absorption

The wavelength of maximal absorption ( $\lambda_{\text{max}}$ ) of the absorption spectra of the malvidin-3-*O*-glucoside solutions was determined (Table 2), with the aim of evaluating the bathochromic effect produced by the presence of the different copigments. No significant differences in  $\lambda_{\text{max}}$  (around 524 nm) between days 1 and 7 were detected in

## RESULTADOS: Capítulo 2

the absence of copigment. Consequently,  $\lambda_{\max}$  was not displaced by the slight but significant degradation of malvidin-3-*O*-glucoside observed under such conditions.

On day 1, the presence of (-)-epicatechin and each of the oenological tannins produced a significant bathochromic displacement. This effect seems to be dose-dependent, because generally the higher the concentration of copigment, the higher the  $\lambda_{\max}$  with the exception of solutions containing skin tannin, quebracho tannin and gallotannin which reached  $\lambda_{\max}$  at lower concentrations. The bathochromic displacement oscillated between 1.7 and 7 nm of  $\lambda_{\max}$ , being particularly high in the case of ellagitannin and quebracho tannin.

**Table 2: Wavelength (nm) of maximum absorbance of a model wine solution of malvidin-3-*O*-glucoside (50 mg/L) supplemented with increasing concentrations of (-)-epicatechin and diverse oenological tannins at 1 and 7 days of treatment.**

Copigment	(g/L)	1 day		7 days	
Control	0.0	524.0 ± 1.4	A α	523.3 ± 0.6	A α
	0.1	526.7 ± 1.2	AB β	524.3 ± 0.6	A α
EC	0.2	528.3 ± 2.5	B β	524.5 ± 0.6	A α
	0.4	529.3 ± 2.9	B β	524.3 ± 0.6	A α
SDT	0.1	525.7 ± 1.2	AB α	524.5 ± 0.5	A α
	0.2	527.0 ± 1.0	B β	524.7 ± 0.6	A α
	0.4	528.7 ± 2.1	B β	524.7 ± 0.6	A α
SKT	0.1	528.0 ± 0.0	B α	527.0 ± 1.0	B α
	0.2	528.7 ± 1.2	B α	526.7 ± 0.8	B α
	0.4	528.7 ± 1.2	B α	531.0 ± 0.1	C β
QT	0.1	531.0 ± 0.1	C β	526.0 ± 0.1	B α
	0.2	531.0 ± 0.1	C β	526.3 ± 0.6	B α
	0.4	527.3 ± 1.2	B α	527.7 ± 1.2	B α
ET	0.1	528.0 ± 0.1	B β	526.3 ± 0.6	B α
	0.2	530.0 ± 1.7	C α	531.0 ± 0.1	C α
	0.4	531.0 ± 0.1	C α	531.0 ± 0.1	C α
GT	0.1	530.0 ± 1.7	B α	526.8 ± 0.3	B α
	0.2	528.0 ± 0.1	B α	530.3 ± 0.6	C β
	0.4	529.3 ± 1.5	B α	531.0 ± 0.1	C β

All data are the mean ± SD of three replicates. EC: (-)-epicatechin; SDT: seed tannin; SKT: skin tannin; QT: quebracho tannin; ET: ellagitannin; GT: gallotannin. Different capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between different doses of each copigment. Different Greek letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between times of treatment.

## RESULTADOS: Capítulo 2

On day 7, the solutions containing skin tannin, quebracho tannin, gallotannin and ellagitannin had maintained the bathochromic displacement, although in the case of quebracho tannin the  $\lambda_{\max}$  was significantly lower than on day 1. In contrast, the bathochromic effect of the solutions containing (–)-epicatechin and seed tannin had completely disappeared, because the  $\lambda_{\max}$  was similar to that of the control solution of malvidin-3-*O*-glucoside.

The decrease in the bathochromic effect observed for (–)-epicatechin, seed tannin and, to a lesser extent, quebracho tannin may have come about for two reasons. It could have been due to a reduction in copigmentation effectiveness, or alternatively the formation of new pigments with a more red-orange hue (Malien-Auberg *et al.*, 2002; Dueñas *et al.*, 2006). The result may have been due to the simultaneous occurrence of both. In contrast, the maintenance of bathochromic displacement in the solutions containing skin tannin and gallotannin, together with the fact that the malvidin-3-*O*-glucoside concentration was similar to that in the control solution, point to the permanence of the copigmentation effect. The particular case of solutions containing ellagitannins is more complicated, because a significant decrease in malvidin-3-*O*-glucoside concentration was detected and it has been reported that new pigments can be formed from these compounds, which have a bluish hue (Jordão *et al.*, 2008; Chassaing *et al.*, 2010). In such case, maintenance of the higher  $\lambda_{\max}$  could be associated with the formation of these new pigments and also to maintenance of the bathochromic effect.

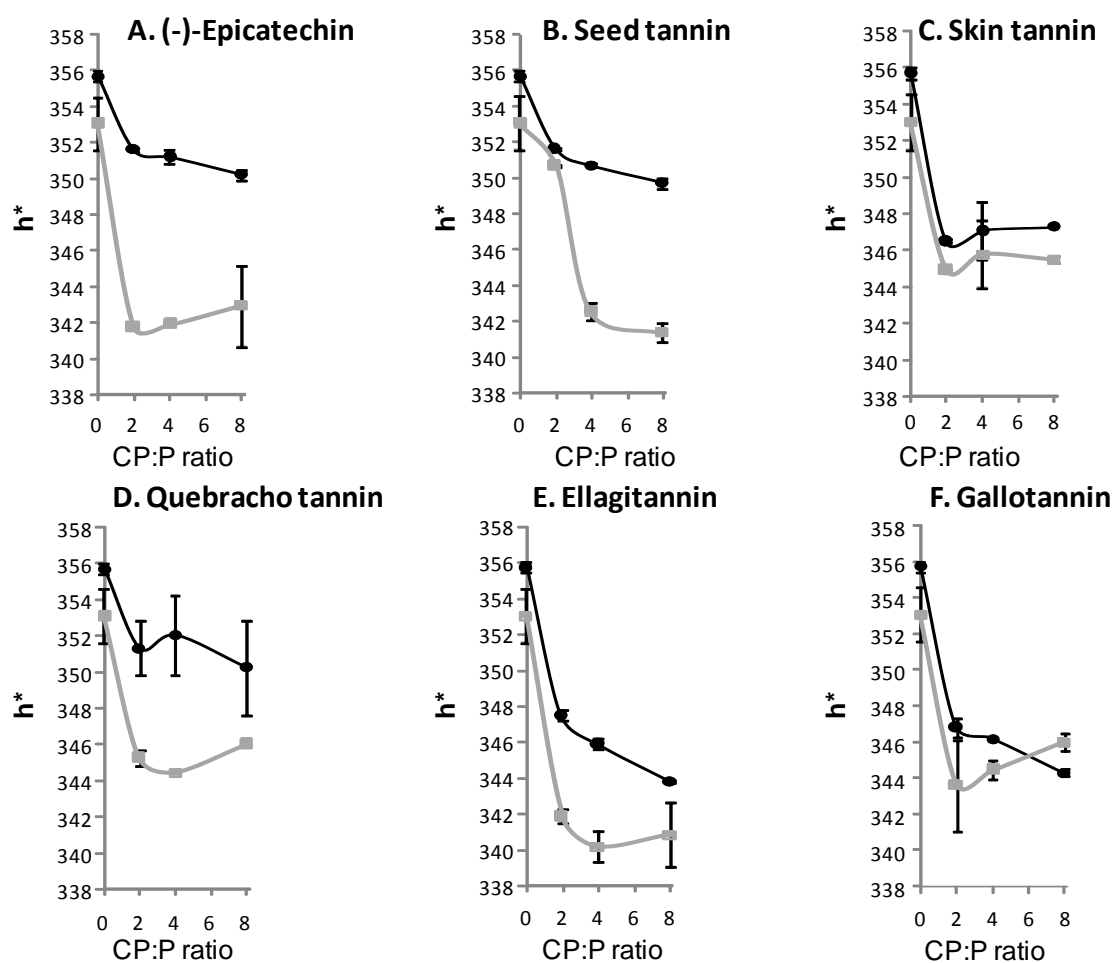
### **Effects on hue**

Figure 6 shows the relation between  $h^*$  and CP:P for (–)-epicatechin and each of the oenological tannins. An increase in  $h^*$  angle for the control solutions of malvidin-3-*O*-glucoside had come about by day 7 compared with day 1. This again confirms the degradation of malvidin-3-*O*-glucoside, which results in a more red-orange color. Supplementation with (–)-epicatechin and each of the tannins brought about a significant decrease in  $h^*$  on day 1, therefore the color of these solutions was clearly more bluish than that of the corresponding control solution. This effect was not dose-dependent, because the decrease in  $h^*$  was generally reached at the lowest CP:P. The decrease in  $h^*$  was clearly maintained on day 7 in the case of solutions containing skin tannin and gallotannin (see Figure 6C, F). The other copigments also caused a decrease in  $h^*$  on day 7, but to a lower extent than on day 1 (see Figure 6A, B, D, E).

The solutions containing skin tannin and gallotannin were the only solutions in which no significant decrease in malvidin-3-*O*-glucoside concentration was detected, therefore it seems that the copigmentation effect is maintained between days 1 and 7. In contrast, the clear increase in  $h^*$  values observed in the presence of the other copigments on day 7 compared with day 1 can be explained by the formation of new pigments and/or a decrease in the copigmentation effect, as discussed above.

## RESULTADOS: Capítulo 2

The changes in  $h^*$  values between days 1 and 7 suggest not only that skin tannin, gallotannin and, to a lesser degree, ellagitannin increase the bluish hue of the solution, but also that this effect is maintained probably because the copigmentation effect lasts longer, and in the case of ellagitannins, because new pigments with a bluish hue may be formed (Jordão *et al.*, 2008; Chassaing *et al.*, 2010). In contrast, (-)-epicatechin and the other oenological tannins exert a bathochromic effect initially, but this decreases over time, probably because new pigments with a red-orange hue are formed (Malien-Auberg *et al.*, 2002; Dueñas *et al.*, 2006) and/or because these compounds are transformed into others with a lower copigmentation effectiveness (Gómez-Míguez *et al.*, 2006).



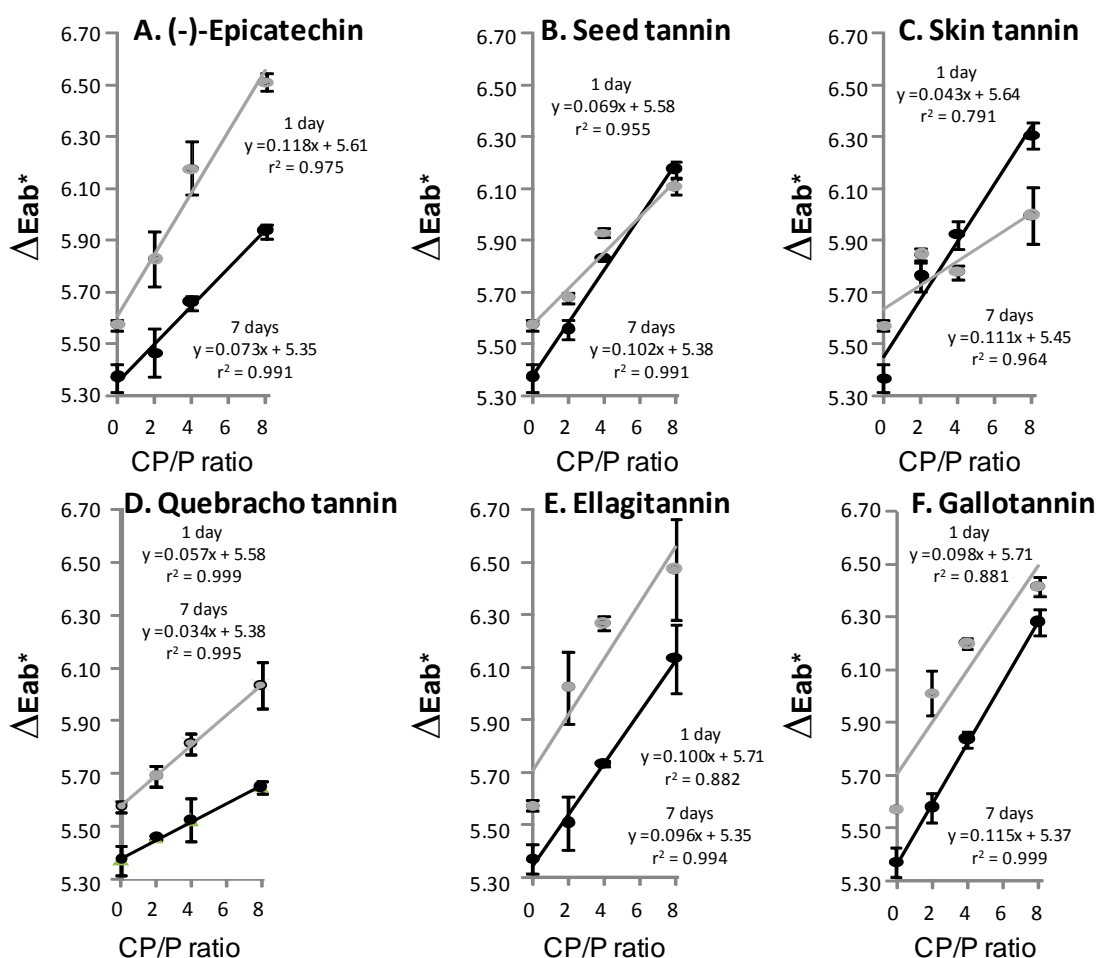
**Figure 6: Influence of the copigment/pigment ratio on the Hue ( $h^*$ ) of a model wine solution of malvidin-3-O-glucoside (50 mg/L) supplemented with (-)-epicatechin and diverse oenological tannins.**

All data are the mean  $\pm$  SD of three replicates. CP:P ratio correspond to the quotient between the copigment and pigment concentrations expressed as g/L. —●— : day 1; —●— : day 7.

## RESULTADOS: Capítulo 2

### Effects on total color differences

To evaluate the effect of the different copigments on the intensity of color, the total color differences (the  $\Delta E_{ab}^*$  values) between the solutions of malvidin-3-*O*-glucoside with or without the different copigments and a pure white color solution were calculated. Generally,  $\Delta E_{ab}^*$  showed a similar trend to that of  $C^*$ , although with some minor differences (Figure 7).



**Figure 7: Influence of the copigment/pigment ratio on the total color differences ( $\Delta E_{ab}^*$ ) of a model wine solution of malvidin-3-*O*-glucoside (50 mg/L) supplemented with (-)-epicatechin and diverse oenological tannins with a pure white color solution.**

All data are the mean  $\pm$  SD of three replicates. CP:P ratio correspond to the quotient between the copigment and pigment concentrations expressed as g/L.  $\bullet$  : day 1;  $\bullet$  : day 7.

### 3. Copigmentation index values

Table 3 summarizes the results for copigmentation index values of (-)-epicatechin and the different commercial tannins investigated. The copigmentation index illustrates simply the effectiveness of the different commercial tannins to improve wine color,

## RESULTADOS: Capítulo 2

which, as discussed, is mainly due to the copigmentation phenomenon. According to the index, on day 1 the best copigment is (-)-epicatechin and ellagitannin, followed in decreasing order by gallotannin, seed tannin, quebracho tannin and skin tannin. However, on day 7 some interesting differences can be observed. First, the copigmentation index of (-)-epicatechin and, to a lesser extent, quebracho tannin and ellagitannin, decrease significantly, suggesting that the copigmentation effect decreases or that malvidin-3-*O*-glucoside reacts to form new compounds with a lesser contribution to the color. In contrast, the copigmentation index of seed tannin, skin tannin and gallotannin increases significantly, probably because the staking structures responsible for the copigmentation effect need time to form completely or because new pigments with a greater contribution to the color are formed (at least in the case of the case of seed tannin).

**Table 3: Copigmentation Index of the different copigments (commercial tannins and (-)-epicatechin).**

Copigment	Time			
	1 day		7 days	
(-)-Epicatechin	16.8 ± 0.4	<b>D β</b>	10.5 ± 0.2	<b>B α</b>
Seed tannin	9.5 ± 0.1	<b>B α</b>	15.0 ± 0.5	<b>C β</b>
Skin tannin	7.8 ± 0.2	<b>A α</b>	17.4 ± 0.3	<b>D β</b>
Quebracho tannin	8.2 ± 0.2	<b>A β</b>	5.1 ± 0.1	<b>A α</b>
Ellagitannin	16.1 ± 0.5	<b>D β</b>	14.1 ± 0.4	<b>C α</b>
Gallotannin	15.1 ± 0.1	<b>C α</b>	17.0 ± 0.4	<b>D β</b>

All data are the mean ± SD of three replicates. Different capital letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the different tannins. Different Greek letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between times of treatment.

### CONCLUSIONS

It can be concluded that all the oenological tannins investigated are good copigments, because they improve the color of a malvidin-3-*O*-glucoside solution. The



## RESULTADOS: Capítulo 2

improvement in color was dose-dependent for each of the tannins, because it was greater when the copigment concentration was higher. Vignault *et al.* (2019) obtained similar results and have shown that pH and ethanol content also have an important influence on the copigmentation effectiveness of oenological tannins. The effect on color varied depending on the botanical origin of the tannins and their chemical structure, probably because some of the tannins can form new pigments with malvidin-3-*O*-glucoside. Specifically, the changes in malvidin-3-*O*-glucoside concentration and color parameters between days 1 and 7 suggest that seed tannin, quebracho tannin and ellagitannin can form new pigments, whereas skin tannin and gallotannin do not seem to do.

Further studies, using not only synthetic media but also real wine, are required to expand our knowledge of the mechanisms by which oenological tannins can improve wine color. It seems that the improvement in color exerted by each of the oenological tannins investigated in the present study was mainly due to the copigmentation effect, because the decrease in malvidin-3-*O*-glucoside concentration was always very low (6.6% in the case of the maximal decrease, with a mean value below 2%). The results prove that supplementation with oenological tannins is an interesting tool for improvement of the color of red wines, and therefore these findings point to the need to include this functionality of oenological tannins in the OIV *International Oenological Codex*.

Finally, this study proposes a copigmentation index (see the equation) to measure the actual effectiveness of commercial tannins, which could be useful for tannin manufacturers and potential users of oenological tannins. The index is based on the total color difference ( $\Delta E_{ab}^*$ ) between each copigment solution and a pure white color solution; it is the best parameter for determining true differences between the color of two solutions, because it reflects the Euclidian distance between two points in the CIELab space. The index also accounts for the percentage increase in  $\Delta E_{ab}^*$  in response to supplementation with the highest dose of tannins (400 mg/L), thereby facilitating its quantification.

### REFERENCES

Ayala F., Echavarri J.F. and Negueruela A.I., 1997. New simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rose wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 357–363.

Ayala F., Echavarri J.F. and Negueruela A.I., 2001. MSCVes.zip.

## RESULTADOS: Capítulo 2

Bakker J. and Timberlake C.F., 1997. Isolation, identification, and characterization of new color stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 35–43.

Bate-Smith E.C., 1973. Haemanalysis of tannins: The concept of relative astringency. *Phytochemistry*, 12, 907–912.

Berké B. and De Freitas V.A.P., 2005. Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chemistry*, 90, 453–460.

Boulton R., 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67–87.

Brouillard R. and Dangles O., 1994. Anthocyanins molecular interactions: The first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chemistry*, 51, 365–371.

Brouillard R. and Dubois J.E., 1977. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in aqueous media. *Journal of the American Chemical Society*, 99, 1359–1364.

Canuti V., Puccioni S., Giovani G., Salmi M., Rosi I. and Bertuccioli M., 2012. Effect of oenotannin addition on the composition of sangiovese wines from grapes with different characteristics. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 220-231.

Celzard A., Szczurek A., Jana P., Fierro V., Basso M.C., Bourbigot S., Stauber M. and Pizzi A., 2015. Latest progresses in the preparation of tannin-based cellular solids. *Journal of Cellular Plastics*, 51, 89–102.

Chassaing S., Lefeuvre D., Jacquet R., Jourdes M., Ducasse L., Galland S., Grelard A., Saucier C., Teissedre P.L., Dangle O. and Quideau S., 2010. Physicochemical studies of new anthocyano-ellagitannin hybrid pigments: About the origin of the influence of oak C-glycosidic ellagitannins on wine color. *European Journal of Organic Chemistry*, 1, 55–63.

Cheyrier V., Dueñas-Paton M., Salas E., Maury C., Souquet J.M., Sarni-Manchado P. and Fulcrand H. 2006. Structure and properties of wine pigments and tannins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 298–305.

De Freitas V., Fernandes A., Oliveira J., Teixeira N. and Mateus N.A., 2017. Review of the current knowledge of red wine colour. *OENO One*, 51.

Dueñas M., Fulcrand H. and Cheyrier V., 2006. Formation of anthocyanidin–flavanol adducts in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, 563, 15–25.

## RESULTADOS: Capítulo 2

Es-Safi N.E., Fulcrand H., Cheynier V. and Moutounet M., 1999. Studies on the acetaldehyde induced condensation of (–)-epicatechin and malvidin-3-O-glucoside in a model solution system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2096–2102.

Fernández de Simón B., Cadahía E., Conde E. and García-Vallejo M.C., 1999. Evolution of phenolic compounds of Spanish oak wood during natural seasoning. First results. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1687–1694.

Francia-Aricha E., Guerra M.T., Rivas-Gonzalo J.C. and Santos-Buelga C., 1997. New anthocyan pigments formed after condensation with flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2262–2266.

Furtado P., Figueiredo P., Chaves Das Neves H. and Pina F., 1993. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 75, 113–118.

Gil M., Kontoudakis N., González E., Esteruelas M., Fort F., Canals J.M. and Zamora F., 2012. Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of cabernet sauvignon and tempranillo wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 7988–8001.

Gómez-Míguez M., González-Manzano S., Escribano-Bailón T., Heredia F.J. and Santos-Buelga C., 2006. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin-3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5422–5429.

Heramosín-Gutiérrez I., Lorenzo E.S. and Espinosa A.V., 2005. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92, 269–283.

Hagerman A.E., 1998. *The Tannin Handbook*. Oxford, OH, USA: Miami University.

Hagerman A.E., Riedl K.M., Jones G.A., Sovik K.N., Ritchard N.T., Hartzfield P.W. and Riechel T.L. 1998. High molecular weight plant polyphenolics (tannins) as biological antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1887–1892.

He F., Liang N.N., Mu L., Pan Q.H., Wang J., Reeves M.J. and Duan C.Q., 2012. Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules*, 17, 1483–1519.

Jordão A.M., Da Silva M.R., Laureano O., Mullen W. and Crozier A., 2008. Effect of ellagitannins, ellagic acid and volatile compounds from oak wood on the (+)-catechin, procyanidin B1 and malvidin-3-glucoside content of model wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14, 260–270.

## RESULTADOS: Capítulo 2

Lempereur V., Blayteyron L., Labarbe B., Saucier C., Klebek H. and Glories Y., 2002a. Groupe National de travail sur les tanins œnologiques: Premiers résultats. *Revue Française d'Oenologie*, 196, 23–26.

Lempereur V., Blayteyron L., Labarbe B., Saucier C., Kelebek H. and Glories Y., 2002b. Groupe national de travail sur les tannins œnologiques: Premiers résultats. Effets instantanés du tanisage sur la couleur. *Revue Française d'Oenologie* 196, 27–29.

Liao H., Cai Y. and Haslam E., 1992. Polyphenol interactions. Anthocyanins: Copigmentation and colour changes in red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59, 299–305.

Magalhaes L.M., Ramos I.I., Reis S. and Segundo, M.A., 2014. Antioxidant profile of commercial oenological tannins determined by multiple chemical assays. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 20, 72–79.

Malacarne M., Nardin T., Bertoldi D., Nicolini G. and Larcher R., 2016. Verifying the botanical authenticity of commercial tannins through sugars and simple phenols profiles. *Food Chemistry*, 206, 274–283.

Malien-Auberg C., Dangles O. and Amiot M.J., 2002. Influence of procyanidins on the color stability of oenin solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3299–3305.

Neves A.C., Spranger M.I., Zhao Y., Leandro M.C. and Sun B., 2010. Effect of addition of commercial grape seed tannins on phenolic composition, chromatic characteristics, and antioxidant activity of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11775–11782.

Obradovic D., Schulz M. and Oatey M., 2005. Addition of natural tannins to enhance the quality of red wine. *Australian and New Zealand Grape Grower and Winemaker*, 493, 52–54.

Obrique-Slifer E., Pena-Neira A., Lopez-Solis R., Ramirez-Escudero C. and Zamora-Marín F., 2009. Phenolic characterization of commercial enological tannins. *European Food Research and Technology*, 229, 859–866.

[OIV] International Organisation of Wine and Vine, 2017. *International Oenological Codex*.

Okuda T., Yoshida T., Hatano T. and Ito H., 2009. Ellagitannins renewed the concept of tannins. In S. Quideau (Ed.), *Chemistry and Biology of Ellagitannins – An underestimated class of bioactive plant polyphenols* (pp. 1–40). Singapore: World Scientific Publishing.

## RESULTADOS: Capítulo 2

Parpinello G.P., Versari A., Chinnici F. and Galassi S., 2009. Relationship among sensory descriptors, consumer preference and color parameters of Italian Novello red wines. *Food Research International*, 42, 1389–1395.

Pascual O, Vignault A, Gombau J, Navarro M, Gómez-Alonso S, García-Romero E, Canals JM, Hermosín-Gutiérrez I., Teissedre P.L. and Zamora F., 2017. Oxygen consumption rates by different oenological tannins in a model wine solution. *Food Chemistry*, 234, 26–32.

Pérez C.A., Wei Y.B. and Guo M.L., 2009. Iron-binding and anti-Fenton properties of baicalein and baicalin. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 103, 326–332.

Quideau S., Varadinova T., Karagiozova D., Jourdes M., Pardon P., Baudry C., Genova P., Diakov T. and Petrova R., 2004. Main structural and stereochemical aspects of the antiherpetic activity of nonhydroxyterphenoyl-containing C-glycosidic ellagitannins. *Chemistry & Biodiversity*, 1, 247–258.

Santos-Buelga C., Bravo-Haro S. and Rivas-Gonzalo J.C., 1995. Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in model solutions. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 201(3), 269–274.

Santos-Buelga C. and De Freitas V., 2009. Influence of phenolics on wine organoleptic properties. In M.V. Moreno-Arribas and M.C. Polo (Eds.), *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 529–570). New York, NY, USA: Springer.

Schwarz M., Wabnitz T.C. and Winterhalter P., 2003. Pathway leading to the formation of anthocyanin vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3682–3687.

Souquet J.M., Cheynier V., Brossaud F. and Moutounet M., 1996. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43, 509–512.

Sylla T., Pouységu L., Da Costa G., Deffieux D., Monti J.P. and Quideau S., 2015. Gallotannins and tannic acid: First chemical syntheses and in vitro inhibitory activity on Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide aggregation. *Angewandte Chemie International Edition*, 54, 8217–8221.

Timberlake C.F. and Bridle P., 1976. Interactions between anthocyanins phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27, 97–105.

Versari A., du Toit W. and Parpinello G.P., 2013. Oenological tannins: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19, 1–10.

Vignault A., Gombau J., Pascual O., Jourdes M., Moine V., Canals J.M., Zamora F. and Teissedre P.L., 2019. Copigmentation of malvidin-3-O-monoglucoside by oenological

## RESULTADOS: Capítulo 2

tannins: Incidence on wine model color in function of botanical origin, pH and ethanol content. *Molecules*, 24, 1448.

Vivas N., 2001. Les tanins oenologiques, d'hier à aujourd'hui: Une révolution discrète que nous devons assimiler dans les pratiques de chais. *Revue des Oenologues et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques*, 28(98), 11–14.

## RESULTADOS: Capítulo 3

## CAPÍTULO 3: Estudio de la interacción entre la mucina y los taninos enológicos mediante la resonancia de plasmones superficiales: relación con la astringencia

Los resultados de este capítulo han sido publicados en la revista *Food Chemistry*, en el artículo titulado: ***Measurement of the interaction between mucin and oenological tannins by Surface Plasmon Resonance (SPR): relationship with astringency.***

Food Chemistry 275 (2019) 397–406



### Measurement of the interaction between mucin and oenological tannins by Surface Plasmon Resonance (SPR); relationship with astringency

J. Gombau<sup>a</sup>, P. Nadal<sup>b</sup>, N. Canela<sup>b</sup>, S. Gómez-Alonso<sup>c</sup>, E. García-Romero<sup>d</sup>, P. Smith<sup>e</sup>, I. Hermosín-Gutiérrez<sup>c</sup>, J.M. Canals<sup>a</sup>, F. Zamora<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, C/ Marcel·lí Domingo 1, 43007 Tarragona, Spain

<sup>b</sup> Centre for Omic Sciences, Avda Universitat 1, 43204 Reus, Spain

<sup>c</sup> Universidad de Castilla-La Mancha, Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Campus Universitario s/n, 13071 Ciudad Real, Spain

<sup>d</sup> Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, Cra. Toledo-Albacete s/n, 13700 Tomelloso, Ciudad Real, Spain

<sup>e</sup> The Australian Wine Research Institute, PO Box 197, Glen Osmond, SA 5064, Australia

#### ARTICLE INFO

##### Keywords:

Oenological tannins  
Mucin  
Molecular interaction  
Surface Plasmon Resonance  
Astringency

#### ABSTRACT

The interaction between stomach porcine mucin and 3 oenological tannins (extract of ellagitannins from oak, extract of gallotannins from gall nuts and extract of proanthocyanidins from grape seeds) was measured by Surface Plasmon Resonance (SPR). These tannins were analysed and their astringency was determined using the Astringency Index method and by tasting. The interaction constants were determined using a Biacore SPR device (1:1 Langmuir binding model). The results indicate that the ellagitannins are more astringent than gallotannins and those, in turn, are more astringent than seed proanthocyanidins if the richness of the commercial extracts is considered. The astringency index of these tannins had high correlation and regression coefficients with their kinetic and thermodynamic dissociation constants. This data support a hypothesis that astringency depends not only on the thermodynamic tendency to form the complex between tannins and salivary proteins but also probably on the time required to dissociate the complex.

## RESULTADOS: Capítulo 3



## RESULTADOS: Capítulo 3

### Measurement of the interaction between mucin and oenological tannins by Surface Plasmon Resonance (SPR); relationship with astringency

Gombau, J.<sup>a</sup>, Nadal, P.<sup>b</sup>, Canela, N.<sup>b</sup>, Gómez-Alonso, S.<sup>c</sup>, García-Romero, E.<sup>d</sup>, Smith, P.<sup>e</sup>, Herмосín-Gutiérrez, I.<sup>c</sup>, Canals, J.M.<sup>a</sup>, Zamora, F.<sup>a</sup>

a Departament de Bioquímica i Biotecnologia, Facultat d' Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, C/ Marcel·lí Domingo 1, 43007-Tarragona, Spain.

b Center for Omic Sciences. Avda Universitat 1. 43204 Reus, Spain.

c Universidad de Castilla-La Mancha, Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Campus Universitario s/n, 13071-Ciudad Real, Spain.

d Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, Ctra. Toledo-Albacete s/n, 13700 Tomelloso, Ciudad Real, Spain.

e The Australian Wine Research Institute, PO Box 197, Glen Osmond SA 5064 Australia.

#### ABSTRACT

The interaction between stomach porcine mucin and 3 oenological tannins (extract of ellagitannins from oak, extract of gallotannins from gall nuts and extract of proanthocyanidins from grape seeds) was measured by Surface Plasmon Resonance (SPR). These tannins were analyzed and their astringency was determined using the Astringency Index method and by tasting. The interaction constants were determined using a Biacore SPR device (1:1 Langmuir binding model). The results indicate that the ellagitannins are more astringent than gallotannins and those, in turn, are more astringent than seed proanthocyanidins if the richness of the commercial extracts is considered. The astringency index of these tannins had high correlation and regression coefficients with their kinetic and thermodynamic dissociation constants. This data support a hypothesis that astringency depends not only on the thermodynamic tendency to form the complex between tannins and salivary proteins but also probably on the time required to dissociate the complex.

**Keywords:** Oenological Tannins, Mucin, Molecular Interaction, Surface Plasmon Resonance, Astringency

## RESULTADOS: Capítulo 3

### 1. Introduction

Astringency has been defined by the American Society for Testing and Materials in 1989 as a complex of sensations of dryness and roughness in the epithelium caused by exposure to substances such as tannins and alum (Llaudy, Canals, Canals, Rozes, Arola, & Zamora, 2004). Excessive astringency is usually considered a negative sensation in wine, however it is widely acknowledged that high-quality red wines have a balanced level of astringency, with the renowned oenologist Emile Peynaud asserting that the harmony, balance and elegance of astringency are signs of great red wines (Peynaud & Blouin, 1980). Peynaud also observed that excessive astringency in wine affects its balance and quality, but on the contrary, a wine lacking in astringency appears flat, bland and without interest.

Wine astringency is caused by the capacity of some phenolic compounds to bind salivary proteins, producing drying and puckering sensations in the mouth (Gawel, 1998; Llaudy et al., 2004). Naturally occurring proanthocyanidins, also called condensed tannins, are mainly responsible for the astringency of red wines. However, aging wine in oak barrels and using oenological tannins can also provide a certain amount of hydrolysable tannins (gallotannins and ellagitannins)(Chira, Zenga, Le Floch, Péchamat, Jourdes & Teissedre, 2015; Navarro, Kontoudakis, Gómez-Alonso, García-Romero, Canals, Hermosín-Gutiérrez, & Zamora, 2016). Both, condensed and hydrolysable tannins contribute to wine astringency. It has been reported that hydrolysable tannins (pentagalloylglucose), which are very nonpolar, precipitates by forming a hydrophobic coat around the protein, whereas the much more polar proanthocyanidins (EC<sub>16</sub>-C) forms hydrogen-bonded cross-links between protein molecules (Hagerman, Rice, & Ritchard, 1998). It has also been described that the enthalpy of the interaction between proteins and proanthocyanidins, associated with hydrophobic interaction and hydrogen bonding, tends to decrease with the age of the wine (McRae, Falconer & Kennedy, 2010) which would explain why the astringency of wines decreases over time.

Proanthocyanidins are released from the solid parts of the grape (skins and seeds) during the maceration process of red winemaking (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean & Dubordieu, 2000). The composition of proanthocyanidins depends heavily on their origin. Seed proanthocyanidins are polymers composed of (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-gallate (Prieur, Rigaud, Cheynier & Moutounet, 1994). Skin proanthocyanidins are composed of the same monomers but also contain (-)-epigallocatechin, and the proportion of (-)-epicatechin-3-gallate is much lower (Souquet, Cheynier, Brossaud & Moutounet, 1996). In addition, seed proanthocyanidins have a lower degree of polymerization (mDP) than skin proanthocyanidins (Cheynier, Prieur, Guyot, Rigaud & Moutounet, 1997). Consequently, skins release procyanidins and prodelphinidins with a higher mDP,

## RESULTADOS: Capítulo 3

whereas seeds mainly release procyanidins with a higher proportion of galloylation and a lower mDP.

Gallotannins are formed by the esterification of gallic acid with the hydroxyl group of a polyol carbohydrate such as glucose (Hagerman et al., 1998). Gallotannins are mixtures of polygalloyl glucoses or polygalloylquinic acid esters with a number of galloyl moieties per molecule ranging from 2 to 12 depending on their plant source (Sylla, Pouységu, Da Costa, Deffieux, Monti & Quideau, 2015).

The chemical structure of ellagitannins consists of an open-chain glucose esterified at positions 4 and 6 by a hexahydroxydiphenoyl unit (HHDP) and a nonahydroxyterphenoyl unit (NHTP) esterified at positions 2, 3 and 5 with a C-glycosidic bond between the carbon of the glucose and position 2 of the trihydroxyphenoyl unit (Quideau, Varadinova, Karagiozova, Joudes, Pardon & Baudry, 2004).

Objective assessment of red wine astringency is usually estimated by tasting. This method, however, needs a group of expert wine tasters and even then there is an inherent subjectivity associated with the process (Velentova, Skrvánková, Panovská & Pokorný, 2002). The perception of astringency also increases with repeated exposure and this can lead to fatigue of the tasters which could alter the result of the tasting (Colonna, Adams & Noble, 2004). In addition, the perception of astringency varies widely among individuals (Fischer, Boulton & Noble, 1994), which makes its objective assessment extremely complicated. For these reasons, there is a great interest in having objective methods to assess astringency.

There are many studies about the use of protein-tannin interactions to investigate astringency mechanisms. Some of these studies use non-salivary proteins such as gelatin (Glories, 1984), ovalbumin (Llaudy et al., 2004), bovine serum albumin (Serafini, Maiani & Ferro-Luzzi, 1997; Soares, Mateus & De Freitas, 2007) or polyproline (McRae et al., 2010) with the aim of improved understanding of the mechanisms involved and also as analytical methods for measuring the intensity of astringency. However, these proteins have structures with limited structural similarity to salivary proteins, which leads to challenges in determining meaningful conclusions. Several studies of protein-tannin interactions using salivary proteins have been reported, using strategies such as nephelometry (De Freitas & Mateus, 2001), viscosity evaluation (Prinz & Lucas, 2000), PAGE-SDS (Gambutì, Rinaldi, Pessina & Moio, 2007), HPLC (Schwarz & Hofmann, 2008), dynamic light scattering (DLS) (Pascal, Poncet-Legrand, Cabane & Vernhet, 2008), FT-MIR spectroscopy (Simoès-Costa, Costa-Sobral, Delgadillo, Cerdeira & Rudnitskaya, 2015), ESI-MS (Canon, Paté, Meudec, Marlin, Cheynier, Giuliani & Sarni-Manchado, 2009), NMR (Cala, Fabre, Fouquet, Dufour & Pianeta, 2010) and microcalorimetry (McRae et al., 2010). More recently, Atomic Force Microscopy (AFM) (Ma, Lee, Liang & Zhou, 2016) and Surface Plasmon Resonance (SPR) (Rafaela, Guerreiro, De Freitas,

## RESULTADOS: Capítulo 3

Sutherland, Goreti & Sales, 2012; Watrelot, Tran, Buffeteau, Deffieux, Le Bourvellec, Quideau & Renard, 2016; Guerreiro, Teixeira, De Freitas, Sales & Sutherland, 2017) have been also used for measuring salivary proteins-tannin interactions.

The phenomenon of surface plasmon resonance occurs due to charge-density oscillation that exists at the interface of two media with dielectric constants of opposite signs, for instance, a metal and a dielectric material (Homola, Yee & Gauglitz, 1999). The resonance is a result of energy and momentum being transformed from incident photons into surface plasmons, and is sensitive to the refractive index of the medium on the opposite side of the metal from the reflected light. The SPR signal is a direct measure of the angle of minimum reflected intensity and is monitored by a fixed array of light-sensitive diodes covering the whole wedge of reflected light. The angle of incidence which results in plasmon formation depends on the thickness of the metal, including the other material adhered to it. When a molecule is fixed to the surface of the metal and another molecule is brought into contact with this surface, the molecular interaction between them can be investigated in real time by measuring the variation of this angle (Akimoto, Sasaki, Ikebukuro & Karube, 2000). Biacore systems exploit SPR and allow not only investigation of the molecular interactions specificity but also the kinetic and thermodynamic constants of their interaction.

The use of SPR for studying the interactions between proteins and tannins has the drawback that can alter the stoichiometry of the interactions that take place in a solution but has the advantage that it allows determining accurately the thermodynamic and kinetic constants of the interaction.

The aim of this work was to study the interaction between mucin and different oenological tannins by Surface Plasmon Resonance (SPR), in order to better understand the mechanism of astringency. Mucin was selected instead of other salivary proteins because it is the protein present at the highest concentration in unstimulated whole human saliva, constituting 20–30% of the total protein (van Nieuw Amerongen, Bolscher & Veerman, 2004). Mucins are highly glycosylated (80%) extracellular glycoproteins with molecular weights ranging from 0.5 to 20 MDa. The protein core (20%) is composed by a central glycosylated region mainly composed by a large number of tandem repeats of serine, threonine and proline (STP repeats). Mucin also has peptide chains, linked to the carboxy-terminals, and sometimes interspersed between the STP-repeats, with a lower glycosylation and with a high proportion of cysteine (>10%). These cysteine rich regions are involved in the formation of mucin polymers via disulfide bond formation (van Nieuw Amerongen et al., 2004). Mucin from porcine stomach was used as a model of salivary protein in these experiments because it was commercially available and has a similar structure to human salivary mucin (Bansil & Turner, 2006).

## RESULTADOS: Capítulo 3

The first objective was to determine the kinetic and thermodynamic interaction constants of each type of tannin with mucin. We have preferred to immobilize mucin in the metallic surface and not tannins because this possibility is more similar to the real behavior. When we taste a red wine we introduce tannins inside the palate where mucin is present. The second objective was to determine whether a relationship exists between these constants and the sensory assessment of astringency elicited by these tannins.

### 2. Material and methods

#### 2.1 Chemicals

Methanol, ethanol, formic acid, acetic acid and hydrochloric acid were of HPLC-grade and were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Methylcellulose, phloroglucinol, ascorbic acid, sodium acetate, ammonium acetate, sodium hydroxide, tannic acid, mucin from stomach porcine type III, Polyvinylpyrrolidone (average molecular weight 10,000; PVP10), phosphate buffered saline, TWEEN 20, HEPES and albumin from chicken egg were purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). (-)-epicatechin ( $\geq 95\%$ ) was purchased from Extrasynthese (Genay, France). All ellagitannin standards (castalagin, vescalagin, grandinin, roburin A, roburin B, roburin C, roburin D and roburin E) were provided by ADERA (Pessac, France).

#### 2.2 Oenological tannins

Three different oenological tannins were used in this study: a proanthocyanidin from grape seeds (Protanpépin, AEB Iberica SA, Castellbisbal, Barcelona, Spain), an ellagitannin from oak (Ellagitan Chêne, AEB Iberica SA, Castellbisbal, Barcelona, Spain) and a gallotannin from Chinese natural gall nuts (Tannic acid, Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA).

#### 2.3 Tannin analysis by precipitation with methyl-cellulose.

All oenological tannin extracts were analyzed using the methyl-cellulose precipitation method (Sarneckis, Dambergs, Jones, Mercurio, Herderich & Smith, 2006). Briefly, solutions of 2 g/L of each oenological tannin extracts were prepared in a model wine synthetic solution (12 % v/v ethanol, 4 g/L tartaric acid adjusted to pH 3.5 with sodium hydroxide). A fixed volume of these solutions (seed tannins: 125  $\mu\text{L}$  of, ellagitannin: 125  $\mu\text{L}$ ; gallotannin: 25  $\mu\text{L}$ ) was placed in two centrifuge tubes. 1 mL of methylcellulose solution (0.4 % w/v) and 1 mL of saturated ammonium sulfate solution was added to tube A and the volume was made up to 5 mL. Tube B was prepared similarly but the addition of 1 mL methyl cellulose solution was omitted and replaced with 1 mL water. After standing at room temperature for 20 minutes, the samples were centrifuged and the absorbance of the supernatant measured at 280 nm using a Helios alpha UV–visible spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA). The

## RESULTADOS: Capítulo 3

difference in absorbance at 280 nm ( $\Delta A_{280}$ ) between tube B and tube A correspond to the tannin content of the sample. The tannin purity (mg of tannin/g of commercial product) of the different oenological tannin extracts was estimated by interpolating the  $\Delta A_{280}$  in two different calibration curves depending on the tannin type, normalized by the weight of the sample. Specifically, proanthocyanidins were interpolated using a (-)-epicatechin calibration curve because it is the main subunit of condensed tannins. In contrast, gallotannins were interpolated using a tannic acid calibration curve because this gallotannin is available at high purity level. Tannic acid was used as a standard for ellagitannins because of the lack of pure commercial vescalagin or other ellagitannins in sufficient quantity. The magnitude of the calibrations were different because the molar absorptivity coefficients of (-)-epicatechin ( $3251 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;  $0.0112 \text{ L}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) and tannic acid ( $75703 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ;  $0.0445 \text{ L}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) are quite different resulting in quite different interpolations depending on the chosen calibration standard. For example, when concentrations are expressed in mg/L, the interpolation using a tannic acid calibration gives values around 4 times lower than when the interpolation was performed using a (-)-epicatechin calibration. All samples were analysed in triplicate.

### **2.4 Ellagitannin analysis by HPLC**

The sample of ellagitannin oak extract (20 mg) was dissolved in 1.5 mL of solvent A (see below). Then, the ellagitannin fraction was isolated (Sephadex LH-20 cartridge) and analysed (separation, identification and quantification) following a previously reported HPLC method (Navarro, Kontoudakis, Canals, García-Romero, Gómez-Alonso, Zamora & Hermosín-Gutiérrez, 2017). The HPLC was an Agilent 1100 Series system (Agilent, Waldbronn, Germany) equipped with DAD (G1315B) and an LC/MSD Trap VL (G2445C VL) electrospray ionization mass spectrometer (ESI-MSn) system, and coupled to an Agilent ChemStation (ChemStation for LC 3D systems, Rev. B.01.03, Agilent Technologies) data-processing station. The chromatographic separation was performed on a fused core, small particle size column (Ascentis Express, 150x4.6 mm, 2.7 particle size; Supelco), at 40 °C. The injection volume was 20  $\mu\text{L}$  and the elution solvents A (0.4% formic acid in water) and B (0.4% formic acid in methanol) which were used with the described linear gradient of elution of the used method. The ellagitannins, gallic acid and ellagic acid were identified by matching the retention time and spectral data (DAD-UV-vis and MS/MS) with those of authentic standards. The quantitation was performed using the DAD-chromatograms extracted at 250 nm. Figure 1A shows the obtained chromatogram. The sample was analysed in triplicate.

### **2.5 Gallotannin analysis by HPLC-DAD-ESI-QTOF**

An aqueous solution of 2 g/L of gallotannin gallnut extract was diluted (1:3) with 40 mM aqueous sodium acetate. The HPLC was a 1260 Infinity high performance liquid chromatography system coupled to a diode array detector (DAD) and a 6545

## RESULTADOS: Capítulo 3

quadrupole-time of flight (Q-ToF) mass spectrometer detector (Agilent, Waldbronn, Germany). The control software was MassHunter Workstation (version B.06.11). The Q-ToF used a Dual Jet Stream Electrospray Ionization (Dual AJS-ESI) source operated in the negative ionization mode and the following parameters were set: capillary voltage, 3500 V; fragmentor, 100; gas temperature, 325 °C; drying gas, 10 L/min; nebulizer, 45 psig; sheath gas temperature, 350 °C; sheath gas flow, 11 L/min; acquisition range, 100-2000 m/z; and fixed collision energy of 25. Samples were analyzed by injection (5 µL) on an Ascentis Express column (150x4.6 mm, 2.7 µm particle size; Supelco, Madrid, Spain) thermostatted at 16 °C. The solvent system, at a flow rate of 0.5 ml/min, was water with 1% acetic acid (solvent A) and methanol (solvent B). The elution gradient was (time, % of solvent A): 0 min, 94%; 10 min, 80%; 50 min, 50%; 55 min, 5%; 65 min, 5%; 70 min, 94%; 10 min equilibrium time was left between analysis. Compounds were identified using the algorithm "Find by Formula" that evaluated the mass accuracy together with the isotopic relative abundance and isotopic separation. Quantitation was performed using the chromatograms acquired at 280 nm using gallic acid as external standard. Figure 1B shows the obtained chromatogram. The sample was analyzed by triplicate.

### **2.6 Proanthocyanidins analysis by HPLC**

The proanthocyanidin grape seeds extract was analyzed by acid-catalyzed depolymerization in the presence of an excess of phloroglucinol and the products of the reaction were separated by RP-HPLC-DAD (Kennedy & Jones, 2001). Five mL of the seed tannin solution (2 g/L) was evaporated under a low-pressure vacuum (Univapo 100 ECH, Uni Equip, Germany). Subsequently, it was resuspended in 6 mL of distilled water and then applied to Sep Pak Plus tC18 Environmental cartridges (Waters, Milford, MA, USA) that had previously been activated with 10 mL of methanol and 15 mL of water. The samples were washed with 15 mL of distilled water, and then the proanthocyanidins were eluted with 6 mL of methanol, immediately evaporated under a vacuum, and re-dissolved in 1 mL of methanol. Finally, 100 µL of this sample was reacted with a 100 µL phloroglucinol solution (0.2 N HCl in methanol, containing 100 g/L phloroglucinol and 20 g/L ascorbic acid) at 50 °C for 20 min. The reaction was stopped by adding 1000 µL of 40 mM aqueous sodium acetate. Reversed-phase HPLC analysis (Agilent series 1200 HPLC-DAD) was carried out with an Agilent Zorbax Eclipse XDBC18, 4.6 × 250 mm, 5 mm column (Agilent Technologies) as described below, and the injection volume was 30 µL. The solvents used were 1% aqueous acetic acid (solvent A) and methanol (solvent B) at a flow rate of 1 mL/min. The elution conditions were 1.0 mL/min. Elution was performed with a gradient starting at 5% B for 10 min, a linear gradient from 5 to 20% B in 20 min, and a linear gradient from 20 to 40% B in 25 min. The column was then washed with 90% B for 10 min and re-equilibrated with 5% B for 5 min before the next injection. The monomers (+)-catechin, (-)-epicatechin, and (-)-epicatechin-3-O-gallate were identified by comparing their retention times with

## RESULTADOS: Capítulo 3

those of the pure compounds and quantified using calibration curves of each monomer. The phloroglucinol adducts of (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin, and (-)-epicatechin-3-O-gallate were identified by their retention time (described in the literature) and confirmed through an HPLC-MS analysis. The quantification of phloroglucinol adducts was performed considering the coefficients described by (Kennedy & Jones, 2001) because the difficulty of obtaining these adducts.

The number of terminal subunits was considered to be the difference between the total monomers measured in normal conditions (with phloroglucinol and acid) and that obtained when the analysis was performed without phloroglucinol and acid addition. The number of extension subunits was considered as the addition of all the phloroglucinol adducts. The mean degree of polymerization (mDP) was calculated by adding the terminal and extension subunits (in moles) and dividing by the terminal subunits. The percentage of prodelphinidins was calculated as the quotient between total (-)-epigallocatechin units and total monomeric units expressed as a percentage. The percentage of galloylation was calculated as the quotient between total (-)-epicatechin-3-gallate units and total monomeric units. Figure 1C shows the obtained chromatogram. The sample was analysed in triplicate.

### **2.7 Astringency index analysis**

The astringency index was determined using the method proposed by Llaudy et al. (2004). Tannic acid standards, the samples of oenological tannins and ovalbumin solutions were prepared in a model wine solution (12% ethanol, 4g/L tartaric acid, adjusted at pH 3.5). The calibration was made using solutions of increasing concentrations of tannic acid (0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 g/L). For each tannic acid concentration, 6 Eppendorf tubes were prepared containing 600  $\mu$ L of increasing concentrations of ovalbumin (0.0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 and 4.0 g/L). To each tube was added 600  $\mu$ L of corresponding tannic acid solution or wine. The tubes were stirred, and 10 min after, the samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min (Sorval RC5C). The supernatants were diluted 1/50 with distilled water. Absorbance was measured immediately at 280 nm (Helios alpha UV-visible spectrophotometer, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltman, MA) in a quartz bucket with an optical path of 10 mm. The decrease of the absorbance at 280 nm for each tannic acid concentration solution versus the concentration of added ovalbumin solution was fitted adequately to a logarithmic equation. The fitted logarithmic equation slopes and the initial tannic acid concentrations were later fitted linearly to obtain the calibration line. This procedure was also applied to solutions of ellagitannin (2 g/L), seed tannin (2 g/L) and gallotannin (0.5 g/L) extracts, and the logarithmic equation slopes were interpolated in the calibration line to obtain the astringency index referred to commercial product of each tannin (expressed as g of tannic acid/g of commercial product). Astringency index



## RESULTADOS: Capítulo 3

was also referred to the real tannin content (expressed as moles of tannic acid/moles of tannin) considering the tannin purity and the medium molecular weight of each tannin. In the case of seed tannin extract it was considered the purity obtained by the methyl-cellulose precipitation method whereas for the other tannin extracts it was considered the purity obtained by HPLC. In all the cases the medium molecular weight was obtained from the HPLC data. The samples were analysed in triplicate.

### **2.8. Surface plasmon resonance analysis**

Biacore 3000 (Biacore Inc., Uppsala, Sweden) with the Biaevaluation software was used for the SPR experiments to study the interaction between mucin from porcine stomach and the three different oenological tannins. Mucin from porcine stomach (Molecular weight: 0.5 to 20 MDa) was immobilized, via amine coupling, on separate channels of a C1 sensor chip. This sensor chip was selected to avoid the possible unspecific interactions of tannins with the dextran that are present in other more usual sensor chips like CM5. Amino coupling was selected instead of aldehyde coupling because it can be used for all types of proteins (glycoproteins or not).

First, the chip was activated by EDC (0.4 M)/NHS (0.1 M) followed by an injection of the protein (100 µg/mL) dissolved in sodium acetate (10 mM; 10µL/min for 7 min) using HEPES (10 mM; pH = 5.0) as running buffer. After immobilization of the protein, any unreacted NHS esters were deactivated by injecting an excess of ethanolamine hydrochloride followed by 150mM NaOH to remove any non-specific adsorption. The three different oenological tannin extracts studied were diluted in binding buffer (10 mM phosphate, 138 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.005% tween-20, pH 7.4), filtered (0.45 µm) and injected at 20°C for 6 min at a flow rate of 5 µL/min for association and followed by 6 min dissociation. Surface regeneration was achieved by repeated injections of a mixture of 1g/L PVP and 150 mM NaOH. The binding of tannins was analyzed through corresponding changes in the refractive index of optical signals (wavelength: 750 nm), and expressed as resonance units (RU). All sensorgrams were corrected for nonspecific binding and refractive index changes by subtracting the signals of an equivalent injection across the underivatized flow cell. All reagents and buffers were prepared in Milli-Q water and were previously filtered.

The kinetic and thermodynamic interaction constants between mucin and the different tannins were calculated considering the tannin molar concentration of each commercial oenological tannin extract and using a 1:1 Langmuir binding model (Roy, Pugniere, Julien & Chopineau, 2001). Similarly than in the case of the astringency index analysis the purity obtained by the methyl cellulose precipitation method was used for the seed tannin extract and that obtained by HPLC for the other tannin extracts. The medium molecular weight obtained from the HPLC data was considered in all the cases.

## RESULTADOS: Capítulo 3

### 2.9 Sensory analysis

All sensory analyses were performed in the tasting room of the Faculty of Enology of Tarragona (University Rovira i Virgili). All the samples were tasted by a group of eighteen experts from the Rovira i Virgili University. A sensory training session was held beforehand so that the experts could homogenize criteria. Two sessions of sensory evaluation of the oenological tannin astringency were carried out in which the only sensory attribute evaluated in all samples was the astringency intensity on a scale from 0 to 10. Samples were served randomly to avoid the influence of tasting order. Dark glasses were used to avoid the influence of color.

Solutions of the different commercial tannin extracts (0.5 g/L) dissolved in mineral water were tasted in the first session. The second session was performed with equimolar solutions of the different tannins to compensate the different richness detected in the commercial products. Considering richness and mean molecular weight, as it has been explained above, the molar concentration of the 0.5 g/L solution of the purest commercial product (gallotannin) is equivalent to 0.31 mM. This purest tannin was considered as reference and consequently solutions of this equimolar concentration were prepared and tasted.

### 2.10 Statistics

All chemical analytical data are expressed as the arithmetic mean  $\pm$  standard deviation of the samples from three analytical repetitions. The analysis of variance (ANOVA) was carried out using XLSTAT software. The astringency sensory intensity of the different tannins was calculated as the arithmetic mean  $\pm$  standard deviation of the average score of the panel. Pearson's correlation of data and linear regressions were performed using XLSTAT software.

## 3. Results and discussion

Table 1 shows the chemical characterization of the three studied oenological tannin extracts which have been analyzed by HPLC and also by precipitation with methylcellulose method. The HPLC chromatogram of the ellagitannin oak extract (Figure 1A) shows 10 identified peaks corresponding to 8 ellagitannins (roburins A, B, C, D and E, grandinin, vescalagin and castalagin). The other two peaks correspond to gallic and ellagic acids. Castalagin and vescalagin are generally considered as the most abundant ellagitannins (between 40-60%) in oak wood and these two compounds are also the main ellagitannins found in wines aged in oak barrels (Chira & Teissedre, 2013; Navarro et al., 2016). However, according to our results, the content of castalagin and vescalagin of the analyzed ellagitannin is not high; castalagin and vescalagin only represent 28% of total ellagitannins and roburin B and C (quantified jointly), though roburin E and grandinin are in higher concentrations.

## RESULTADOS: Capítulo 3

According to this HPLC analysis of this commercial ellagitannin extract, the total ellagitannin content was  $143.8 \pm 1.1$  mg/g of commercial product with a mean molecular weight of 1233.6 g/mol. Analysis of this commercial ellagitannin using the methylcellulose precipitation method gave a total tannin content of  $125.5 \pm 3.4$  mg/g of commercial product. The similarity of these results suggest that the methylcellulose precipitation method can be considered as appropriate for measuring the ellagitannin richness of commercial extracts in a simple and economical way.

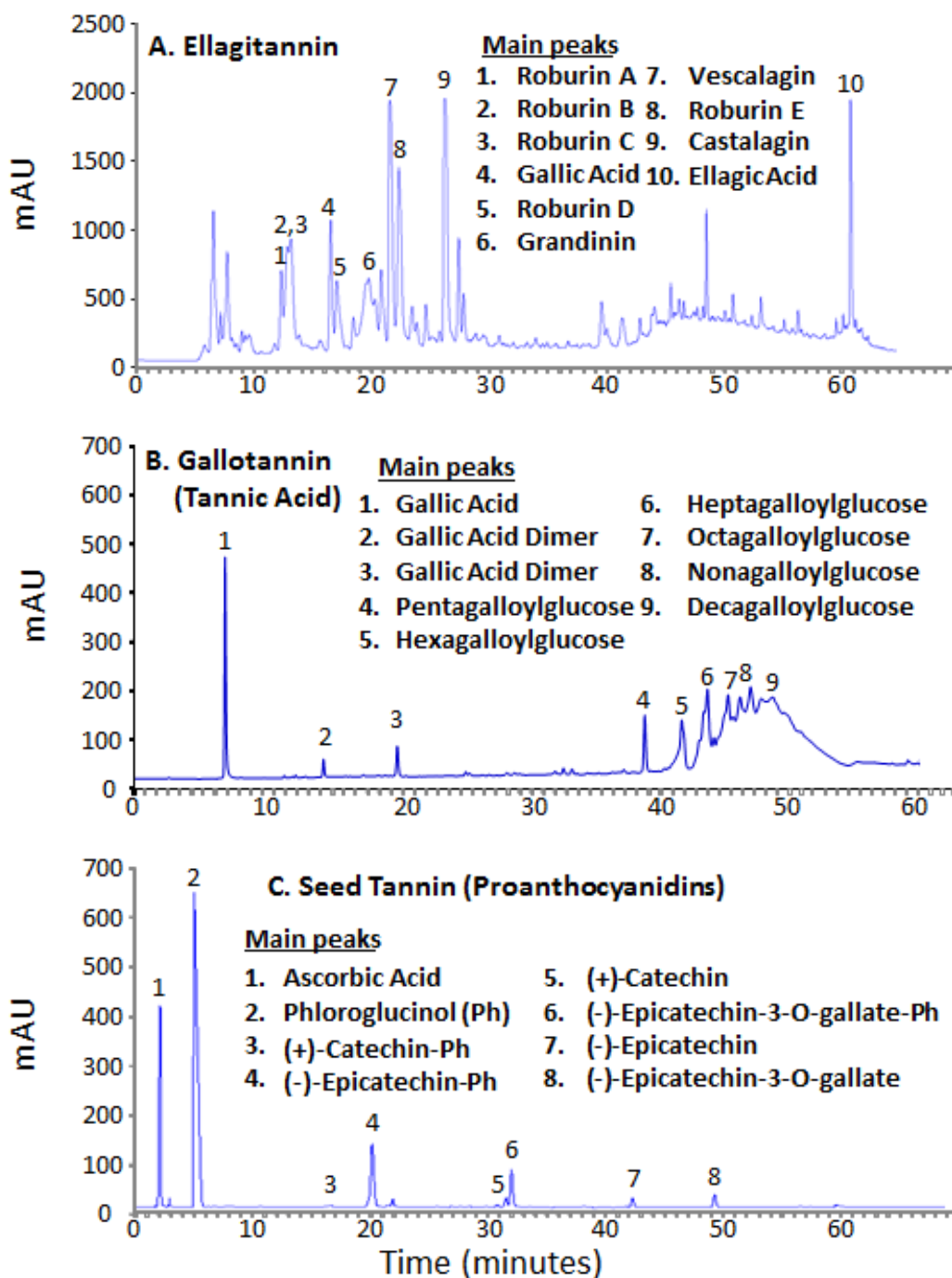


Figure 1: HPLC Chromatograms of the different oenological tannins.

**Table 1: Chemical characterization and astringency indicators of the oenological tannins.**

A. Elagitannin					B. Gallotannin (Tannic Acid)				C. Seed Tannin (Proanthocyanidins)			
Anal. method	Compound	MW	Concentration		Compound	MW	Concentration		Compound	MW	Concentration	
			mg/g	μmol/g			mg/g	μmol/g			mg/g	μmol/g
HPLC	Roburin A	1851.3	6.9 ± 0.1	3.72 ± 0.05	Pentagalloylglucose	940.7	19.6 ± 1.2	20.8 ± 1.3	PA	1414.6	269.1 ± 23.4	190.2 ± 16.5
	Roburin BC	1983.4	39.7 ± 0.1	20.01 ± 0.06	Hexagalloylglucose	1092.8	42.5 ± 3.2	38.9 ± 2.9	mDP		4.49 ± 0.3	
	Roburin D	1850.3	9.3 ± 0.6	5.05 ± 0.31	Heptagalloylglucose	1244.9	137.1 ± 7.2	110.1 ± 5.8	PD (%)		N.D.	N.D.
	Grandinin	1066.8	22.8 ± 0.1	21.39 ± 0.09	Octagalloylglucose	1397.0	127.5 ± 8.4	90.9 ± 6.0	GAL (%)		16.4 ± 0.2	
	Vescalagin	934.6	18.5 ± 0.0	19.81 ± 0.05	Nonagalloylglucose	1549.1	174.5 ± 12.1	112.6 ± 7.8	Flavan-3-ols monomers	315.0	50.0 ± 0.3	158.7 ± 1.0
	Roburin E	1066.8	24.2 ± 0.1	22.72 ± 0.09	Decagalloylglucose	1701.2	415.5 ± 27.3	244.2 ± 16.0	C	290.3	20.8 ± 0.1	71.5 ± 0.3
	Castalagin	934.6	22.3 ± 0.1	23.86 ± 0.11	Total gallotannins	1483.3	916.2 ± 58.2	617.6 ± 39.2	EP	290.3	21.8 ± 0.1	75.0 ± 0.3
	Total Elagitannins	1233.6	143.8 ± 1.1	116.6 ± 0.9	Gallic Acid	170.1	53.3 ± 2.0	313.2 ± 11.5	EPG	458.4	7.5 ± 0.1	16.3 ± 0.2
	Gallic Acid	170.1	6.7 ± 0.4	39.31 ± 2.56	Gallic Acid Dimer 1	322.2	4.8 ± 0.2	14.8 ± 0.5	EGC	306.3	N.D.	N.D.
	Ellagic Acid	302.2	1.8 ± 0.0	5.9 ± 0.03	Gallic Acid Dimer 2	322.2	9.7 ± 2.9	30.1 ± 9.0	Total phenolic compounds		319.1 ± 23.7	
Total phenolic compounds		152.3 ± 1.6		Total phenolic compounds		983.9 ± 51.2		Total tannins		633.1 ± 2.3		
Total tannins		125.5 ± 3.4		Total tannins		869.6 ± 2.6		Other phenolic compounds		273.7 ± 9.5		
Other phenolic compounds		235.6 ± 3.3		Other phenolic compounds		125.5 ± 3.4		Total Phenolic compounds		906.8 ± 11.5		
Total Phenolic compounds		351.1 ± 6.7		Total Phenolic compounds		995.1 ± 6.0						
A. Elagitannin					B. Gallotannin (Tannic Acid)				C. Seed Tannin (Proanthocyanidins)			
Sensory Astringency (solutions of 0.5 g of tannin extract/L)			1.6 ± 0.5 A		Sensory Astringency (Tannin equimolar solutions (0.31 mM))			3.8 ± 0.6 B		2.4 ± 0.5 AB		
Sensory Astringency (Tannin equimolar solutions (0.31 mM))			6.2 ± 0.9 B		Sensory Astringency (Tannin equimolar solutions (0.31 mM))			3.8 ± 1.8 A		3.0 ± 1.3 A		
Astringency Index tannin extract (g of tannic acid/ g of tannin extract)			0.24 ± 0.01 A		Astringency Index tannin extract (g of tannic acid/ g of tannin extract)			1.06 ± 0.02 C		0.62 ± 0.02 B		
Astringency Index tannin (mol of tannic acid/ mol of tannin)			1.26 ± 0.04 C		Astringency Index tannin (mol of tannic acid/ mol of tannin)			1.06 ± 0.02 B		0.86 ± 0.02 A		

All data are the mean ± SD of three replicates. MW: Molecular weight; PA: proanthocyanidins; mDP: mean degree of polymerization; PD (%): percentage of prodelphinidins; GAL (%): percentage of galloylation; C: (+)-catechin; EP: (-)-epicatechin; EPG: (-)-epicatechin-3-O-gallate; EGC: (-)-epigallocatechin. Different letters indicate the existence of statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS: Capítulo 3

The HPLC chromatogram of the gallotannin extract (tannic acid) (Figure 1B) shows 9 identified peaks corresponding to gallic acid, two gallic acid dimers and the gallotannins comprised between pentagalloylglucose and decagalloylglucose, the former being the most abundant compound (45%). According to this HPLC analysis the total gallotannin content of this commercial product was  $916.2 \pm 58.2$  mg/g of commercial product with a mean molecular weight of 1483.3 g/mol. According to the specification sheet of the supplier (Sigma- Aldrich, Steinheim, Germany), tannic acid is decagalloylglucose with a molecular weight of 1701.2 and a loss on drying  $\leq 12\%$ . However, as previously noted this gallotannin extract is not pure decagalloylglucose as it contains appreciable proportions of other gallotannins of lower molecular weight. In any case, our results show that the real richness (91.6%) is very close to the dry weight of the commercial product specified by the provider. The analysis of this gallotannin extract by the methylcellulose precipitation method also gave a similar result  $869.6 \pm 2.6$  mg/g of commercial product which confirm that this method can be useful for quality control of commercial tannins.

The HPLC chromatogram of the seed tannin extract after acidic cleavage in the presence of an excess of phloroglucinol showed 8 peaks (Figure 1C). The first two peaks corresponded to the excess of two reagents (ascorbic acid and phloroglucinol) whereas the other 6 peaks corresponded to the different products of the phloroglucinolysis. The terminal subunits are quantified as flavan-3-ol monomers, (+)-catechin, (-)-epicatechin and (-)-epicatechin-3-O-gallate, while the extension subunits are quantified as adducts flavan-3-ol-phloroglucinol, (+)-catechin-phloroglucinol, (-)-epicatechin-phloroglucinol and (-)-epicatechin-3-O-gallate-phloroglucinol. The peaks of the other subunit, (-)-epigallocatechin and (-)-epigallocatechin-phloroglucinol, were not detected because this tannin was extracted from grape seeds that does not contain this flavan-3-ol monomer (Prieur et al., 1994). The data allows calculation of the total proanthocyanidin richness of the commercial tannin, the percentage of prodelphinidins, the percentage of galloylation and the mean degree of polymerization (mDP). According to our data the total proanthocyanidins content of this commercial seed tannin extract was  $269.1 \pm 23.4$  mg/g of commercial product. In contrast, the total tannin content obtained by the methylcellulose method was  $633.1 \pm 2.3$  mg/g of commercial product. Contrary to the observation with the ellagitannin and gallotannin extracts, the results of the proanthocyanidin concentration measured by methylcellulose precipitation do not match those obtained by HPLC after acidic cleavage in the presence of an excess of phloroglucinol. This difference could be due to different causes such as the commercial seed extract contain some tannins already bound to other macromolecules, to the fact of not all the interflavanic bonds can be cleaved in the presence of an excess of phloroglucinol or because the concentration was estimated after C18 extraction while the tannin content by methylcellulose assay was directly measured on the tannin extract. As such, the proanthocyanidin richness obtained by methylcellulose precipitation method seems likely to be closer to the real

## RESULTADOS: Capítulo 3

richness than that obtained by the acid catalyzed depolymerization method. However, acidic cleavage does afford information about the proanthocyanidin mean degree of polymerization (4.49) and the mean molecular weight (1414.6 g/mol) that are necessary for estimating the thermodynamic and kinetic association and dissociation constants between the different tannins and mucin.

Table 1 also shows the astringency indicators of the different tannin extracts. The sensory evaluation of the astringency was performed by comparing solutions of the same concentration (0.5 g of tannin extract/L) and also comparing solutions of the same tannin molarity (0.31 mM) considering the richness of the different tannin extracts and the corresponding mean molecular weight of the tannins that contain. When the comparison of the astringency intensity was performed with solutions of 0.5 g of tannin extract/L, the gallotannin extract was scored as the most astringent followed in decreasing order by seed tannin extract and ellagitannin extract that was considered the least astringent. This sensory evaluation is useful to classify the commercial extracts by function of their astringency but cannot classify the different type of tannins by their real astringency because the commercial products have notable differences in their richness. In fact, when the equimolar solutions were compared, ellagitannin was clearly the most astringent followed by gallotannin and seed tannin. These data indicate that the commercial gallotannin extract is more astringent than commercial seed tannin extract, which is more astringent than the commercial ellagitannin extract. If the purity of the products is considered though, the order changes and ellagitannins is really more astringent than gallotannins which, in turn, is more astringent than seed tannins. This order was confirmed by the astringency index. When expressed as grams of tannic acid/g of commercial product, the astringency of the different commercial tannin extracts was classified in the same order as the sensory evaluation of solutions of 0.5 g/L, whereas when it was expressed as mol of tannic acid/mol of tannin the classification of astringency is in the same order as the sensory evaluation of the equimolar solutions.

The observed higher astringency of ellagitannins makes some sense given the relative concentrations of proanthocyanidins and ellagitannins observed in wines aged in oak barrels. Usually ellagitannins are present in much lower concentration than proanthocyanidins (Chira & Teissedre, 2013) but their presence exert a clear influence in the final wine astringency, especially when the wines are aged in new French oak barrels (Navarro et al., 2016).

Figure 2 shows the obtained SPR sensorgrams of the different types of oenological tannin extracts in a C1 sensor chip in which mucin from porcine stomach was immobilized. When the three commercial tannin extracts were injected into the system the SPR signal (resonance units - RU) increased depending on tannin concentration, confirming that all these tannins interact with the fixed mucin. In all

## RESULTADOS: Capítulo 3

sensorgrams two steps are clearly distinguished, the association step between the different tannins and fixed mucin, which last from 100 to 460 seconds, and the dissociation step which starts when the tannin injection is stopped and only the buffer is flowing. The highest increase in SPR signals in relation to the injected tannin concentration was produced by ellagitannin extract (Figure 2A) followed in decreasing order by gallotannin (Figure 2B) and seed tannin (Figure 2C) extracts.

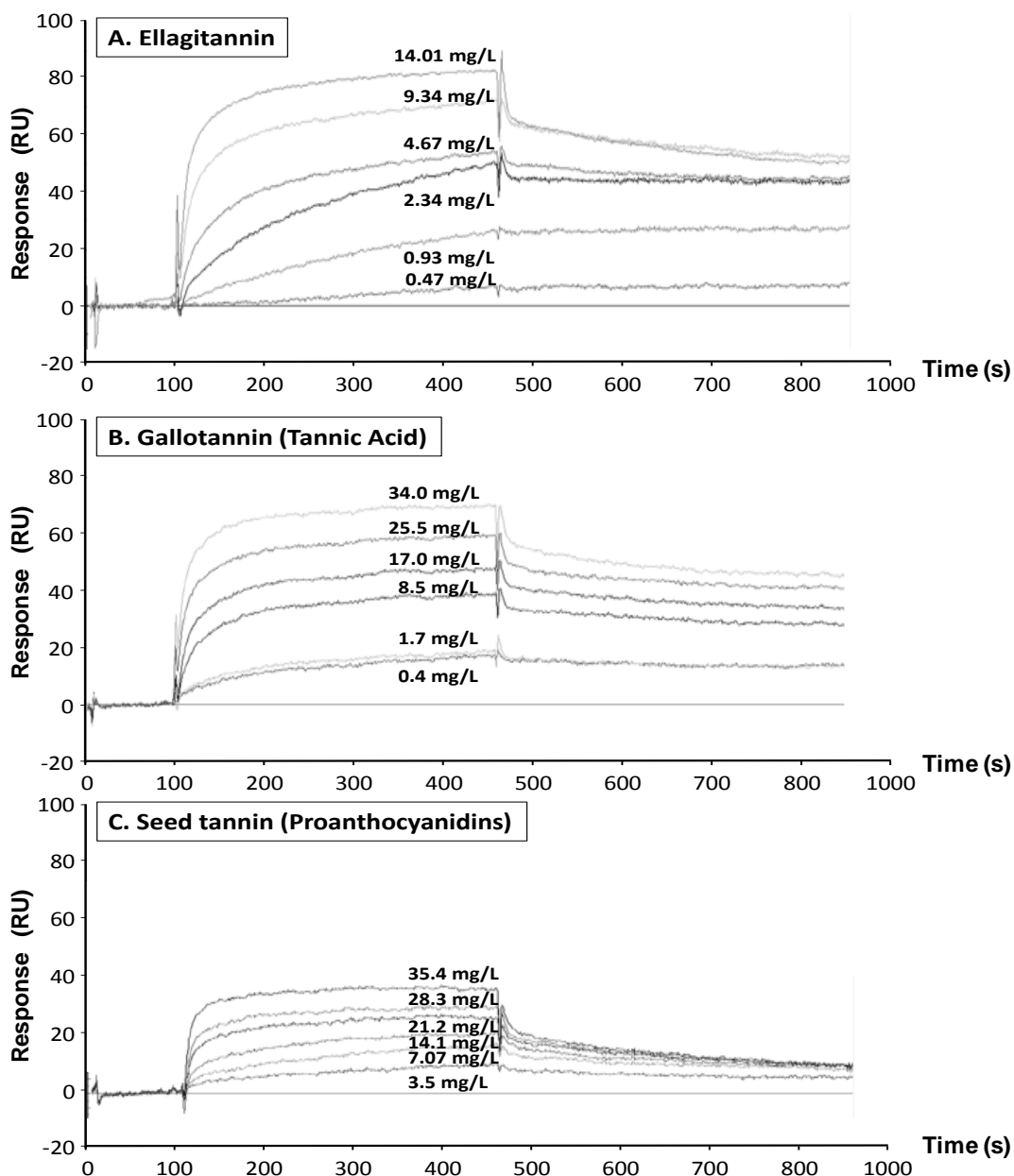


Figure 2: SPR Sensograms of the different oenological tannins.

## RESULTADOS: Capítulo 3

Table 2 shows the kinetic and thermodynamic constants of the interaction between the three types of tannins with mucin calculated by means of the Biaevaluation software using a 1:1 Langmuir binding model (Roy et al., 2001). All these constants do not correspond to pure molecules because they have been calculated considering the commercial extracts and their chemical composition. Hence these constants really correspond to a mixture of different type of tannins that include other unidentified compounds. However, this is to our understanding of the best possible approach that we can do, given the unavailability of pure tannins in sufficient amount.

**Table 2: Kinetic and thermodynamic constants of the different oenological tannin.**

Kinetic and thermodynamic constants		Ellagitannin	Gallotannin (Tannic Acid)	Seed Tannins (Proanthocyanidins)
Kinetic constants	$Ka$ ( $M^{-1}.s^{-1}$ )	$5.50 \times 10^4 \pm 0.01 \times 10^4$	$3.71 \times 10^3 \pm 0.05 \times 10^3$	$2.41 \times 10^3 \pm 0.03 \times 10^3$
	$Kd$ ( $s^{-1}$ )	$2.54 \times 10^{-3} \pm 0.01 \times 10^{-3}$	$2.91 \times 10^{-3} \pm 0.01 \times 10^{-3}$	$4.61 \times 10^{-3} \pm 0.06 \times 10^{-3}$
Thermodynamic constants	$KA$ ( $M^{-1}$ )	$2.16 \times 10^7 \pm 0.03 \times 10^7$	$1.27 \times 10^6 \pm 0.10 \times 10^6$	$5.24 \times 10^5 \pm 0.07 \times 10^5$
	$KD$ (M)	$4.63 \times 10^{-8} \pm 0.08 \times 10^{-8}$	$7.84 \times 10^{-7} \pm 0.04 \times 10^{-7}$	$1.91 \times 10^{-6} \pm 0.02 \times 10^{-6}$

All data are the mean  $\pm$  SD of three replicates.  $Ka$ : Kinetic association constant;  $Kd$ : Kinetic dissociation constant;  $KA$ : Thermodynamic association constant;  $KD$ : Thermodynamic dissociation constant.

According to these results, the kinetic association constants ( $ka$ ) of the three types of tannins is much greater than their corresponding kinetic dissociation constants ( $kd$ ). These data indicate that there is a strong interaction between mucin and tannins as it can be observed in the sensorgrams (Figure 2) in which the association curve increment is very fast and the values of the dissociation curves are maintained for long period of time. The results suggest therefore that astringency of these tannins will be felt quickly and that it will persist for a long time. In that sense, ellagitannins have a  $ka$  14.8 times higher than gallotannins and 22.8 times higher than seed tannins which would suggest that ellagitannin may initiate astringency perception faster than the other tannins. In contrast, the three tannin types have more similar  $kd$  between them. Specifically, the  $kd$  of ellagitannins is 1.2 and 1.8 fold lower than those of gallotannins and seed tannins respectively which suggest that the complex between ellagitannins and mucin is somewhat more stable over time.

Table 2 also shows the thermodynamic dissociation ( $KD$ ) and association ( $KA$ ) constants of the interaction between the three types of tannins and mucin. Both constants provide information about the tannin, mucin and the tannin-mucin complex concentrations at equilibrium. Generally, only  $KD$  is provided because represents the molar concentration of the tannin needed to saturate 50 % of the mucin. However, both constants provide information about thermodynamic stability of the tannin-



## RESULTADOS: Capítulo 3

mucin complexes. In that sense, the formation of the tannin-mucin complexes is thermodynamically favorable for the three tannin types because the  $K_A$  values are very high. Moreover, ellagitannins have the lowest  $K_D$  value followed in increasing order by gallotannins and seed tannins. These data indicate that the ellagitannins concentration needed to reach the 50% saturation of mucin capacity is lower than for gallotannins and this one in turn lower than for seed tannins.

Statistical correlation was performed in order to determine whether there is a relationship between these constants (kinetic and thermodynamic) and the sensory and astringency index assessment of astringency for each tannin type. Table 3 shows the Pearson correlation coefficients and  $p$  values obtained among the following parameters: Sensory Astringency of solutions of the same concentration (0.5 g/L) of commercial tannin extracts, Sensory Astringency of the equimolar solutions (0.31 mM) of tannins (considering the purity of commercial extracts), Astringency Index referred to commercial product (g of tannic acid/g of commercial product), Astringency Index referred to tannin (mol of tannic acid/mol of tannin), kinetic constants ( $k_a$  and  $k_d$ ) and thermodynamic constants ( $K_A$  and  $K_D$ ).

The astringency of solutions of the same concentration (0.5 g/L) of commercial tannin extracts only showed a significant ( $r = 0.782$ ;  $p = 0.013$ ) positive correlation with the Astringency Index referred directly to the weight of the commercial products. This data supports observations made by Llaudy et al. (2004), who has reported a good correlation of this index with the perception of the astringency of red wines and provides support that the Astringency Index is a good indicator for objectively measuring astringency of tannins. As expected, Sensory Astringency of equimolar solutions correlate significantly ( $r = 0.815$ ;  $p = 0.007$ ) with Astringency Index referred to tannins (when the purity of the commercial products is considered) and not with Astringency Index referred directly to commercial product. The reason is obviously related with the different richness of the commercial tannin extracts and the tannin average molecular weights because the significant correlation is only obtained when these data is taken into account. The Sensory Astringency of the equimolar solutions also showed significant correlations with  $k_a$  ( $r = 0.807$ ;  $p = 0.009$ ),  $K_A$  ( $r = 0.808$ ;  $p = 0.008$ ) and  $K_D$  ( $r = -0.726$ ;  $p = 0.027$ ) suggesting the perception of the tannin astringency is related with these constants.

**Table 3: Significant correlation coefficients between astringency and the kinetic and thermodynamic constants.**

Component	Sensory Astringency				Astringency Index			
	Solutions of 0.5 g of tannin extract/L		Equimolar solutions (0.31 mM)		Referred to tannin extract		Referred to tannin	
	Person's correlation coefficient	<i>p</i> -value	Person's correlation coefficient	<i>p</i> -value	Person's correlation coefficient	<i>p</i> -value	Person's correlation coefficient	<i>p</i> -value
Sensory Astringency (0.5 g of tannin extract/L)			-0.063	0.872	<b>0.782</b>	<b>0.013</b>	-0.182	0.639
Sensory Astringency (Equimolar solutions; 0.31 mM)	-0.063	0.872			-0.586	0.097	<b>0.815</b>	<b>0.007</b>
Astringency Index referred to tannin extract	<b>0.782</b>	<b>0.013</b>	-0.586	0.097			-0.457	0.217
Astringency Index referred to tannin	-0.182	0.639	<b>0.815</b>	<b>0.007</b>	-0.457	0.217		
<i>ka</i>	-0.576	0.104	<b>0.807</b>	<b>0.009</b>	<b>-0.834</b>	<b>0.005</b>	<b>0.867</b>	<b>0.002</b>
<i>kd</i>	0.010	0.979	-0.608	0.082	0.130	0.739	<b>-0.931</b>	<b>&lt;0.001</b>
KA	-0.572	0.108	<b>0.808</b>	<b>0.008</b>	<b>-0.829</b>	<b>0.006</b>	<b>0.871</b>	<b>0.002</b>
KD	0.176	0.651	<b>-0.726</b>	<b>0.027</b>	0.358	0.345	<b>-0.981</b>	<b>&lt;0.0001</b>

Bold numbers means the existence of statistic significance ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS: Capítulo 3

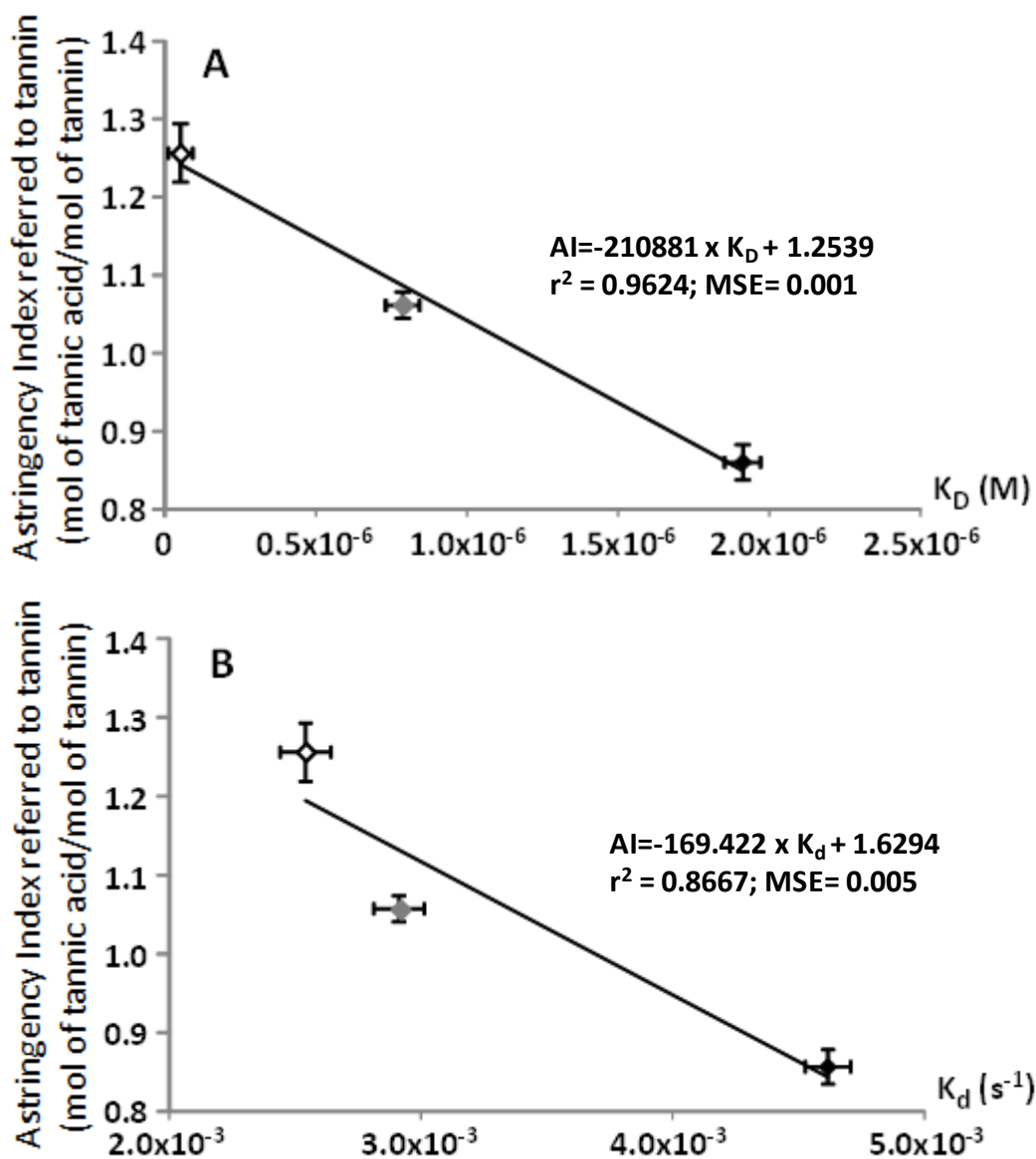
Astringency Index referred to tannin extract showed negative significant correlations with  $ka$  ( $r = -0.834$ ;  $p = 0.005$ ) and  $KA$  ( $r = -0.829$ ;  $p = 0.006$ ). It must be considered at least as quite surprising the existence of a negative correlation between an Astringency Index and kinetic and thermodynamic association constants because suggest that the astringency is higher when the formation of the tannin-mucin complex is less favorable. However, the correlation between kinetic and thermodynamic constants with the Astringency Index referred to tannin extract must be considered with great precaution because this Astringency index depends on the tannin concentration whereas the kinetic and thermodynamic constants do not.

Comparison of the Astringency Index referred to tannins with the association and dissociation constants is perhaps more sensible because in this case the units of expression of the different parameters are compatible. Astringency Index referred to tannins showed significant correlation with all the constants ( $ka$ :  $r = 0.867$  and  $p = 0.002$ ;  $kd$ :  $r = -0.931$ ;  $p < 0.001$ ;  $KA$ :  $r = 0.871$ ;  $p = 0.002$ ;  $KD$ :  $r = -0.981$ ;  $p < 0.0001$ ) when it was referred to tannins. In that case, association constants correlate positively whereas dissociation constants correlate negatively, and the Pearson's' correlation coefficients of both dissociation constants are very high. This data suggests the existence of a close relationship between tannins astringency and the kinetic and thermodynamic dissociation constants that can be visualized in Figure 3 in which the Astringency Index referred to tannins is fitted versus  $KD$  (Figure 3 A) and  $kd$  (Figure 3 B). These graphics show that very good correlations between this Astringency Index and both dissociation constants exist and therefore that SPR shows promise as a tool for improving the assessment of tannin astringency.

### 4. Conclusions

This data confirms that SPR is a useful tool for studying the interactions between tannin and salivary proteins. These results indicate that ellagitannins are more astringents than gallotannins and that in turn more than proanthocyanidins from seed tannins when the molar purity of the extracts is taken into account. However, commercial products have different composition and richness which means that their influence on astringency is more strongly affected by their purity than by the type of tannins they contain. Finally, the astringency index referred to the tannin has very good correlation and regression coefficients with the kinetic and thermodynamic dissociation constants. These data suggest that astringency depends not only on the thermodynamic tendency to form the complex between tannins and salivary proteins but also probably on the time required to dissociate the complex. Further studies are needed to increase the knowledge of tannin-salivary proteins interactions but this work shows that SPR can provide a useful methodological approach.

## RESULTADOS: Capítulo 3



**Figure 3: Relation between astringency index of the different oenological tannins and their thermodynamic and kinetic dissociation constants.**

All data are the mean  $\pm$  SD of three replicates.  $K_D$ : Thermodynamic disassociation constant;  $K_d$ : Kinetic disassociation constant);  $\diamond$ : Ellagitannin;  $\blacklozenge$ : Gallotannin (Tannic acid);  $\blacklozenge$ : Seed Tannin (Proanthocyanidins).

## REFERENCES

Akimoto, T., Sasaki, S., Ikebukuro, K., & Karube, I. (2000). Effect of incident angle of light on sensitivity and detection limit for layers of antibody with surface plasmon resonance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 355–362.

## RESULTADOS: Capítulo 3

Bansil, R., & Turner, B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11, 164 – 170.

Cala, O., Fabre, S., Fouquet, E., Dufour, E. J., & Pianeta, I. (2010). NMR of human saliva protein/wine tannin complexes. Towards deciphering astringency with physico-chemical tools. *Comptes Rendus Chimie*, 13, 449–452.

Canon, F., Paté, F., Meudec, E., Marlin, T., Cheynier, V., Giuliani, A., & Sarni-Manchado, P. (2009). Characterization, stoichiometry, and stability of salivary protein-tannin complexes by ESI-MS and ESI-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 2535–2545.

Cheynier, V., Prieur, C., Guyot S., Rigaud, J., & Moutounet, M. (1997). The structures of tannins in grapes and wines and their interaction with proteins, In T.R. Watkins (Ed), *Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits* (pp. 81–93). Washington DC, USA: ACS Symposium Series. American Chemical Society.

Chira, K., & Teissedre, P. L. (2013). Extraction of oak volatiles and ellagitannins compounds and sensory profile of wine aged with French winewoods subjected to different toasting methods: Behaviour during storage. *Food Chemistry*, 140, 168–177.

Chira, K., Zenga, L., Le Floch, A., Pechamat, L., Jourdes, M., & Teissedre, P.L. (2015). Compositional and sensory characterization of grape proanthocyanidins and oak wood ellagitannin. *Tetrahedron*, 71, 2999–3006.

Colonna, A. E., Adams, D. O., & Noble, A. C. (2004). Comparison of procedures for reducing astringency carry-over in evaluation of red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 26-31.

De Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 113-119.

Fischer, U., Boulton, R. B., & Noble, A. C. (1994). Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Quality and Preference*, 5, 55–64.

Gambutì, A., Rinaldi, A., Pessina, R., & Moio, L. (2006). Evaluation of aglianico grape skin and seed polyphenol astringency by SDS–PAGE electrophoresis of salivary proteins after the binding reaction. *Food Chemistry*, 97, 614–620.

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

Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges, 2ème partie. Mesure, origine et interpretation. *Connaissance Vigne Vin*, 18, 253–271.

## RESULTADOS: Capítulo 3

Guerreiro, J. R. L., Teixeira, N., De Freitas, V., Sales, M. G. F., & Sutherland, D. S. (2017). A saliva molecular imprinted localized surface Plasmon resonance biosensor for wine astringency estimation. *Food Chemistry*, 233, 457–466.

Hagerman, A. E., Rice, M. E., & Ritchard, N. T. (1998). Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloylglucose and epicatechin<sub>16</sub> (4-8) catechin (procyanidin). *Food Chemistry*, 46, 2590-2595.

Homola, J., Yee, S. S., & Gauglitz, G. (1999). Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors Actuators B: Chemical*, 54, 3–15.

Kennedy, J. A., & Jones, G. P. (2001). Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49, 1740-1746.

Llaudy, M., Canals, R., Canals, J., Rozes, N., Arola, L., & Zamora, F., (2004). New method for evaluating astringency in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 742–746.

Ma, S., Lee, H., Liang, Y., & Zhou, F. (2016). Astringent Mouthfeel as a Consequence of Lubrication Failure. *Angewandte Chemie-International Edition*, 55, 5793 –5797.

McRae, J.M., Falconer, R.J., & Kennedy, J.A. (2010). Thermodynamics of Grape and Wine Tannin Interaction with Polyproline: Implications for Red Wine Astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12510–12518.

Navarro, M., Kontoudakis, N., Canals, J. M., García-Romero, E., Gómez-Alonso, S., Zamora, F., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2017). Improved method for the extraction and chromatographic analysis on a fused-core column of ellagitannins found in oak-aged wine. *Food Chemistry*. 226, 23-31.

Navarro, N., Kontoudakis, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J. M., Hermosín-Gutiérrez, I., & Zamora, F. (2016). Influence of the botanical origin and toasting level on the ellagitannin content of wines aged in new and used oak barrels. *Food Research International*, 87, 197–203.

Pascal, C., Poncet-Legrand, C., Cabane, B., & Vernhet, A. (2008). Aggregation of a proline-rich protein induced by epigallocatechin gallate and condensed tannins: Effect of protein glycosylation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6724–6732.

Peynaud, E., & Blouin, J. (1980). *Le goût du vin: le grand livre de la dégustation*. Paris, France: DUNOD.

Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36, 781–784.

## RESULTADOS: Capítulo 3

Prinz, J. F., & Lucas, P. W. (2000). Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation*, 27, 991–994.

Quideau, S., Varadinova, T., Karagiozova, D., Jourdes, M., Pardon, P., & Baudry, C. (2004). Main structural and stereochemical aspects of the antiherpetic activity of nonhydroxyterphenoyl-containing C-glycosidic ellagitannins. *Chemistry & Biodiversity*, 1, 247–258.

Rafaela, J., Guerreiro, L., De Freitas, V., Sutherland, D. S., Goreti, M., & Sales, F. (2012). SPR based Studies for Pentagalloyl Glucose Binding to  $\alpha$ -Amylase. *Procedia Engineering*, 47, 498-501.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubordieu, D. (2000). In P. Ribéreau-Gayon & Y. Glories (Ed), *Handbook of Enology. The chemistry of wine stabilization and treatments* (pp 232-234). Chichester, U.K.: Wiley.

Roy, M. O., Pugniere, M., Jullien, M., Chopineau, J., & Mani, J. C. (2001). Study of Hydrophobic interactions between acylated proteins and phospholipid using BIACORE. *Journal of Molecular Recognition*. 14, 72-78.

Sarneckis, C. J., Dambergs, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J., & Smith P. A. (2006). Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12, 39-49.

Schwarz, B., & Hofmann, T. (2008). Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *European Food Research and Technology*, 227, 1693–1698.

Serafini, M., Maiani, G., & Ferro-Luzzi, A. (1997). Effect of ethanol on red wines tannin-protein (BSA) interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3148-3151.

Simoës-Costa, A. M., Costa-Sobral, M. M., Delgadillo, I., Cerdeira, A., & Rudnitskaya, A. (2015). Astringency quantification in wine: Comparison of the electronic tongue and FT-MIR spectroscopy. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 207, 1095–1103.

Soares, S., Mateus, N., & De Freitas, V. (2007). Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary  $\alpha$ -amylase (HSA) by fluorescence quenching. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6726-6735.

Souquet J. M., Cheynier, V., Brossaud, F., & Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43, 509–512.

Sylla, T., Pouységu, L., Da Costa, G., Deffieux, D., Monti, J. P., & Quideau, S. (2015). Gallotannins and tannic acid: First chemical syntheses and in vitro inhibitory activity on

## RESULTADOS: Capítulo 3

Alzheimer's amyloid b-peptide aggregation. *Angewandte Chemie-International Edition*, 54, 8217–8221.

Van Nieuw Amerongen, A., Bolscher J, G, M., & Veerman E.C.I. (2004). Salivary Proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology? *Caries Research*, 38, 247–253.

Valentova, H., Skrvánková, S. Panovská, Z., & Pokorny, J. (2002). Time-intensity studies of astringency taste. *Food Chemistry*, 78, 29-37.

Watrelet, A. A., Tran, D. T., Buffeteau, T., Deffieux, D., Le Bourvellec, C., Quideau, S., & Renard, C. (2016) Immobilization of flavan-3-ols onto sensor chips to study their interactions with proteins and pectins by SPR. *Applied Surface Science*, 371, 512-518.



# DISCUSIÓN GENERAL

---



## DISCUSIÓN GENERAL

Los taninos del vino tinto son determinantes de su calidad ya que ejercen una gran influencia sobre el cuerpo, el color y su estabilización, la astringencia, el sabor amargo y la capacidad de un vino para envejecer. Éstos provienen de las partes sólidas de las uvas liberándose de las semillas y las pieles durante la vinificación. La concentración total en tanino del vino depende en gran medida de la variedad de uva, de su madurez y de las prácticas y condiciones de vinificación. Además, el uso de taninos enológicos comerciales en vinificación y el proceso de crianza en barrica pueden proporcionar un aporte adicional de taninos en el vino.

No obstante, la concentración en tanino también dependerá en gran medida de la proporción de semillas y pieles con relación al volumen del mosto/vino. De hecho, si la proporción de pieles y semillas con respecto al mosto es mayor, muy probablemente se liberarán más taninos. En este sentido, la proporción de pieles y semillas en los granos de uva puede depender de muchos factores, tales como la variedad vinífera, el nivel madurez, las prácticas vitícolas aplicadas y los factores ambientales. De entre ellos, la variedad de uva es muy probablemente el factor más determinante de la morfología de la baya.

En el capítulo 1, uvas de Merlot, Cabernet Sauvignon, Tempranillo y Garnacha fueron vendimiadas a un nivel de madurez similar. Las bayas de cada una de estas variedades fueron caracterizadas morfológicamente. Los resultados indican que las bayas de Merlot y Cabernet Sauvignon se caracterizaron por presentar un menor tamaño que las de Tempranillo y Garnacha. Asimismo, la proporción en peso de semillas por baya de las uvas de Merlot y Cabernet Sauvignon era significativamente mayor que en el Tempranillo, que a su vez era superior que en la Garnacha.

Con el objetivo de evaluar la liberación de taninos de las semillas de estas 4 variedades se prepararon soluciones modelo con la proporción en peso de semillas por baya (%SB) característico de cada variedad. La maceración tuvo lugar durante 15 días tras los cuales las soluciones de maceración fueron analizadas. Los mayores valores del índice de polifenoles totales y de la concentración en tanino correspondieron a las maceraciones de las semillas de Merlot seguidas en orden decreciente por las de Cabernet Sauvignon, las de Tempranillo y las de Garnacha, siendo las de éstas dos últimas iguales estadísticamente. Por tanto, la cantidad de compuestos fenólicos en general y de taninos en particular liberados por las semillas dependió en gran medida del porcentaje en peso de semillas de cada variedad. En dicho sentido, el Cabernet Sauvignon y el Merlot, que presentaron mayor %SB, extrajeron mayor cantidad de compuestos fenólicos y taninos que las otras dos variedades, que presentaron un menor %SB. No obstante, su liberación también estuvo, en menor medida, influenciada por las características propias de cada variedad. En este sentido, aunque Merlot y Cabernet Sauvignon tenían igual %SB, las semillas de Merlot liberaron más cantidad de taninos. Asimismo, el Tempranillo que tenía mayor % SB, liberó una

## DISCUSIÓN GENERAL

cantidad de taninos similar que la Garnacha. Específicamente, las semillas de Merlot presentaban la mayor capacidad de liberación de tanino por unidad de peso seguidas en orden decreciente por las de Cabernet Sauvignon, las de Garnacha y las de Tempranillo.

No se observaron diferencias en cuanto al grado medio de polimerización (mDP) de las proantocianidinas liberadas por las semillas entre las diferentes variedades estudiadas. No obstante, sí que se observaron ciertas diferencias en el porcentaje de galoilación (%GAL) de las proantocianidinas, ya que Tempranillo y Merlot presentaban valores de %GAL superiores a los de la Garnacha, y ésta a su vez a los del Cabernet Sauvignon.

El índice de astringencia de las soluciones modelo mostró una tendencia similar a la de las concentraciones de tanino liberadas por las semillas de las diferentes variedades, sin que en general se observara ninguna influencia del mDP o del %GAL. Se puede concluir por tanto, que el %SB parece ser el mayor determinante de la liberación de taninos y de la astringencia de un medio modelo similar al vino e idéntico para las cuatro variedades.

De forma paralela se elaboraron tres tipos de vino con cada una de las variedades en condiciones reales de fermentación alcohólica. Uno de los vinos fue elaborado fermentando solamente el mosto (GJW), otro fue elaborado fermentando el mosto juntamente con la proporción adecuada de semillas (%SB) de cada variedad (SW). Finalmente, el tercer vino fue elaborado mediante la vinificación de los racimos despalillados y estrujados (GW), reproduciendo por tanto las condiciones reales de vinificación.

En líneas generales, la concentración de taninos liberada por las semillas en el vino de semillas (SW) era algo menor que la obtenida mediante las maceraciones en medio modelo. No obstante, presentaba una tendencia similar a pesar de que en este caso las condiciones de los diferentes mostos no eran exactamente idénticas y de que tuvo lugar una fermentación alcohólica real. Sin embargo, se observaron algunas diferencias en el mDP y % GAL de las proantocianidinas extraídas en los vinos de semillas (SW) respecto a las maceraciones en medio modelo. Estas diferencias probablemente estén asociadas al desarrollo de la fermentación alcohólica que puede favorecer la polimerización mediante la formación de puentes etilo o debido a que las estructuras de las levaduras pueden absorber taninos. Asimismo, las diferentes condiciones de los mostos, especialmente su pH, pueden influir en la estructura de las proantocianidinas.

La astringencia de los compuestos liberados por las semillas en los SW mostró también una tendencia similar que en las soluciones modelo, siendo mayor en las semillas de Merlot, seguido en orden decreciente por las de Cabernet Sauvignon, Tempranillo y Garnacha. Por tanto, estos datos parecen confirmar que la astringencia está

## DISCUSIÓN GENERAL

influenciada en gran medida por la cantidad de tanino liberada por las semillas y que el % SB es el principal determinante.

En el caso de los vinos obtenidos en condiciones reales de vinificación (GW), el vino de Merlot presentó la mayor concentración en tanino seguido por orden decreciente por el de Cabernet Sauvignon, el de Tempranillo y el de Garnacha. Naturalmente, en todos los GW la concentración en tanino era superior a la del SW dado que las pieles también liberan tanino. Dado que a mayor tamaño de la baya menor es la proporción de pieles, es de esperar que el tamaño de la baya ejerza un efecto sobre la concentración final de taninos. Sin embargo, parece que el porcentaje en peso de las semillas fue el mayor determinante ya que existe una clara relación entre la concentración final en taninos y el %SB. En general, parece que las variedades que liberaron mayor concentración de tanino de las semillas en los SW y en las soluciones modelo, también liberaron más tanino con la presencia de pieles y semillas.

Como era de esperar, la astringencia de estos vinos (GW) fue mayor que los correspondientes vinos de semilla (SW) por la mayor aportación de tanino procedente de las pieles. Los vinos Merlot y Cabernet Sauvignon presentaron una astringencia similar entre ellos que era significativamente mayor que en los de Garnacha y Tempranillo. Es necesario señalar que otros factores presentes en el medio como el pH, la concentración en polisacáridos y la concentración de etanol pueden también ejercer un cierto efecto sobre la interacción entre los taninos y las proteínas pudiendo por tanto modular la astringencia.

Según los datos obtenidos en el análisis de componentes principales (PCA) de los vinos (GW), parece ser que la concentración de tanino y la astringencia de los vinos correlacionan muy estrechamente y de forma positiva. A su vez, estos dos parámetros también están intensamente y positivamente correlacionados con el % SB. También se observa una cierta correlación negativa entre el peso de la baya y estos parámetros, si bien esta correlación parece no ser tan intensa como en el caso de %SB. Asimismo, según el PCA se puede observar que la astringencia no está correlacionada con el mDP y el % GAL de las proantocianidinas y por tanto parece ser que en general la astringencia está más influenciada por la concentración de proantocianidinas que por el mDP y el % GAL de éstas.

Se puede concluir por tanto que la proporción de semillas en función del peso de la baya (%SB) es uno de los principales factores que condicionan la concentración en tanino del vino y consecuentemente su astringencia. Sin duda, otros factores como la variedad de uva, las técnicas vitícolas aplicadas o las condiciones climáticas también condicionan la concentración final en taninos y su astringencia, pero nuestros resultados muestran que el %SB es probablemente el factor con mayor incidencia.

## DISCUSIÓN GENERAL

Como se ha comentado anteriormente, el uso de taninos enológicos en vinificación es una práctica muy habitual. Una de muchas de las propiedades asociadas a los taninos enológicos es su efecto positivo sobre el color de los vinos tintos ya que se ha descrito que pueden actuar como copigmentos y que algunos taninos pueden reaccionar con los antocianos para generar nuevos pigmentos más estables.

En el capítulo 2 se estudió el efecto de dos taninos hidrolizables (un elagitanino y un galotanino) y de tres taninos condensados (un tanino de semilla, un tanino de piel y un tanino de quebracho) sobre el color de la malvidina-3-O-glucósido en soluciones modelo con una concentración de 50 mg/l de este antociano. Específicamente se estudió su eficacia como copigmentos, evaluando el efecto hipercrómico y el efecto batocrómico generados por la copigmentación.

Para cada tanino enológico se prepararon soluciones con diferentes relaciones copigmento/pigmento. Dado la dificultad e incertidumbre en conocer la masa molecular y la riqueza de los diferentes taninos enológicos, esta relación copigmento/pigmento se estableció en función de sus concentraciones expresadas en mg/L y no como relación molar. Específicamente para cada tanino comercial se prepararon soluciones con relaciones copigmento/pigmento de 2, 4 y 8 que se comparaban con una solución control que contenía solamente malvidina-3-O-glucósido.

La evaluación del efecto sobre el color de la malvidina-3-O-glucósido de los diferentes taninos se realizó mediante la determinación a 1 y 7 días en todas las soluciones de la absorbancia a 520nm, las coordenadas CIELab y la longitud de onda de máxima absorbancia de su espectro de absorción visible, a las que se restaba los correspondientes valores de soluciones que contenían las mismas concentraciones de los diferentes taninos para eliminar la contribución de dichos taninos al color. Asimismo, se cuantificó la concentración de malvidina-3-O-glucósido a 1 y 7 días en todas las soluciones para poder determinar su posible desaparición, ya sea debida a su oxidación o a su transformación en nuevos pigmentos.

Según los resultados obtenidos, todos los taninos enológicos produjeron en general un incremento del color en las soluciones de malvidina-3-O-glucósido. En el día 1, este incremento del color puede ser asociado al fenómeno de la copigmentación ya que no se detectó ninguna disminución de la concentración de malvidina-3-O-glucósido, respecto al control, en las soluciones que contenían los taninos enológicos. El efecto hipercrómico fue observado por un incremento de la absorbancia a 520nm, de la Chroma ( $C^*$ ), y de  $\Delta E_{ab}^*$  (respecto al punto totalmente blanco puro del espacio CIELab) y por una disminución de la claridad  $L^*$ . Estas variaciones fueron lineales con la relación de concentraciones copigmento/pigmento en el caso de la absorbancia a 520nm,  $C^*$ ,  $L^*$ ;  $\Delta E_{ab}^*$ , lo que confirma que todos los taninos enológicos ejercen un efecto como copigmentos. En dicho sentido, como se ha discutido en el capítulo 2 de

## DISCUSIÓN GENERAL

los resultados, otros autores ya habían observado un comportamiento lineal entre el aumento de absorbancia a 520nm y las relaciones de concentración copigmento/pigmento. Asimismo, todos los taninos estudiados ejercieron un efecto batocrómico ya que generaban en el día 1 un desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción hacia valores más altos.

En el día 7 se observaron diferencias en el color de las soluciones con respecto a los valores determinados en el día 1 de la experimentación. En el caso de la solución control, se observó una disminución de la concentración de malvidina-3-*O*-glucósido, muy probablemente asociada a su oxidación. Esta disminución en la concentración de malvidina-3-*O*-glucósido coincidía con decrementos en la absorbancia a 520nm, de la  $C^*$  y  $\Delta Eab^*$  y un incremento en  $L^*$  y  $H^*$ .

Las soluciones que también contenían los diferentes taninos enológicos, al igual que pasó en el día 1, presentaban valores superiores de la absorbancia a 520 nm,  $C^*$ ,  $\Delta Eab^*$  y menores valores de  $L^*$  que la solución control en el día 7. No obstante, estas diferencias en el color no eran exactamente iguales a las observadas en el día 1 de la experimentación. Estas diferencias con respecto al día 1 dependían en gran medida del origen botánico del tanino y parecen estar asociadas en algunos casos a la formación de nuevos pigmentos, ya que para algunos taninos se detectó una disminución de la concentración de malvidina-3-*O*-glucósido superior que en la solución control. Este fenómeno fue observado en los taninos de semilla, quebracho y en el elagitanino pero no en el tanino de piel y el galotanino. Se puede concluir por tanto, que el efecto hiperocrómico generado por el tanino de piel y el galotanino están muy probablemente asociados únicamente a la copigmentación, mientras que en el caso de los otros taninos serían debidos a un doble fenómeno, la copigmentación y la formación de nuevos pigmentos. En este sentido, está descrito en la bibliografía que tanto los taninos condensados como los elagitaninos pueden formar nuevos pigmentos con los antocianos. Hay que señalar que a pesar de que el tanino de piel es un tanino condensado no se observó una disminución de la concentración de malvidina-3-*O*-glucósido respecto al control y por tanto probablemente todo el efecto hiperocrómico fue debido a la copigmentación. Este resultado podría asociarse a que el extracto de taninos de piel presente una mayor concentración en flavonoles los cuales al ser muy buenos copigmentos favorecen mayoritariamente el fenómeno de la copigmentación.

Es necesario señalar que en el día 7 la disminución de la concentración de malvidina-3-*O*-glucósido en las soluciones que contenían los taninos enológicos fue siempre inferior al 7 % respecto al control, por lo que se puede afirmar que el incremento del color fue en todos los casos mayoritariamente debido a la copigmentación.

Dada la necesidad de establecer un índice para medir la eficacia como copigmentos de los diferentes taninos comerciales se ha propuesto a la OIV un índice de copigmentación para que sea incluido en las fichas sobre los taninos enológicos del

## DISCUSIÓN GENERAL

Codex enológico. Este índice se basa en la diferencia de color ( $\Delta E_{ab}^*$ ) respecto al punto totalmente blanco puro en el espacio CIE Lab. Este índice, que representa la distancia euclidiana dentro de la esfera CIE Lab, se expresa como el incremento porcentual de  $\Delta E_{ab}^*$  de la solución que contiene malvidina-3-O-glucósido con una concentración de 400 mg/l del tanino comercial respecto de la que contiene únicamente el antociano.

En resumen, el uso de taninos enológicos comerciales es una buena herramienta para la mejora y la estabilización del color ya que todos los taninos enológicos ejercieron un efecto como copigmentos y algunos de ellos parece que pueden favorecer la formación de nuevos pigmentos.

La astringencia se define como una percepción táctil asociada a una sensación de rugosidad y aspereza que tiene lugar en el epitelio de las células de la cavidad bucal. Está generalmente aceptado que la astringencia es debida a la capacidad de los taninos para interactuar con las proteínas salivares dando lugar a complejos supramoleculares que acaban precipitando, con lo que la saliva pierde su capacidad lubricante. Los taninos, como principales responsables de esta sensación, pueden proceder de la propia uva (proantocianidinas), de la crianza del vino en barricas de roble (elagitaninos) o de la adición de taninos comerciales al vino (todos los tipos de tanino).

La evaluación de la astringencia se realiza normalmente por análisis sensorial. Sin embargo, este método necesita un grupo de catadores expertos e incluso entonces existe una subjetividad inherente asociada con el proceso. Por otra parte, la percepción de astringencia también aumenta con la exposición repetida y esto puede conducir a la fatiga de los catadores y alterar por tanto el resultado de la cata. Asimismo, la percepción de la astringencia varía ampliamente entre individuos, lo que hace que su evaluación objetiva sea extremadamente complicada.

En el capítulo 3 se propone la aplicación de la resonancia de plasmones superficiales (Surface Plasmon Resonance – SPR) como técnica para el estudio de las interacciones tanino-proteína con el objetivo de relacionar dichas interacciones con la astringencia. Mediante esta técnica podemos seguir las interacciones tanino-proteína en tiempo real y a su vez, podemos determinar las constantes cinéticas y termodinámicas de dichas interacciones.

Con este propósito se estudió la interacción de tres extractos de taninos enológicos comerciales (un extracto de tanino de semillas, un extracto de galotanino y un extracto de elagitanino) con una mucina porcina de estomago, como proteína modelo de estructura similar que la mucina presente en la saliva humana.

En primer lugar, se determinó la riqueza en tanino y la composición química de cada uno de los extractos de tanino enológico mediante el método de precipitación con



## DISCUSIÓN GENERAL

metil-celulosa. La riqueza en tanino para el elagitanino fue  $125.5 \pm 3.4$  mg/g, la del galotanino  $869.6 \pm 2.6$  mg/g y la del tanino de semilla  $633.1 \pm 2.3$  mg/g. Mediante HPLC también se determinaron las riquezas de los diferentes taninos, que en términos generales se aproximaban bastante a las obtenidas por el método de la metil-celulosa (excepto en el caso del tanino de semilla). Asimismo, se utilizó el análisis cromatográfico para determinar las diferentes especies químicas presentes en los extractos de taninos hidrolizables y de este modo calcular la masa molecular media de los taninos presentes. Específicamente, la masa molecular media en el elagitanino fue (1233.6 g/mol) y en el del galotanino (1483.3 g/mol). En el caso del extracto de taninos condensados, la masa molecular media aproximada se determinó mediante floroglucinolisis (1414.6 g/mol). Estos valores se calcularon porque son imprescindibles para estudiar las interacciones entre los taninos y las proteínas mediante SPR.

La astringencia de los extractos comerciales fue determinada sensorialmente por un panel de cata entrenado (intensidad de la astringencia) y analíticamente mediante el Índice de astringencia descrito por Llaudy et al., (2004) (la referencia está presente en la introducción).

Según los resultados analíticos obtenidos, el mayor índice de astringencia fue el del extracto de galotanino, seguido en orden decreciente por el de tanino de semilla y el de elagitanino, cuando los datos eran referidos al extracto comercial. No obstante, cuando el índice de astringencia era referido al contenido molar en tanino de los extractos comerciales, el tanino más astringente era el elagitanino seguido en orden decreciente por el galotanino y el tanino de semilla. Por consiguiente, la riqueza en tanino del extracto es más importante que la propia naturaleza del tanino en el momento de definir su impacto en el vino.

Sensorialmente, un panel entrenado de cata evaluó la intensidad de la astringencia, puntuando este atributo entre 0 y 10, de soluciones de cada uno de los extractos disueltos en agua. Cuando el panel cató soluciones de la misma concentración en gramos por litro del extracto comercial, puntuaron con mayor intensidad de astringencia el extracto de galotanino seguido en orden decreciente por el extracto de tanino de semilla y el extracto de elagitanino. Es decir, que ordenaron de forma idéntica los extractos (de más a menos astringente) que el índice de astringencia. Asimismo, la intensidad de astringencia determinada sensorialmente y el índice de astringencia presentaron una correlación estadísticamente significativa.

En cambio, cuando el panel de cata evaluó la intensidad de astringencia de soluciones de la misma concentración molar en tanino (0.31 mM de tanino), teniendo en cuenta la riqueza molar de los extractos, los catadores evaluaron el extracto de elagitanino como el más astringente seguido en orden decreciente por el de galotanino y el de tanino de semilla. Estos resultados sensoriales tuvieron también una correlación significativamente positiva con el índice de astringencia cuando era referido a la

## DISCUSIÓN GENERAL

concentración de tanino puro del extracto. Estos resultados confirman la utilidad del índice de astringencia como método objetivo de evaluación de la percepción de astringencia.

Paralelamente se estudiaron las interacciones entre los diferentes taninos y la mucina mediante SPR, lo que permitió determinar las constantes cinéticas de asociación y disociación así como las constantes termodinámicas de la interacción de los diferentes taninos con la mucina. Para todos los taninos, la constante de asociación cinética ( $ka$ ), característica de la reacción de formación del complejo tanino-mucina, fue mucho mayor que la constante de disociación cinética ( $kd$ ), característica de la reacción de disociación del complejo tanino-mucina. Estos datos explicarían porqué la percepción de la astringencia de los taninos aparece rápidamente y perdura en el tiempo.

Los diferentes taninos presentaron diferencias en sus constantes cinéticas de interacción con la mucina. Específicamente, la mayor  $ka$  fue para el elagitanino, seguido en orden decreciente por el galotanino y el tanino de semilla. Asimismo, la mayor  $kd$  era la del complejo tanino de semilla-mucina seguida en orden decreciente por el complejo galotanino-mucina y el complejo elagitanino-mucina. Estos datos nos confirman que la asociación con la mucina es cinéticamente más rápida para el elagitanino y que a su vez el complejo formado se disocia más lentamente. En cambio, el tanino de semilla tuvo una cinética de asociación más lenta con la mucina y una cinética de disociación más rápida del complejo correspondiente.

Las constantes termodinámicas de asociación ( $KA$ ) y disociación ( $KD$ ) son características de la estabilidad termodinámica del complejo tanino-mucina. Las dos constantes termodinámicas nos dan la misma información, no obstante, una es la inversa de la otra debido a que se refieren a los dos sentidos del equilibrio. Normalmente se utiliza la  $KD$ , ya que determina la concentración de tanino en que el 50 % de la proteína está saturada formando complejos. En este sentido, una menor  $KD$  implica que la estabilidad termodinámica del complejo tanino-mucina sea mayor.

Según los datos termodinámicos obtenidos, la  $KD$  fue menor para el elagitanino seguido en orden creciente por el galotanino y el tanino de semilla. Estos datos confirman que el complejo elagitanino-mucina es el más estable termodinámicamente, seguido en orden decreciente por el complejo galotanino-mucina y por el complejo tanino de semilla-mucina.

Todos estos datos cinéticos y termodinámicos sugieren que los elagitaninos son probablemente más astringentes que los galotaninos y éstos a su vez más que los taninos de semilla. También nos sugieren que la astringencia está muy relacionada con las constantes cinéticas y termodinámicas de asociación y disociación de los taninos con las proteínas salivares, ya que se observaron correlaciones estadísticamente significativas de estas constantes con el índice de astringencia y la evaluación sensorial.

## DISCUSIÓN GENERAL

En este sentido, las constantes termodinámicas y cinéticas determinadas por SPR correlacionaron significativamente con el índice de astringencia cuando fue expresado por mol de tanino puro. Asimismo, también correlacionaron significativamente con la evaluación sensorial de las soluciones con la misma concentración molar en tanino. Específicamente la correlación fue positiva con la  $k_a$  y la  $K_A$  y negativa con la  $k_d$  y la  $K_D$ , lo cual es muy lógico ya que nos explicaría que la astringencia está relacionada con una mayor velocidad de formación del complejo tanino-proteína y una menor velocidad de disociación de éste, así como una mayor estabilidad termodinámica del complejo formado.

En cambio, estas constantes no correlacionaron ni con el índice de astringencia, expresado en función del extracto comercial, ni con la evaluación sensorial de soluciones con la misma concentración en gramos por litro de extracto comercial. En este sentido, es necesario de señalar que las constantes cinéticas y termodinámicas de la interacción dependen de la naturaleza del tanino y de la proteína así como de factores externos tales como el pH, la temperatura, entre otros. Naturalmente, como su propio nombre indica, éstas son constantes y por tanto no dependen de la concentración en tanino y consecuentemente no van a depender de las riquezas de los diferentes extractos comerciales.

Finalmente, las correlaciones con los valores más altos de los coeficientes de correlación de *Pearson* fueron las establecidas entre el índice de astringencia referido al contenido molar en tanino de los extractos, y las constantes de disociación cinética y termodinámica. Estos resultados sugieren que la sensación de astringencia no solo depende de la estabilidad termodinámica del complejo tanino-proteína sino también del tiempo necesario para su disociación.

Por tanto se puede concluir que la SPR es una técnica útil para el estudio de la interacción tanino-proteína salivar así como para abordar con un enfoque novedoso el estudio de la astringencia.



# CONCLUSIONES GENERALES

---



## CONCLUSIONES GENERALES

1. La morfología de la baya, que depende en gran medida de la variedad vinífera, parece ejercer un gran efecto sobre la composición fenólica, el color, y la astringencia del vino tinto.
2. De entre los diferentes parámetros morfológicos analizados, el tamaño de la baya (100BW y 100BV) y muy especialmente el porcentaje en peso de semillas de la baya (%SB) son los que ejercen una mayor influencia sobre la concentración final del vino en taninos y por consiguiente sobre su astringencia.
3. Los taninos enológicos comerciales actúan como eficaces copigmentos en un medio modelo. Todos los taninos enológicos estudiados generaron un efecto hiperocrómico en las soluciones modelo de vino con malvidina-3-*O*-glucósido, ya que disminuyeron la claridad ( $L^*$ ) e incrementaron los valores de la absorbancia a 520 nm, la chroma ( $C^*$ ) y la diferencia de color respecto del punto blanco de la esfera CIELab ( $\Delta E_{ab}^*$ ). La suplementación con todos los taninos enológicos generó también un efecto batocrómico ya que aumentaron los valores de la longitud de onda de máxima absorción del espectro visible, lo que originó un viraje de la tonalidad de las soluciones hacia tonalidades más azuladas (disminución de la  $H^*$ ).
4. La suplementación con elagitaninos, tanino de semilla y tanino de quebracho originó una mayor disminución de la concentración de malvidina-3-*O*-glucósido que en la solución control a los 7 días de experimentación. Estos datos sugieren que se formaron nuevos pigmentos derivados de la malvidina-3-*O*-glucósido, lo que explicaría la modificación del color de la solución resultante.
5. Se ha propuesto un Índice para medir la eficacia como copigmentos de los diferentes taninos enológicos basado en la distancia euclidiana entre dos puntos del espacio CIELab.
6. Los resultados obtenidos sugieren que la suplementación con los taninos enológicos es verdaderamente eficaz para mejorar la intensidad del color, actuando como copigmentos, y muy probablemente la estabilidad del color en los vinos tintos.
7. La resonancia de plasmones superficiales (SPR) permite estudiar las interacciones entre los taninos enológicos y la mucina en tiempo real, lo que permite una novedosa aproximación al estudio de la astringencia.

## CONCLUSIONES GENERALES

8. Mediante la utilización de la resonancia de plasmones superficiales se han determinado las constantes cinéticas y termodinámicas de la interacción de tres taninos enológicos (un extracto de elagitaninos procedente del roble, un extracto de galotaninos procedente de agayas de roble y un extracto de proantocianidinas procedente de semillas de uva) con la mucina.
9. Según los datos obtenidos, las constantes cinéticas y termodinámicas de la interacción taninos-mucina presentan una correlación estadísticamente significativa con la evaluación de la astringencia tanto analítica (índice de astringencia) como sensorial. Estos datos también permiten concluir que los elagitaninos presentan la mayor astringencia seguidos en orden decreciente por los galotaninos y los taninos de semillas cuando los resultados se refieren a su contenido real en tanino puro. Cabe señalar que los diferentes extractos comerciales presentan una gran variabilidad en su riqueza lo que debe tenerse en cuenta para considerar su impacto real sobre la astringencia del vino.
10. Las constantes de disociación termodinámica ( $KD$ ) y cinética ( $kd$ ) de las interacciones taninos-mucina presentaron coeficientes de correlación altos con el índice de astringencia. Estos datos sugieren que la percepción de astringencia no solamente depende de la estabilidad termodinámica del complejo tanino-mucina sino también probablemente del tiempo que tarda este complejo en disociarse.



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina

Jordi Gombau Roigé

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGLI

Influencia de las semillas de la uva y de la suplementación con taninos enológicos comerciales sobre el color y la astringencia del vino tinto; aplicación de la resonancia de plasmones superficiales al estudio de las interacciones tanino-mucina

Jordi Gombau Roigé