



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

Influencia de la composición fenólica y
polisacarídica en las características organolépticas
de los vinos tintos

Influence of the phenolic and polysaccharide
composition on the organoleptic characteristics of
red wines

Facultad de Farmacia

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Natalia Quijada Morín

2014



VNiVERSIDAD
D SALAMANCA

DPTO. QUIMICA
ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA

Campus Miguel de Unamuno-37007 Salamanca
Teléf.: 923 294537 – Fax: 923 294515
e-mail: nutr@usal.es

Julián C. Rivas Gonzalo, Catedrático de Nutrición y Bromatología y M^a Teresa Escribano Bailón, Profesora Titular de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Salamanca, directores del trabajo “*Influencia de la composición fenólica y polisacáridica en las características organolépticas de los vinos tintos*”, realizado por **Natalia Quijada Morín** para optar al título de Doctor, AUTORIZAN la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 24 de junio de 2014

Julián C. Rivas Gonzalo

M^a Teresa Escribano Bailón

Para la realización de este trabajo se ha contado con las siguientes ayudas institucionales:

- Ayuda Predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI). Ref. BES-2009-021475. Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Proyecto de investigación “Composición detallada de flavanoles y su relación con la madurez fenólica en la uva tinta para vinificación” (AGL2008-05569-C02-01) Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Proyecto de investigación “Influencia del cambio climático en la composición flavanólica y antociánica de la uva y vino: nuevas tecnologías de vinificación: Proyecto CENIT *Demeter*. Consorcio CENIT “Demeter” (2008-2011)
- Proyecto de investigación “Papel de los flavanoles y flavonoles en la intensidad y calidad de la astringencia de los vinos y su interacción con el color” (AGL2011-30254-C02-01) Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Proyecto de investigación “Funcionalidad biológica y tecnológica de los flavonoides de los alimentos” (EDU/894/2009) Junta de Castilla y León.

En primer lugar, quiero mostrar mi agradecimiento a los doctores Julián Carlos Rivas Gonzalo y María Teresa Escribano Bailón, los directores de este trabajo. Gracias a ellos el tiempo invertido en la realización de este trabajo ha sido gratificante y provechoso. Gracias por su confianza, por su dedicación y por lo muchísimo que me han enseñado.

Je voudrais aussi remercier personnel du INRA Montpellier et spécialement docteur Thierry Doco et Pascale Williams qui m'ont accueilli dans leur labo et dans leur équipe de recherche et m'ont fait sentir comme si j'étais chez moi.

Quería agradecer a mis padres el apoyo y el empuje que siempre me han mostrado. Gracias por enseñarme la satisfacción del trabajo bien hecho y la recompensa del esfuerzo. A Virgi, por su apoyo y su alegría.

A todos mis compañeros del departamento, que con su día a día han conseguido que el departamento sea casi un segundo hogar, a todos gracias por los cafés, las meriendas, las cañas de los viernes, las excursiones y demás.

A María José, por su disponibilidad y su ayuda, gracias por hacernos la vida más fácil.

A José Joaquín por su paciencia y su tranquilidad, que se contagian.

A los profesores del departamento, Ana, Tino, Pilar, Milagros, Cesar, Alfonso y Rafael, por su amabilidad, y por su interés, y especialmente a Concha por su cercanía y su ayuda, y a María Jesús por su humor e ironía.

A Montse, Cristina, Nacho, Laura, Begoña, Susana, y Andrea, por ser unos compañeros estupendos, con los que es fácil y agradable trabajar.

A todos los que han pasado por el departamento en este periodo de tiempo, de todos he aprendido algo y todos sois de alguna forma parte de este trabajo, muy especialmente José Miguel,

Jorge y Raúl, con los que he tenido oportunidad de trabajar más estrechamente y que han sido fundamentales para el desarrollo de algunas partes de esta tesis. Gracias.

A los farmacéuticos locos, que consiguen sacarme una carcajada hasta en los peores momentos, gracias por los viajes, por las visitas y las jornadas gastronómicas.

A Antonio y Yoanna, por las cenas-terapia de grupo, por su paciencia y su comprensión.

A Edu, por querer entenderlo todo, por su interés y sus preguntas.

A Marta y Eli, por toda una vida juntas, por las escapadas navideñas y por sus ánimos. A Eli además tengo que agradecerle varias de las páginas de esta tesis, ahora también es un poquito tuya.

A Julio, por mantener la amistad pese al tiempo y la distancia.

A Chuchi, por tu confianza, por tu apoyo, por tantas cosas que no las puedo resumir en unas líneas, así que gracias por todo.

A mis padres y a Chuchi

TABLA DE CONTENIDO



PRODUCCIÓN CIENTÍFICA	1
------------------------------------	----------

INTRODUCCIÓN	3
---------------------------	----------

I: COMPOSICIÓN FENÓLICA DE UVAS Y VINO.....	5
--	----------

1. NO FLAVONOIDES.....	8
------------------------	---

1.1. Ácidos fenólicos.....	8
----------------------------	---

1.2. Estilbenos.....	10
----------------------	----

2. FLAVONOIDES.....	12
---------------------	----

2.1. Antocianos	12
-----------------------	----

2.1.1. Color y estabilidad de los antocianos.....	14
---	----

2.1.1.1. La estructura de la molécula	14
---	----

2.1.1.2. Presencia de SO ₂	15
---	----

2.1.1.3. pH del medio	16
-----------------------------	----

2.1.1.4. Estabilidad individual.....	17
--------------------------------------	----

2.1.2. Reactividad de antocianos	18
--	----

2.1.2.1. Copigmentacion	18
-------------------------------	----

2.1.2.2. Pigmentos derivados de antocianos.....	21
---	----

2.2. Flavanoles	31
-----------------------	----

2.2.1. Taninos hidrolizables.....	32
-----------------------------------	----

2.2.2. Taninos condensados o proantocianidinas	32
--	----

2.3. Flavonoles	35
-----------------------	----

II-CARBOHIDRATOS EN UVAS Y VINO	37
--	-----------

1. PARED CELULAR DE LAS UVAS.....	37
-----------------------------------	----

2. POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR DE LAS UVAS.....	39
---	----

3. POLISACÁRIDOS EN EL VINO	42
-----------------------------------	----

3.1. Manoproteínas	43
--------------------------	----

3.2. PRAGs.....	44
-----------------	----

3.3. Ramnogalacturonanos de tipo I.....	45
---	----

3.4. Ramnogalacturonanos de tipo II.....	45
--	----

4. OLIGOSACÁRIDOS EN VINO.....	46
--------------------------------	----

III-COLOR	48
COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO	50
IV ASTRINGENCIA.....	55
OBJETIVOS	63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	67
<u>BLOQUE I: MADUREZ TECNOLÓGICA Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR: INFLUENCIA SOBRE LA EXTRACTABILIDAD DE POLIFENOLES DE LOS HOLLEJOS</u>	69
CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE EXTRACTABILIDAD DE LOS ANTOCIANOS PRESENTES EN LOS HOLLEJOS DE UVAS	71
1.1. <i>Objetivos</i>	72
1.2. <i>Resumen</i>	74
1.3. <i>Publicaciones</i>	77
CAPÍTULO 2: COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR Y EXTRACTABILIDAD DE FLAVAN-3-OLES Y FLAVONOLES EN UVAS CON DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ TECNOLÓGICA.....	93
2.1. <i>Objetivos</i>	94
2.2. <i>Resumen</i>	96
2.3. <i>Publicación</i>	99
<u>BLOQUE II: COMPOSICIÓN FENÓLICA Y POLISACARÍDICA Y SU INFLUENCIA EN LA ASTRINGENCIA DE LOS VINOS</u>	129
CAPITULO 3: COMPOSICIÓN FENÓLICA Y POLISACARÍDICA Y SU INFLUENCIA EN LA ASTRINGENCIA DE LOS VINOS.....	131
3.1. <i>Objetivos</i>	134
3.2. <i>Resumen</i>	135
3.3. <i>Publicaciones</i>	139

BLOQUE III: CARACTERIZACIÓN DE PROPIEDADES SENSORIALES DE COMPUESTOS FENÓLICOS AISLADOS	155
CAPÍTULO 4: ESTUDIO FÍSICOQUÍMICO Y COLORIMÉTRICO DE PIGMENTOS DERIVADOS DE ANTOCIANOS	157
4.1. <i>Objetivos</i>	158
4.2. <i>Resumen</i>	160
4.3. <i>Publicación</i>	163
CAPÍTULO 5: ESTUDIO DE LA ASTRINGENCIA DE FLAVANOLES EN DISOLUCIONES MODELO	183
5.1. <i>Objetivos</i>	184
5.2. <i>Resumen</i>	185
5.3. <i>Publicación</i>	189
SUMMARY	217
CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS	253
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	263

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

La presente Memoria de Tesis está elaborada utilizando el formato de compendio de artículos/publicaciones establecido por la Comisión de Doctorado (15 de Febrero de 2013) al amparo del Artículo 14 del Capítulo II del Reglamento de Doctorado de la Universidad de Salamanca (25 de Octubre de 2011, modificado el 18 de julio de 2013). Los estudios realizados están enmarcados dentro de los proyectos de investigación “Influencia del cambio climático en la composición flavanólica y antociánica de la uva y vino: nuevas tecnologías de vinificación: Proyecto CENIT Demeter”, y “Papel de los flavanoles y flavonoles en la intensidad y calidad de la astringencia de los vinos y su interacción con el color: Proyecto AGL2011”. dando lugar a la siguiente producción científica a partir de la cual se ha elaborado esta memoria:

- Quijada-Morin, N.; Dangles, O.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailon, M.T. Physico-chemical and chromatic characterization of malvidin 3-glucoside-vinylcatechol and malvidin 3-glucoside-vinylguaiacol wine pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 9744-9752.
- Hernández-Hierro, J.M.; Quijada-Morín, N.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *732*, 26-32.
- Quijada-Morín, N.; Regueiro, J.; Simal-Gándara, J.; Tomás, E.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 12355-12361.

- Hernández-Hierro, J.M.; Quijada-Morín, N.; Martínez-Lapuente, L.; Guadalupe, Z.; Ayestarán, B.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree. *Food Chemistry* **2014**, *146*, 41-47.
- Quijada-Morín, N.; Williams, P.; Rivas-Gonzalo, J.C.; , Doco, T.; Escribano-Bailón, M.T. Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chemistry*, **2014**, *154*, 44-51.
- Ferrer-Gallego, R, Quijada-Morín, N., Brás, N.F., de Freitas, V., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T. Characterization of sensory properties of flavanols. A molecular dynamic approach (Redactado).
- Quijada-Morín, N.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripening stages (Redactado).

INTRODUCCIÓN



I- COMPOSICIÓN FENÓLICA DE UVAS Y VINO

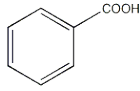
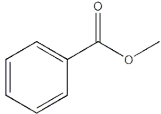
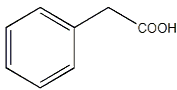
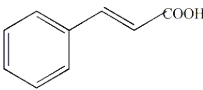
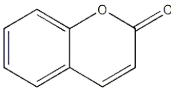
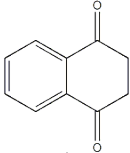
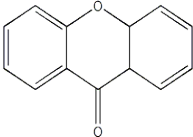
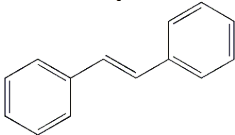
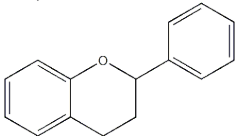
Los compuestos fenólicos constituyen un grupo muy numeroso de moléculas ampliamente distribuidas en el reino vegetal, que se caracterizan por presentar, al menos, un anillo bencénico en su estructura, unido a uno o más grupos hidroxilo.

Son metabolitos secundarios de las plantas, en las que se acumulan en diferentes tejidos en cantidades relativamente elevadas. Ejercen diversas actividades a lo largo de todo el ciclo vegetal, incluyendo la participación en estrategias defensivas, como atrayentes para insectos y animales polinizadores o dispersores de las semillas, como agentes alelopáticos, protectores ante la radiación ultravioleta y como moléculas señalizadoras [1].

Sus propiedades químicas vienen determinadas por el carácter nucleofílico del anillo bencénico y por el carácter ácido de la función fenólica. Estos dos factores unidos proporcionan a los compuestos fenólicos un creciente interés biológico que está ligado a sus potenciales efectos beneficiosos sobre la salud. Entre sus efectos destacan: su capacidad antioxidante, antitumoral, cardioprotectora, antiinflamatoria y antimicrobiana. Se considera que su ingesta prolongada provoca a largo plazo una modulación favorable del metabolismo humano asociada a la prevención o reducción del riesgo de sufrir patologías degenerativas, bien sean de tipo cardiovascular, diabetes, obesidad o cáncer [1].

Se han descrito más de 8000 compuestos fenólicos distintos que pueden ser clasificados en varios grupos atendiendo a su estructura química. Una de las clasificaciones más habituales se basa en el número y disposición de sus átomos de carbono (tabla 1).

Tabla 1: estructura básica de los compuestos fenólicos. Adaptado de Crozier et al. 2006 [2].

Nº de carbonos	Esqueleto	Clasificación	Estructura básica	Ejemplo
7	C6-C1	Ácidos hidroxibenzoicos		Ácido gálico
8	C6-C2	Acetofenonas		Galoacetofenona
8	C6-C2	Ácidos fenilacéticos		Ácido p-hidroxifenil-acético
9	C6-C3	Ácidos hidroxicinámicos		Ácido p-cumárico
9	C6-C3	Cumarinas		Esculetina
10	C6-C4	Naftoquinonas		Juglona
13	C6-C1-C6	Xantonas		Mangiferina
14	C6-C2-C6	Estilbenos		Resveratrol
15	C6-C3-C6	Flavonoides		Naringenina

En las uvas y vinos podemos distinguir dos grandes grupos de compuestos fenólicos:

- Flavonoides: caracterizados por presentar un esqueleto C6-C3-C6. De los compuestos presentes en uvas y vino forman parte de este grupo los antocianos, flavonoles y flavanoles (figura 1).

- No flavonoides: representados en uvas y vinos por ácidos fenólicos y estilbenos.

La importancia de los compuestos fenólicos en las uvas y el vino se debe a que van a determinar gran parte de las características organolépticas de este último, como el color o la astringencia [3].

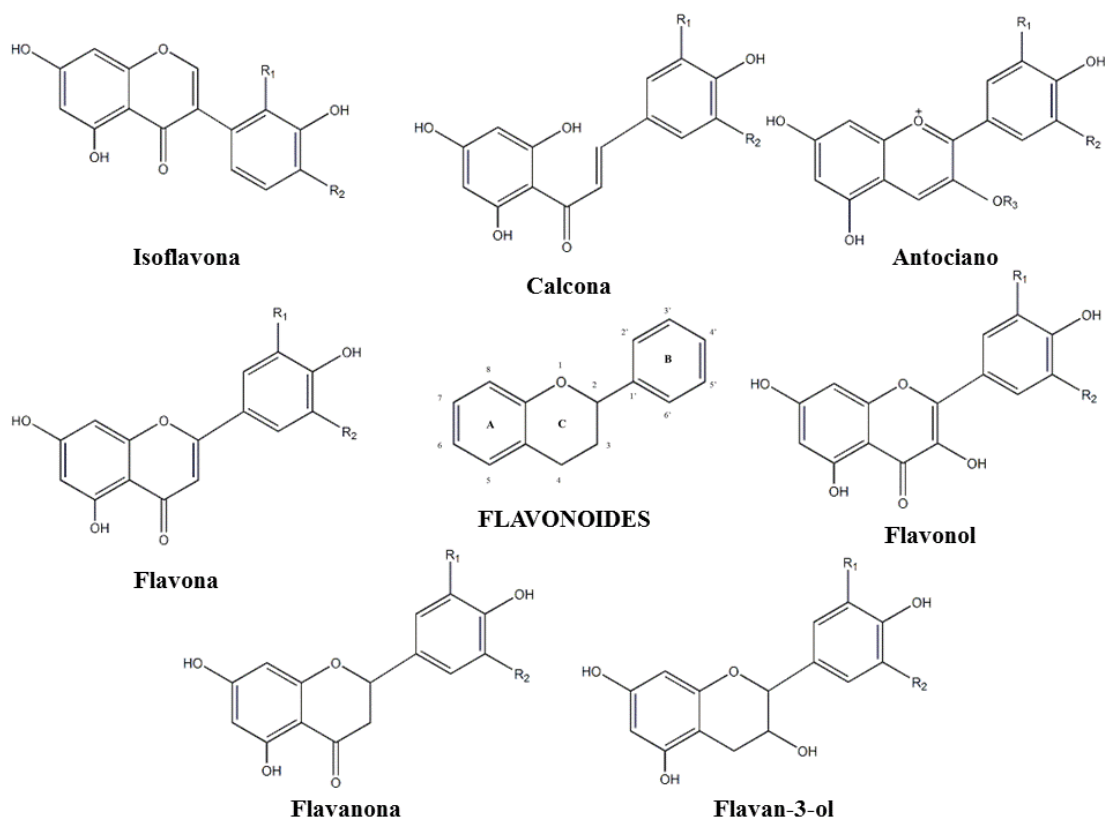


Figura 1: estructuras generales de los principales flavonoides.

1. NO FLAVONOIDES

1.1. ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos que se encuentran en las uvas y los vinos se pueden clasificar en dos grupos en función de su estructura, los ácidos benzoicos (C6-C1) y los ácidos cinámicos (C6-C3), cuyas estructuras generales se muestran en la figura 2.

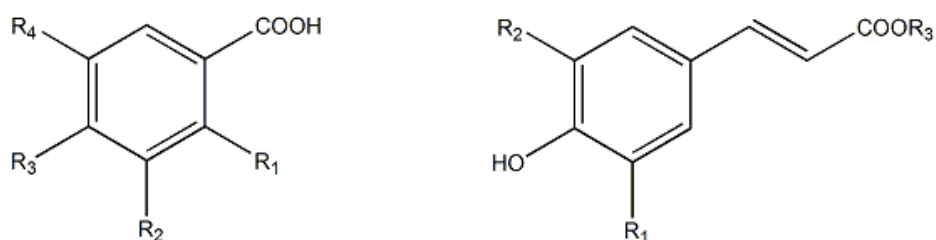


Figura 2: estructura general de los ácidos hidroxibenzoicos (izquierda) e hidroxicinámicos (derecha).

En las uvas los ácidos hidroxibenzoicos aparecen frecuentemente formando glicósidos o formando ésteres, siendo liberados mediante hidrólisis ácida o alcalina respectivamente dando como resultado las correspondientes formas libres [4]. El ácido benzoico más abundante en el vino es el ácido gálico, que se ha encontrado en concentraciones de hasta 126 mg/L [5]. Su elevada abundancia se debe a que se puede formar en los vinos por hidrólisis de otros compuestos fenólicos. Las concentraciones de los ácidos hidroxibenzoicos en los vinos presentan gran variación en función de su origen geográfico y variedad de uva empleada [6].

Los principales ácidos benzoicos y cinámicos detectados en uvas y vinos se recogen en las tablas 2 y 3, y como puede observarse, difieren en el patrón de sustitución del anillo bencénico.

Tabla 2: patrón de sustitución de los ácidos hidroxibenzoicos presentes en uvas y vino.

Ácidos hidroxibenzoicos	R1	R2	R3	R4
<i>Ácido gálico</i>	H	OH	OH	OH
<i>Ácido genístico</i>	OH	H	H	OH
<i>Ácido p-hidroxibenzoico</i>	H	H	OH	H
<i>Ácido protocatéquico</i>	H	OH	OH	H
<i>Ácido salicílico</i>	OH	H	H	H
<i>Ácido siríngico</i>	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
<i>Ácido vanílico</i>	H	OCH ₃	OH	H

Los ácidos hidroxicinámicos se acumulan en vacuolas de células del hollejo y de la pulpa como ésteres tartáricos, y sus concentraciones oscilan entre 0,06 mg/g de hollejo a 0,78 mg/g de hollejo, en función del tipo de ácido y de la cepa. En los vinos se encuentran formando glicósidos o ésteres, o combinados con antocianos, en concentraciones en torno a 100 mg/L. Hay que señalar, que en ocasiones pueden aparecer en vinos envejecidos en barricas de roble como resultado de la descomposición de ligninas [7].

Tabla 3: patrón de sustitución de los ácidos hidroxicinámicos.

Ácidos hidroxicinámicos	R1	R2	R3
<i>Ácido cafeico</i>	OH	H	H
<i>Ácido caftárico</i>	OH	H	Ácido tartárico
<i>Ácido p-cumárico</i>	H	H	H
<i>Ácido p-cutárico</i>	H	H	Ácido tartárico
<i>Ácido ferúlico</i>	OCH ₃	H	H
<i>Ácido fertárico</i>	OCH ₃	H	Ácido tartárico
<i>Ácido sinápico</i>	OCH ₃	OCH ₃	H

Ambos tipos de ácidos se encuentran en concentración del orden de 10 veces mayor en vinos tintos que en blancos [4].

Pese a que son incoloros en disolución, su presencia puede ser muy importante en la definición del color de los vinos ya que, como se comentará más adelante, son capaces de formar combinaciones estables con antocianos, generando compuestos con distintas propiedades colorimétricas a las de los antocianos a partir de los cuales se han generado. Además, estos compuestos intervienen en reacciones de copigmentación intramolecular cuando se encuentran acilando antocianos, lo que se observa como un efecto hiperacrómico (mayor absorbancia) y un desplazamiento batocrómico (hacia longitudes de onda mayores) en las disoluciones en las que se produce este fenómeno [8].

No presentan un olor o sabor particular, sin embargo, son precursores de fenoles volátiles, como el 4-vinilfenol y el 4-vinilguayacol, generados por algunas bacterias y levaduras (p. ej. *Brettanomyces ssp*) que poseen actividad enzimática tipo descarboxilasa. Estos fenoles se han descrito en los vinos como aromas poco agradables, ligados a notas de ahumado, caucho quemado, clavo, olor a disolvente, a medicinas, “farmacia”... [9-12]

1.2. ESTILBENOS

Son un tipo de compuestos fenólicos que son sintetizados en algunas plantas como respuesta al estrés, causado principalmente por la radiación ultravioleta, incluso una vez recolectadas las uvas [13-15], o a infecciones microbianas. Este tipo de compuestos se localizan en las células del hollejo de las uvas y son cedidos al mosto durante el proceso de vinificación.

Pese a que las cantidades de este tipo de compuestos encontradas en los vinos no son muy elevadas (del orden de 3 a 5 mg/L), han sido extensamente estudiados debido a su importante actividad biológica. Las concentraciones de este grupo de compuestos son

mayores en vinos tintos que en blancos o rosados, debido a que el tiempo de contacto con los hollejos durante la maceración es más prolongado en los primeros. El contenido está también relacionado con numerosos factores, entre los que se incluye la variedad de uva, factores climáticos, infecciones fúngicas, radiación ultravioleta, prácticas enológicas, etc.

Uno de los compuestos más estudiados y que mayor número de referencias bibliográficas acumula es el *trans*-resveratrol, al que se atribuyen propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiobesidad, y la prevención de trastornos cardiovasculares, entre otros [16].

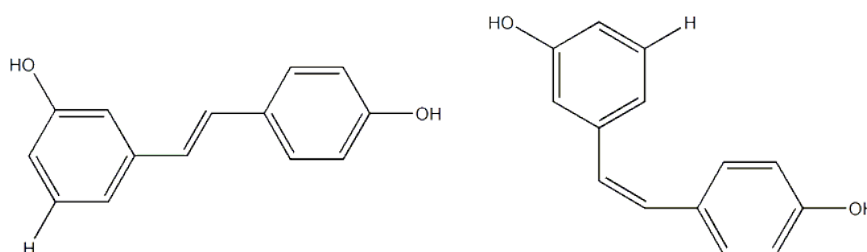


Figura 3: *trans*-resveratrol (izquierda) y *cis*-resveratrol (derecha).

El resveratrol se encuentra en la naturaleza en dos formas isoméricas, *cis* y *trans* (figura 3), que se pueden encontrar tanto en forma libre como conjugadas con glucosa. Estas últimas, se denominan piceidos (figura 4). Además, en los vinos, los estilbenos se han encontrado en formas oligoméricas y poliméricas, que reciben el nombre de viniferinas (figura 4) [17-20], así como en forma de otros derivados que difieren en la presencia de grupos hidroxilos o metoxilos, como el *trans*-piceatanol al que se atribuye actividad anticancerígena [20]

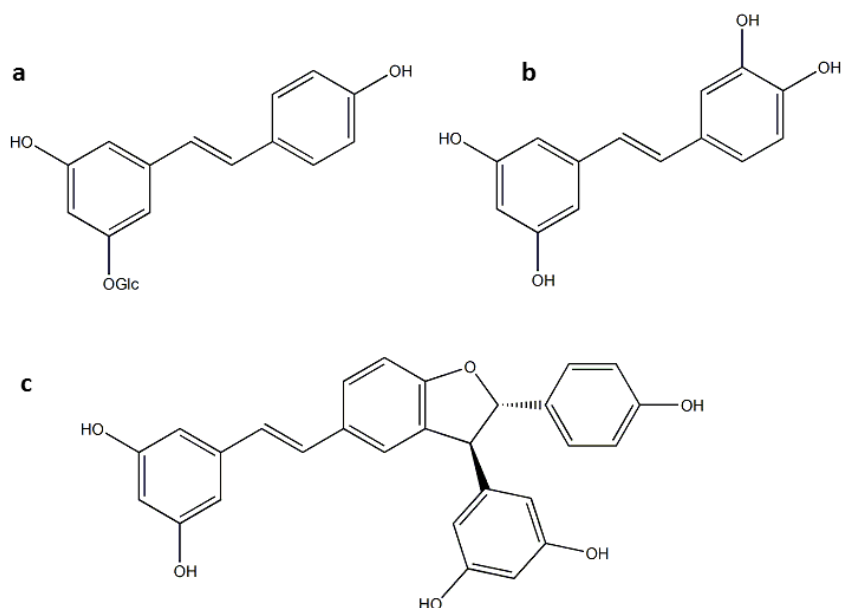
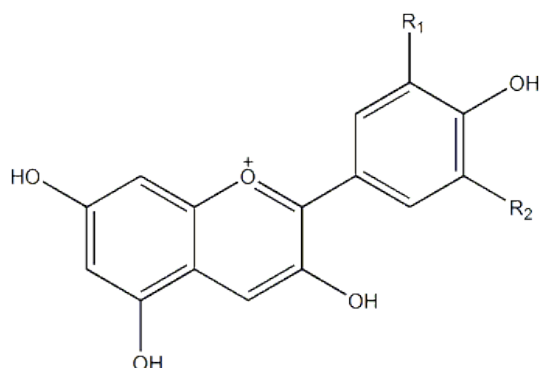


Figura 4: estructura de algunos de los estilbenos presentes en uvas y vino: *trans*-piceido (a); *trans*-piceatanol (b); *trans*- δ -viniferina (c).

2. FLAVONOIDES

2.1. ANTOCIANOS

Los antocianos presentes en las uvas y el vino son principalmente 3-O-monoglucósidos de cinco antocianidinas (figura 5), que se diferencian unas de otras por el patrón de sustitución del anillo B por grupos hidroxilos y/o metoxilos. Se localizan en vacuolas del hollejo de las uvas y en algunos casos también en la pulpa (variedades tintoreras) [21] y son cedidos al vino durante los procesos de vinificación [22].



Antocianidina	R1	R2
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH ₃	H
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

Figura 5: estructura general de las antocianidinas del vino.

Se presentan ampliamente distribuidos en el reino vegetal y son los pigmentos responsables de la coloración de muchas flores y frutos, proporcionando a los mismos colores que oscilan desde el azul hasta el rojo, incluyendo morados, naranjas, rosas y violetas [23]. La presencia de este tipo de compuestos y sus derivados en los vinos va a determinar una importante característica sensorial: el color.

La cantidad y distribución de las antocianidinas en las uvas depende en gran medida de su variedad, pero también de otros factores como son la madurez, las condiciones climáticas y la zona de producción [24]. Los antocianos en las uvas se encuentran mayoritariamente como 3-monoglucósidos, que pueden presentar acilación, principalmente con los ácidos acético, p-cumárico o cafeico.

También se ha descrito la presencia de 3,5-diglucósidos [25] o 3,7-diglucósidos [26] en pequeñas cantidades, que hasta hace unos años se habían detectado sólo en vides americanas y no en *Vitis vinífera* spp, y se creían ausentes en estas últimas [25,26]. La presencia de diglucósidos y su concentración se ha utilizado para diferenciar entre variedades híbridas productoras directas y *Vitis vinífera*, y también para detectar posibles adulteraciones en los vinos.

La presencia de los grupos hidroxilo y metoxilo, y de los azúcares hacen que estos compuestos presenten naturaleza hidrosoluble, y que sean solubles también en metanol y etanol.

El contenido de antocianos en los vinos depende tanto del que presenten las uvas, como de las técnicas de vinificación empleadas. El contenido máximo de antocianos nativos se alcanza unos días después de iniciarse la maceración de las uvas, y va disminuyendo a continuación debido a fenómenos de precipitación de materia coloidal, de adsorción en las paredes celulares de las levaduras y a la transformación de los antocianos nativos en compuestos derivados [27].

2.1.1. Color y estabilidad de los antocianos

El patrón de sustitución y su naturaleza, y la posible acilación del azúcar determinan el color que presentan los pigmentos antociánicos. Asimismo, éste se encuentra afectado por las condiciones del medio: composición, pH, presencia de SO₂, posibilidad de copigmentación con otras moléculas, etc.

2.1.1.1. La estructura de la molécula

La presencia de grupos glucídicos en posición 3 del anillo C provoca un desplazamiento hipsocrómico en el máximo de absorbancia respecto al aglicón.

La presencia de sustituyentes -OH y -OCH₃ en el anillo B determina que el máximo de absorbancia se desplace hipsocrómicamente, siendo mayor este desplazamiento si la sustitución se produce con grupos metoxilo y cuando se encuentran dos posiciones sustituidas más que cuando sólo se encuentra una [28].

También se ha puesto de manifiesto que el incremento de la sustitución por azúcares se acompaña por un incremento en el coeficiente de extinción molar respecto a los aglicones

o los derivados mono o di glucosilados [29]. Asimismo, los derivados diglucosilados o acilados presentan, en general, mayor estabilidad que los monoglucosilados [30].

La presencia de sustituyentes en posición 4 también incrementa la estabilidad de los antocianos, y ésta a su vez es mayor cuanto más voluminoso sea el sustituyente en esa posición [31].

2.1.1.2. Presencia de SO₂

El SO₂ en los vinos puede proceder de dos fuentes, la producción por levaduras y la adición tecnológica, siendo esta última más importante cuantitativamente. Esta adición obedece a tres motivos: proteger al mosto de las oxidaciones bien oxidándose él mismo o bien inhibiendo las enzimas oxidativas; seleccionar un medio de cultivo adecuado debido a su acción bactericida y actuar frente a levaduras aerobias [32].

El anión bisulfito que se encuentra libre en el medio es capaz de realizar un ataque nucleofílico sobre la posición 4 de la molécula del antociano lo que provoca una decoloración de la misma, ya que se pierde la estructura de dobles enlaces conjugados que es el grupo cromóforo de estas moléculas [33]. Su influencia sobre el color que presentan las disoluciones de antocianos es intensa e inmediata. A concentraciones de 200 ppm de SO₂ y al pH del vino, las moléculas de antociano pierden hasta un 85% de su intensidad colorante [3].

Por otra parte, la unión a bisulfito aumenta la estabilidad de los antocianos debido a que impide que se produzcan reacciones de polimerización y/o de hidratación. Habitualmente la unión a bisulfito es reversible, pudiéndose generar de nuevo la sal de flavilio coloreada y liberarse SO₂. Sólo en el caso de que las concentraciones de bisulfito en el medio sean muy elevadas esta unión llega a ser irreversible.

Algunas moléculas estructuralmente relacionadas con los antocianos son resistentes a la decoloración que provoca el bisulfito. Tal es el caso de los piranoantocianos, compuestos

que deben su resistencia a la presencia de sustituyentes en la posición 4 de la molécula de antociano que hace que se encuentre protegida frente al ataque nucleofílico del bisulfito.

2.1.1.3. pH del medio

Los antocianos se presentan bajo diversas formas estructurales en equilibrio (figura 6) y el factor determinante que provoca el paso de unas formas a otras es el pH del medio [34].

A pH ácidos, la forma estructural mayoritaria es el catión flavilio (AH^+) de color rojo. A pH poco ácido y en medios no acuosos se generan bases quinoidales neutras por desprotonación que presentan coloración azul-violacea.

Cuando el pH se encuentra comprendido entre 3 y 6 en el medio acuoso se forman pseudobases carbinol (también llamadas formas hemiacetálicas), debido al ataque nucleofílico del agua sobre la posición 2 de los antocianos. Estas formas son incoloras y se encuentran en equilibrio con formas abiertas denominadas calconas que poseen una coloración ligeramente amarillenta.

Como consecuencia de los equilibrios estructurales, en general los antocianos presentan colores más intensos a pH ácidos y a medida que se incrementa el pH del medio se producen desplazamientos hipsocrómicos, en algunos casos muy intensos y efectos hipocrómicos en el color de las disoluciones [36].

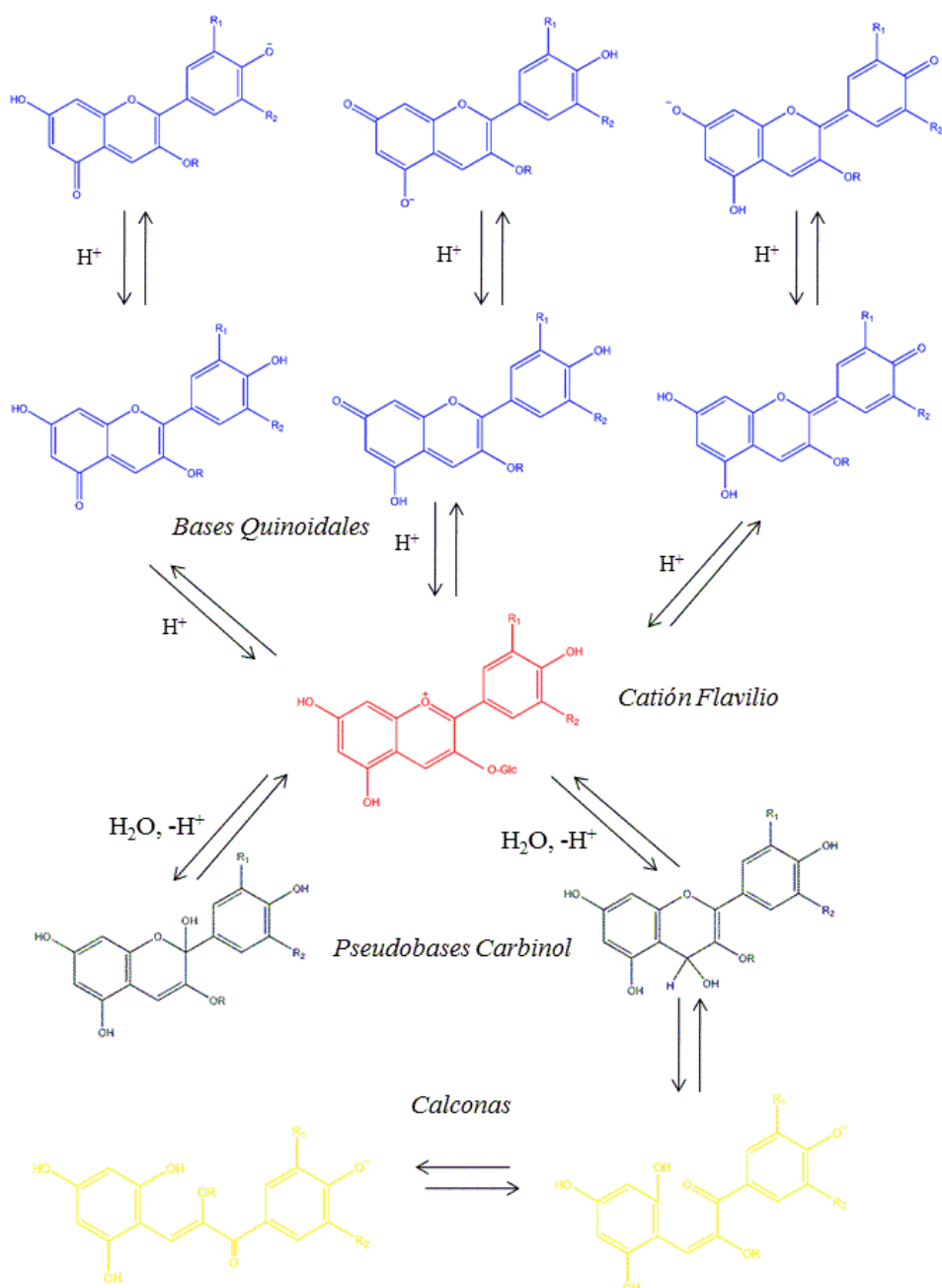


Figura 6: equilibrios estructurales de los antocianos en función del pH. Adaptado de Brouillard et al., 1977 [35].

2.1.1.4. Estabilidad individual

La estabilidad de los monoglucósidos de antocianos frente al pH, la presencia o ausencia de oxígeno y la luz han sido estudiadas por diversos autores [30,36-41]. Todos los estudios realizados demuestran que las temperaturas elevadas y la presencia de luz

afectan negativamente la estabilidad de los antocianos. Además, esta estabilidad disminuye aún más a valores de pH por encima de 3 [36]. Por otra parte, también ha sido demostrado que las disoluciones de antocianos almacenadas bajo atmósfera reductora presentan mayor estabilidad que las almacenadas en presencia de oxígeno [38,41].

2.1.2. Reactividad de antocianos

Durante el proceso de vinificación y el periodo de envejecimiento de los vinos, se producen numerosas reacciones en las que intervienen antocianos y otros compuestos fenólicos, principalmente, reacciones de copigmentación y de formación de pigmentos derivados.

2.1.2.1. Copigmentación

La copigmentación se ha definido como un proceso exotérmico y espontáneo que consiste en la asociación entre una molécula orgánica, denominada copigmento y las formas coloreadas de las moléculas de antocianos (catión flavilio o formas quinoidales). El copigmento es una molécula incolora o una porción de molécula que presenta un sistema Π rico en electrones que es capaz de interactuar con el catión flavilio de los antocianos, deficiente en electrones. La naturaleza de esta interacción no está muy clara, aunque se postula que se debe principalmente a interacciones de tipo Π - Π y repulsiones coulombicas. Los complejos de copigmentación formados adoptan una estructura tipo sándwich, y presentan naturaleza hidrofóbica. La aparición de este fenómeno se traduce en un incremento en la intensidad colorante de la disolución (efecto hiperacrómico) que habitualmente está acompañado de un desplazamiento en la longitud de onda de absorbancia máxima hacia valores mayores, lo que se percibe como la aparición de colores más azulados [42]. Los complejos de copigmentación están más protegidos frente al ataque nucleofílico del agua, lo que aumenta la proporción de moléculas de antociano que se encuentran en forma coloreada. El fenómeno de copigmentación causa a la vez una modificación y un incremento en la estabilidad del color de las disoluciones. La

eficacia de un compuesto para actuar como copigmento está condicionada por su estructura y su tamaño, siendo las moléculas más planas las que resultan ser mejores copigmentos.

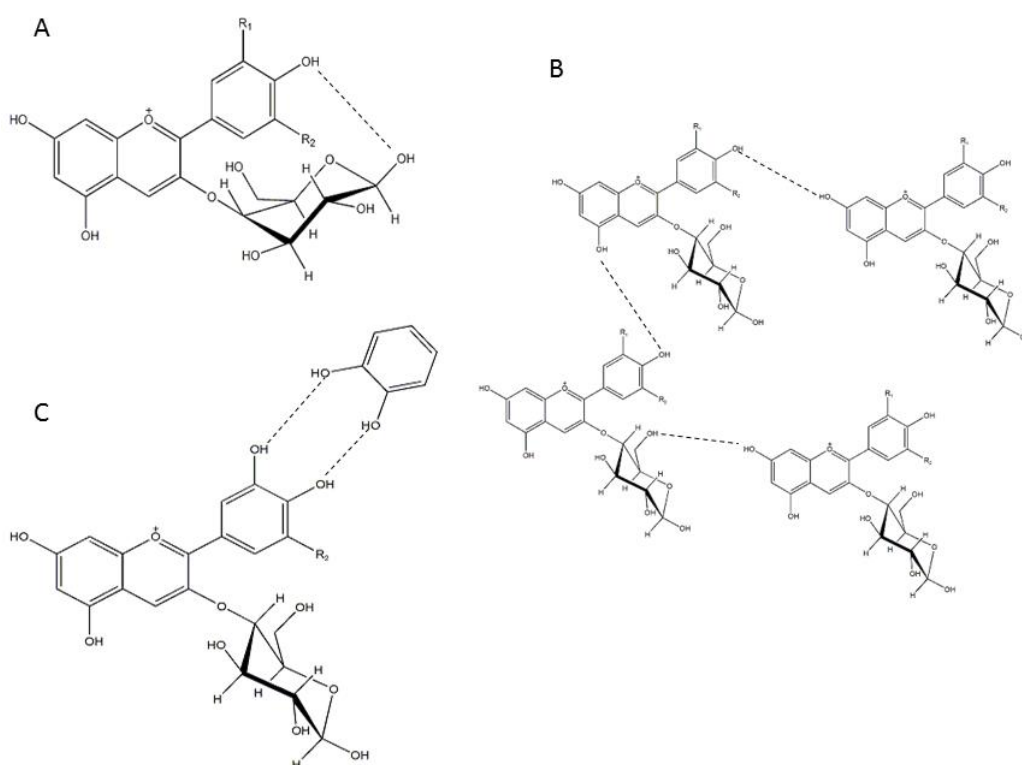


Figura 7: tipos de fenómenos de copigmentación descritos en vinos: copigmentación intramolecular (A), autoasociación (B), copigmentación heteromolecular (C). Adaptado de Castañeda-Ovando et al, 2009. [43].

En función del tipo de moléculas que intervienen, se han descrito dos tipos de copigmentación diferentes:

- Intramolecular (figura 7A): Este tipo de copigmentación tiene lugar cuando el copigmento forma parte de la molécula de antociano. Se produce en antocianos de estructura compleja, con uno o más azúcares, y que se encuentran acilados, principalmente en posición 6'-OH del azúcar, por ácidos fenólicos. Este tipo de compuestos son capaces de formar un plegamiento en su estructura que provoca que los grupos aromáticos acilados se sitúen sobre y bajo el plano formado por el núcleo del ión

flavilio, generando una estructura tipo sándwich. Este tipo de plegamiento proporciona una elevada estabilidad al color de los antocianos, especialmente entre pH 4 y 5 [44]. La estructura generada es altamente resistente a las reacciones de hidratación, ya que existe un elevado impedimento estérico que provoca que las posiciones 2 y 4 de la molécula del antociano, que son las que sufren el ataque nucleofílico del agua sean muy poco accesibles [45]. Esto favorece la existencia de formas coloreadas. Este tipo de copigmentación ha sido descrita algunas flores y ha sido propuesto que también se puede manifestar en algunos de los pigmentos generados durante el envejecimiento de los vinos, como el caso de los piranoantociano-flavanol [46].

- Intermolecular: se produce por asociación de los antocianos y otras moléculas presentes en el medio. Se han descrito dos tipos de reacciones de copigmentación intermolecular, la denominada homomolecular o autoasociación (Figura 7B) que se produce entre distintas moléculas del antociano presentes en el medio; y la heteromolecular (Figura 7C) en la que las moléculas de antociano interactúan con otros compuestos fenólicos. La autoasociación provoca una desviación positiva de la ley de Beer. Cuando se produce el fenómeno de autoasociación los antocianos se apilan verticalmente formando complejos helicoidales. No está claro que este fenómeno se produzca en vinos, aunque sí se conoce su existencia en flores. Algunos autores lo consideran responsable de la mayoría de las desviaciones de la ley de Beer que se producen en vinos mientras que otros consideran que es un fenómeno con poca importancia en la expresión de color de los vinos jóvenes [47].

La copigmentación heteromolecular se produce en medios acuosos en los que haya antocianos y otros compuestos que puedan actuar como copigmentos, y se ha observado en fluidos intra y extravacuolares. Se considera que la existencia de este fenómeno es el responsable directo de la gran variedad de colores que exhiben algunas flores, comparado con el número limitado de antocianos que se encuentran en sus pétalos. En los vinos este fenómeno ha sido estudiado por diversos autores, que han tratado de

evaluar los factores que afectan al desarrollo de este fenómeno y los compuestos involucrados en él. Los principales factores que influyen sobre este proceso son el pH del medio, la temperatura, la naturaleza del pigmento y del copigmento, la relación entre las concentraciones y la presencia de disolventes orgánicos en el medio [8]. Para que se produzca este fenómeno es importante la existencia de una red de moléculas de agua, por lo que todo factor que rompa esta red provoca una disminución de la copigmentación, como por ejemplo sucede con la presencia de cosolventes en el medio o con el incremento de la fuerza iónica.

En los vinos, los copigmentos más efectivos en la copigmentación heteromolecular son los flavonoles, los flavanoles y los ácidos fenólicos [48].

La copigmentación ha demostrado tener una gran importancia sobre el color final que presentan los vinos, llegando a suponer entre el 30 y el 50% de la coloración que presentan los vinos jóvenes [8].

Asimismo, se ha postulado que la copigmentación puede ser un primer paso en la formación de pigmentos derivados de antocianos en los vinos [49]. Se han descrito una gran cantidad de pigmentos derivados de antocianos que aparecen en los vinos durante los procesos de envejecimiento (Figura 8). Estos compuestos son más estables fisicoquímicamente que los antocianos a partir de los cuales se han generado y presentan características colorimétricas distintas a las de los compuestos de partida, y son los principales responsables del cambio de color que se produce en los vinos durante el envejecimiento [27].

2.1.2.2. Pigmentos derivados de antocianos

Durante el proceso de envejecimiento de los vinos se han descrito numerosas reacciones que tienen lugar entre los antocianos y otros compuestos presentes en el medio, frecuentemente de naturaleza polifenólica, que conducen a la formación de pigmentos derivados de antocianos. Estos derivados presentan características físico-químicas y

colorimétricas diferentes a las de los antocianos a partir de los cuales se han generado.

Existen 4 grupos principales de pigmentos formados a partir de los antocianos, cuyas estructuras generales se resumen en la figura 8.

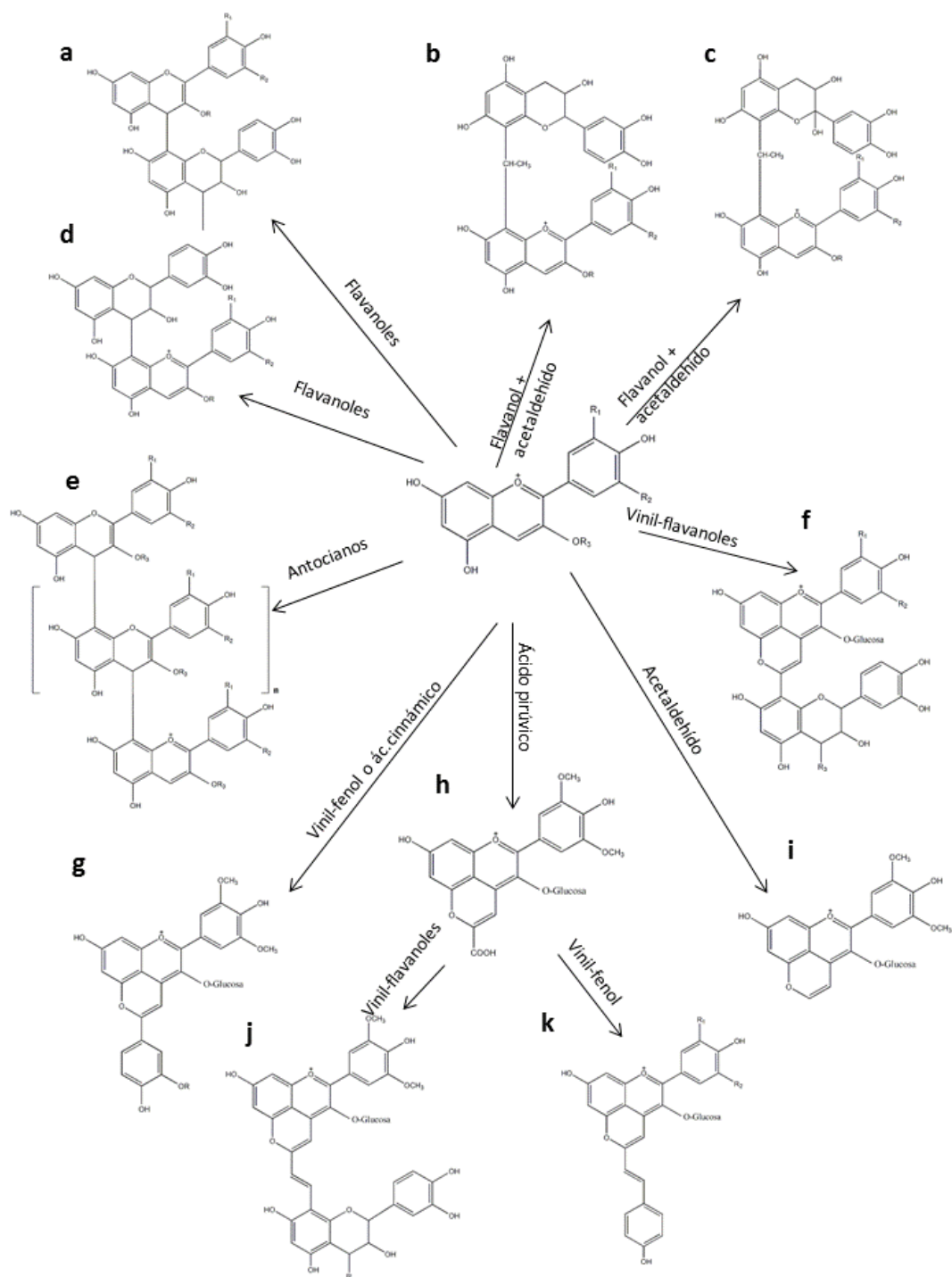


Figura 8: transformaciones químicas de los antocianos durante el proceso de vinificación. Adaptado de Monagas y Bartolomé, 2008 [50].

2.1.2.2.1. Productos de condensación directa entre antocianos y flavanoles

Al pH del vino, los antocianos en forma flavilio pueden actuar como electrófilos a través de las posiciones C-2 o C-4 o como nucleófilos si se encuentran en forma hemiacetálica a través de las posiciones C-6 o C-8 (figura 9). La presencia de estas posiciones reactivas hace que los antocianos puedan reaccionar con taninos en reacciones de condensación directa.

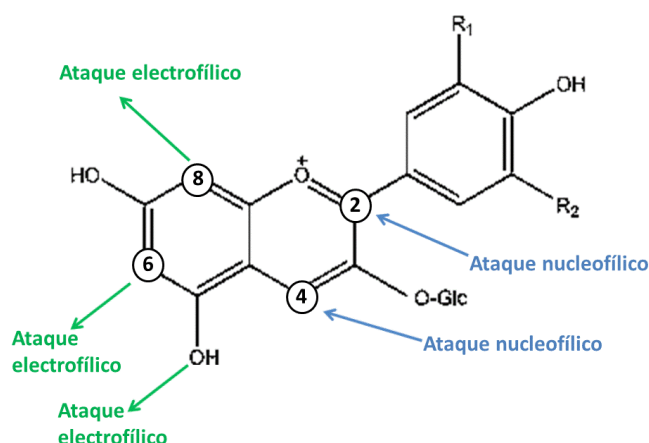


Figura 9: principales posiciones reactivas de los antocianos. Adaptado de de Freitas y Mateus, 2006 [51].

La condensación directa entre antocianos y flavanoles genera dos tipos de compuestos: los antociano-flavanol (A-F) (figura 8a) y los flavanol-antociano (F-A) (figura 8d).

Las formas hemiacetálicas incoloras de los antocianos pueden dar lugar a aductos del tipo F-A, por el ataque de las posiciones nucleofílicas sobre la posición C-4 de un flavanol, que tras sufrir una deshidratación dará lugar a una forma flavilio coloreada. La presencia de este tipo de compuestos en vinos ha sido ampliamente documentada por diversos autores [26,52-54].

Si el ataque se produce desde la posición nucleofílica C6 o C8 del flavanol sobre la posición electrofílica C4 del antociano, se forma un aducto del tipo A-F. Inicialmente este aducto se encuentra en forma flaveno incolora, pero puede oxidarse y dar lugar a la forma flavilio coloreada.

La formación de compuestos de tipo A-F o F-A se encuentra determinada por el pH del medio, así a pH 2 se favorece la formación de compuestos de tipo F-A⁺ cuya tasa de formación se ve limitada por la hidrólisis acida de las procianidinas, mientras que a pH 3.8 prevalecen los compuestos de tipo A-F, que no fueron detectados a pH más bajo [55]. Parece que la formación de ambos tipos de compuestos está más asociada a flavanoles oligoméricos que a poliméricos [56], aunque en vinos se han detectado masas correspondientes a octámeros [57].

2.1.2.2.2. Oligómeros de antocianos

Los compuestos detectados son dímeros y trímeros de antocianos (figura 8e) en los que al menos una de las unidades es malvidina-3-glucosa. También es frecuente que presenten alguna unidad acilada con ácido p-cumárico. [58]. Estos compuestos fueron detectados por primera vez en extractos de hollejo [58], y posteriormente en fracciones aisladas a partir de vino tinto [59,60].

Todos ellos se presentan en forma monocargada, siendo el catión flavilio la unidad terminal de la cadena.

Además, también se han detectado oligómeros formados por la unión de flavanoles y dímeros de antocianos [60]. Parece que estos compuestos estarían formados por un flavanol como unidad superior unido a un dímero de antociano a través del C-4 del flavanol y las posiciones nucleofílicas C-6 o C-8 de la subunidad superior del dímero de antociano. Se ha propuesto que su formación se produciría tras la hidrólisis ácida de un flavanol, que da lugar a la aparición de un carbocatión en posición 4, seguido de la reacción con un dímero de antociano ya existente.

2.1.2.2.3. Productos de condensación mediada por aldehídos

El primer grupo de pigmentos derivados de antocianos descritos en los vinos fueron los productos de condensación entre antocianos y flavanoles mediada por acetaldehído (figura 8b y 8c). El acetaldehído es el aldehído más abundante en los vinos, ya que se

origina en el metabolismo de las levaduras o por oxidación del etanol [61]. El mecanismo de reacción para la formación de este tipo de derivados (figura 10) implica la formación de un carbocatión, a partir del aldehído, que es capaz de reaccionar con la posición C-6 o C-8 del flavanol. Posteriormente, la deshidratación del producto de esta reacción conduce a la formación de un nuevo carbocatión que sufre un ataque nucleofílico por una molécula de antociano, uniéndose a través de la posición C-8 del antociano. Esto genera dos nuevos pigmentos que difieren en la estereoquímica del carbono anomérico del puente etilo formado entre las dos subunidades.

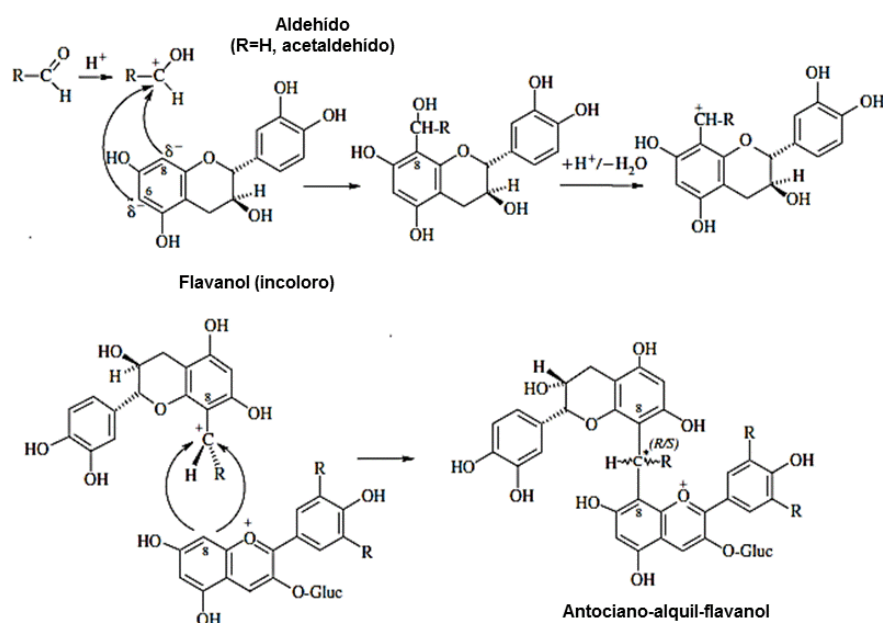


Figura 10: reacción de formación de productos de condensación mediada por aldehídos.

Adaptado de de Freitas y Mateus, 2010 [62].

Estos pigmentos presentan un máximo de absorbancia desplazado batocrómicamente con respecto a los antocianos nativos, en torno a 535 nm, y se ha propuesto que sufren reacciones de copigmentación entre el flavanol y el antociano [63], lo que contribuiría también a explicar la elevada resistencia que presentan frente a las variaciones de pH del medio y la decoloración causada por bisulfito.

Otros aldehídos presentes en los vinos dan lugar a reacciones de formación de pigmentos derivados similares a las descritas para el acetaldehído. Entre estos aldehídos se incluyen isovaleraldehído (3-metil butiraldehído), benzaldehído, propionaldehído, isobutiraldehído, formaldehído y 2-metilbutiraldehído, cuyo origen se debe al metabolismo de las levaduras y a que son extraídos desde las barricas de roble durante el envejecimiento. Los compuestos generados a partir de estos aldehídos han sido detectados en los vinos de Oporto únicamente en niveles de trazas [64-66]. Los productos resultantes difieren en el tipo de puente que forma la unión interflavánica. Estos compuestos presentan el máximo de absorción en torno a 540 nm, mostrando coloración púrpura.

Otros pigmentos formados a partir de aldehídos y compuestos fenólicos son las denominadas oaklinas (figura 11). Recibieron este nombre ya que son el resultado de la reacción entre catequina y aldehídos extraídos de la madera de roble durante el proceso de envejecimiento de los vinos. Concretamente los aldehídos que intervienen en la formación de este tipo de compuestos son el sinapaldehído y coniferaldehído. Como consecuencia de la reacción, se han descrito varios pigmentos estructuralmente relacionados entre sí y que se caracterizan por presentar un anillo de tipo catequina-pirilio [67,68]. Estos compuestos presentan el máximo de absorción entre 480 y 520 nm, y presentan una coloración rojo-ladrillo.

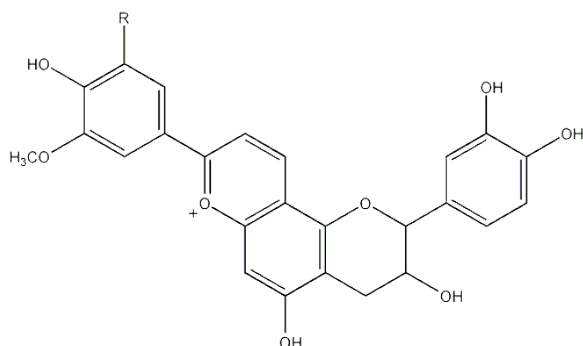


Figura 11: estructura general de las oaklinas.

Los aldehídos intervienen también en la formación de pigmentos tipo xantilio. En este caso, el ácido glioxílico, metilglioxal, hidroximetilfurfural o furfural pueden mediar la condensación entre dos moléculas de catequina a través de sus posiciones C-8. El dímero formado da lugar un pigmento de estructura xantilio tras sufrir oxidación y deshidratación (figura 12). Estos pigmentos presentan coloración amarilla al pH del vino, con el máximo de absorbancia en torno a 440 nm.

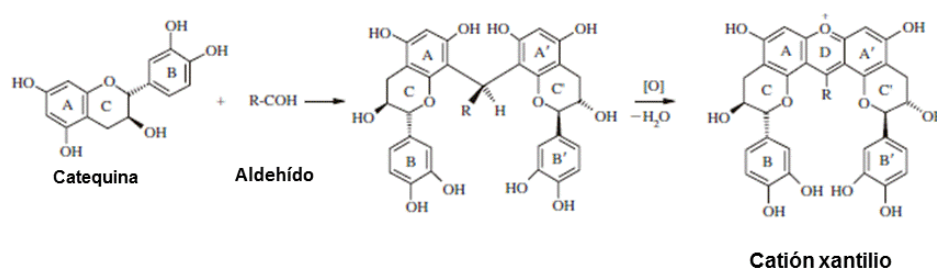


Figura 12: formación de pigmentos tipo xantilio. Adaptado de de Freitas y Mateus, 2010 [62].

2.1.2.2.4. Piranoantocianos

Este tipo de compuestos derivados de antocianos se caracterizan por tener en su estructura un anillo pirano adicional (anillo D) formado entre el grupo OH situado en el C-5 y el C-4 del anillo piránico del antociano (figura 8). Presentan un espectro de absorción desplazado hipsocrómicamente respecto a los antocianos a partir de los cuales se generan y un hombro a 352-370 nm, característico de los antocianos con sustituyentes en posición 4.

Se han descrito varios subtipos de piranoantocianos, en función sus precursores y su estructura química.

Los piranoantocianin-fenoles (figura 8g) fueron detectados por primera vez en las membranas poliméricas empleadas para la filtración del vino [69]. Se han propuesto dos mecanismos para su formación, uno de ellos en el que intervendrían antocianos y

vinilfenoles generados por descarboxilación de ácidos cinámicos durante la fermentación [70], y otro en el que se forman a partir de los antocianos y los ácidos cinámicos intactos (figura 13) [71]. Se cree que en los vinos se podrían producir ambos mecanismos, siendo el primero el predominante en las primeras etapas de la vinificación y el segundo, más lento, el que se produciría en el periodo de envejecimiento. Estos pigmentos presentan coloración naranja, y el máximo de absorbancia en torno a 505-510 nm.

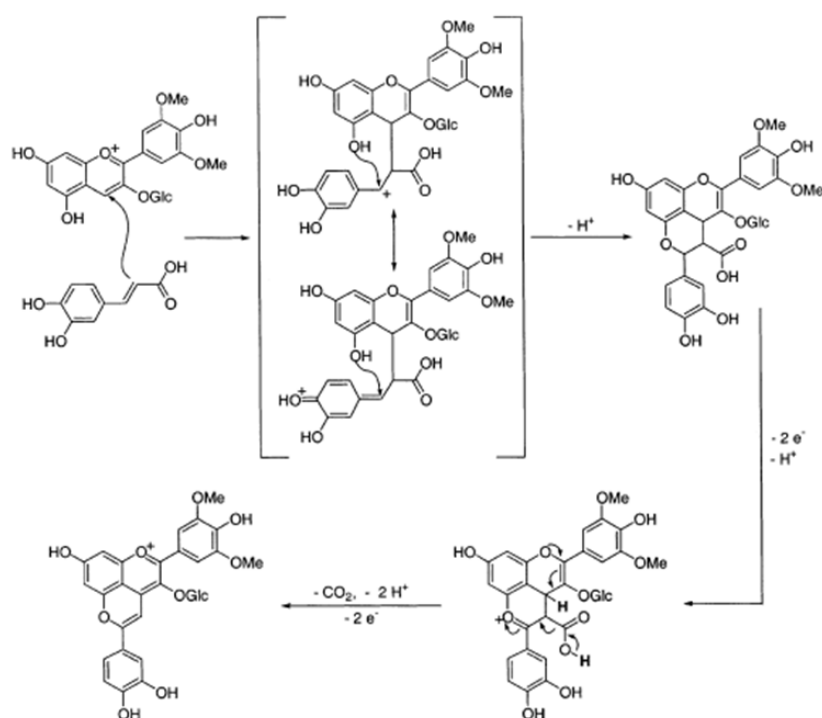


Figura 13: mecanismo de formación propuesto para el compuesto piranomalvidin-3-glucosylcatecol por Schwarz y colaboradores. Tomado de Schwarz et al., 2003 [71].

Se han detectado e identificado en vino varios compuestos de este tipo que difieren en el patrón de sustitución del anillo fenólico (anillo E), en función del ácido hidroxicinámico implicado en la reacción. Así, se han descrito los derivados de los ácidos cafeico, ferúlico, sinápico y cumárico en vinos producidos a partir de distintas variedades de uva y diversos orígenes geográficos [72-75].

Los piranoantocianin-flavanol (figura 8f) fueron descritos por primera vez en medios modelo en los que había antocianos, flavanoles y acetaldehído [76]. Presentan coloración rojo-anaranjada, con máximos de absorbancia entre 500 y 511 nm y elevada resistencia a la decoloración, tanto la causada por los cambios de pH como la provocada por la presencia de SO₂ en el medio [54]. Presentan una estructura compleja en la que está presente un flavanol que conserva su estructura original tras la cicloadición.

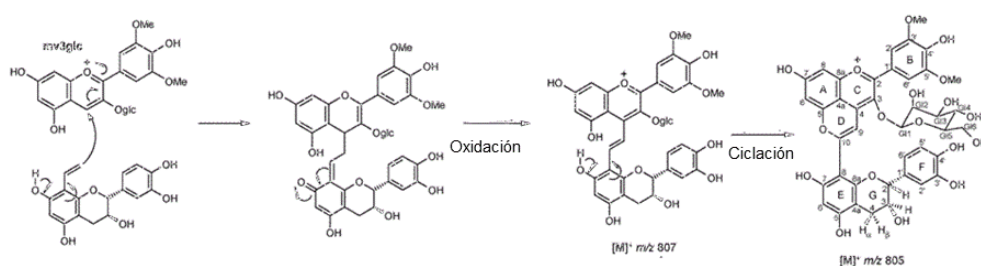


Figura 14: mecanismo propuesto para la formación de compuestos tipo piranoantocianin-flavanol. Adaptado de Cruz et al., 2008 [77].

Se ha propuesto que se forman mediante la reacción entre un antociano en forma flavilio y un vinilflavanol (figura 14). Este último, resultaría de la transformación de residuos de etilflavanoles que se generarían por tres posibles procesos:

- Reacción entre acetaldehído y monómeros de flavanol.
- Ruptura de oligómeros de flavanoles con puentes etilo como enlaces interflavánicos.
- Ruptura de otros compuestos de tipo antociano-etil-flavanol.

Se han detectado piranoantocianos unidos a flavanoles con grados de polimerización de hasta tetrámeros en vinos australianos [78]. Parece que el número de subunidades de tipo flavanólica podría influir en las características colorimétricas de los pigmentos, probablemente debido a la existencia de fenómenos de copigmentación intramolecular [62].

Los carboxipiranoantocianos (figura 8h) se forman a partir de la condensación de antocianos y ácido pirúvico. El primero que se describió fue el formado a partir de malvidina-3-O-glucosa y se denominó vitisina A [79]. Las vitisinas de tipo A se caracterizan por presentar el máximo de absorción desplazado hipsocrómicamente unos 20 nm respecto al antociano de partida, presentar un hombro a una longitud de onda de entre 352 y 370 nm, gran estabilidad y alta expresión de color a pH elevados [80]. Se ha postulado que se forman principalmente durante el proceso de fermentación, ya que es el momento en el que la concentración de ácido pirúvico en los vinos es más elevada [81].

Las vitisinas de tipo B (figura 8i) se forman a partir de antocianos y acetaldehído, y se caracterizan por no presentar ningún sustituyente en su anillo D. A estos compuestos se les dio el nombre de vitisinas B cuando fueron descritos para diferenciarlos de las vitisinas de la serie A [80]. Su máximo de absorción se encuentra desplazado hipsocrómicamente 36-39 nm con respecto al antociano de partida. Su mecanismo de formación aún no ha sido completamente elucidado.

También se han descrito metilpiranoantocianos (figura 15), y se ha propuesto que se podrían formar a partir de antocianos y acetona [72]. Posteriormente, se han aislado dos metilpiranoantocianinas en vinos de Oporto, y se ha propuesto su síntesis por condensación de antocianos y ácido acetoacético [82]. Estos pigmentos presentan coloración amarillo-naranja, con máximos de absorción a 478 nm.

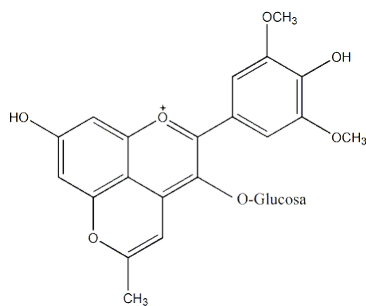


Figura 15: estructura general de las metilpiranoantocianos.

Las portisinas o vinilpiranoantocianos (figura 8j) se generan a partir de vitisinas de tipo A y vinilflavanoles. Reciben el nombre de portisinas ya que fueron detectadas por primera vez en vinos de Oporto [83]. Presentan el máximo de absorbancia en torno a 575 nm, lo que se traduce en una coloración azul que ha demostrado ser muy estable [84]. Esto es debido a la presencia de dobles enlaces conjugados por toda la molécula que permite la deslocalización de los electrones Π . Estos compuestos sólo aparecen en vinos con periodos de envejecimiento prolongado ya que se forman a partir de otros compuestos generados durante el envejecimiento de los vinos. Presentan una elevada intensidad colorante, y los coeficientes de extinción determinados para alguno de estos compuestos son muy elevados comparados con los de los antocianos u otros pigmentos derivados [84].

Recientemente se han descrito otras portisinas (figura 8k), en las que en vez del flavanol aparece un anillo fenólico con distintos patrones de hidroxilación o metoxilación. Se forman por la reacción de carboxipiranoantocianos y vinilfenoles o ácidos fenólicos, en un mecanismo análogo al descrito para la formación de vinilflavanoles. Estos compuestos presentan longitudes de onda de absorbancia máxima desplazados hipsocrómicamente con respecto a los vinilpiranoantocianos-catequina, en torno a 533-540 nm [85].

2.2. FLAVANOLES

Son un grupo heterogéneo de compuestos de fenólicos que pueden presentar grados de polimerización variable y que se caracterizan por su capacidad para formar combinaciones estables con proteínas, polisacáridos y otros polímeros, lo que determina su capacidad de provocar sensación de astringencia en boca, de curtir pieles, de inhibición enzimática, etc. Son moléculas de naturaleza hidrosoluble que también son solubles en medios hidroalcohólicos.

Se clasifican en dos grupos en función del tipo elemental de molécula a partir de la cual se forman:

2.2.1. Taninos hidrolizables.

Los taninos hidrolizables presentes en los vinos se clasifican en galotaninos o elagitaninos en función de que su hidrólisis genere moléculas de ácido gálico o de ácido elágico. Estos compuestos se encuentran en la madera y son cedidos a los vinos durante los procesos de maceración en barrica. Su presencia influye en las características organolépticas de los vinos, incluyendo en el color ya que pueden afectar a las reacciones de formación de pigmentos derivados de antocianos [86-88].

2.2.2. Taninos condensados o proantocianidinas

Los flavan-3-oles se encuentran en los vinos como formas monoméricas (denominadas genéricamente catequinas) y como proantocianidinas oligoméricas (hasta 10 subunidades) o poliméricas (más de 10 subunidades).

Las proantocianidinas se denominan así ya que por calentamiento en medio ácido generan antocianidinas. Los taninos identificados en uvas y vino son procianidinas (generan cianidina) y prodelfinidinas (generan delfinidina).

Presentan dos centros quirales, en las posiciones 2 y 3, lo que da lugar a dos series de derivados, los derivados *trans* (2*R*, 3*S*), y los derivados *cis* (2*S*, 3*S*). Es frecuente encontrar derivados esterificados con ácido gálico, especialmente en posición 3.

En uvas y vinos se han encontrado derivados de catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina y epicatequina-3-galato (figura 16), y en menor concentración catequina-3-galato y galocatequina-3-galato [50].

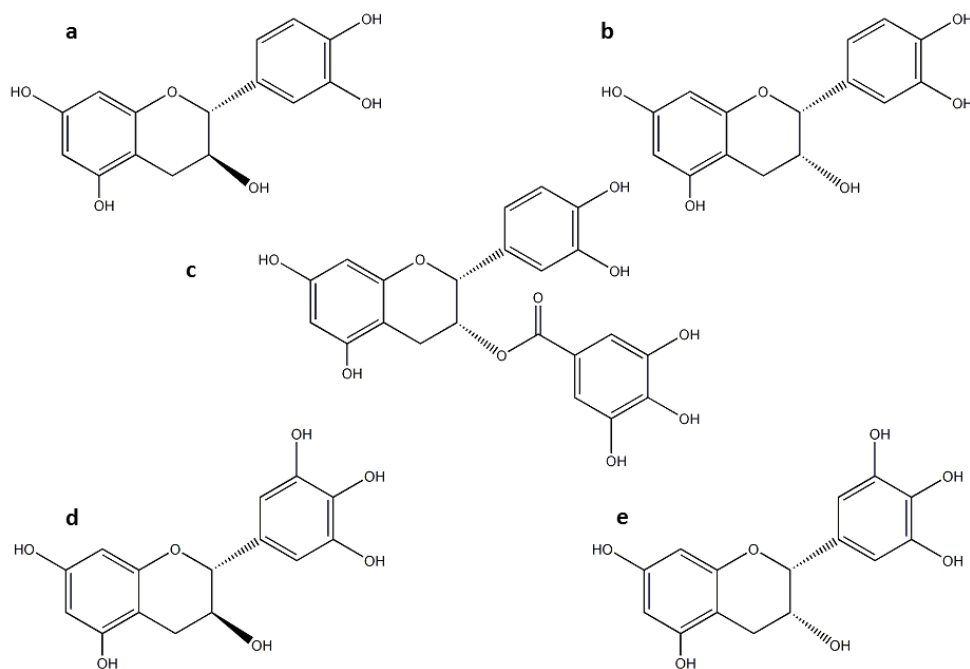


Figura 16: principales flavan-3-oles monómeros presentes en uvas y vino: catequina (a), epicatequina (b), epicatequina-3-O-galato (c), galocatequina (d) y epigalocatequina (e).

Los flavanoles monómeros se unen entre sí mediante enlaces C-C para formar oligómeros y polímeros. En las proantocianidinas de la serie B estos enlaces se localizan entre las posiciones C4, de la subunidad superior, y C6 o C8 de la subunidad inferior. Las proantocianidinas de la serie A presentan un enlace tipo éter adicional entre las posiciones C-2 de la subunidad superior y el grupo hidroxilo de los carbonos 5 ó 7 de la subunidad inferior (figura 17).

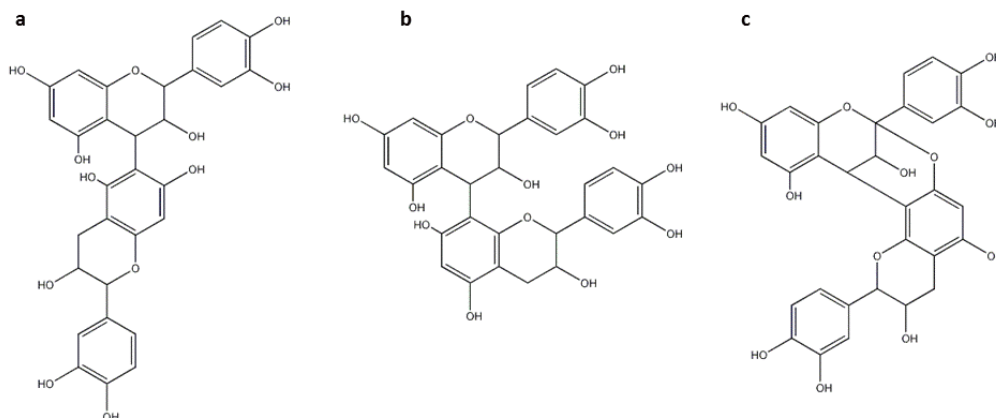


Figura 17: proantocianidinas de la serie B unidas mediante enlace C4-C6 (a) o C4-C8 (b) y proantocianidina de la serie A unida mediante enlace C4-C8 y C2-O-C5.

La presencia de varios tipos diferentes de subunidades y enlaces posibles entre ellas genera una gran diversidad en este tipo de compuestos.

En las uvas se localizan principalmente en las semillas y en menor medida en los hollejos y raspones. Las semillas de las uvas presentan únicamente procianidinas, mientras que en los hollejos se encuentran tanto procianidinas como prodelfinidinas [89,90]. Estos compuestos son cedidos al vino durante los procesos de vinificación y maceración, por lo que en los vinos se encuentran ambos tipos de derivados.

Su concentración en los vinos está relacionada con las técnicas de vinificación empleadas y la variedad de uva, oscilando entre 1 y 4 g/L en el caso de vinos tintos y de 100 a 300 mg/L en el caso de vinos blancos [4].

Estos compuestos son difíciles de estudiar debido a la gran diversidad y similitud de las estructuras que presentan y a la falta de patrones comerciales que permitan su identificación y cuantificación.

Se han desarrollado diversas técnicas para el análisis de los oligómeros y polímeros de proantocianidinas, incluyendo el uso de HPLC en fase reversa, que ha demostrado su eficacia para el análisis de oligómeros [91-93], o la hidrólisis ácida en presencia de

nucleófilos que proporciona información sobre el grado de polimerización y la distribución en subunidades de los polímeros [94,95].

La importancia de este tipo de compuestos en los vinos se debe a que tienen una gran influencia en las características organolépticas de los mismos, especialmente en el color y la astringencia [96].

En cuanto al color, pese a que estos compuestos son incoloros en disolución, pueden formar asociaciones con los antocianos presentes en los vinos, dando lugar a fenómenos de copigmentación o a la formación de nuevos pigmentos, con características colorimétricas diferentes a los antocianos nativos, como ya ha sido descrito en el apartado referido a los pigmentos derivados de antocianos y a los fenómenos de copigmentación.

En cuanto a la astringencia, estos compuestos han sido muy relacionados con la percepción de astringencia, y se considera que son los principales causantes de esta sensación en los vinos tintos. Aunque los mecanismos relacionados con la astringencia no se conocen completamente, generalmente se acepta que esta sensación está relacionada con la capacidad de las proantocianidinas de interaccionar con las proteínas lo cual provocaría la precipitación de proteínas salivares, conduciendo a una falta de lubricación y sensación de sequedad de la mucosa bucal, como se discutirá más detalladamente en el apartado dedicado a la astringencia.

2.3. FLAVONOLES

Son compuestos fenólicos de coloración amarillenta que se encuentran en las uvas, principalmente en el hollejo, aunque también se han detectado pequeñas cantidades en pulpa [97]. Se acepta su principal función en la planta es la de actuar como protectores frente a la radiación ultravioleta [98]. En las uvas se encuentran principalmente las formas glicosiladas de los 4 flavonoles mayoritarios (figura 18). Habitualmente se presentan en forma de 3-glucósido, 3-glucurónido o 3-galactósido. En vino se encuentran

cantidades importantes de aglicones, probablemente generados por la hidrólisis de las formas glicosiladas durante la vinificación.

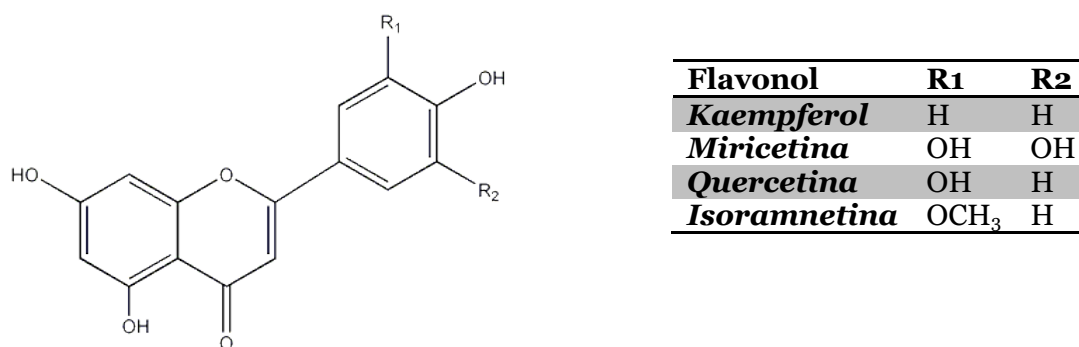


Figura 18: estructura general de los flavonoles presentes en uvas y vino.

Su contenido total varía entre 2 y 200 mg/kg de uva, y no parece estar relacionado con el tipo de uva, blanca o tinta, aunque sí se han observado diferencias varietales tanto en cantidad como en la distribución de estos compuestos que han hecho que se haya propuesto el uso de estos perfiles para la clasificación taxonómica [99]. La exposición a la luz solar incrementa la acumulación de estos compuestos en las uvas [100,101].

Se localizan principalmente en las capas superiores de la epidermis de los hollejos y durante la vinificación son extraídos desde los hollejos hacia los mostos-vinos en las primeras etapas de fermentación.

Su importancia en los vinos, pese a que se encuentran en los mismos en bajas concentraciones, se debe a la capacidad que presenta este grupo de compuestos para actuar como copigmentos de los antocianos [48].

II- CARBOHIDRATOS EN UVAS Y VINO

1. PARED CELULAR DE LAS UVAS

Las células de las uvas, al igual que las del resto de vegetales se encuentran rodeadas de pared celular vegetal, una estructura macromolecular cuya función principal es dar soporte estructural y mecánico a la célula así como protegerla de patógenos, de la deshidratación y de otros factores ambientales. Además, esta pared determina y mantiene la forma de la célula, controla la presión interna y el crecimiento de la misma.

La pared celular vegetal está formada por tres capas, la pared celular primaria, la lámina media y la pared celular secundaria (figura 19) [102]. La lámina media se compone principalmente de pectinas y pequeños prótidos. Esta capa sirve de comunicación entre paredes celulares primarias de células adyacentes.

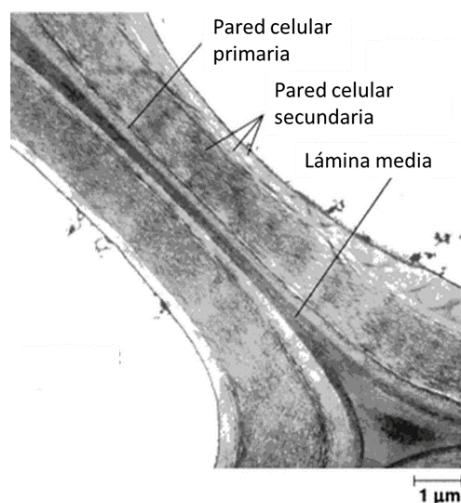


Figura 19: microfotografía electrónica de transmisión de la pared celular vegetal. Adaptado de Campbell, 2005 [103].

La pared celular secundaria es una estructura más rígida y gruesa que la pared celular primaria, y aparece una vez que las células han cesado su crecimiento. Está formada principalmente por celulosa (40-80%), aunque también presenta hemicelulosas (10-40%), pectinas y lignina (5-25%). Aunque su presencia en las células de las uvas no es clara, se postula que podría desarrollarse pared secundaria en las células de la semilla. En relación a la pulpa y al hollejo, los cambios estructurales que sufren las uvas durante el proceso de maduración, parecen incompatibles con la aparición de pared celular secundaria en sus células [104]. Sin embargo, se han aislado pequeñas cantidades de lignina a partir de las paredes vegetales de las células de hollejo [105], lo que hace pensar en la posible aparición de pared celular secundaria durante la maduración.

La pared celular primaria de las uvas está formada en un 90% por carbohidratos, divididos en tres grupos principales, celulosa, hemicelulosas y polisacáridos pécticos. El 10% restante son proteínas estructurales.

En plantas superiores se han descrito dos tipos de paredes celulares primarias, las paredes celulares de las uvas pertenecen al tipo I, en el que se encuentran las paredes celulares primarias de las plantas dicotiledóneas, gimnospermas y algunas monocotiledóneas [106].

La pared celular primaria de las células que pertenecen al modelo de tipo I presentan 3 capas, la primera de ellas es una red de celulosa y hemicelulosas que representa más del 50% de la pared celular. Esta red se encuentra embebida en la matriz o gel de pectinas, que supone entre el 25 y 40% del material de la pared celular. Estas estructuras mantienen la forma debido a la presencia de proteínas estructurales covalentemente unidas entre sí. Las proteínas estructurales representan entre el 1 y el 10% de la pared celular [104] (figura 20).

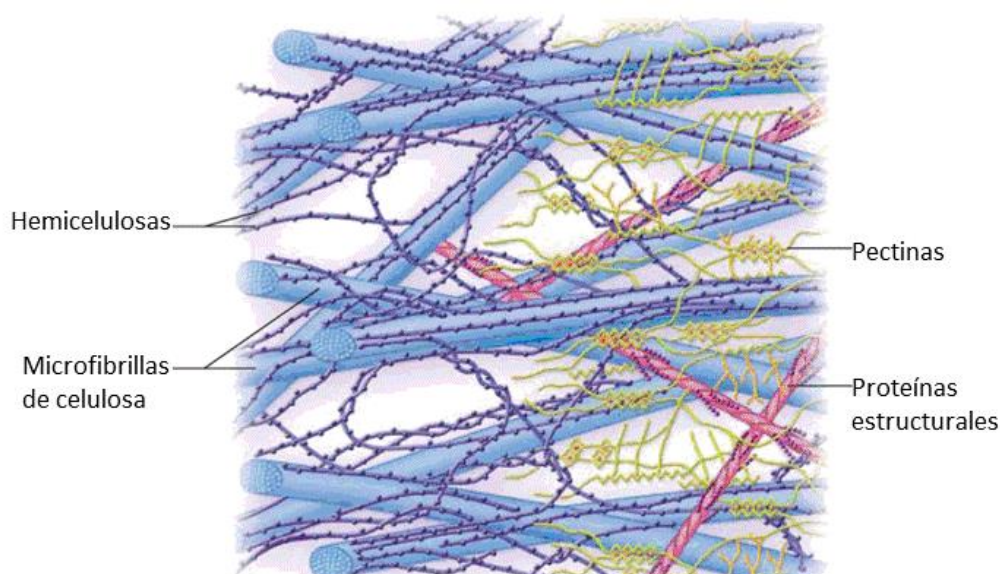


Figura 20: estructura de la pared celular. Adaptado de Buchanan, 2002 [107].

2. POLISACÁRIDOS DE LA PARED CELULAR DE LAS UVAS

En la pared celular de las uvas se encuentran 3 tipos de polisacáridos: celulosa, hemicelulosas y pectinas.

La celulosa es un polisacárido no ramificado formado por moléculas de glucosa que se unen mediante enlaces β -1 \rightarrow 4 glicosídicos formando cadenas de celobiosa. Estas cadenas se asocian entre sí en paralelo mediante puentes de hidrógeno, formando microfibrillas con estructura enrollada [104].

Las hemicelulosas son polisacáridos altamente ramificados que se unen a las microfibrillas de celulosa mediante enlaces por puentes de hidrógeno. Esta unión da lugar a la aparición de una red de moléculas fibrosas y resistentes. Las hemicelulosas están constituidas por un esqueleto básico común, formado por residuos β -D-glucopiranososa unidos mediante enlace 1 \rightarrow 4, y presentan ramificaciones con otros azúcares [102]. En función de los azúcares presentes en esta estructura se distinguen varios tipos de hemicelulosas: xiloglucanos (figura 21), mananos, xilanos, arabinoxilanos, glucuronoxilanos o glucuronoarabinoxilanos. A parte del soporte mecánico y estructural

recientemente se ha postulado que las hemicelulosas pueden tener importancia en la adhesión celular [108].

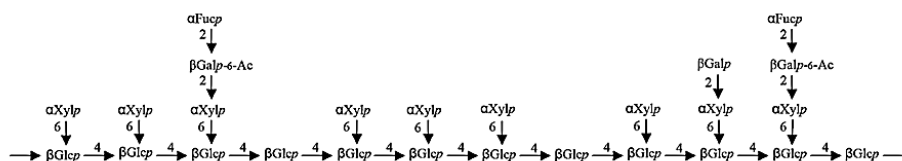


Figura 21: estructura del xiloglucano. Tomado de Hanlin et al., 2010 [104].

Las pectinas se encuentran embebidas en la red formada por las celulosas y hemicelulosas, formando geles hidrofílicos que retienen el agua, por lo que tienen un papel importante en la regulación del estado hídrico y en el transporte de iones en la planta. Las pectinas son polisacáridos complejos, estructuralmente heterogéneos y con carácter ácido. Se encuentran constituidos por cadenas lineales de ácido α -D-galacturónico unido mediante enlace 1→4 que puede encontrarse modificado o sustituido por un número variable de ramificaciones formadas por azúcares sencillos o cadenas complejas, que dan lugar a una gran variedad de estructuras [102,104]. Las pectinas incluyen homogalacturonanos, ramnogalacturonanos de tipo I, ramnogalacturonanos de tipo II y arabinogalactanos.

Los homogalacturonanos (figura 22) son polímeros formados por cadenas lineales de ácido galacturónico unidos mediante enlaces α -1→4. Estos residuos pueden encontrarse metoxilados en el grupo carboxilo del carbono 6 o acetilados en las posiciones 2 ó 3. La presencia de metilación es importante debido a que neutraliza la carga negativa que presentan las cadenas sin metilar y que permite la interacción con los iones Ca^{2+} formando geles. Esto permite la existencia de microdominios dentro de los polisacáridos pécnicos que presentan diferentes propiedades [109].

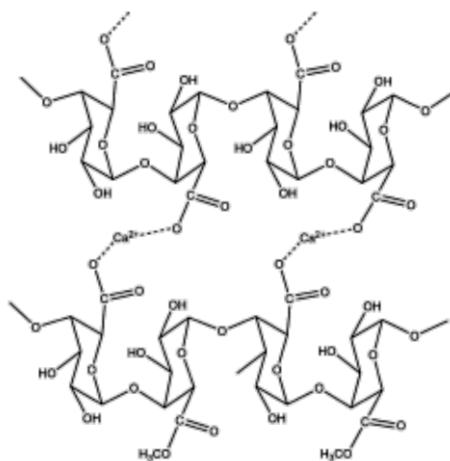


Figura 22: esqueleto de homogalacturonano, en el que se muestran los puentes de calcio entre residuos. Tomado de Hanlin et al., 2010 [104].

Los ramnogalacturonanos de tipo I (figura 23) están formados por un esqueleto que presenta un número variable de unidades de ácido galacturónico unidas por enlace α-1→4 y de ramnosa con enlace α-1→2; y tres tipos de cadenas laterales neutras, formadas principalmente por arabinanos, galactanos y arabinogalactanos.

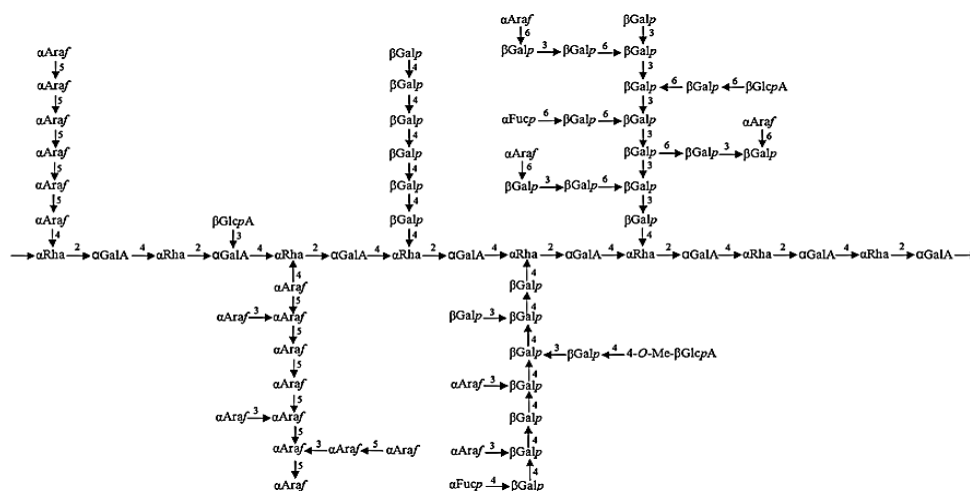


Figura 23: estructura del ramnogalacturonano de tipo I. Tomado de Hanlin et al., 2010 [104].

El esqueleto de los ramnogalacturonanos de tipo II está formado por cadenas cortas (7-9 residuos) de ácido galacturónico con ramificaciones complejas y altamente conservadas que contienen 12 tipos de residuos glicosídicos diferentes unidos entre sí por más de 20

tipos de enlaces (figura 24). Es el tipo de polisacárido más complejo y ramificado que se encuentra en las uvas y en el vino [110].

Esta estructura altamente ramificada de los ramnogalacturonanos es la responsable de que estos dominios se hayan conocido como regiones o zonas “erizadas” de las pectinas, en contraposición con las zonas lisas formadas por cadenas lineales de homogalacturonanos.

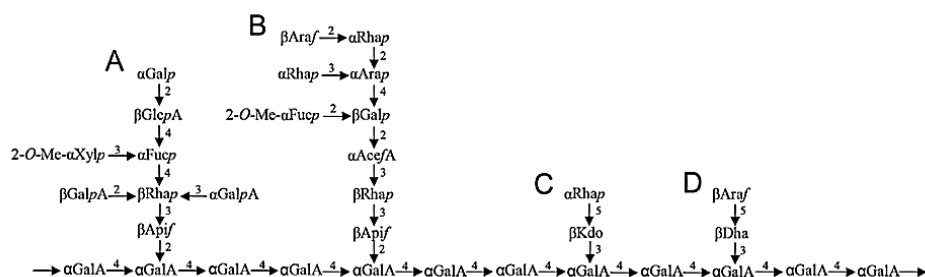


Figura 24: estructura del ramnogalacturonano de tipo II mostrando 4 de los posibles tipos de ramificaciones (cadenas A, B, C y D). Tomado de Hanlin et al., 2010 [104].

3. POLISACÁRIDOS EN EL VINO

Los polisacáridos presentes en el vino se pueden clasificar en función de su origen. Así se distingue entre polisacáridos procedentes de la pared celular de las uvas y polisacáridos procedentes de la pared celular de las levaduras. Entre los polisacáridos procedentes de las uvas se encuentran los polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs), y los ramnogalacturonanos [111]. Procedentes de las paredes celulares de las levaduras se encuentran las manoproteínas y de forma minoritaria, los glucanos.

Aproximadamente un 35% de los polisacáridos presentes en los vinos son manoproteínas, un 40% polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa, un 20% ramnogalacturonanos de tipo II y un 4% ramnogalacturonanos de tipo I [111]. Estos porcentajes pueden variar en función de la variedad de uva, madurez de la misma y de las técnicas de vinificación empleadas.

3.1. MANOPROTEÍNAS

Las manoproteínas presentes en los vinos proceden de las paredes celulares de las levaduras que llevan a cabo la fermentación. Las manoproteínas se ceden al vino en dos fases, la primera de ellas, se produce durante la fermentación y que corresponde a las manoproteínas excretadas por las levaduras durante la fase de crecimiento exponencial; y la segunda, corresponde a la liberación de manoproteínas por autólisis celular de las levaduras, que tiene lugar durante el envejecimiento de los vinos sobre lías [112].

Estas manoproteínas se componen de un núcleo proteico que supone aproximadamente el 20% en peso de la molécula. El 80% restante son residuos de manosa, organizados en forma de cadenas cortas lineales o de cadenas largas y ramificadas. Pese a que sus estructuras desde el punto de vista de la composición son muy homogéneas, sus pesos moleculares son muy variables, de 5000 a 400000 Dal [111]. Su contenido en vinos tintos oscila entre 100 y 150 mg/L [113].

Estos compuestos se han relacionado con la prevención de la aparición de turbidez debida a proteínas, especialmente importante en vinos blancos. Algunas manoproteínas también han sido relacionadas con la prevención de la precipitación de ácido tartárico, aunque este efecto parece estar fuertemente influido por el peso molecular de las mismas [114].

Entre sus efectos sensoriales en los vinos, estos compuestos han sido relacionados con la retención de compuestos aromáticos [115,116], la estabilización del color [117], una disminución de la astringencia [111] y con un incremento del cuerpo y redondez de los vinos tintos.

3.2. PRAGs

En el vino se pueden encontrar varios compuestos pertenecientes a este grupo, siendo los más abundantes los arabinogalactanos de tipo II, arabinogalactanos-proteínas y arabinanos [111,118].

Su contenido medio en vinos blancos se encuentra entre 50 y 150 mg/L mientras que en tintos es algo superior, entre 100 y 200 mg/L [111]. No obstante, su contenido está muy influido por las técnicas de vinificación empleadas, llegándose a cuantificar contenidos cercanos a los 500 mg/L en vinos con tratamientos enzimáticos [118] o térmicos [119].

Los arabinogalactanos de tipo II (AGs) y los arabinogalactano-proteína (AGPs) son compuestos de tipo neutro que son cedidos al vino a partir de las paredes celulares primarias de las células de las uvas. Son el grupo de poliósidos más abundante en los mostos y en los vinos durante las primeras etapas del proceso de vinificación [120,121]. Presentan una estructura común, que consiste en un esqueleto de residuos glicosídicos de β -D-galactano unidos mediante enlace 1 \rightarrow 3, que posee cadenas laterales de este mismo azúcar unidas mediante enlace 1 \rightarrow 6. Estas cadenas se encuentran sustituidas en alta proporción por residuos de arabinosa en conformación tipo furanosa. Los arabinogalactano-proteína poseen habitualmente menos de un 10% de un péptido rico en hidroxiprolina. Los AGPs son fácilmente extraíbles desde las uvas hacia el vino y se encuentran en alta proporción en los mostos, en cambio los AGs son cedidos con mayor dificultad desde las pectinas, por lo que son necesarias varias etapas de maceración para que sean liberados en cantidades significativas. Esto hace que su concentración sea, habitualmente, mayor en vinos tintos que en blancos [112]. Los AGPs tienden a inhibir la agregación de los taninos, por lo que se cree que pueden influir en la percepción de astringencia de los vinos [113].

Los arabinanos están formados por residuos de α -L-arabinosa en conformación furanosa con unión 1 \rightarrow 5 y están escasamente ramificados. Se encuentran habitualmente unidos a

ramnogalacturonanos de tipo I, en los que aparecen como cadena lateral [122]. Son poco abundantes en los vinos, aunque parecen tener importancia en la aparición de turbidez en los mismos debido a fenómenos de insolubilización provocados por acción enzimática. Al igual que los arabinogalactanos y los arabinogalactano-proteína, los arabinanos presentan naturaleza neutra.

3.3. RAMNOGALACTURONANOS DE TIPO I

Son cedidos al vino a partir de las paredes celulares de las uvas. Este grupo de polisacáridos se encuentra en los vinos de forma minoritaria, en concentraciones inferiores a 20 mg/L [123].

Tienen naturaleza ácida y su estructura presenta residuos de α -L-ramnosa alternados con ácido α -D- galacturónico. La repetición de este disacárido provoca la formación de una cadena que se orienta formando una espiral alargada. Puede presentar ramificaciones en los residuos de ramnosa, formadas bien por monosacáridos o por cadenas laterales de arabinanos, galactanos y arabinogalactanos, lo que le da su aspecto ramificado característico.

Se ha propuesto que los ramnogalacturonanos de tipo I podrían estar unidos covalentemente a polisacáridos no pécticos, especialmente a xiloglucanos [122,124].

3.4. RAMNOGALACTURONANOS DE TIPO II

Representan aproximadamente el 20% de los polisacáridos solubles presentes en el vino tinto [111]. Su estructura está formada por un esqueleto de cadenas cortas (7-9 residuos) de ácido galacturónico con ramificaciones complejas que contienen 12 tipos de residuos glicosídicos diferentes unidos entre sí por más de 20 tipos de enlaces [125]. La cadena de ácido galacturónico les confiere un carácter ácido que determina alguna de las propiedades que presentan estos compuestos [125].

Se encuentran tanto en forma monomérica como dimérica, unidos mediante enlaces de borato. Se ha observado que las formas dimeras favorecen la agregación de proantocianidinas cuando se encuentran en concentraciones similares a las que presentan estos compuestos en el vino, lo que podría provocar una disminución de la astringencia. Se ha postulado que la capacidad de los dímeros de RG-II para intervenir en la agregación de proantocianidinas se debe a que presentan dos zonas hidrofóbicas que se unirían a los agregados de proantocianidinas, dando lugar a un rápido incremento del tamaño de partícula [113].

Su contenido es inferior a 50 mg/L en los vinos blancos, mientras que en los tintos se encuentra entre 80 y 150 mg/L. [126].

4. OLIGOSACÁRIDOS EN VINO

Los oligosacáridos han sido descritos como carbohidratos no digeribles que presentan entre tres y quince residuos monosacáridicos unidos covalentemente mediante enlaces de tipo glicosídico. Los oligosacáridos descritos en el vino derivan de los polisacáridos de la pared celular de la uva anteriormente mencionados [127]. El estudio de composición de los residuos glicosídicos de la fracción oligosacáridica de los vinos ha confirmado la presencia de estructuras relacionadas con mananos, arabinogalactanos, homogalacturonanos y ramnogalacturonanos [132].

Existen pocos estudios en vino sobre los oligosacáridos; aunque estos compuestos han sido ampliamente estudiados en otras matrices como los cereales o la leche, en las que han demostrado ser compuestos bioactivos. Su posible actividad prebiótica ha sido descrita por diversos autores [128-130].

La presencia de estos compuestos en los vinos está altamente influida por las técnicas de vinificación empleadas [131]; aunque otros factores, como la variedad o el año de

vendimia también parecen tener importancia [127]. Se han descrito concentraciones que oscilan entre 250 y 300 mg/L para este tipo de compuestos en los vinos tintos en las variedades Carignan y Merlot [132], y en torno a 100 mg/L para las variedades Chardonnay y Grignolino [127].

En estos momentos, su posible influencia sobre las características organolépticas o en la calidad de los vinos tintos son aún desconocidas; aunque su estructura y las concentraciones encontradas en los vinos sugieren que podrían tener influencia sobre estas características, especialmente sobre la percepción de astringencia.

III- COLOR

El color es la primera característica que el consumidor percibe de un alimento o bebida y que inmediatamente se relaciona con su calidad, por lo que la industria alimentaria tiene gran interés en controlar esta característica. En vinos es especialmente importante a la hora de evaluar su calidad, y proporciona al catador y al consumidor información sobre los defectos y virtudes del vino, su edad, evolución y estado de conservación [133].

El color es un concepto complejo, y que ha sido definido como la respuesta mental al estímulo que una radiación luminosa visible produce en la retina. Se considera un concepto psicofísico que se relaciona al mismo tiempo con la psicología del observador, la fisiología de la visión y con la energía radiante espectral de una fuente luminosa. El color no es, por tanto, una propiedad de los objetos, ya que si la fuente de iluminación cambia, el estímulo producido también se modifica.

Para que se produzca el fenómeno de la percepción del color es necesario, a parte de un observador que sea capaz de percibir los colores, que exista un iluminante que emita luz en las longitudes de onda del visible, entre 380 y 780 nm, y un objeto que deje pasar y/o refleje parte de la luz que recibe (transmitancia) mientras que absorbe otra parte (absorbancia). La luz transmitida por el objeto es la que puede ser detectada por la retina e interpretada por el cerebro dando lugar al estímulo del color.

Este estímulo cromático está dividido en tres sensaciones bien diferenciadas que dan al color su carácter tridimensional:

- Matiz o tono: es el atributo fundamental, tradicionalmente definido como el que nos permite clasificar a los colores como rojizos, amarillentos, etc., y es aquel que permite diferenciar un color respecto al gris del mismo brillo o estímulo

acromático. Está relacionado con las diferencias de absorbancia de la energía radiante a diferentes longitudes de onda. Es el atributo cualitativo del color.

- Brillo o luminosidad: es el atributo que permite clasificar un color de forma general como claro u oscuro. Se puede definir como el atributo que permite considerar equivalente cualquier color a alguno de los miembros de la escala de grises, comprendida entre el negro y el blanco. Es una medida relativa de la luz reflejada frente a la absorbida.
- Saturación o pureza: es el atributo que determina, para cada tono, su grado de diferencia con el gris del mismo brillo y describe la reflexión o transmisión a una determinada longitud de onda. Es el atributo cuantitativo del color.

Estos tres atributos permiten definir cualquier color. El ojo humano es capaz de distinguir unos 200 tonos, con aproximadamente 450 niveles de luminosidad y 80 de saturación por tono, lo que representa 7 millones de estímulos. La precisión que se necesita en ocasiones para definir estos estímulos y el hecho de que el color sea una apreciación subjetiva, hacen que se hayan desarrollado estrategias para la evaluación del color. Estas estrategias se pueden dividir en dos grandes grupos:

1. Medida visual del color: denominada también análisis sensorial. Se realiza mediante un panel de catadores que realizan una descripción del color o por comparación con patrones (escalas, atlas de color, etc)
2. Medida instrumental del color. Es más rigurosa y precisa. Se emplean dos tipos de aparatos. Unos, como los espectrofotómetros o espectrorradiómetros miden la magnitud radiométrica o fotométrica que caracteriza a la fuente o al objeto y a partir de ella se calculan distintos parámetros e índices. Otros, son los colorímetros, que miden el color de fuentes de radiación primarias o secundarias, obteniendo directamente los valores triestímulo X, Y, Z de forma óptica no matemática y que se tratan en el siguiente apartado.

COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO

La colorimetría es la rama de la ciencia que estudia la especificación numérica del color de un estímulo visual definido físicamente, de manera que:

- Estímulos con la misma especificación y bajo las mismas condiciones de observación aparecen iguales para un observador con visión normal para los colores.
- Estímulos que aparecen iguales poseen la misma especificación.
- Los números que comprende la especificación son funciones continuas de los parámetros físicos que definen la distribución de la energía radiante espectral del estímulo.

Esto puede ser expresado de forma geométrica, considerando un espacio vectorial de tres dimensiones, denominado Espacio Triestímulo, en el que cada estímulo de color se representa por un vector que expresa las cantidades proporcionales de cada uno de los estímulos primarios.

Dado que el color es una respuesta variable, para realizar su medida de forma adecuada es necesario hacer constantes el resto de elementos que influyen sobre él, para ello la “Commission Internationale de L’Eclairage” (CIE) [134] establece iluminantes y observadores estándar, con unas características determinadas y constantes.

Los iluminantes deben tener siempre la misma energía radiante a cada longitud de onda, ser reales y que se puedan fabricar. Los iluminantes se definen en función de la temperatura a la que ha de someterse un cuerpo negro perfecto para que emita luz al calentarse. A lo largo de su historia la CIE ha definido varios iluminantes [135], pero el que recomienda utilizar de forma en la mayoría de los casos en estos momentos es el

denominado iluminante D65 (figura 24) que se relaciona con una temperatura de color aproximada de 6504 K y representa una fase de la luz de día natural.

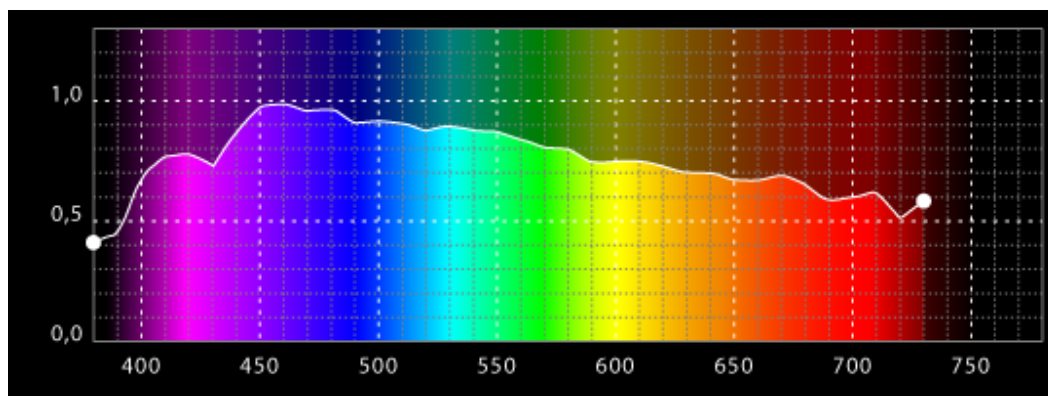


Figura 25: distribución espectral de la energía radiante del iluminante estándar D65.

Además de los iluminantes, la CIE ha definido también observadores estándar [136]:

- Observador colorimétrico patrón CIE 1931: se define a partir de las medidas de sensibilidad de conos rojos, verdes y azules de observadores normales. Se denomina también observador de 2° (figura 26).

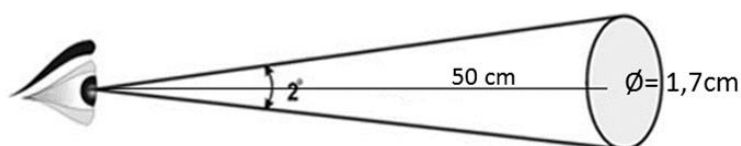


Figura 26: observador estándar CIE 1931.

- Observador colorimétrico patrón suplementario CIE 1964 u observador de 10° (figura 27). Su campo visual de igualación es más amplio que el del observador de 2° .

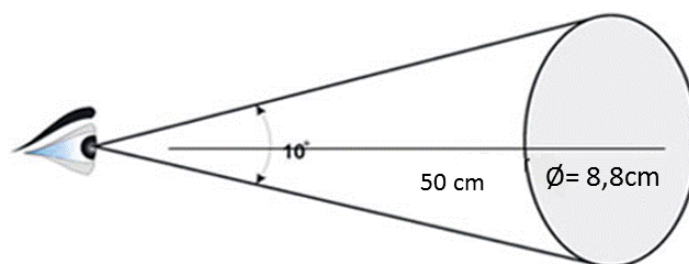


Figura 27: observador estándar CIE 1964.

La CIE ha propuesto diversos sistemas para representar el color, tratando de conseguir que reflejen adecuadamente la sensación visual percibida por el observador. De todos ellos, el más empleado en la actualidad es el espacio CIELAB, que fue propuesto en 1976 (figura 28), aunque posee algunas limitaciones que desaconsejan su uso en algunos casos [137].

Este espacio se define mediante las coordenadas rectangulares claridad (L^*) y cromaticidad (a^* , b^*), lo que genera un espacio relativamente esférico. El espacio CIELAB es un espacio relativo, ya que depende del iluminante, por lo que es necesario definir cuál es el iluminante empleado en cada caso.

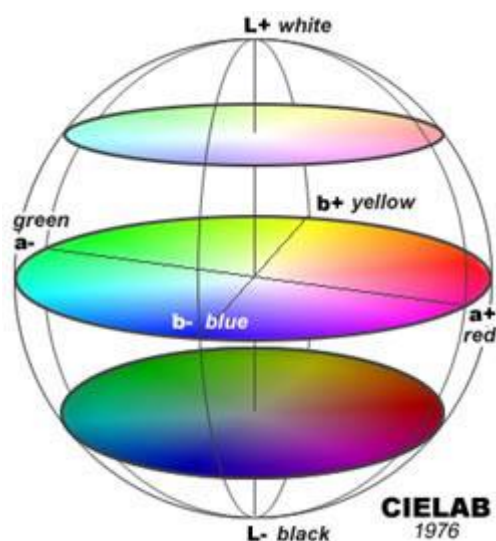


Figura 28: representación del espacio CIELAB 1976.

A partir de los índices de claridad y cromaticidad del espacio CIELAB (L^* , a^* , b^*) se definen otros parámetros psicométricos uniformes denominados croma (C^*_{ab}) y tono (h_{ab}).

El croma es la cantidad de color o de cromatismo que presenta un punto representado en el espacio CIELAB. Se corresponde con la longitud del vector que va desde el origen de coordenadas del espacio CIELAB hasta ese punto. Hace referencia a la pureza del color, y cuanto más elevados sean sus valores más se alejará ese punto del gris. Es el atributo cuantitativo del color.

El tono es el atributo cualitativo del color y en el espacio CIELAB se corresponde con el ángulo formado entre el vector que va desde el origen de coordenadas hasta el punto que representa el color y el eje de abscisas. Toma valores entre 0° y 360° .

Asignando valores los parámetros luminosidad (L^*), croma (C^*_{ab}) y tono (h_{ab}) queda definido cualquier punto en el espacio CIELAB de manera inequívoca.

En aplicaciones industriales suele ser más importante determinar las diferencias de color entre dos muestras o entre una muestra y un patrón que medir su color.

Esta diferencia de color en el espacio CIELAB queda definida por la siguiente ecuación [138]:

Ecuación 1: diferencia de color en el espacio CIELAB.

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Esta diferencia de color representa la distancia entre dos puntos de color, lo que no siempre se corresponde con diferencias de color idénticas ya que el espacio CIELAB no es completamente uniforme. En circunstancias normales se considera que dos estímulos de color son distinguibles si existen entre ellos diferencias de color de 1 a 3 unidades

CIELAB por un ojo humano no entrenado [139], pudiendo llegar a distinguirse si su diferencia de color es 0,1 unidades por un individuo bien entrenado.

El uso de la colorimetría ha propiciado un importante avance en el estudio del color de los vinos, ya que permite la comparación de las medidas realizadas en los distintos laboratorios, eliminando la subjetividad que provoca la utilización de atlas o escalas de color.

IV- ASTRINGENCIA

La astringencia es una sensación compleja que se ha definido como la sequedad, rugosidad o aspereza que se percibe al ingerir determinados alimentos o bebidas [140].

Es un atributo fundamental en los vinos tintos. Así, se dice que un vino tinto de calidad debe presentar un nivel de astringencia equilibrado. Si es demasiado elevado, desvía la percepción de otros matices en el vino; pero si es demasiado bajo, provoca que el vino resulte insípido y poco interesante [140].

La astringencia no es un sabor, sino que se trata de una sensación táctil que no se limita a una región concreta de la lengua o el epitelio oral, y que requiere un tiempo para desarrollarse completamente [141].

Desde un punto de vista fisicoquímico, se considera que el mecanismo principal involucrado en la percepción de la astringencia es la precipitación de proteínas salivares [142], lo que conlleva una disminución de la lubricación del epitelio oral que es percibido como sequedad o aspereza; aunque recientemente se ha relacionado también con la presencia de partículas coloidales en disolución [143] o la activación de receptores de tipo laminina en la mucosa lingual [144].

La saliva es un fluido acuoso, segregado por glándulas exocrinas presentes en la boca y que contiene proteínas, glicoproteínas, glicolípidos, carbohidratos, transudados séricos e iones inorgánicos [145]. Entre sus funciones destacan: cubrir y lubricar las superficies bucales, proporcionar hidratación a la mucosa bucal y disminuir la fricción entre el bolo alimenticio y la faringe durante la deglución.

Entre las proteínas y glicoproteínas que forman parte de la saliva se considera que las proteínas ricas en prolina (PRPs), las histatinas y las mucinas son las más relacionadas

con la percepción de la astringencia. Todas ellas son capaces de unirse a polifenoles, por los que muestran gran afinidad, mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, formando complejos que precipitan (figura 29) [140].

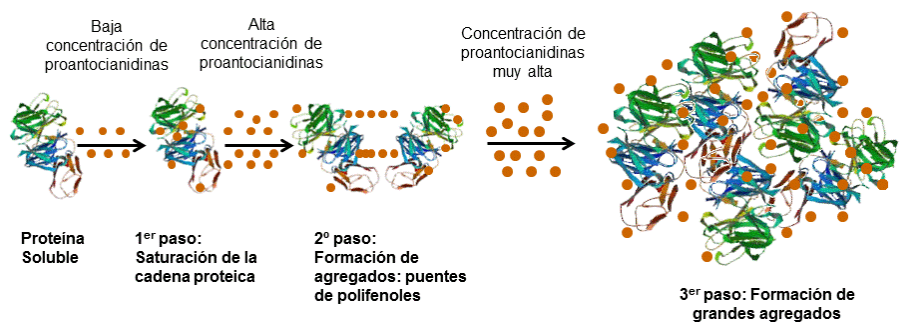


Figura 29: formación de complejos proantocianidinas-proteína.

Las proantocianidinas son los compuestos presentes en los vinos que han sido más ampliamente relacionados en el desarrollo de la percepción de astringencia, aunque también se relaciona con otros compuestos como los pigmentos formados por la condensación de antocianos y flavan-3-oles y con fenoles de naturaleza no flavanólica como ácidos hidroxicinámicos [140].

Existen distintos parámetros que pueden influir sobre la percepción de la astringencia. Así, entre los dependientes de las proantocianidinas, se encuentran: su concentración y grados de polimerización y de galoilación. Entre los que dependen de la proteína, se encuentran: su grado de glicosilación y su estructura secundaria. Entre los parámetros dependientes del medio, destacan: la fuerza iónica, el etanol, el pH, y la presencia de otros compuestos que puedan afectar a la percepción de la astringencia como el caso de los polisacáridos [142].

Se ha puesto de manifiesto que el incremento del peso molecular de los taninos y de su grado de galoilación aumentan su afinidad por las proteínas salivares, debido probablemente a un incremento en el número de posibles puntos de interacción [142].

En relación a las proteínas, los péptidos más pequeños tienen menor afinidad por las proantocianidinas que los que tienen mayor tamaño. Por otra parte, las proteínas globulares presentan menor afinidad que las que tienen conformación más abierta, las cuales interaccionan más fácilmente con los taninos [146]. La glicosilación de las proteínas también tiene influencia en la unión a taninos, por una parte se ha demostrado que la glicosilación aumenta la afinidad de las proteínas por los taninos; pero por otra parte, aumenta la solubilidad de los complejos formados, por lo que su influencia sobre la percepción de la astringencia no está clara [147].

El etanol presente en el medio reduce la sensación de astringencia [148]. Se han propuesto dos explicaciones principales para esto. Por una parte, el etanol favorece la lubricación bucal debido a que estimula la segregación de saliva por parte de la glándula parótida [140]. Por otra parte aumenta la solubilidad de los complejos tanino-proteína.

En cuanto al pH, se han realizado diversos estudios sobre precipitación de proteínas empleando taninos en medios a diferentes pH. Aunque existen discrepancias entre los resultados obtenidos por distintos autores sobre la influencia del pH del medio en la capacidad de los taninos para precipitar proteínas. Parece que el grado de unión y precipitación son mínimos a pH muy bajo (inferior a 2) y muy alto (superior a 8) mientras que son máximos en las proximidades del punto isoeléctrico de las proteínas, cuando sus repulsiones electrostáticas son mínimas [142].

La influencia de la fuerza iónica del medio es diferente en función del tipo de compuesto fenólico del que se trate. Para proantocianidinas y quercetina la interacción disminuye al aumentar la fuerza iónica [149,150] mientras que para taninos hidrolizables se ha observado el efecto opuesto [151].

En cuanto a la influencia de otros compuestos presentes en los vinos, los principales estudios se han llevado a cabo con polisacáridos. En este sentido, se ha observado que la adición de manoproteínas a los vinos reduce su índice de gelatina lo que ha sido

relacionado con la disminución de la astringencia percibida [117]. En cuanto a otros polisacáridos, el ramnogalacturonano de tipo II disminuye significativamente la astringencia percibida por los catadores en disoluciones modelo, y las mezclas de polisacáridos neutros también se relacionan con una disminución de la astringencia [152]. La capacidad de los polisacáridos para disminuir la percepción de la astringencia ha sido relacionada con 2 posibles mecanismos (figura 30). El primer mecanismo propone la interacción entre taninos y polisacáridos formando complejos solubles [113,153], compitiendo así con las proteínas salivares por la unión a los taninos. El otro mecanismo consistiría en la unión a agregados proteína-tanino, dando lugar a complejos ternarios proteína-tanino-polisacárido, de elevada solubilidad [149,154,155].

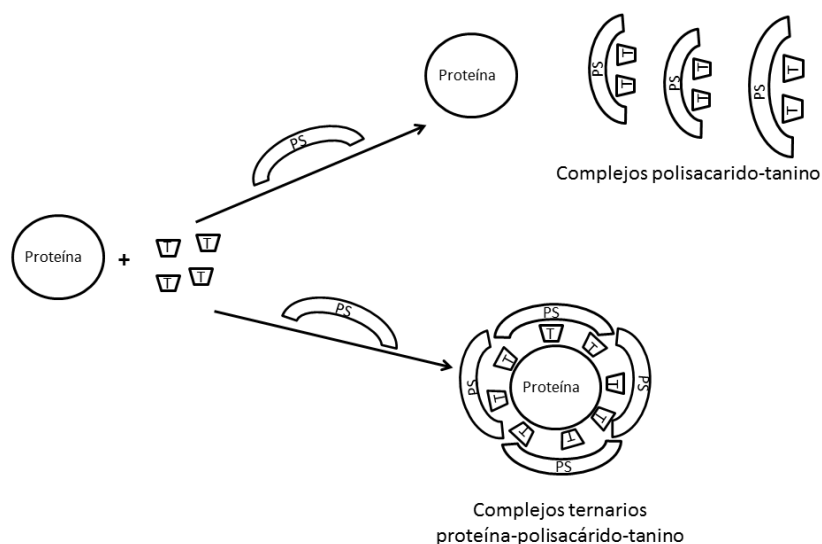


Figura 30: mecanismos propuestos para la interacción proteína-tanino-polisacáridos. T: tanino, PS: polisacárido. Adaptado de Mateus et al, 2004 [156].

La importancia de la percepción de la astringencia para la calidad de muchos alimentos y bebidas hace que se hayan desarrollado numerosos métodos para intentar evaluarla, si bien el panel de catadores continúa siendo la herramienta más habitualmente utilizada.

Esta sensación se describe en función del tiempo que tarda en desarrollarse o alcanzar su punto máximo, en función de su persistencia tras la expectoración o deglución y en función de su calidad, es decir, de los descriptores empleados para definirla.

La complejidad de esta sensación ha provocado que se haya generado un extenso y complejo vocabulario para intentar describir el perfil táctil percibido por los catadores. Así, Gawel y colaboradores [157] desarrollaron una rueda de terminología, en la que se incluyen 21 términos concretos y 14 descriptores abstractos para describir la astringencia de vinos tintos australianos e italianos (figura 31).

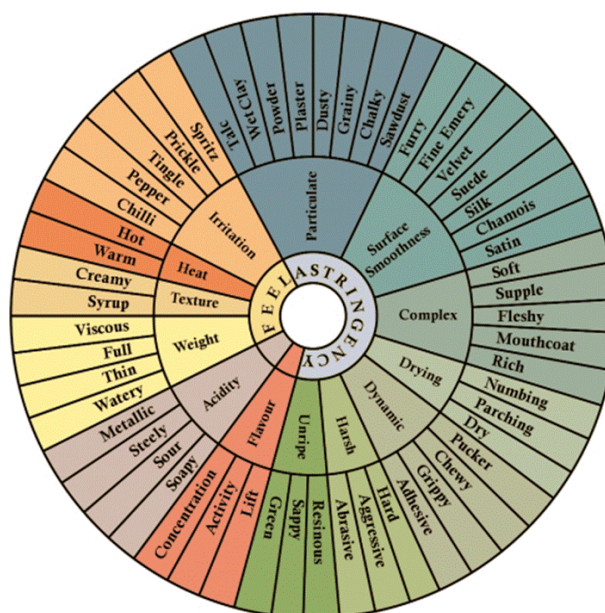


Figura 31: rueda de la astringencia desarrollada por Gawel et al. 2000 [157].

El empleo de grupos de catadores puede llevar aparejados problemas de tipo práctico. Por una parte, puede ser difícil encontrar un grupo de catadores experto disponible para las sesiones de cata. Por otra parte, el hecho de que la astringencia sea una sensación que resulta saturante y acumulativa [141] limita el número de muestras que se pueden catar en una sola sesión.

Por ello se han utilizado diversas aproximaciones indirectas con la finalidad de determinar la extensión de las interacciones proteína-polifenoles, y relacionarlo con la

astringencia. Clásicamente se ha utilizado el índice de gelatina propuesto inicialmente por Glories y que aparece descrito en numerosos trabajos [158-160]. Asimismo, se ha estudiado la interacción de proteínas y taninos empleando distintas proteínas como BSA [156], ovoalbúmina [158] y proteínas salivares como α -amilasa y PRPs [154]. Para evaluar esta interacción, los distintos autores han empleado diversas técnicas como nefelometría [161], nefelometría en flujo [162], light scattering [155], RMN y modelización molecular [143], SDS-PAGE [163] o SAXS [164,165]. Las principales limitaciones de las técnicas indirectas son que no siempre presentan una buena correlación con los resultados obtenidos a través de paneles de catadores, la falta de reproducibilidad de algunos de estos métodos, como sucede con el índice de gelatina de Glories [166], y que no proporcionan información sobre los distintos atributos o subcualidades de la astringencia.

Como ya se ha señalado, todos estos factores hacen que el estudio de la percepción de la astringencia de los vinos sea una tarea compleja, pero a la vez que presente un gran interés práctico, debido a las implicaciones que presenta esta característica sobre la calidad de los vinos.

OBJETIVOS



La composición fenólica de los vinos determina muchas de sus características organolépticas, como el color o la astringencia. Esta composición está influida por diversos factores, como la variedad de uva empleada, el grado de madurez alcanzado o las técnicas de vinificación utilizadas. Todos estos factores van a determinar cuantitativa y cualitativamente los compuestos fenólicos que van a ser cedidos desde las uvas hacia los vinos.

Las características sensoriales se relacionan con distintas familias de compuestos fenólicos. Así, el color de los vinos está determinado principalmente por los antocianos que se encuentran en los mismos; aunque otros compuestos presentes en los vinos (flavonoles, flavanoles, ácidos fenólicos) también influyen en los cambios de color, bien mediante la formación de nuevos pigmentos o bien por intervenir en fenómenos de copigmentación. La astringencia se relaciona con la presencia de proantocianidinas, que son capaces de interactuar con las proteínas salivares y provocar su precipitación, originando la falta de lubricación y sensación de sequedad propias de la astringencia.

El **objetivo general** de esta tesis doctoral ha sido estudiar la influencia de la composición polifenólica y polisacáridica en las características organolépticas de los vinos tintos, especialmente en su color y astringencia y el efecto que podría ejercer el grado de madurez de la uva.

Los resultados obtenidos se han agrupado en tres bloques:

El primer bloque estudia la composición fenólica y de la pared celular de uvas cosechadas con distintos grados de madurez. En él, se desarrollan los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la variación de la composición fenólica del hollejo en función del momento de recogida y del contenido de sólidos solubles (capítulos 1 y 2).

- Estudiar la influencia del grado de madurez y del contenido en sólidos solubles en la extractabilidad de compuestos fenólicos desde los hollejos de las uvas (capítulos 1 y 2).
- Caracterizar la composición de la pared celular de los hollejos de las uvas recogidas con distintos grados de madurez y determinar la influencia de dicha composición en la extractabilidad de los compuestos fenólicos (capítulos 1 y 2).

El segundo bloque está focalizado en el estudio de la composición de los vinos y la relación de esta composición con la astringencia percibida. Los objetivos específicos desarrollados en este bloque son:

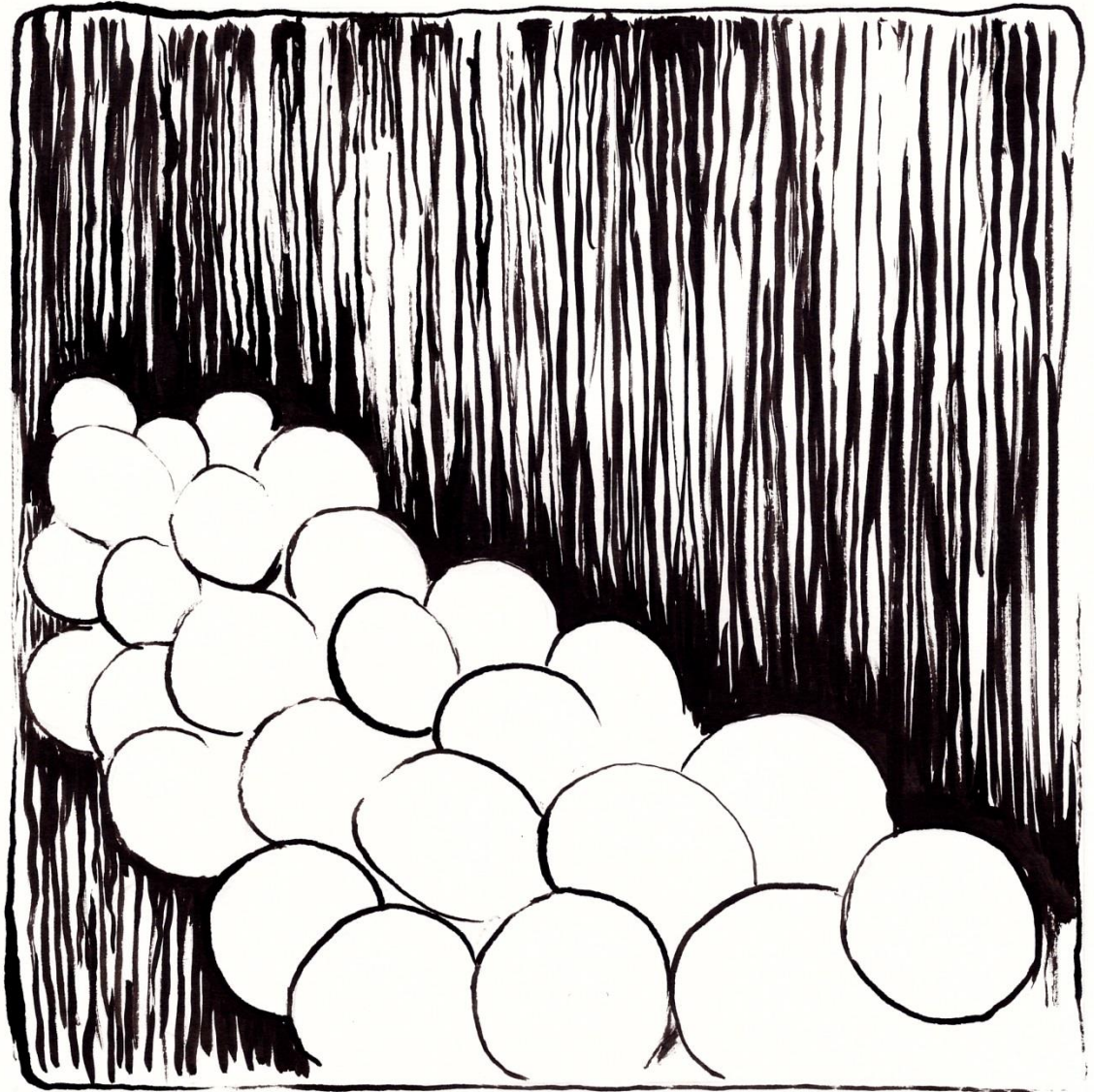
- Optimizar un método de análisis de proantocianidinas polimerizadas en los vinos estudiados mediante despolimerización en presencia de nucleófilos (capítulo 3).
- Realizar el análisis y caracterización de las fracciones proantocianídica, polisacáridica y oligosacáridica de los vinos (capítulo 3).
- Determinar la influencia de la composición proantocianídica, polisacáridica y oligosacáridica en la percepción de astringencia de los vinos (capítulo 3).

El tercer bloque se centra en el estudio de las características sensoriales (de color y gustativas) de compuestos fenólicos aislados. Los objetivos específicos propuestos en este bloque son:

- Realizar la caracterización colorimétrica y fisicoquímica de pigmentos derivados de antocianos (capítulo 4).
- Caracterizar sensorialmente oligómeros de proantocianidinas con diferentes estructuras (capítulo 5).
- Analizar la interacción de catequina y galocatequina con proteínas mediante simulación de dinámica molecular utilizando el fragmento peptídico IB₇₁₄. (capítulo 5).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN





BLOQUE I:

MADUREZ TECNOLÓGICA Y COMPOSICIÓN
DE LA PARED CELULAR:

INFLUENCIA SOBRE LA EXTRACTABILIDAD
DE POLIFENOLES DE LOS HOLLEJOS

CAPÍTULO 1:

ESTUDIO DE EXTRACTABILIDAD DE LOS ANTOCIANOS PRESENTES EN LOS HOLLEJOS DE UVAS

Los antocianos son compuestos polifenólicos que se acumulan en vacuolas en las células del hollejo de las uvas, desde son cedidos a los mostos-vinos durante el proceso de vinificación. La composición fenólica de los vinos depende de varios factores. Por una parte, de la composición de las uvas de partida y, por otra, de las técnicas empleadas durante el proceso de vinificación, que van a condicionar la mejor o peor cesión de los compuestos que se encuentran en el hollejo hacia el medio.

Uno de los factores que afectan a la composición de las uvas es la madurez. Cuando se habla de madurez de las uvas podemos referirnos a madurez tecnológica, en la que se tiene en cuenta principalmente el contenido en azúcares y la acidez, o a madurez fenólica, que es el momento en el que las uvas alcanzan el contenido óptimo en compuestos de tipo polifenólico [167], tanto cuantitativa como cualitativamente. Ambos factores son importantes a la hora de elaborar vinos tintos de calidad. Además de la fecha de cosecha, es importante tener en cuenta que la acumulación de azúcares en la pulpa de las uvas presenta una cierta heterogeneidad en los viñedos, presentando una distribución de tipo gaussiano [168].

La pared de la célula vegetal es una estructura macromolecular compleja que rodea y protege las células. En las células de los hollejos actúa como barrera que dificulta la cesión de los compuestos fenólicos hacia los mostos-vinos.

La composición de la pared celular de los hollejos sufre cambios durante el periodo de maduración. Estos cambios permiten, en una primera fase, la expansión y crecimiento de

las células y, posteriormente, la pérdida de rigidez relacionada con la maduración de las uvas. Los cambios estructurales se relacionan con modificaciones en la composición de las paredes celulares, como la disminución en el contenido de pectinas, la relajación de la red formada por xiloglucanos y celulosa y la pérdida de azúcares en las cadenas laterales de las pectinas [169].

Comúnmente se acepta que la extractabilidad de antocianos aumenta a lo largo de la maduración como consecuencia de la degradación de la pared celular [4], y se han realizado algunos estudios que relacionan las variaciones en la pared celular a lo largo del proceso de maduración con la extractabilidad de antocianos [170,171]. Las características físicas del hollejo, como la fuerza de ruptura [172], el espesor del hollejo o su dureza [173], que dependen de la composición de la pared celular, también han sido relacionadas con la capacidad de ceder compuestos fenólicos, así hollejos más duros y finos se han relacionado con una mejor cesión de antocianos. Otras variables que han sido estudiadas en relación con la capacidad de extracción de los antocianos han sido la variedad de uva empleada [174,175], el contenido de etanol del medio de maceración [176] y el grado de madurez. Principalmente, los estudios se han llevado a cabo empleando las variedades Shiraz [177], Sousón, Brancellao, Ferrol, Merenzao, Mouratón y Mencía [175]. La disparidad de los resultados obtenidos en estos estudios para las distintas variedades hace pensar que el efecto de la madurez sobre la extracción depende de la variedad de uva empleada. Tempranillo es la variedad de uva tinta más extensamente cultivada en España, sin embargo, no existen trabajos en la bibliografía que relacionen la madurez de las uvas y la capacidad de ceder compuestos fenólicos al medio de maceración.

1.1. OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo ha sido estudiar la influencia del grado de madurez en la capacidad de extracción de los antocianos de los hollejos de uvas pertenecientes a la

variedad Tempranillo. Este objetivo general se concretó en los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la variación en la composición de los antocianos del hollejo en función del momento de recogida (precosecha, cosecha y sobremadurez) y del contenido de sólidos solubles, expresados como grados Brix (22, 24 y 26 °Brix).
- Estudiar cómo afecta el grado de madurez y el contenido de sólidos solubles a la extractabilidad de los antocianos de los hollejos.
- Determinar la composición de la pared celular de los hollejos en uvas recogidas en distintos momentos y con diferente contenido en sólidos solubles dentro de cada momento de cosecha.
- Establecer relaciones entre la composición de la pared celular y la extractabilidad de los antocianos.

1.2. RESUMEN

Los resultados obtenidos en este apartado de la tesis han dado lugar a dos publicaciones:

Hernández-Hierro, J.M.; Quijada-Morín, N.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 732, 26-32.

Hernández-Hierro, J.M.; Quijada-Morín, N.; Martínez-Lapuente, L.; Guadalupe, Z.; Ayestarán, B.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree. *Food Chemistry* **2014**, 146, 41-47.

En la primera de las publicaciones realizadas se comprobó la influencia del grado de madurez de las uvas y de su contenido en sólidos solubles con la extractabilidad de los antocianos presentes en los hollejos de las uvas de la variedad Tempranillo.

Los resultados obtenidos mostraron que la composición de los antocianos de las uvas recogidas en distintos grados de madurez y con diferentes contenidos de sólidos solubles es diferente. El factor que más afectó a la composición fue la fecha de vendimia, aunque también se observaron diferencias dentro de una misma fecha para las uvas con distinto contenido en sólidos solubles. En cuanto a la extractabilidad de los antocianos, se puso de manifiesto que el estado fisiológico ejerce gran influencia en la capacidad de extracción de los mismos hacia el medio, mientras que el contenido en sólidos solubles

presentó una influencia menor. Las muestras con mayor grado de madurez (sobremadurez) cedieron con mayor facilidad los antocianos al medio, aunque su contenido en los mismos fuera menor, mientras que las muestras correspondientes al primer punto de muestreo (precosecha) presentaron los menores porcentajes de extracción. En cuanto al tipo de compuestos extraídos, se observó que los antocianos no acilados presentaron mejor extractabilidad que los compuestos acilados. También fueron estudiadas las características cromáticas de las extracciones hidroalcohólicas en distintos momentos del proceso de extracción. Casi todas las muestras presentaban diferencias de color en el primer día de extracción que permitían diferenciarlas del resto, mientras que en el séptimo día se agrupaban en 3 zonas del espacio CIELAB. Cada una de estas zonas presenta diferencias de color entre las muestras inferiores a 3 unidades CIELAB, lo que indica que no presentan diferencias de color entre sí. Pese a las diferencias observadas tanto en composición como en las características colorimétricas en las distintas muestras y los distintos días de extracción, no existe una relación clara entre los antocianos extraídos y el color, probablemente debido a la existencia de fenómenos de copigmentación y/o a la presencia de pigmentos poliméricos.

En la segunda de las publicaciones pertenecientes a este capítulo se detalla la composición de la pared celular de las uvas con diferentes grados de madurez y contenido de sólidos solubles, y la relación entre esta composición y la extractabilidad observadas para los antocianos.

Los resultados obtenidos mostraron que la composición de la pared celular está fuertemente influida tanto por el contenido en sólidos solubles como por el estado fisiológico de las uvas. Se observó una fuerte disminución en el material insoluble a medida que progresa la maduración. No obstante, los perfiles de las distintas familias de polisacáridos se mantuvieron bastante constantes en todas las muestras, lo que indica la conservación de las estructuras. En general, los contenidos en los distintos componentes de la pared celular fueron más elevados en las muestras pertenecientes al punto de

cosecha que en precosecha o sobremadurez, con la excepción del contenido en proteínas, que aumentó ligeramente al progresar la madurez, probablemente para compensar la pérdida de polisacáridos estructurales y ayudar a mantener la integridad celular.

La composición de la pared celular también influyó en la extractabilidad de antocianos al medio. La cantidad total de pared celular presente en los hollejos es el factor que más influyó en la capacidad de extracción, influyendo negativamente en la extractabilidad de los antocianos, es decir, a mayor cantidad de pared celular, menor extractabilidad de los antocianos presentes en el hollejo. Pese a esta fuerte oposición de la cantidad total de material insoluble en la pared celular, algunos de sus componentes se relacionaron positivamente con la extractabilidad de los antocianos hacia el medio de maceración.. Entre los factores relacionados con la composición de la pared celular que facilitaron la extracción de los antocianos están el contenido de celulosa, de ramnogalacturonano de tipo II (RG-II) y de polifenoles asociados a la pared, lo que indica que a mayores contenidos de estos compuestos en la pared celular, mayor será la extractabilidad de los antocianos presentes en el hollejo.

Además, se construyó un modelo de regresión lineal múltiple (MLR) considerando la extractabilidad de los antocianos como variable dependiente y los distintos parámetros obtenidos para la composición de la pared celular como variables independientes. 8 variables resultaron ser estadísticamente significativas en el ajuste final del modelo, que presentó un coeficiente de determinación $R^2 = 0.962$ y cuya ecuación ajustada se muestra a continuación:

Extracción total de antocianos = $73.1867 + 1.47262 * [\text{Ácido galacturónico}] - 1.23289 * [\text{Glucosa}] - 17.1139 * [\text{Ramnosa}] + 7.43013 * [\text{Manosa}] + 41.8535 * [\text{Apiosa}] - 96.604 * [2\text{-O-metilxilosa}] + 36.5243 * [\text{Ácido glucurónico}] - 0.0684884 [\text{Lignina}]$.



Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes

José Miguel Hernández-Hierro, Natalia Quijada-Morín, Julián C. Rivas-Gonzalo, M. Teresa Escribano-Bailón*

Grupo de Investigación en Polifenoles, Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E 37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2011

Received in revised form 20 October 2011

Accepted 26 October 2011

Available online 6 November 2011

Keywords:

Anthocyanin extractability

Physiological stages

Soluble solids contents

Colour

Red wine

Tempranillo

ABSTRACT

The influence and the extent of the anthocyanin extractability from grape skins at different physiological stages and different soluble solids contents within each stage were investigated. For this purpose three different physiological stages (pre-harvest, harvest and over-ripening) and three soluble solids contents (22, 24 and 26 °Brix) within each stage were taken into account using *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo.

This study revealed the influence of physiological stages and soluble solids contents on the amounts of anthocyanins. The most important factor was the physiological stage although the soluble solid contents effect was also relevant, especially for anthocyanins monoglucosides. The highest contents in anthocyanins were found at pre-harvest, following by harvest and finally at over-ripening. Within each physiological stage, the relative abundance of acylated derivatives was influenced by the soluble solids contents. The percentages of acylated anthocyanins tend to decrease as the soluble solids contents.

Differences in the anthocyanin extractabilities were highly influenced by the physiological stages and in a lesser extent by the soluble solids contents. The lowest extraction percentages were obtained in pre-harvest samples whatever soluble solids contents. Over-ripening samples present the lowest contents of anthocyanins but these compounds are easily released from tissues to the hydroalcoholic solution providing the highest extraction percentages. Generally, non-acylated anthocyanins were better extracted than the acylated anthocyanins.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294 537; fax: +34 923 294 515.

E-mail address: escriban@usal.es (M.T. Escribano-Bailón).

Acknowledgements

Thanks are due to the Spanish MICINN (Project ref. AGL2008-05569-C02-01), to CDTI (Project CENIT Demeter) and to Junta de Castilla y León (group GR133) for financial support. N. Quijada-Morín thanks the Spanish MICINN for the F.P.I. predoctoral scholarship. The authors also thank Bodegas Torres (Lleida, Spain) for supplying the grape samples.



Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree



José Miguel Hernández-Hierro^{a,1}, Natalia Quijada-Morín^a, Leticia Martínez-Lapuente^b, Zenaída Guadalupe^b, Belén Ayestarán^b, Julián C. Rivas-Gonzalo^a, M. Teresa Escribano-Bailón^{a,*}

^a Grupo de Investigación en Polifenoles, Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, E-37007 Salamanca, Spain

^b Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino, Universidad de La Rioja, 26006 Logroño, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 June 2013

Received in revised form 3 September 2013

Accepted 5 September 2013

Available online 14 September 2013

Keywords:

Anthocyanin extractability

Ripeness degrees

Soluble solids contents

Grapes

Cell wall composition

ABSTRACT

The relationship between cell wall composition and extractability of anthocyanins from red grape skins was assessed in Tempranillo grape samples harvested at three stages of ripening (pre-harvest, harvest and over-ripening) and three different contents of soluble solids (22, 24 and 26 °Brix) within each stage. Cell wall material was isolated and analysed in order to determine cellulose, lignin, non-cellulosic polysaccharides, protein, total polyphenols index and the degree of esterification of pectins. Results showed the influence of ripeness degree and contents of soluble solids on cell wall composition. Furthermore, principal components analysis was applied to the obtained data set in order to establish relationships between cell wall composition and extractability of anthocyanins. Total insoluble material exhibits the biggest opposition to anthocyanin extraction, while the highest amounts of cellulose, rhamnogalacturonans-II and polyphenols were positively correlated with anthocyanin extraction. Moreover, multiple linear regression was performed to assess the influence of the cell wall composition on the extraction of anthocyanin compounds. A model connecting cell wall composition and anthocyanin extractabilities was built, explaining 96.2% of the observed variability.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294 537; fax: +34 923 294 515.

E-mail address: escriban@usal.es (M.T. Escribano-Bailón).

¹ Current address: Food Colour & Quality Laboratory, Department of Nutrition & Food Science, Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain.

Acknowledgements

Thanks are due to the Spanish MICINN (Projects ref. AGL2008-05569-C02 and AGL2011-30254-C02) and to Junta de Castilla y León (group GR133) and to Project DEMETER program CENIT for financial support. N. Quijada-Morín and J.M. Hernández-Hierro also thank the Spanish MICINN for the F.P.I. predoctoral scholarship and the Juan de la Cierva contract (JCI-2011-09201) respectively. The authors also thank Bodegas Torres (Lleida, Spain) for supplying the grape samples and C. Martín-Rodríguez and A. Montero-Rozas (Department of Inorganic Chemistry, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca) who kindly allowed us to use the FT-IR instrument.

CAPÍTULO 2:

COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR Y EXTRACTABILIDAD DE FLAVAN-3-OLEOS Y FLAVONOS EN UVAS CON DISTINTOS ESTADOS DE MADUREZ TECNOLÓGICA

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de plantas que se acumulan en distintos tejidos vegetales. En los hollejos de las uvas se encuentran antocianos, flavanoles y flavonoles, los cuales son cedidos al vino durante los procesos de vinificación. Estos compuestos van a determinar gran parte de las propiedades organolépticas de los mismos.

La pared celular es una estructura macromolecular que actúa como barrera para la difusión de los compuestos fenólicos y cuya composición se ve modificada a medida que progresa la maduración de las uvas. En el capítulo anterior se ha puesto de manifiesto que la cantidad total de pared celular en los hollejos de las uvas disminuye al progresar la maduración, lo que facilita la extracción de los pigmentos antociánicos.

El grado de madurez de las uvas condiciona tanto cuantitativa como cualitativamente los compuestos extraídos de dos formas. Por una parte, el grado de madurez determina la composición de las uvas, y por otra, determina la capacidad que presenten estos compuestos para ser extraídos hacia los mostos-vinos durante los procesos de vinificación. En general, la extracción de compuestos desde los hollejos aumenta al progresar la maduración, debido a la degradación de la pared celular por enzimas pectolíticas [4].

La extracción de proantocianidinas ha sido estudiada en distintas variedades de uvas [178], demostrándose que la variedad de uva es un factor que tiene influencia en la

extracción de estos compuestos desde los hollejos. Existen algunos estudios que vinculan la extracción de las proantocianidinas a la madurez y a otras propiedades del hollejo como la dureza o el espesor [173], que a su vez están relacionados con la composición de la pared celular. Asimismo, la madurez afecta a la porosidad e integridad de la pared celular [179], y parece que uvas más maduras tendrían mayor capacidad para adsorber proantocianidinas y por tanto limitarían su extracción hacia el medio de maceración.

Las proantocianidinas se relacionan con la astringencia de los vinos y con la formación de pigmentos derivados de antocianos durante el envejecimiento de los vinos tintos, mientras que los flavonoles se relacionan con fenómenos de copigmentación en las disoluciones y su presencia es importante para la evolución del color de los vinos.

Según nuestro conocimiento, la extractabilidad de flavonoles y proantocianidinas a partir de hollejos de uva tinta de la variedad Tempranillo no ha sido estudiada con anterioridad, pese a ser la variedad de uva tinta más extensamente cultivada en España. El estudio de la relación entre la madurez tecnológica de las uvas y la extractabilidad de los compuestos fenólicos presentes en las mismas tiene un gran interés práctico ya que puede ayudar a seleccionar el momento óptimo de vendimia.

2.1. OBJETIVOS

El objetivo general de este apartado es estudiar la influencia de la madurez tecnológica en la extractabilidad de proantocianidinas y flavonoles de los hollejos de uvas tintas de la variedad Tempranillo. Este objetivo general se desarrolla en los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la composición de flavan-3-oles y flavonoles en hollejos de uvas con distintos estados de madurez tecnológica.
- Estudiar la extractabilidad de esos compuestos fenólicos desde los hollejos de uvas de la variedad Tempranillo hacia disoluciones modelo.

- Establecer relaciones entre la composición de la pared celular y la extractabilidad de los flavan-3-oles y los flavonoles presentes en el hollejo.
- Determinar la influencia de la madurez sobre la capacidad de extracción de los flavan-3-oles y los flavonoles.

2.2. RESUMEN

Los resultados obtenidos en este apartado de la tesis han sido recogidos para su publicación en el siguiente artículo:

Quijada-Morín, N.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripening stages.

La extractabilidad de los compuestos de tipo flavan-3-ol y flavonol fue estudiada en muestras recogidas en tres momentos de maduración correspondientes a los estados de precosecha, cosecha y sobremadurez. Cada grupo de muestras se clasificó, mediante flotación en disoluciones de distintas densidades, en tres subgrupos en función de su contenido en sólidos solubles: 22, 24 y 26 °Brix.

Los resultados obtenidos junto con los correspondientes a la composición de la pared celular fueron sometidos a un análisis estadístico para intentar establecer correlaciones entre la composición de dicha pared y la extractabilidad de los compuestos fenólicos estudiados.

En el caso de los flavan-3-oles, la extractabilidad aumentó con el tiempo de maceración, alcanzando el máximo en el último día del estudio, así como a medida que progresaba la madurez, siendo más alta en las muestras sobremaduras. Sin embargo, el contenido en sólidos solubles no mostró influencia clara en la extractabilidad.

En cuanto a las características estructurales de las moléculas, se puso de manifiesto que las procianidinas eran más fácilmente extraídas que las prodelfinidinas. Respecto a la influencia del tamaño molecular, los monómeros se extrajeron con mayor facilidad mientras que el resto de compuestos mostró un comportamiento variable en las distintas muestras.

Con el fin de intentar establecer relaciones entre las variables de composición de la pared celular y las extractabilidades calculadas, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Este análisis reveló la fuerte influencia positiva del grado de madurez sobre la extractabilidad de las proantocianidinas y la nula influencia en la extractabilidad del contenido en sólidos solubles. Por su parte, el contenido total de pared celular mostró una fuerte oposición a la extracción de los compuestos. En cuanto a los componentes de la pared celular, los arabinogalactanos, los mananos, los ramnoglacturonanos de tipo I (RG-I), los homogalacturonanos, los xiloglucanos, y el contenido en polisacáridos totales mostraron cierta oposición a la extracción total de proantocianidinas. Por el contrario, la celulosa mostró una tendencia contraria, de forma que a mayor contenido de celulosa en la pared celular, mayor extracción de proantocianidinas. Este efecto positivo de la celulosa se mostró más intenso para la extracción de prodelfinidinas que para la de procianidinas o para el total de proantocianidinas.

En cuanto a los flavonoles, éstos fueron extraídos más rápidamente que las proantocianidinas y alcanzaron, en general, el máximo de extracción el quinto día de estudio. Ni el grado de madurez de las uvas, ni el contenido de sólidos solubles ni el contenido total de pared celular mostraron relación con la extractabilidad de los mismos. Sin embargo, algunos componentes de la pared celular sí que se relacionaron con su extractabilidad. Así, la mayor presencia de arabinogalactanos y mananos parecía dificultar la extractabilidad de los flavonoles, mientras que la mayor presencia de proteína se relacionó con una mayor extracción de los flavonoles mayoritarios y del total de flavonoles.

Es posible que el diferente comportamiento que muestran las dos familias de compuestos estudiados en este trabajo se deba a la diferente localización que presentan, tanto tisular como intracelular. Los flavonoles se localizan en células de la epidermis [180], y se ha propuesto que se pueden encontrar tanto en vacuolas [180,181] como en forma libre en el citoplasma [182] o incluso asociados a estructuras nucleares [180,183], mientras que las

proantocianidinas se localizan en capas de la hipodermis de los hollejos [184], y se han encontrado tanto en el interior de vacuolas, como asociados a proteínas en tonoplastos o unidos a polisacáridos de pared. La presencia de cutícula en las células epidérmicas [102] y no en las hipodérmicas podría ser otro factor que determine que la extractabilidad de ambos tipos de compuestos sea diferente, ya que podría actuar como barrera para la difusión de flavonoles mientras que no afectaría a la extracción de proantocianidinas.

En cuanto a las diferencias en composición debidas a la madurez, en general los contenidos tanto de flavan-3-oles como de flavonoles eran más elevados en las muestras correspondientes al punto de cosecha que en precosecha o sobremadurez. Entre los flavonoles, los contenidos de prodelphinidinas eran más altos en las muestras recogidas en cosecha. El contenido en sólidos solubles no mostró una influencia clara en el caso de las proantocianidinas. Los contenidos de flavonoles aumentaban al incrementarse el grado Brix en las muestras de precosecha y cosecha, mientras que en las de sobremadurez se observó la tendencia inversa.

En resumen, las variables estudiadas influyen sobre la extractabilidad de los compuestos fenólicos. Se observó que la extractabilidad de las proantocianidinas es más elevada en uvas con mayor grado de madurez, mientras que el contenido en material insoluble se opone a la extracción de estos compuestos. El comportamiento de los flavonoles es muy diferente, ya que su extractabilidad no se ve afectada por el grado de madurez, ni por el contenido en sólidos solubles ni por el contenido en material insoluble, aunque sí se ve afectado por la composición de la pared celular. Estas diferencias en comportamiento para los dos grupos de compuestos podrían deberse su diferente localización tisular e intracelular.

TITLE: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

AUTHORS: Natalia Quijada-Morín¹, José Miguel Hernández-Hierro², Julián C Rivas-Gonzalo¹ and M. Teresa Escribano-Bailón^{1,*}

ADDRESS: ¹: Grupo de Investigación en Polifenoles. Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E 37007 Salamanca, Spain.

²: Food Colour & Quality Laboratory, Department of Nutrition & Food Science, Universidad de Sevilla, Facultad de Farmacia, 41012 Sevilla, Spain.

***Corresponding author: M. Teresa Escribano-Bailón**

Phone: +34 923 294 537

Fax: +34 923 294 515

E-mail: escriban@usal.es

1 **ABSTRACT**

2 Flavonol and flavan-3-ol extractability from red grape skins were evaluated in
3 Tempranillo grapes harvested at different ripeness stages and with different soluble
4 solids contents within each stage. Flavan-3-ol extractability is related to ripeness stage
5 and also to cell wall composition, mainly to arabinogalactans (AG), manans,
6 rhamnogalacturonans-I (RG-I), homogalacturonans (HG), xyloglucans (XG), and total
7 polysaccharides content, which are negatively correlated to flavan-3-ol extractability,
8 while soluble solid contents did not exert any influence on their extraction. Moreover,
9 procyanidin extraction is more strongly related to cell wall composition than
10 prodelfhinidin extraction. Flavonol extractability was not influenced by insoluble-
11 material contents although some cell wall components presented relationship with
12 flavonol extractability, the presence of AG and manans would decrease total flavonol
13 extractability while protein is positively related to total and major flavonol compounds
14 (i.e quercetin and myricetin derivatives). The different behavior observed between those
15 two groups of polyphenols compounds could be due to different tissue and cellular
16 location.

17 **KEYWORDS:**

18 Grape skins, Flavan-3-ol extractability, Flavonol extractability, Cell wall.

19

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.

Manuscript: Flavanolic and flavonolic extractabilities from Tempranillo red grape skins. Relationship with cell wall composition at different ripeness stages.



BLOQUE II:

COMPOSICIÓN FENÓLICA Y POLISACARÍDICA
Y SU INFLUENCIA EN LA ASTRINGENCIA DE
LOS VINOS

CAPÍTULO 3:

COMPOSICIÓN FENÓLICA Y POLISACARÍDICA Y SU INFLUENCIA EN LA ASTRINGENCIA DE LOS VINOS

La astringencia es una sensación táctil compleja, que se desarrolla en todo el epitelio oral y que se relaciona con la sequedad, rugosidad y aspereza percibidas al ingerir determinados alimentos o bebidas, como por ejemplo, vino tinto, en el que la astringencia es una de las características organolépticas más importantes. Se ha dicho que los vinos de calidad deben presentar un nivel de astringencia equilibrado, si es demasiado alto resulta desagradable pero si es demasiado bajo los vinos son poco interesantes [140].

De entre todos los compuestos presentes en el vino tinto, los compuestos de tipo polifenólico, y especialmente las proantocianidinas son los que más se han relacionado con la sensación de astringencia, debido a su capacidad para precipitar proteínas salivares [140,185].

El estudio de las proantocianidinas es una tarea compleja, debido a su gran diversidad estructural. En los vinos se encuentran oligómeros y polímeros formados por catequina, epicatequina, epicatequina-3-galato, galocatequina, epigalocatequina y en menor concentración catequina-3-galato y galocatequina-3-galato [50], unidos mediante enlaces carbono-carbono. Estos enlaces pueden situarse en distintas posiciones, lo que genera una gran variedad de compuestos, especialmente al aumentar el grado de polimerización. Se han desarrollado diversas metodologías para el estudio de la estructura de estas moléculas, entre las que se encuentra la despolimerización en presencia de nucleófilos, siendo los más utilizados tolueno- α -tiol, benzilmercaptano o floroglucinol [94,95,186]. Estas técnicas conllevan la hidrólisis controlada de estos

compuestos poliméricos en medio ácido, que provoca la ruptura del enlace interflavánico entre las distintas subunidades. La subunidad inferior o terminal queda intacta, mientras que en las superiores o de extensión se forma un carbocatión que es fácilmente atacado por el nucleófilo presente en el medio. Posteriormente se realiza en análisis mediante cromatografía líquida de los productos de reacción, pudiéndose determinar y cuantificar el número de subunidades de cada tipo que aparecen en las distintas posiciones. Esta técnica proporciona información relativa a la distribución en subunidades y al grado medio de polimerización que presentan los compuestos analizados, aunque sus principales limitaciones son que no se obtiene información de la cantidad de cada polímero presente en el medio ni de las posiciones de enlace existentes entre las subunidades.

Algunos autores han relacionado parámetros obtenidos en las técnicas de despolimerización en presencia de nucleófilos (concentración total, el grado medio de polimerización, la presencia de galoilación) con la percepción de astringencia [187-189], sin embargo, no se han establecido relaciones directas que permitan relacionar la composición de los vinos con la percepción de astringencia de forma concluyente.

Aunque se acepta que el principal mecanismo que provoca el desarrollo de la astringencia en los vinos es la precipitación de las proteínas salivares por la interacción con los taninos [142], otros compuestos presentes en los vinos pueden provocar cambios en la percepción de astringencia, por lo que su determinación también resulta importante para el estudio de la astringencia. Entre los compuestos descritos como moduladores de la sensación de astringencia se encuentran los polisacáridos. Los polisacáridos son moléculas de estructura compleja que forman parte de la pared celular de las uvas y de las levaduras y que son cedidos al vino durante los procesos de vinificación, por lo que su concentración en los mismos está muy influenciada por las técnicas de vinificación empleadas [118,190], aunque otros factores, como la madurez de las uvas o la variedad empleada también han demostrado tener cierta influencia. Algunas

familias de polisacáridos pueden interactuar con taninos [113,153] o con agregados de taninos [113], generando complejos solubles, que disminuyen la disponibilidad de los mismos para interactuar con proteínas salivares, pudiendo así modificar la astringencia.

Estudios in vitro han demostrado la influencia de los polisacáridos en las interacciones entre proteínas y taninos, bien inhibiendo esa interacción [117,154] o bien inhibiendo la precipitación de los complejos formados [149,156].

Estudios en medios modelo han demostrado que algunos polisacáridos afectan a la percepción de la astringencia [152], pero el efecto que podrían tener en los vinos no ha sido estudiado.

En los vinos encontramos también oligosacáridos, que derivan de los polisacáridos y cuyas concentraciones y distribución en los vinos comienzan a ser objeto de estudio en los últimos años [131,132]. Debido a su relación estructural con los polisacáridos es posible que estos compuestos también puedan tener cierta influencia sobre la percepción de la astringencia, sin embargo, este aspecto no ha sido demostrado hasta la fecha.

3.1. OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo es el estudio de la influencia de la composición fenólica y polisacáridica en la astringencia de vinos tintos de la variedad Tempranillo. Este objetivo general fue desarrollado en los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una optimización para los vinos objeto de estudio del método de análisis de polímeros de proantocianidinas mediante hidrólisis ácida en presencia de nucleófilos.
- Caracterización de la fracción proantocianídica de los vinos.
- Evaluación sensorial de los vinos y estudiar la relación con la composición de proantocianidinas.
- Análisis y caracterización de las fracciones polisacáridica y oligosacáridica de vinos tintos de la variedad Tempranillo de orígenes geográficos distintos.
- Estudio de la influencia de los carbohidratos en la modulación de la sensación de astringencia en los vinos tintos.

3.2. RESUMEN

Los resultados relacionados con el análisis de las composiciones de proantocianidinas, polisacáridos y oligosacáridos de vinos tintos de la variedad Tempranillo han dado lugar a dos publicaciones que se engloban en el mismo capítulo de esta tesis.

Quijada-Morín, N.; Regueiro, J.; Simal-Gándara, J.; Tomás, E.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 12355-12361.

Quijada-Morín, N.; Williams, P.; Rivas-Gonzalo, J.C.; , Doco, T.; Escribano-Bailón, M.T. Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chemistry*, **2014**, *154*, 44-51.

Para la realización de ambos estudios fueron seleccionados 13 vinos de la variedad Tempranillo, de orígenes geográficos distintos, pertenecientes a las denominaciones de origen protegidas de Toro, Ribera de Duero y Rioja, y a 4 vendimias diferentes.

En la primera de las publicaciones se detallan los resultados de la optimización del método de análisis de proantocianidinas mediante despolimerización por hidrólisis ácida en presencia de floroglucinol y la relación con la astringencia percibida de los vinos de partida, que fue evaluada por un panel de catadores expertos. Los datos de composición obtenidos y la astringencia evaluada fueron tratados estadísticamente con el objetivo de establecer correlaciones entre los mismos.

La concentración total de proantocianidinas y el grado medio de polimerización no mostraron relación estadística con la percepción de astringencia, en contraposición a lo que había sido descrito por otros autores [191-193]. La composición en subunidades sí mostró una fuerte correlación con la astringencia percibida, la presencia de epicatequina

en posiciones de extensión o de galocatequina en posición terminal se relacionó con un incremento en la astringencia mientras que la presencia de epigalocatequina tanto en posiciones de extensión como en posición terminal se relacionó con una disminución de la astringencia. Se construyó un modelo de regresión lineal múltiple con un coeficiente de determinación $R^2=0.877$, lo que indica que permite explicar el 87.7% de la variabilidad observada en las muestras.

En la segunda de las publicaciones se detalla la obtención de los perfiles polisacáridos y oligosacáridos de los 13 vinos obtenidos a partir de uvas de la variedad Tempranillo. El perfil oligosacárido de vinos de la variedad Tempranillo se describe en este trabajo por primera vez.

Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico para evaluar la relación entre la composición de las proantocianidinas, los polisacáridos y los oligosacáridos y la percepción de astringencia de los vinos analizados. Todas las familias de polisacáridos presentaron una clara oposición a la astringencia percibida, siendo más fuerte para manoproteínas y ramnogalacturonanos del tipo II (RG-II). Las manoproteínas pueden actuar como estabilizadores de los polifenoles lo que podría relacionarse con su capacidad para modular la astringencia. Por otra parte, RG-II es el tipo de polisacárido más ramificado que se encuentra en los vinos, lo que podría tener relación con su capacidad para disminuir la astringencia. Los residuos glicosídicos correspondientes a la fracción oligosacáridica no mostraron una tendencia clara en el análisis de componentes principales realizado. Todos los residuos glicosídicos presentes en la fracción oligosacáridica fueron también determinados en la fracción polisacáridica lo que indica que tanto la estructura tridimensional que adopten los residuos glicosídicos al formar oligo o polisacáridos como el tamaño de los carbohidratos son importantes para la modulación de la astringencia.

El modelo de regresión lineal múltiple generado a partir de los datos de composición proantocianidínica, polisacáridica y oligosacáridica explicó el 96.8% de la variabilidad observada en la astringencia percibida. La composición en subunidades de las proantocianidinas mostró la mayor influencia en el modelo. Entre los polisacáridos sólo los polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs) presentaron influencia en el modelo final, mientras que 4 residuos glicosídicos pertenecientes a la fracción oligosacáridica fueron estadísticamente significativos en el modelo final ajustado. Dos de estos residuos (manosa y galactosa) se relacionaron positivamente con la astringencia percibida, probablemente debido a que su presencia en elevadas cantidades en la fracción oligosacáridica se debe a que existe una elevada degradación de los polisacáridos en los que se encontrarían inicialmente estos residuos.

Este estudio confirma la importancia del perfil polisacáridico y oligosacáridico en la modulación de la percepción de astringencia provocada por las proantocianidinas en los vinos tintos, a la vez que destaca la importancia de la estructura y el tamaño de los carbohidratos en dicha modulación.

Relationship between the Sensory-Determined Astringency and the Flavanolic Composition of Red Wines

Natalia Quijada-Morín,[†] Jorge Regueiro,[‡] Jesús Simal-Gándara,[‡] Esperanza Tomás,[§]
 Julián C. Rivas-Gonzalo,[†] and M. Teresa Escribano-Bailón^{*,†}

[†]Grupo de Investigación en Polifenoles, Universidad de Salamanca, E-37007 Salamanca, Spain

[‡]Nutrition and Bromatology Group, Analytical and Food Chemistry Department, Faculty of Food Science and Technology, Ourense Campus, University of Vigo, E-32004 Ourense, Spain

[§]Bodegas Roda, E-26200 Haro, La Rioja, Spain

ABSTRACT: The relationship between the proanthocyanidin profile and the perceived astringency was assessed in 13 commercial Tempranillo red wines. The concentration and compositional information were obtained by liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization mass spectrometry after acid-catalyzed depolymerization of wine proanthocyanidins in the presence of excess phloroglucinol. Statistical analysis of the results showed significant correlations between sensory and chemical determinations. Astringency was more affected by the subunit composition than by the total concentration or the average degree of polymerization of wine proanthocyanidins. Higher proportions of epicatechin (EC) subunits in extension positions and gallocatechin (GC) subunits in terminal positions were shown to increase astringency. On the contrary, the amount of epigallocatechin (EGC) in both extension and terminal positions was negatively correlated with the perceived astringency.

KEYWORDS: *astringency, wine, flavanol, proanthocyanidins, tannins, phloroglucinol*

Received: May 30, 2012

Revised: November 22, 2012

Accepted: November 26, 2012

Published: November 26, 2012

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel: +34 923294537. Fax: +34 923294515. E-mail: escriban@usal.es.

Funding

Thanks are due to the Spanish MINECO for financial support (Project ref AGL2011-30254-C02-01). J.R. and N.Q.M. acknowledge the Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain (MICINN) for his Juan de la Cierva contract and for her FPIscholarship, respectively.

Notes

The authors declare no competing financial interest.



Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency



Natalia Quijada-Morín^a, Pascale Williams^b, Julián C. Rivas-Gonzalo^a, Thierry Doco^b, M. Teresa Escribano-Bailón^{a,*}

^aGrupo de Investigación en Polifenoles, Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, E-37007 Salamanca, Spain

^bINRA, Joint Research Unit 1083, Sciences for Enology, 2 Place Pierre Viala, F-34060 Montpellier, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 October 2013

Received in revised form 20 December 2013

Accepted 29 December 2013

Available online 7 January 2014

Keywords:

Red wine

Proanthocyanidins

Polysaccharides

Oligosaccharides

Astringency perception

ABSTRACT

The influence of the proanthocyanidic, polysaccharide and oligosaccharide composition on astringency perception of Tempranillo wines has been evaluated.

Statistical analyses revealed the existence of relationships between chemical composition and perceived astringency. Proanthocyanidic subunit distribution had the strongest contribution to the multiple linear regression (MLR) model. Polysaccharide families showed clear opposition to astringency perception according to principal component analysis (PCA) results, being stronger for mannoproteins and rhamnogalacturonan-II (RG-II), but only Polysaccharides Rich in Arabinose and Galactose (PRAGs) were considered in the final fitted MLR model, which explained 96.8% of the variability observed in the data. Oligosaccharides did not show a clear opposition, revealing that structure and size of carbohydrates are important for astringency perception. Mannose and galactose residues in the oligosaccharide fraction are positively related to astringency perception, probably because its presence is consequence of the degradation of polysaccharides.

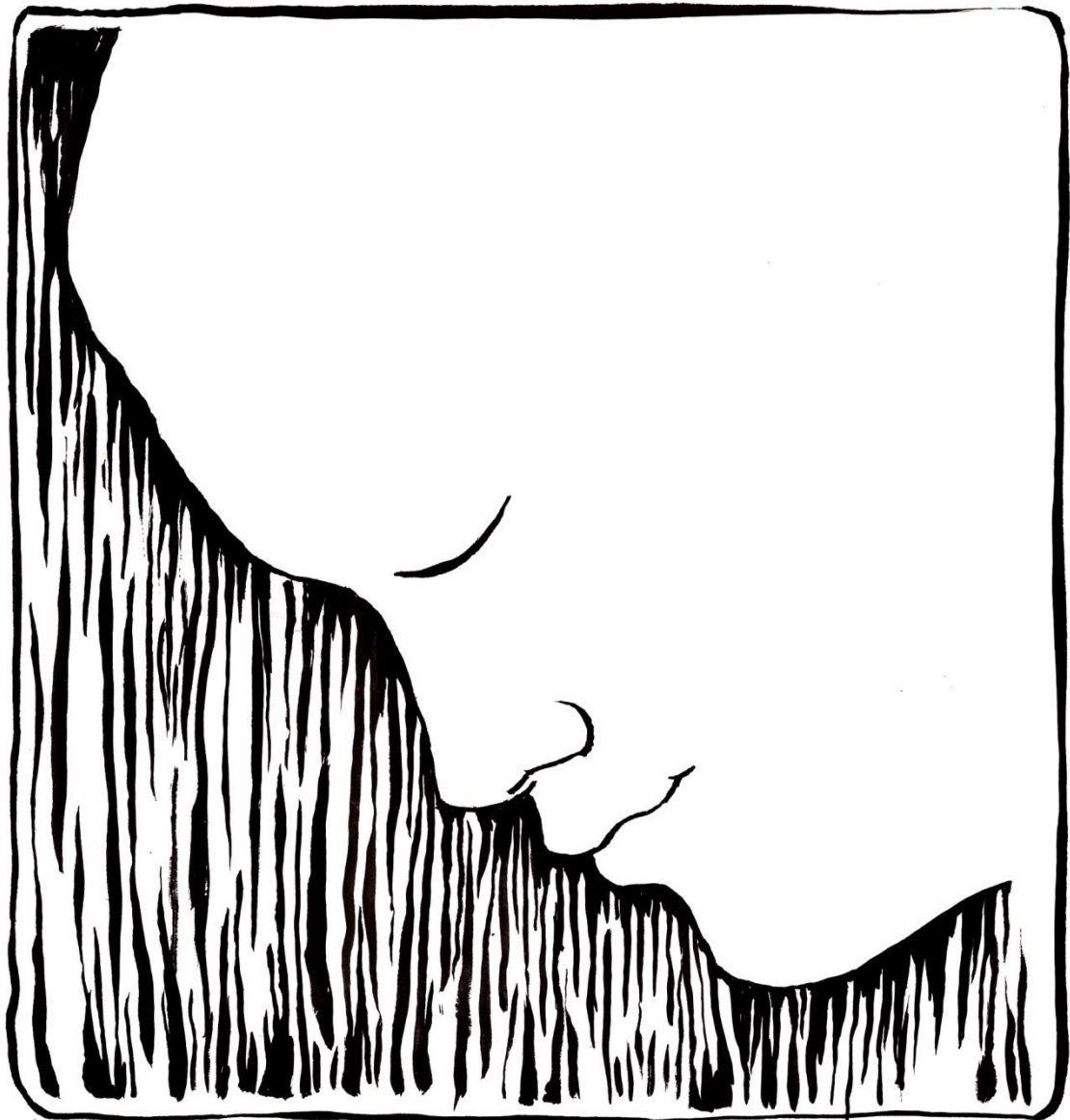
© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294 537; fax: +34 923 294 515.

E-mail address: escriban@usal.es (M.T. Escribano-Bailón).

Acknowledgements

Thanks are due to the Spanish MICINN (Ref. AGL2011-30254-C02) and to Consolider-Ingenio 2010 Programme (Ref. CSD2007-0063) for financial support. N. Quijada-Morín also thanks the Spanish MICINN for the F.P.I. predoctoral scholarship.



BLOQUE III:

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROPIEDADES
SENSORIALES DE COMPUESTOS FENÓLICOS
AISLADOS

CAPÍTULO 4:

ESTUDIO FÍSICOQUÍMICO Y COLORIMÉTRICO DE PIGMENTOS DERIVADOS DE ANTOCIANOS

Existe una gran cantidad y variedad de pigmentos derivados de antocianos que se originan en los vinos durante los procesos de vinificación y envejecimiento y que proporcionan características colorimétricas diferentes a las que presentan los antocianos a partir de los cuales se originaron. En el apartado de introducción se han descrito algunos de estos compuestos presentes en los vinos, entre los que se encuentran los piranoantocianin-fenoles, que se caracterizan por presentar un anillo fenólico adicional en la posición C-10 del anillo D (figura 32).

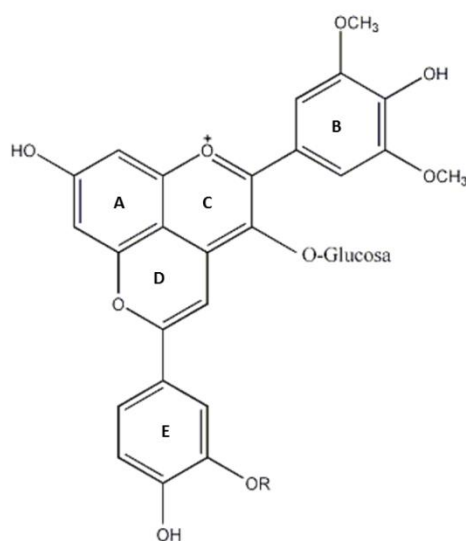


Figura 32: estructura general de los piranoantocianin-fenoles.

Se han descrito dos mecanismos de formación para este tipo de compuestos, uno de ellos consiste en la reacción entre antocianos y vinilfenoles provenientes de la descarboxilación enzimática de ácidos hidroxicinámicos [70] y el otro propone la condensación directa de antocianos con ácidos hidroxicinámicos [71]. Parece que en los

vinos se podrían producir ambos tipos de mecanismos, siendo el primero el dominante en las primeras etapas de la vinificación, y el segundo, más lento, se produciría durante el envejecimiento. La aparición de este tipo de derivados depende de varios factores, entre ellos de la concentración de sus precursores en el medio, del pH o de la presencia de etanol [194]. La formación de este tipo de compuestos se ha relacionado con el cambio de color observado en los vinos tintos durante el envejecimiento ya que, en general, su máximo de absorbancia está desplazado hipsocrómicamente con respecto al de los antocianos a partir de los cuales se han generado, proporcionando una coloración rojo-anaranjada [62]. Debido a la presencia de sustituyentes en la posición C-4 este tipo de compuestos son más resistentes a la decoloración causada por la hidratación o por el anión bisulfito que los antocianos a partir de los que se generan, lo que se relaciona con la elevada expresión de color que presentan estos pigmentos al pH del vino [195].

El conocimiento de las características fisicoquímicas y colorimétricas de los pigmentos derivados de antocianos puede ayudar a comprender su comportamiento en los vinos y a explicar los cambios observados durante la evolución de los mismos.

4.1. OBJETIVOS

El objetivo general de este apartado fue realizar la caracterización fisicoquímica y colorimétrica de pigmentos derivados de antocianos. Este objetivo general se concretó en los siguientes objetivos específicos:

- Sintetizar y aislar pigmentos derivados de antocianos.
- Determinar el coeficiente de absorción molar de cada uno de los pigmentos aislados.
- Estudio del comportamiento frente a las variaciones de pH de los compuestos.
- Determinación de las constantes de equilibrio de hidratación/protonación.
- Estudio de la estabilidad colorimétrica frente a la adición de bisulfito.

- Estudio de la copigmentación con catequina: determinación de las constantes de copigmentación para cada pigmento y estudio del efecto de la copigmentación sobre el color de las disoluciones.

4.2. RESUMEN

Los resultados obtenidos en este apartado de la tesis dieron lugar a la siguiente publicación:

Quijada-Morin, N.; Dangles, O.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailon, M.T. Physico-chemical and chromatic characterization of malvidin 3-glucoside-vinylcatechol and malvidin 3-glucoside-vinylguaiacol wine pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 9744-9752.

En este estudio se realizó la síntesis de los derivados de malvidin-3-glucósido con los ácidos cafeico y ferúlico, con el objetivo de obtener y aislar los compuestos malvidin-3-glucósido-4-vinilcatecol (PA1) y malvidin-3-glucósido-4-vinilguayacol (PA2).

Los compuestos fueron sintetizados mediante la incubación de soluciones acuosas de malvidin-3-glucósido con el ácido hidroxicinámico correspondiente en cada caso. La formación de los compuestos fue monitorizada mediante HPLC, y los compuestos resultantes fueron aislados empleando HPLC a escala semipreparativa, y posteriormente liofilizados.

Las características fisicoquímicas y cromáticas de ambos pigmentos fueron estudiadas. Se determinó el coeficiente de extinción molar para cada uno de ellos a pH 0.8 y a la longitud de onda de absorbancia máxima de cada pigmento.

Se realizaron pruebas para determinar la extensión de la decoloración causada por la presencia del anión bisulfito en las disoluciones de estos pigmentos. Ambos pigmentos mostraron gran resistencia a la decoloración debido a la presencia del anillo piránico adicional que impide el ataque nucleofílico del bisulfito sobre la posición 4 del pigmento.

El comportamiento frente a las variaciones de pH fue estudiado en el intervalo entre 2 y 4.5, observándose diferencias entre ambos pigmentos

El pigmento PA1 se comportó como un dímero no covalente de dos iones piranoflavilio que se hidrata en dos pasos sucesivos sin que exista transferencia del protón. En cambio, el comportamiento del PA2, en el que aparecieron dos bandas de absorbancia, sugiere la existencia de un equilibrio entre el catión piranoflavilio y la base quinoidal. Las constantes termodinámicas que rigen estos equilibrios fueron también determinadas.

El estudio de la copigmentación de ambos compuestos con catequina mostró resultados sorprendentes. La adición de catequina a las disoluciones de PA1 provocan un efecto hipercrómico leve, mientras que en las de PA2 se observa un incremento muy importante en la absorbancia de la banda I, asociado a un gran aumento del coeficiente de extinción del pigmento cuando se encuentra en forma copigmentada. Además se produjo un cambio importante en el tono de las disoluciones, que pasan de moradas a rojas.

La gran estabilidad frente a la decoloración por efecto del pH o del bisulfito exhibida por los dos pigmentos y la extraordinaria capacidad para copigmentar con catequina mostrada por el pigmento denominado PA2 hacen pensar que los pigmentos de tipo piranoantociano podrían tener una influencia elevada en el color de los vinos en los que se encuentran, pese a que las concentraciones determinadas en los mismos no sean muy elevadas, y revelaron el interés de estos pigmentos para su potencial uso como colorantes en la industria alimentaria.

Physico-Chemical and Chromatic Characterization of Malvidin 3-Glucoside-vinylcatechol and Malvidin 3-Glucoside-vinylguaiacol Wine Pigments

NATALIA QUIJADA-MORÍN,[†] OLIVIER DANGLES,[‡] JULIÁN C. RIVAS-GONZALO,[†] AND
M. TERESA ESCRIBANO-BAILÓN^{*†}

[†]Grupo de Investigación en Polifenoles, Universidad de Salamanca, E-37007 Salamanca, Spain, and
[‡]Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse, INRA, UMR408, F-84000 Avignon, France

The physicochemical and chromatic features of malvidin 3-glucoside-vinylcatechol (PA1) and malvidin 3-glucoside-vinylguaiacol (PA2) adducts were investigated. Important differences between both pigments were observed. In the investigated pH range (2.0–4.5), our results suggest that PA1 could be considered as a noncovalent dimer of two pyranoflavylum ions (AH)₂ which undergo a hydration reaction in two successive steps, with no proton transfer. In contrast, only proton transfer equilibrium between the pyranoflavylum ion and the quinonoid bases was observed for PA2. The hydration and acidity thermodynamic constants of both pyranoanthocyanins were determined by UV–vis spectroscopy. Pigment PA1 was shown to be less sensitive to bisulfite addition than to water addition, and PA2 seems to be largely insensitive to both water and bisulfite additions. The binding constants for the interaction between the pigments and (+)-catechin in aqueous solution and the changes in the CIELAB parameters that it provoked were also determined. The huge increase in the absorption of the pyranoflavylum ion of PA2 when it binds catechin has no equivalent for anthocyanins and nicely outlines the potential of pyranoanthocyanins in the expression of natural colors.

KEYWORDS: Pyranoanthocyanin; red wine pigments; copigmentation; malvidin 3-*O*-glucoside; hydroxycinnamic acid; caffeic acid; ferulic acid; CIELAB

*To whom correspondence should be addressed. Phone: +34 923 294 537. Fax: +34 923 294 515. E-mail: escriban@usal.es.

Received for review March 26, 2010. Revised manuscript received July 21, 2010. Accepted July 22, 2010. Thanks are due to the Spanish MICINN (Project ref AGL2008-05569-C02-01) and to Junta de Castilla y León (group GR133) for financial support. N.Q.-M. thanks the Spanish MICINN for the FPI predoctoral scholarship.

CAPÍTULO 5:

ESTUDIO DE LA ASTRINGENCIA DE FLAVANOLES EN DISOLUCIONES MODELO.

Los flavonoles presentes en muchos alimentos y bebidas se señalan como los principales compuestos responsables de la sensación de astringencia que provoca la ingesta de los mismos, debido a que estos compuestos son capaces de precipitar proteínas, que es uno de los principales mecanismos implicados en el desarrollo de la sensación de astringencia.

Entre las proantocianidinas presentes en el vino podemos distinguir dos grupos principales: por una parte las procianidinas, formadas por subunidades de catequina y epicatequina, y por otra parte las prodelfinidinas, constituidas por unidades de galocatequina y epigalocatequina. Las diferentes subunidades existentes, la posible presencia de galoilación en las mismas, la variedad en la posición de los enlaces entre las subunidades que forman las proantocianidinas y el grado de polimerización hacen que exista una gran diversidad estructural en las proantocianidinas presentes en los vinos.

Las características estructurales de las proantocianidinas parecen estar relacionadas con sus características organolépticas, algunos autores relacionan el grado de polimerización de las proantocianidinas con la percepción de la astringencia [196], mientras que otros señalan que su influencia no es importante [197]. Recientemente, se ha postulado que los taninos de mayor tamaño de los vinos serían más astringentes que los menos polimerizados, que en cambio provocarían mayor sensación de amargor [198]. Asimismo, se ha puesto de manifiesto mediante evaluación sensorial, que la epicatequina se percibe como más amarga y astringente que la catequina [199]. Las diferencias

observadas apoyan la hipótesis de que la estereoquímica de los flavan-3-oles es determinante en el desarrollo de estas sensaciones [200,201].

Contenidos altos de prodelphinidinas se han relacionado con vendimias de alta calidad. Así, se ha puesto de manifiesto, que en años en los que la madurez fenólica es óptima, su contenido en uvas y vinos es más elevado [202], lo que a su vez se ha relacionado con mejores características sensoriales de los vinos (con más cuerpo y redondez). Sin embargo, según nuestro conocimiento no existían estudios sobre la evaluación sensorial de este tipo de compuestos, probablemente debido a la dificultad para aislar cantidades suficientes para poder llevar a cabo un análisis sensorial con panel de catadores.

5.1. OBJETIVOS

El objetivo principal de este apartado es la evaluación sensorial de compuestos de tipo proantocianidina. Para conseguir esta evaluación, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Obtención y caracterización de oligómeros de proantocianidinas con diferentes estructuras (monómeros, dímeros y trímeros di-hidroxilados y tri-hidroxilados en el anillo B).
- Caracterización sensorial de las fracciones y compuestos aislados.
- Analizar la interacción de catequina y galocatequina con proteínas mediante simulación de dinámica molecular utilizando el fragmento peptídico IB₇₁₄.

5.2. RESUMEN

Los resultados obtenidos en este apartado han sido redactados para su publicación:

Ferrer-Gallego, R, Quijada-Morín, N., Brás, N.F., de Freitas, V., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T. Characterization of sensory properties of flavanols. A molecular dynamic approach.

Los flavanoles evaluados en este estudio se aislaron a partir de cebada. Los dímeros y trímeros de prodelphinidas y procianidinas aislados fueron caracterizados mediante hidrólisis ácida en presencia de nucleófilos empleando la metodología optimizada que se describe en el capítulo 3 de esta tesis.

Las características gustativas de los compuestos aislados fueron evaluadas por un panel de catadores expertos que asignaron puntuaciones para el amargor y la astringencia, así como para subcualidades de esta última: persistencia, amargor, sequedad, aspereza, verdor, dureza, viscosidad, suavidad y aterciopelado.

En general, los catadores relacionaron las sensaciones negativas (astringencia, persistencia, amargor, sequedad, aspereza, verdor y dureza) con las procianidinas mientras que las sensaciones positivas (viscosidad, suavidad y aterciopelado) parecieron estar más conectadas a las prodelphinidas. La persistencia está más relacionada con las procianidinas y con los atributos negativos que con las prodelphinidas y los atributos positivos. También se observó que un mayor número de subunidades en la molécula se relacionaba con menor intensidad de los atributos negativos y mayor intensidad de los atributos positivos. El análisis de componentes principales permitió describir el 95.5% de la variabilidad de los datos y confirma la relación entre las procianidinas y los atributos sensoriales desagradables y la relación de las prodelphinidas con los atributos sensoriales positivos.

Además del estudio sensorial, se realizaron simulaciones de la dinámica molecular de los monómeros catequina y galocatequina con el fragmento peptídico IB₇₁₄ en disolución acuosa. IB₇₁₄ es un fragmento peptídico de 14 aminoácidos, representativo de las proteínas ricas en prolina (PRPs) presentes en la saliva humana y consideradas como las principales implicadas en la interacción tanino-proteína y, por tanto, en el desarrollo de la astringencia.

Las simulaciones se realizaron con una molécula del fragmento peptídico y 8 moléculas de catequina o con una molécula de péptido y 8 moléculas de galocatequina, para reproducir así las condiciones ensayadas en el análisis sensorial. Se extrajeron varias estructuras de los sistemas durante la simulación. En ambos casos, se observó la formación de complejos estables entre las moléculas de los flavan-3-oles y el fragmento peptídico. En el caso de la catequina se produjo una unión rápida (3.8 ns) seguida de la unión de una segunda molécula. Ambas moléculas permanecieron unidas de forma simultánea al péptido el tiempo restante de la simulación, provocando un cambio en la estructura del mismo, que pasa de presentar una conformación extendida a otra más compacta. En el caso de la simulación con galocatequina, hasta pasados 20 ns no se produjo una unión eficaz de la molécula al fragmento peptídico y, a diferencia de lo ocurrido con la catequina, no se produjo la unión simultánea de varias moléculas del flavanol. Se observó también que las distintas moléculas de galocatequina tienden a interaccionar entre sí formando agrupaciones, lo que podría estar relacionado con la baja tasa de interacción observada entre la galocatequina y el péptido. En ambos casos, las fuerzas que intervienen en la unión de las moléculas fenólicas y el fragmento peptídico no son sólo hidrofóbicas, como cabría esperar, sino también hidrofílicas. Los datos obtenidos mediante esta simulación sugieren que la interacción con catequina es más extensa y duradera que la de galocatequina, lo que apoya los datos obtenidos en el análisis sensorial en el que la catequina fue percibida como más astringente y esta sensación era más persistente que en el caso de la galocatequina.

Estos resultados sugieren que existe relación entre la estructura de los compuestos y las características sensoriales percibidas, y que incluso pequeños cambios en dichas estructuras pueden ser percibidos sensorialmente de formas muy diferenciadas.

TITLE: Characterization of sensory properties of flavanols. A molecular dynamic approach.

AUTHORS: Raúl Ferrer-Gallego^{a,b}, Natalia Quijada-Morín^a, Natércia F. Brás^b, Victor de Freitas^b, Julián C. Rivas-Gonzalo^a, M. Teresa Escribano-Bailón^{a*}

ADDRESS: ^aGrupo de Investigación en Polifenoles. Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E 37007 Salamanca, Spain

^bCentro de Investigação em Química, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 4169-007 Porto, Portugal

Corresponding author: M. Teresa Escribano-Bailón

Phone: +34 923 294 537

Fax: +34 923 294 515

e-mail: escriban@usal.es

1 **ABSTRACT**

2 In this work, we have studied sensations elicited by catechin and procyanidins in
3 comparison to those elicited by gallicocatechin and prodelphinidins by means of a
4 sensory panel and to obtain further insights into the mechanisms of action, molecular
5 dynamic simulations have been performed. Results obtained show clear differences in
6 bitterness, intensity of astringency and astringency qualities between the two types of
7 flavanols. In general, dihydroxylated B-ring flavanols were more astringent, bitter, dry,
8 rough, unripe and persistent than three-hydroxylated B-ring. Besides, these last
9 compounds were smoother, more velvety and viscous. Molecular Dynamics simulations
10 suggested that catechin binds to a human salivary proline-rich peptide IB7₁₄ faster than
11 gallicocatechin and this interaction is maintained for more time. IB7₁₄ can interact with
12 two catechin molecules concurrently while only interacts with one gallicocatechin
13 molecule. MD simulations support the results obtained from the tasting panel.

14

15 **KEYWORDS:** astringency, bitterness, flavanols, prodelphinidins, procyanidins,
16 catechin, gallicocatechin, molecular dynamic simulations, peptide IB7₁₄

17

18

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

Manuscript: Characterization of sensory properties of flavanols.
A molecular dynamic approach.

SUMMARY



1. INTRODUCTION

The organoleptic properties of red wines, such as color or astringency, determine wine quality and consumer acceptance. These organoleptic properties are mainly due to the presence of certain phenolic compounds, which are mostly located in grape skins and seeds, from they are released into must-wines during winemaking. Grapes phenolic composition is affected by grape variety, harvest date, climatic conditions, soil, and cultural practices [50].

Cell wall acts as a barrier for the diffusion of phenolic compounds from grapes to wines during winemaking. Grape cell walls are composed mainly by carbohydrates, classified in three main groups, cellulose, pectic polysaccharides and hemicelluloses. Besides carbohydrates, protein, lignin, and phenolic compounds can also be found as part of grape cell walls [109]. It is generally accepted that the extraction of phenolic compounds from grapes skins increases as ripeness progress as a consequence of cell wall degradation by pectolytic enzymes [4]. Grape ripeness degree influences polyphenolic composition of red wines in two different ways: on the one hand, it determines the phenolic composition of grapes skins and seeds, and on the other hand, it causes changes in cell wall composition that may condition the amount of compounds extracted into the maceration media.

Among phenolic compounds present in red wines, anthocyanins and its derivatives are the main responsables for the color of red wines. In turns, proanthocyanidins are mainly related to astringency perception and together with flavonols and phenolic acids, they are involved in copigmentation phenomena and in changes of color that may occur during wine ageing.

Copigmentation is the main color stabilization mechanism [47] of anthocyanidins, which could imply up to 30-50% of the color expression of young wines [8]. This phenomenon takes place as a spontaneous and exothermic process that consist of the stacking of an

organic molecule, called copigment, and a coloured form of an anthocyanin molecule. Two general kinds of copigmentation phenomena have been described: intramolecular copigmentation and intermolecular copigmentation, this last including the self-association mechanism.

As a consequence of the copigmentation phenomenon, a hyperchromic effect usually accompanied by a bathochromic shift of the maximum absorbance wavelength of the solutions occurs. Flavonols, flavan-3-ols and phenolic acids are the most effective copigments in red wines [48]. Moreover, it has been suggested that copigmentation could act as the first stage in the formation of new pigments, and that it could influence the extraction of pigments from grapes. Furthermore, copigmentation could slow down the rates of oxidation and polymerization reactions of phenolic compounds since it would decrease their free concentrations. Besides copigmentation, other processes occur in red wines causing changes in the color. Among them, the formation of anthocyanin derived pigments, which can be classified in four main groups: direct anthocyanin-flavanol condensation products, anthocyanin oligomers, aldehyde-mediated anthocyanin-flavanol condensation products, and pyranoanthocyanins [51]. These pigments have different color properties than the anthocyanins from they are formed. One of the chapters of this manuscript of thesis is devoted to the study of a particular type of anthocyanidin pigments, the pyranoanthocyanins. These derivative compounds are characterized by presenting an additional heterocyclic D ring on their structure that results from the cyclisation between the OH group at C-5 and the C-4 of the anthocyanin pyranic ring. Many compounds originally constitutive of the grape must or formed as a result of the fermentation process can interact with anthocyanins forming pyranoanthocyanins. Pyranoanthocyanin-phenols can be formed by the reaction between cinnamic acids and anthocyanidins [70]. They display an absorption spectrum hypsochromically shifted in relation to the spectrum of the anthocyanin monoglucoside from they are derived and exhibit higher color intensity and stability towards pH changes or bisulfite bleaching

than anthocyanins. The presence of substituents in C-4 position protects the chromophore group from the nucleophilic attack (of water or bisulfite).

Color is a complex concept that has been defined as the mental response to the stimulus that a luminic visible radiation causes in retina. The chromatic stimulus is divided in three sensations: hue that is the qualitative parameter for color definition, chroma that indicates quantitative aspects of color, and lightness that represents the balance between absorbed and reflected light. This stimulus depends on the observer and also on the illumination, thus, in order to make comparisons and unify criteria; the “Commission Internationale de L’Eclairage” (CIE) has described standard illuminants and standard observers for colorimetry [134]. Colorimetry represents an important advance in the study of red wine color, because it permits the comparison of measurements made by different investigations and removes the subjectivity of the use of color atlas or scales.

Proanthocyanidins or condensed tannins present in wine are related to astringency perception, and also to the formation of derived-pigment and to the copigmentation phenomena. In grapes they are mainly found in seeds and in skins from they are released into must-wines during fermentation-maceration processes [89,90]. Prodelpidinins are only found in skins, while procyanidins are located in both, skins and seeds. There is a large variety of proanthocyanidin compounds in wine, which differ in the subunit composition, the number of subunits present in the molecule, the position of the links between the different subunits and in the presence or not of galloylation [89,203]. This large variety makes proanthocyanidin analysis a difficult task. Several methods have been developed for their analysis. Among them, acid-catalized depolymerization in the presence of nucleophiles such as phloroglucinol is commonly used for large proanthocyanidins or complex mixtures analysis [94,95]. This method provides information about average polymerization degree, percentage of galloylated subunits and subunit distribution. Several authors had related total proanthocyanidin concentration, average degree of polymerization and galloylation percentage to astringency

development [142], thus the determination of these parameters is of great interest due to the possible existence of relationships between them and astringency perception in red wines.

Astringency is a complex sensation, described as the roughing, puckering and drying mouth feel that is developed by the intake of several foods and drinks [140]. It is generally accepted that the main mechanism which drives astringency is salivary protein precipitation [204], which causes a decrease in mouth epithelia lubrication. Other mechanisms such as laminin receptor activation or the presence of colloidal particles in solution have been recently related to astringency development [144].

The presence of other compounds in wines, as polysaccharides, can modify astringency perception. Polysaccharides found in red wine have two different origins: they can come from grape cell walls or from yeast cell walls. Mannoproteins and glucans are released from yeast cell walls while polysaccharides rich in arabinose and galactose (PRAGs) and rhamnogalacturonans (RG) are released from grapes. About 35% of red wine polysaccharides are mannoproteins, 40% are PRAGs, 20% are RG-II and 4% are RG-I [111]. Grape variety, maturity and vinification techniques can modify these percentages [190]. Oligosaccharides are also found in red wines [127,132]. They are described as non-digestible carbohydrates formed by 3 to 15 monosaccharide residues linked by glycosidic bonds. They come from wine polysaccharides and they are structurally related to polysaccharides from vegetal cell wall. There are not studies which relate oligosaccharides to wine organoleptic properties, but their structural similarity to polysaccharides make them an interesting research field.

Mannoproteins and RG-II are thought to decrease astringency perception [152]. This interaction could be caused by two different mechanisms, the first one proposes the interaction of tannins and polysaccharides yielding soluble complexes and decreasing the available tannin concentration for the interaction with salivary proteins. The other one

suggests the formation of high soluble ternary complexes of protein, tannin and polysaccharides [156]. Despite several fractions of polysaccharides have been evaluated in model solution in order to determinate their organoleptic properties [152], there are not studies which relate their presence in wine to the modulation of the astringency perception.

Although several indirect methods have been developed for astringency evaluation, experts taste panels are commonly used. Panelists are usually ask to describe this sensation as a function of the time that it takes to develop, the duration of the sensation in mouth after expectoration and a huge and complex vocabulary that details the different subqualities of the astringency perception [157].

The complexity of red wine composition and the existence of interactions between the compounds present in the wine matrix made the establishment of relationships between the organoleptic properties and chemical composition a difficult but interesting task.

2. AIM

Polyphenolic composition of red wines is well known to affect its organoleptic characteristics, such as color or astringency. Color is mainly related to anthocyanin composition, while astringency is related to proanthocyanidins, nevertheless, the presence of other compounds in red wine can modify its organoleptic properties. Red wine color is modified during ageing by the formation of derived pigments and the existence of copigmentation phenomena, while astringency perception is influenced by the presence of other compounds in the wine matrix, as polysaccharides.

Red wine composition is determined by grape variety, but also by grape maturity and winemaking techniques, that will determinate the amount of compounds extracted from grapes to maceration media.

The general aim of this PhD Thesis is to study the influence of the polyphenolic and polysaccharide composition of red wines on its organoleptic characteristics, focusing on color and astringency.

The specific aims of this PhD Thesis were:

- To study the influence of ripening degree on the polyphenolic composition of grape skins and on its extraction (Chapters 1 and 2).
- To characterize the cell wall composition of grape skins during ripening and its influence on the phenolic compounds extractability from grape skins (Chapter 1 and 2).
- To determine the influence of proanthocyanidin, polysaccharide and oligosaccharide composition of red wines on the astringency perception (Chapter 3).
- To perform the colorimetric and physicochemical characterization of anthocyanin-derivative pigments (Chapter 4).

- To study the relationship between the flavanol structure and the sensation elicited in the oral cavity (Chapter 5).

3. EXPERIMENTAL SECTION

SECTION I: TECHNOLOGICAL MATURITY AND CELL WALL COMPOSITION: INFLUENCE ON THE EXTRACTABILITY OF POLYPHENOLS FROM GRAPE SKINS

CHAPTER 1: ANTHOCYANIN EXTRACTABILITY FROM GRAPE SKINS

The aim of this chapter was to study the influence of grape ripeness on anthocyanin extractability from grape skins and on cell wall composition, as well as determinate the influence of cell wall composition on anthocyanin extractability from grape skins.

The results obtained in this chapter led to the following *peer reviewed* publications:

Hernández-Hierro, J.M.; Quijada-Morín, N.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 732, 26-32.

Hernández-Hierro, J.M.; Quijada-Morín, N.; Martínez-Lapuente, L.; Guadalupe, Z.; Ayestarán, B.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree. *Food Chemistry* **2014**, 146, 41-47.

1. Materials and Methods

Grape samples were harvested at three different ripeness degrees and were sorted according to their density in three groups corresponding to 22, 24 and 26° Brix. Skins were manually separated from whole grapes and three subsamples were taken from each

sample, one for the exhaustive methanolic extraction, one for the hydroalcoholic extraction and the third one for cell wall analysis.

For exhaustive methanolic extraction, ten grams of grape skins were macerated at 4 °C in methanol containing 0.1% of HCl 12M until colourless of skins, methanolic phases were successively pooled, a few milliliters of water were added and the extract was concentrated under vacuum at 30° C until methanol was removed and finally made up to 100 mL with ultrapure water, and injected into the chromatographic system to determine anthocyanins.

For hydroalcoholic extraction, ten grams of grape skins were macerated in 100 mL of model wine solution (4 g L⁻¹ tartaric acid, 12.5% ethanol, adjusted at pH 3.6 with NaOH 0.5 M). The vials were kept at 25 °C and darkness throughout the experiment. At regular intervals (1, 3, 5 and 7 days) 250 µL of extraction medium were taken, and injected into the chromatographic system to determine anthocyanins.

Chromatographic analyses were carried out in order to identify and quantify the extracted compounds using Agilent Technologies 1200 Series RRLC. Extractability was calculated as the ration between hydroalcoholic extraction and exhaustive methanolic extraction of each compound.

Chromatic analyses were performed using an Agilent Technologies UV–vis spectrophotometer 8453 for scanning between 380 and 770nm. CIE 1964 10° standard observer and the CIE D65 illuminant were used as references to calculate the tristimulus values recommended by the Comission Internationale de l'Éclairage [134]. The CIELAB space was used and parameters measured included: Lightness (L^*), red–green coordinate (a^* , $-a^*$), yellow–blue coordinate (b^* , $-b^*$). From a^* and b^* coordinates another two colour parameters are defined: the hue angle (h_{ab}) and chroma (C^*_{ab}) which indicate qualitative and quantitative aspects of colour respectively. Calculations were made using the CromaLab® software.

Cell wall material was obtained as previously described [205]. The following parameters were determined on the isolated cell walls as described elsewhere: non-cellulosic polysaccharides [206], cellulose [207], esterification degree of pectins [208], protein [209], lignin [210] and phenolic compounds [211].

Statistical data treatments were performed in order to establish relationships between grape maturity, soluble solid contents, anthocyanin extractabilities and cell wall composition. The SPSS 13.0 for Windows software package (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for data processing.

2. Results and discussion

Exhaustive methanolic extraction results pointed out that anthocyanin contents were highly influenced by ripeness degree and in a lesser extent by soluble solid contents. Soluble solids effect was more important for anthocyanin monoglucosides than for the rest of compounds quantified. The highest anthocyanin amounts were found at pre-harvest samples, followed by harvest and the lower ones at over-ripening. Non-acylated derivatives were predominant, reaching values between 70.9% and 84.1% of the quantified compounds; and these percentages increased as the soluble solid contents whatever the physiological state, with the exception of the highest percentage which was found in the 24 °Brix over-ripening sample. This behavior suggested the existence of relationship between acyl-transferase activity and sugar accumulation in grape berries. Extractability maximum levels were reached at the third day of the hydroalcoholic extraction, achieving levels around 60% of anthocyanin extraction. In general, non-acylated anthocyanins were better extracted than acylated anthocyanins. Anthocyanins extractability was influenced by ripeness degree, and also by soluble solid content. In general, ripper samples presented higher extractabilities than pre-harvest samples, probably due to the degradation of cell walls caused by ripeness.

Chromatic characteristics of the samples were measured during the extraction process, in order to evaluate the impact of physiological stage and soluble solid contents on the color of the maceration media. On the first day of the hydroalcoholic extraction almost all the samples presented color differences between them. On the seventh day of extraction samples were grouped in three clusters attending to their color properties, without color differences within each group. There was not a clear relationship between anthocyanin composition of the extracts and displayed color. This fact is probably caused by the presence of polymeric pigments and the development of copigmentation phenomena.

Cell wall composition was also very influenced by ripeness degree and soluble solid contents. A decrease in the total isolated cell wall material was observed as ripeness progressed, from 4.2% at pre-harvest to 3.3% and 2.5%, harvest and over-ripening, respectively. During ripening, the amounts of almost all the quantified monosaccharides showed a slight increase and then a decrease in over-ripening samples. Regarding soluble solid contents, all monosaccharides contents presented an increase followed by a decrease in pre-harvest samples as the content in soluble solids is raised, while harvest and over-ripening samples did not show a homogeneous pattern when the soluble solid content is increased. Polysaccharide families' contents were obtained using the iterative calculation from monosaccharide profiles. The polysaccharide families' percentages remained quite stable across the different samples, which indicate the high conservation of the structures. In general polysaccharides presented an increase followed by a decrease as ripeness progressed, except for arabinogalactans, which reached their maximum value in pre-harvest samples and then showed a continuous decrease. Pectin esterification degree did not show a clear pattern across the samples, reaching values from 8.4% to 85.3%. Lignin presented a slight increase followed by an important decrease during ripening and its contents constituted on average nearly 30% by weight of cell wall material. Cellulose pattern was not clear but a slight increase is observed from pre-harvest to harvest and then its levels remain nearly constant. Polyphenols content

presented an increase followed by a slight decrease. Protein content increased during ripening, this increase could compensate the loss of structural polysaccharides and contribute to maintain cell wall integrity as ripeness progress. In general, the changes observed in grape skins were continuous but moderate and occurred in lesser extent than those reported for other fruits of tissues [212].

Regarding influence of cell wall material on anthocyanin extractability, PCA analysis revealed that total insoluble material content presented the highest opposition to anthocyanin extractability, while cellulose, rhamnogalacturonans-II (RG-II) and polyphenols present in cell wall material were positively correlated to anthocyanin extractability. The total cell wall amount is a crucial factor for anthocyanin extractability, but molecular structure also plays an important role. The rest of the studied parameters presented slightly oppositions to anthocyanin extraction.

MLR was performed to assess the influence of the cell wall composition on the extraction of anthocyanin compounds. Total anthocyanin extraction percentage was selected as dependent variable, whereas all the quantified monosaccharides amounts, protein, polyphenols, cellulose, lignin, pectins esterification level and total insoluble material were used as independent variables. Among all the variables considered, eight of them were considered statistically significant ($p < 0.05$) in the fitted final model which presents the following adjusted equation:

$$\text{Total anthocyanin extraction} = 73.1867 + 1.47262 * [\text{Galacturonic acid}] - 1.23289 * [\text{Glucose}] - 17.1139 * [\text{Rhamnose}] + 7.43013 * [\text{Mannose}] + 41.8535 * [\text{Apiose}] - 96.604 * [2\text{-O-methylxylose}] + 36.5243 * [\text{Glucuronic acid}] - 0.0684884 * [\text{Lignin}]$$

The coefficient of determination ($R^2 = 0.962$) indicated that the proposed model explains the 96.2% of the variability of the anthocyanins total extraction, which supposed a good fit to the data.

To summarize, anthocyanin composition was highly influenced by ripeness degree and in lesser extent by soluble solid contents. Differences in anthocyanin extractabilities were related to physiological stages and also to soluble solid contents. Cell wall composition is influenced by ripeness degree and soluble solid contents. The composition of cell wall determined anthocyanin extractability to the media, total insoluble material exhibits the biggest opposition to anthocyanin extraction, while the highest amounts of cellulose, RG-II and polyphenols within the cell wall composition were positively correlated with anthocyanin extraction. A model connecting cell wall composition and anthocyanin extractabilities was built, explaining 96.2% of the observed variability.

CHAPTER 2: FLAVAN-3-OLS AND FLAVONOLS EXTRACTABILITIES FROM GRAPE SKINS

The aim of this chapter was to study the influence of technological maturity and cell wall composition on the extractability of flavan-3-ols and flavonols from grape skins.

The results obtained in this chapter are being drafted for its publication.

1. Materials and Methods

For this study, the grape samples described in chapter 1 were used. Grape skins were manually removed from the whole grapes and two subsamples were made, one for the exhaustive methanolic extraction and the other one for the hydroalcoholic extraction, the extraction procedure has been previously described in chapter 1. As described in chapter 1, extractability was calculated as the ration between hydroalcoholic extraction and exhaustive methanolic extraction of each compound.

Sample preparations were carried out as previously described [213,214]. Chromatographic analyses were carried out in order to identify and quantify the extracted phenolic compounds; the used chromatographic [215] and mass spectrometer [216] conditions for flavonol analysis are described elsewhere. Flavan-3-ol chromatographic separation was performed on a reversed-phase column Spherisorb ODS-2 (150 x 4.6 mm, 3 μ m) from Waters (Milford, MA, USA) maintained at 25°C. Mobile phases A and B were respectively, 0.25% acetic acid in water and acetonitrile The following linear gradient was used to achieve the chromatographic separation: from 0 to 10% B in 5 min, from 10 to 14.5% B in 35 min, from 14.5 to 19% B in 5 min, from 19 to 55% B in 5 min, hold at 55%B for 5 min, from 55 to 80% B in 5 min, hold at 80% B for 3 min, from 80 to 0% B in 2 min and hold at 0% B for 5 min. The flow rate and the injection volume were set at 0.5 mL min⁻¹ and 100 μ L, respectively. UV/Vis spectra were

recorded from 200 to 600 nm, while acquiring at a selected wavelength of 280 nm. Flavan-3-ols mass spectrometric analyses were performed as previously described [216].

Cell wall material was obtained and analyzed as described in chapter 1, briefly; cell wall material was obtained as previously described [205]. The following parameters were determined on the isolated cell walls as described elsewhere: non-cellulosic polysaccharides [206], cellulose [207], esterification degree of pectins [208], protein [209], lignin [210] and phenolic compounds [211].

Statistical data treatments were performed in order to establish relationships between grape maturity, soluble solid contents, anthocyanin extractabilities and cell wall composition. The IBM-SPSS 21 for Windows software package (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for data processing.

2. Results and Discussion

Cell wall composition of grape skins harvested at different ripening stages has been described in our previous work [217]. Those results were also summarized in chapter 1.

Up to 22 different flavan-3-ols monomers, dimers, trimers and tetramers and 17 flavonol compounds were detected and quantified in the analyzed samples.

The maximum values for total proanthocyanidin extractability were reached on the last day of the study. It could be inferred that the extraction of proanthocyanidins from grape skins would probably had increased if the maceration had been lengthen. Extractability is increased with ripeness stage, in good agreement with other studies [176,218], while no clear pattern is observed for soluble solid contents. Prodelphinidin extractability increases with ripening, whereas this is not so evident for procyanidins. The extraction of prodelphinidins seems to be faster the first days of the study, although afterwards it tends to slow down.

In general monomers were easily extracted in all samples, while dimers, trimers and tetramers had variable behavior. PCA analysis was conducted using proanthocyanidin extractabilities at the last day of the study, ripening stage, soluble solid contents and cell wall composition variables. The first principal component (PC 1) described 37.66% of the variability in the data and second principal component (PC 2) described 26.74% of the variability. Stage of ripening showed a clear positive relationship with total proanthocyanidin extractability, and also with procyanidin and prodelphinidin extractabilities, while soluble solid contents did not present any influence on the compounds extraction. Regarding cell wall composition, total insoluble material displayed the biggest opposition to proanthocyanidins extractabilities. Among cell wall constituents, some polysaccharide families exert a negative influence on proanthocyanidin total extractability and procyanidin extractability, namely arabinogalactans (AG) manans, RG-I, homogalacturonans (HG), xyloglucans (XG), and total polysaccharides content. The opposition to prodelphinidin extractability of those cell wall components is weaker than for procyanidins. Cellulose showed a strong positive relationship with prodelphinidin extraction and also with procyanidin and with total proanthocyanidin extractabilities. These results revealed that proanthocyanidin extractability is mainly influenced by harvest date and total insoluble material and in lesser extent by some cell wall components. The pattern exhibited for proanthocyanidin extractability is quite similar for the previously reported for anthocyaninin extractability [217].

In general, flavonol extractabilities reached its maximum at the fifth day of the hydroalcoholic maceration, which implied that they are extracted faster than proanthocyanidins but slower than anthocyanidins [219]. Quercetin, myricetin and laringetin derivatives were most efficiently extracted than kaempferol or syringetin derivatives, while isorhamnetin derivatives were not extracted in hydroalcoholic media.

PCA analysis was conducted in order to establish relationships between compounds extractabilities at the fifth day of the study and cell wall composition. PC 1 described 41.31% of the variability observed in the data and PC 2 described 22.76%. This analysis revealed that ripening stage or soluble solid contents was not related to total flavonol extractability. It showed also the lack of influence of the insoluble-material contents on flavonol extractability. Some cell wall components presented relationship with flavonol extractability, AG and manans presence would decrease total flavonol extractability while protein is positively related to total and major flavonol compounds (i.e quercetin and myricetin derivatives), and to laricitrin derivatives extractabilities. A possible explanation to the different behaviors shown for the diverse polyphenolic compounds extractabilities is the different location of the diverse polyphenolic compounds in the tissues. Flavonol glucosides are located in epidermal cell layers [180] while anthocyanins and proanthocyanidins are located in hypodermal cell layers in grape skins [184]. Moreover, anthocyanins are located inside cell vacuoles [181], proanthocyanidins have been found inside vacuoles, linked to proteins in the internal face of tonoplasts and also linked to cell wall polysaccharides [184] while flavonol cellular location is not clear, some authors have determined the flavonol concentrations inside vacuole [180,181], but other histochemistry studies had suggested that they could be in cytoplasm as free forms in flower petals [182], while other authors had pointed the possibility of association between nucleus structures and flavonol compounds [180,183]. These diverse cellular and tissue locations could be responsible of the differences observed between these polyphenols families' extractabilities.

Flavan-3-ol total contents showed an increased followed by a slight decrease as ripens progressed. Harvest samples presented the highest total content whatever the soluble solid contents, while the lowest contents were found in pre-harvest samples. Procyanidins and prodelphinidins followed the same pattern. Prodelphinidin contents were higher in harvest samples, but their percentages were bigger in pre-harvest

samples; while over-ripening samples presented the lowest percentages. The abundance of prodelfhinidins in red wines has been previously related to good maturity level of the grapes [202] and to the ability of producing high quality wines [168].

Flavonol contents tended to increase as soluble solid contents were grown in pre-harvest and harvest samples, while over-ripening samples showed the opposite trend. The highest levels were reached in harvest samples whilst pre-harvest and over-ripening samples showed quite lower levels. Regarding the kind of derivative, quercetin and myricetin derivatives were the most abundant compounds in all the studied samples, as previously reported for Tempranillo grapes [99,220,221], kaempferol, laricitrin, syringetin and isorhamnetin derivatives were also detected and quantified. Glucose-linked derivatives were the most abundant ones in all the studied samples, followed by glucuronides and galactosides. Small percentages of rutosides, neosperidosides and aglucons were also found.

To summarize, proanthocyanidin and flavonol extractabilities were influenced in some extent by cell wall composition while ripening stage only affected proanthocyanidin extractability. Unlike the observed for anthocyanins extractability and proanthocyanidin extractability, flavonol extractability was not affected by insoluble material amounts. The extractions of these groups of phenolic compounds from grapes skins are slower than those reported for anthocyanins, reaching its maximums in general the fifth day for flavonol extraction and on the ninth day for proanthocyanidin extraction. Regarding the influence of ripening stage and soluble solid contents on grape skins composition, it is noteworthy that harvest samples presented the highest contents of both flavonols and flavan-3-ols.

SECTION II: PHENOLIC AND POLYSACCHARIDE COMPOSITION AND ITS INFLUENCE ON RED WINE ASTRINGENCY.

CHAPTER 3: PHENOLIC AND POLYSACCHARIDE COMPOSITION AND ITS INFLUENCE ON RED WINE ASTRINGENCY.

The main aim of this chapter was to study the influence of the phenolic and polysaccharide composition of red wines on their perceived astringency.

The results obtained in this chapter led to the two following *peer-reviewed* publications:

Quijada-Morín, N.; Regueiro, J.; Simal-Gandara, J.; Tomás, E.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 12355-12361.

Quijada-Morín, N.; Williams, P.; Rivas-Gonzalo, J.C.; , Doco, T.; Escribano-Bailón, M.T. Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chemistry*, **2014**, *154*, 44-51.

1. Materials and Methods

13 commercial wines from the Spanish protected designations of origin Toro, Rioja and Ribera de Duero were selected for this study. They were elaborated with grapes of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo variety, except one of them which consisted of a blend 96% Tempranillo, 4% Graciano. They belonged to four different vintages: 2006, 2008, 2009 and 2010. Sensory evaluation was carried out by a professional tasting panel, which rated perceived astringency in a scale from 0 to 5. Alum was used as reference standard and two previous sessions were carried out in order to standardize criteria. The consistency of

the taste panel was evaluated using one-way variance analysis (ANOVA), and the obtained results supported the reliability of the sensory panel.

Wine was bleached using sodium bisulfite, and proanthocyanidin compounds were extracted using a mixed-mode anion exchange/reversed phase SPE cartridge Oasis MAX (60 mg, 3 mL) from Waters (Milford, MA).

Proanthocyanidin composition was determined by acid-catalyzed depolymerization in the presence of phloroglucinol following the method described by Kennedy [95] with minor modifications. The cleavage products were analyzed using HPLC-MS. Because of the lack of the corresponding standards, extension subunits, that is, flavan-3-ols Ph adducts, were quantified using their molar response factors relative to catechin as reported by Kennedy and Jones [95].

Polysaccharide and oligosaccharide composition of the red wines was assessed after the isolation of both fractions using high resolution size exclusion column chromatography as previously described [132].

The polysaccharide composition was estimated from the concentration of individual glycosyl residues determined by GC-MS after hydrolysis, reduction and acetylation as described elsewhere [190].

The isolated oligosaccharide fraction underwent to solvolysis with anhydrous MeOH containing 0.5 M HCl for 16 h at 80°C, followed by per-O-trimethylsilylation of the methyl glycoside derivatives in order to ascertain the neutral and acidic composition [222].

Unsupervised methods were applied to observe patterns in the data indicating relationships between samples and/or between variables. The unsupervised pattern recognition method used for data analysis was principal components analysis (PCA), which was applied to the correlation matrix of the original variables. Backward stepwise

multiple linear regression was performed in order to develop a model for astringency perception using as independent variables wine compositions. The SPSS 13.0 for Windows software package (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for data processing.

2. Results and discussion

Acid-catalyzed depolymerization in the presence of phloroglucinol provided valuable information on proanthocyanidin subunit composition, average degree of polymerization (aDP), average molecular weight (aMW), and total proanthocyanidin concentration of the studied wines. Regarding proanthocyanidin subunit composition (+)-catechin (C), (-)-epicatechin (EC), (-)-epicatechin-3-O-gallate (ECg) (+)-gallocatechin (GC), (-)-epigallocatechin (EGC), were found as terminal subunits, whereas only C, EC, and EGC were identified as extension constituents. The observed percentages of PA subunits in these red wines resembled more skins proanthocyanidins than seeds proanthocyanidins, mainly due to the presence of GC and ECg. Calculated aDP was quite similar across the wines, ranging from 2.9 to 4.3. The total concentration of proanthocyanidins ranged from 351 to 1314 mg L⁻¹. Ribera del Duero wines concentrations were slightly higher than Rioja wines concentrations, while Toro wine, which was also the oldest wine in this study, presented the lowest contents.

Multivariate analysis was performed in order to establish relationships between the determined proanthocyanidic composition and the perceived astringency. Astringency was selected as the dependent variable, whereas monomeric flavan-3-ols concentrations, proanthocyanidin subunits concentrations, and aDP were used as independent variables. MLR was conducted applying a backward-stepwise strategy. The coefficient of determination ($R^2 = 0.877$) indicated that the proposed model explained 87.7% of the variability observed in the astringency, which supposed a quite good fit to the data. Results showed that GC concentrations in terminal position and EC concentration in extension positions were positively correlated with astringency perception, while EGC

concentrations in both extension and terminal positions would decrease astringency perception. The rest of the studied parameters did not show statistically significant correlation with perceived astringency. Earlier studies have suggested a positive relationship between astringency and proanthocyanidins concentration [191-193]. Nevertheless, in our study (range of concentrations of proanthocyanidins, 351–1314 mg L⁻¹), the total concentration of proanthocyanidins did not show statistical correlation with the perceived astringency

The concentration (mg L⁻¹) of Mannoproteins (MPs), Polysaccharides Rich in Arabinose and Galactose (PRAGs), Rhamnogalacturonan-II (RG-II) and Glucans in wines was estimated from the concentration of individual glycosyl residues. Total polysaccharides contents (sum of individual polysaccharides families) ranged from 180 to 525 mg L⁻¹. In general, older samples showed a lower polysaccharide content, which may indicate that these compounds tend to decrease during wine storage [120]. In general, Ribera del Duero samples had a lower content in comparison with Rioja samples. The only Toro protected origin sample presents an unusual high content, specially taking into account that it is the oldest sample in the study. Percentages of the different families in the studied wines revealed that PRAGs are the major compounds in the youngest wines (2009 and 2010 vintages), and in R2 and T1 wines. In general 2008 wines from Ribera del Duero presented high mannoprotein and RG-II percentages. Toro wine presented an unusual distribution, with high PRAG, medium RG-II and low mannoprotein percentages. All the studied wines presented low glucans percentages.

Oligosaccharide composition of Tempranillo red wines is reported in this work for the first time. Total oligosaccharide contents ranged from 75 to 325 mg L⁻¹. Nine different glycosyl residues were detected and quantified in all the analysed samples. Galacturonic acid, glucose and mannose presented the highest contents in all the studied wines, while glucuronic acid and fucose were the less abundant glycosyl residues in the oligosaccharide fraction in all the studied samples.

PCA analyses were used as unsupervised pattern recognition to reveal the possible relationships between the studied variables. All polysaccharides families' contents showed opposition with perceived astringency, and this opposition was stronger for mannoproteins and RG-II. Glycosyl residues concentrations originated from the oligosaccharide fraction did not show a clear trend in the PCA plot constructed with astringency scores. All glycosyl residues found in oligosaccharide fraction are also found in polysaccharide one, so the different behavior for astringency modulation could indicate that polymerization and tridimensional structure are both important in the modulation of perceived astringency. Multiple linear regression was performed in order to evaluate the influence of compositional variables on perceived astringency. Nine of the studied variables were statistical significant in the final fitted model ($p < 0.05$). The regression coefficient R^2 took a value of 0.968, which supposes that the fitted model explains 96.8% of the variability observed in the data. The addition of the polysaccharide and oligosaccharide compositional variables implied an important improvement of the final model in comparison with the described for proanthocyanidin compositional variables. The standardized regression coefficients (β) were also provided in the model. They showed that the highest influence in the regression model is caused by proanthocyanidins compositional variables, namely EC in extension positions, GC in terminal positions and EGC in both terminal and extension positions. Among polysaccharides families, only PRAGs were statistically significant for the fitted model. Four glycosyl residues corresponding to oligosaccharide fraction were significant for the fitted model. Rhamnose (Rha) and xylose (Xyl) were negatively correlated with perceived astringency, while galactose (Gal) and mannose (Man) were positively correlated with it. It is possible that the positive correlation of Gal and Man to perceived astringency is related to the decrease of PRAGs and mannoproteins observed in samples with high levels of Gal and Man in the oligosaccharide fraction. This fact also supports the idea that tridimensional structure and size of carbohydrates are important for astringency modulation.

SECTION III: CHARACTERIZATION OF ISOLATED PHENOLIC COMPOUNDS ORGANOLEPTIC PROPERTIES.

CHAPTER 4: PHYSICO-CHEMICAL AND COLORIMETRIC STUDY OF ANTHOCYANIN DERIVED PIGMENTS.

The main aim of this chapter was to study the physico-chemical and colorimetric characteristics of two anthocyanin-derived pigments, malvidin 3-glucoside-vinylcatechol and malvidin 3-glucoside-vinylguaiacol.

The results obtained in this chapter led to the following *peer-reviewed* publication:

Quijada-Morín, N.; Dangles, O.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Physico-chemical and chromatic characterization of malvidin 3-glucoside-vinylcatechol and malvidin 3-glucoside-vinylguaiacol wine pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 9744-9752.

1. Materials and Methods

Anthocyanin-derived pigments were synthesized by the incubation at controlled temperature of aqueous solutions containing malvidin-3-glucoside and caffeic acid for the obtaining of malvidin 3-glucoside-vinylcatechol (PA 1) or malvidin-3-glucoside and ferulic acid for malvidin 3-glucoside-vinylguaiacol pigment (PA 2), following the pathway proposed by Fulcrand *et al* [70] for the formation of this kind of anthocyanin derivatives.

The compounds were isolated using HPLC at semi-preparative scale and lyophilized. The purity and identity of the pigments isolated were checked by HPLC-DAD and MS. Their physico-chemical and chromatic characteristics were studied. Thermodynamic measurements were carried out in solutions of the pigments in citrate buffer with different pH values ranging from 1.0 to 4.5 spectrophotometric measurements were recorded using a Hewlett- Packard UV-vis HP8453 spectrophotometer (Palo Alto, CA).;

bisulfite bleaching resistance was studied by adding different concentrations of sodium bisulfite to pigments solutions at pH 3.5, solution spectra were recorded 15 min after the addition. Copigmentation experiments were carried out using catechin as copigment in solutions with constant pigment concentration and variable copigment concentrations, obtaining molar ratios copigment to pigment ranging from 0 to 100. Stability in aqueous solution was studied for 6 weeks at 32°C, aliquots were taken weekly and its changes were monitored using HPLC-DAD-MS.

For the determination of molar absorption coefficients (ϵ_{\max}), solutions of PA1 and PA2 in concentrations ranging from 2.4×10^{-6} to 1.6×10^{-4} M for PA1 and 3.0×10^{-6} to 1.0×10^{-4} M for PA2 were prepared at pH 0.8 and their absorbance was determinate at λ_{\max} : 507 nm for PA1 and 508 nm for PA2.

CIELAB parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}) were determinate from recorded spectra using by using the original software CromaLab, following the recommendations of the Commission International de L'Eclairage [134].

Semiempirical quantum mechanics calculations were performed with the Hyperchem software (Autodesk, Sausalito, USA) using the PM3 program. The Scientist software (MicroMath, Salt Lake City, USA) was used for all curve-fitting procedures.

2. Results and discussion.

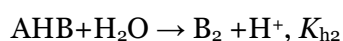
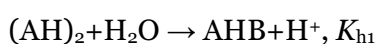
The ϵ_{\max} values at pH 0.8 were 4496 (± 48) $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda_{\max}=507$ nm) and 3058 (± 46) $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda_{\max}=508$ nm) for PA1 and PA2, respectively. Those values were lower than the determined for malvidin-3-glucoside or other anthocyanins [28], which could explain the difficulties to detect those derived pigments in wine. The ϵ_{\max} value for PA2 was reported in this publication for the first time.

The behavior of these pigments versus pH variations was studied in the pH range between 2 and 4.5; showing great differences among the two pigments. The observed

pattern in the PA1 solutions suggested a pure hydration reaction with no proton transfer taking place while the existence of two absorption bands for PA2 spectra is consistent with the existence of a simple acid-base equilibrium between the pyranoflavylium ion (AH) and the quinonoid bases (A) without significant hydration. Chromatic measurements revealed that the fading of the PA1 solution is much less noticeable than in the case of malvidin-3-glucoside, and an increase of 10 CIELab units in the hue angle toward more orange hues suggests the appearance of yellow-orange forms, which could be chalcones in low concentration. By contrast, the increase of pH in the PA2 solution provokes a decrease in lightness and therefore a darkening of the pigment solution, accompanied by a spectacular decrease of the hue angle (~70 CIELab units), indicating the possible presence of blue quinonoid forms.

The effect of SO₂ was also evaluated, and only a slight hypochromic effect was noticed. This confirmed the high resistance to bleaching of these pigments due to the presence of C-4 substituents in the pyranoflavylium ion.

The observed behavior for PA1 solutions vs. pH suggested the existence of two successive hydration steps. Similar behavior had been previously observed for wine pigments in which M3G is linked to a catechin moiety via an ethyl bridge derived from ethanal [63,223], and was successfully applied to PA1



Where (AH)₂, colored homodimer (two pyrylium nuclei); AHB, heterodimer (1 pyrylium nucleus + 1 hemiketal nucleus $r = \epsilon_{AHB} / \epsilon_{AH_2} < 1$); and B₂, colorless homodimer (2 hemiketal nuclei). The thermodynamic constants for this process were also calculated taking values

Summary

$pK_{h1}=2.84 (\pm 0.11)$, $pK_{h2}=5.19 (\pm 0.05)$, and $r=0.80 (\pm 0.01)$; r value revealed that AHB heterodimer retains 80% of the colored homodimer $(AH)_2$.

Regarding PA2, the pH dependence of the absorbance values at 505 and 590 nm is consistent with the existence of a simple acid-base equilibrium between the pyranoflavylum ion (AH) and the quinonoid bases (A) without significant hydration. The pK_a values of PA2 deduced from analysis at 505 and 590 nm were coherent and, respectively, equal to $2.86 (\pm 0.09)$ and $2.89 (\pm 0.12)$.

It is noteworthy that the presence of the additional methyl group in the PA2 structure exerts a decisive influence on the behavior of the pyranoanthocyanin in aqueous solution.

The stability storage in aqueous solution was studied for 6 weeks. After this period, 63% of PA1 and 72% of PA2 were recovered, this indicated a higher stability than malvidin-3-glucoside, which in the same experimental conditions only 40% of the native anthocyanin was recovered.

The copigmentation phenomena using (+)-catechin as copigment revealed different behaviors for the two studied pigments. For pigment PA1 only a weak hyperchromic effect and bathochromic shift were observed, the calculated copigmentation constant ($K=17.1 (\pm 0.7) M^{-1}$ ($R = 0.99$)) weaker than that estimated for malvidin-3-glucoside ($K=89M^{-1}$) in the same conditions [224], probably due to a competition with non-covalent dimerization of the pigment PA1. PA2 binding to catechin promoted a spectacular increase in band I and a weak decrease in band II. This strong hyperchromic effect can be quantitatively interpreted by assuming a selective AH-catechin binding (negligible binding between A and catechin) resulting in a copigmentation complex with a much higher molar absorption coefficient than free AH. The calculated copigmentation constant took a value of 228, which is consistent with the interpretation that copigmentation should be stronger for pyranoanthocyanins than for anthocyanins, due to the wider planar polarizable chromophore they present. The observed color change in the

copigmented solutions outlines the potential of the pyranoanthocyanins as natural colorants, moreover, it suggest that they could contribute to red wine color in a discriminated way as a function of their substituents and in a higher way than the expected due to the relative low concentrations that are found for this kind of pigments in wines.

CHAPTER 5: STUDY OF ASTRINGENCY PERCEPTION CAUSED BY FLAVANOLS IN MODEL SOLUTION.

The main objective of this chapter was to characterize the sensory profile of isolated catechins and oligomeric proanthocyanidins and to establish the relationship between the proanthocyanidin structure and the organoleptic properties

The results obtained are being drafted for its publication.

1. Materials and Methods

Proanthocyanidins dimers and trimers were obtained from barley and submitted to semi-preparative HPLC-DAD isolation.

Isolated compounds were characterized using acid catalyzed cleavage in the presence of phloroglucinol, applying the optimized methodology described in chapter 3 [225].

The trained sensory panel was composed by ten wine-taster experts, who evaluated several sensory attributes (i.e. intensity of astringency, bitterness, drying, roughness, unripe (greenness), smoothness, velvety, viscosity and persistence). The phenolic compounds were dissolved separately in mineral water at pH 3.6 at concentration 1.5 g L^{-1} . Tasters placed 5 mL of the solution in the mouth, swilled it around for 15 seconds, expectorated and then rated the attributes in the Labelled Magnitude Scale (LMS) [226]. The attribute persistence was rated 2 minutes after the sample was expectorated.

Molecular dynamics simulations were built using a peptide model IB₇₁₄ (peptide of 14 aminoacid residues, which contains a characteristic sequence of proline rich proteins) and either catechin or gallocatechin molecules. The simulations were performed for 1 peptide fragment and 8 catechin or 8 gallocatechin molecules in each case in order to reproduce the experimental conditions used in the sensory analysis (flavan-3-ol concentration = 1.5 g L^{-1}). All complex geometries were minimized in two stages. Subsequently, an MD simulation of 100 ps at constant volume and temperature, and

considering periodic boundaries conditions was performed. This was followed by 40 ns of MD simulation with the NPT ensemble, in which Langevin dynamics was used (collision frequency of 1.0 ps⁻¹) to control the temperature at 303.15 K [227]. All simulations were carried out using the AMBER 12.0 simulations package [228]. Bond lengths involving hydrogen atoms were constrained using the SHAKE algorithm, and the equations of motion were integrated with a 2 fs time step using the Verlet leapfrog algorithm [229]. The Particle-Mesh Ewald (PME) method [230] was used to treat long-range interactions, and the nonbonded interactions were truncated with a 10 Å cutoff. The MD trajectories were saved every 2 ps and were analyzed with the PTRAJ module of AMBER 12.0 [229].

The IBM SPSS 21 for Windows software package (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for data processing.

2. Results and Discussion

Comparison between three-hydroxylated B-ring and dihydroxylated B-ring flavanols shows that tasters considered galocatechin less astringent, bitter, dry, rough unripe and persistent than catechin. On the contrary, galocatechin presented higher smoothness, velvety and viscosity. Comparing proanthocyanidins, tasters stated that prodelpidin trimers (**PDT**) were less astringent, bitter, dry, rough, unripe and persistent than procyanidin trimers (**PCT**). However they presented higher smoothness, velvety and viscosity. Similarly, prodelpidin dimers (**PDD**) were less astringent, bitter, dry, rough, unripe and persistent than procyanidin dimers (**PCD**), although they presented higher velvety and viscosity. Similar behavior can be obtained from the comparison between prodelpidins (dimers and trimers) and the monomer catechin. These observations suggest that the number of hydroxyl substituents (two in procyanidins, and three in prodelpidins) in the B ring of the proanthocyanidins structure determine the quality of the astringency perception. Positive sensory attributes (smoothness, velvety, viscosity) are more intense in tri-hydroxylated than in dihydroxylated

proanthocyanidins, which are more related to negative attributes (i.e. bitter, rough, unripe). Regarding the number of units of the flavanol, from monomers to trimers, it can be observed that higher number of flavanol units in the molecule is related with less intensity of negative sensory attributes and more intensity of positive attributes.

Principal component analysis (PCA) was used as unsupervised pattern recognition method. The first principal component (PC1) described 91.4% of the variability in the data and the second component (PC2) described 4.1%. In the score plot, the procyanidins presented negative scores in PC1, showing catechin the most negative value. On the contrary, prodelphinidins presented positive values in PC1, showing **PDT** the most positive one. **PCT** and **PCD** presented similar scores in this PC as also occurred for galocatechin and **PDD**. Variables considered as positive oral attributes (velvety, smoothness and viscosity) presented positive scores, while variables considered as negative sensations presented negative scores. This pattern suggests that procyanidins are more related with unpleasant oral sensations (intensity of astringency, bitterness, unripe, harsh and drying) while prodelphinidins are linked to good oral sensations. Persistence seems to be more related with the unpleasant sensations (procyanidins) than with the agreeable ones (prodelphinidins).

To better characterize the conformational behaviour of catechin and galocatechin molecules with the peptide fragment IB7₁₄ in aqueous solution, computational studies were additionally carried out. In regards to MD simulation IB7₁₄:(catechin)₈, initially, there was a binding of 1 catechin to the peptide after 3.8 ns. An additional binding of another catechin molecule occurred at 6.6 ns and this structural arrangement (with 25% of catechin molecules bound to the IB7₁₄ peptide) was maintained throughout the remaining 33.4 ns of simulation, revealing its higher stability. The interaction of catechin molecules to IB7₁₄ occurs by the establishment of many hydrophobic and hydrophilic interactions. The peptide tends to adopt a semi-coiled structure, in which two catechin molecules are strongly encapsulated.

The simulation of IB₇₁₄:(gallo catechin)₈ system revealed that the binding of these molecules to IB₇₁₄, was weaker than the one observed for the IB₇₁₄:(catechin)₈ system. The maximum binding was achieved after 9.3 ns of simulation and it was only of 1 molecule which ceased to interact with the peptide after few picoseconds and only at 20 ns of simulation another molecule of gallo catechin was bound to IB₇₁₄. The later structural arrangement (12.5% of binding) was maintained throughout the remaining simulation. The interaction with the peptide fragment involves both hydrophilic and hydrophobic forces as in the case of the system with catechin. It was detected the occurrence of assemblies of two gallo catechin molecules that are perfectly aligned between themselves. The formation of these clusters could be related to the lower interaction with the peptide fragment observed for gallo catechin when compared to catechin.

The decrease observed in the Solvent-Accessible Surface Area (SASA) value when binding catechin suggests a larger binding extension for this compound compared with gallo catechin. MD simulations support the results obtained from the tasting panel which revealed catechin as more astringent and persistent than gallo catechin. The differences observed in the simulations between the two monomers nicely outline the interest of the study of the interactions of prodelphinidins and salivary proteins.

CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS



Las conclusiones obtenidas en los estudios que componen esta tesis doctoral son las siguientes:

Bloque I:

1. El grado de madurez influye sobre la composición de los hollejos de las uvas, tanto en los compuestos fenólicos como en la composición de la pared celular. Los contenidos de antocianos son más altos en precosecha y disminuyen al avanzar la maduración, mientras que los contenidos máximos de proantocianidinas y flavonoles se presentan en el punto de cosecha. En cuanto a la pared celular, la cantidad total disminuye a lo largo del proceso de maduración, y su composición sufre cambios leves pero continuos durante el mismo.
2. La extractabilidad de antocianos y proantocianidinas se ve fuertemente influida por el grado de madurez, de forma que el mayor grado de madurez facilita la extracción de estos compuestos. Por el contrario, el contenido en sólidos solubles no presenta una influencia importante. La cantidad total de material insoluble influye negativamente en la extracción de ambas familias de compuestos, si bien algunos componentes de la pared celular influyen positivamente en la extracción de los mismos. Así, mayores cantidades de celulosa, ramnogalacturonanos de tipo II y polifenoles se relacionan con una mejor extracción de los antocianos. La celulosa también influye positivamente en la extracción de las proantocianidinas. El resto de componentes de la pared celular muestran ligeras oposiciones a la extracción de ambos tipos de compuestos.
3. La extractabilidad de los flavonoles no se ve afectada por el grado de madurez, ni por el contenido en sólidos totales ni por la cantidad de pared celular. Algunos componentes de la pared celular sí influyen en la extracción de los flavonoles, la presencia de arabinogalactanos y mananos provoca una menor extracción de flavonoles mientras que una mayor presencia de proteínas aumentaría la extracción de estos compuestos.

4. Se propone que las diferencias de extractabilidad observadas para estas familias de compuestos, se deben a sus diferentes localizaciones tisulares e intracelulares.

Bloque II:

5. La concentración de proantocianidinas presentes en los vinos y su grado medio de polimerización no muestran relación con la astringencia percibida en los mismos. Sin embargo, la distribución de las subunidades sí influye de forma importante en la percepción de esta sensación. La presencia de galocatequina en posición terminal o de epicatequina en posiciones de extensión se relaciona con un incremento de la astringencia, mientras que la presencia de epigalocatequina tanto en posición terminal como de extensión disminuye la percepción de astringencia.
6. Se ha comprobado la capacidad para modular la astringencia de los polisacáridos en vinos por primera vez y se concluye que los ramnogalacturonanos de tipo II y las manoproteínas son los compuestos que más disminuyen la percepción de la astringencia.
7. Los residuos glicosídicos presentes en la fracción oligosacáridica no muestran relación clara con la percepción de astringencia. Dado que todos los residuos glicosídicos determinados en esta fracción han sido también determinados en la fracción polisacáridica, se propone que el tamaño molecular y la disposición espacial que adoptan los residuos glicosídicos en las fracciones oligosacáridica y polisacáridica determinan la capacidad de los carbohidratos para modular la astringencia.

Bloque III:

8. Los pigmentos malvidín 3-glucósido-4-vinilcatecol y malvidín 3-glucósido-4-vinilguayacol, presentan características fisicoquímicas y colorimétricas particulares y distintas a las del antociano de partida (3-monoglucósido de malvidina), siendo

más resistentes a la degradación y a la decoloración. Asimismo, el catión flavilio del pigmento malvidín 3-glucósido-4-vinilguayacol muestra un aumento extraordinario de la absorción en presencia de catequina como copigmento, que no tiene equivalencia en el caso de los antocianos originales, lo que subraya el gran potencial colorante que podrían tener estos compuestos.

9. Los pigmentos malvidín 3-glucósido-4-vinilcatecol y malvidín 3-glucósido-4-vinilguayacol muestran características muy diferentes entre sí, lo que indica que los piranoantocianos podrían contribuir al color de los vinos tintos de forma discriminada en función de los sustituyentes presentes en el anillo aromático adicional. El pigmento malvidín 3-glucósido-4-vinilcatecol se comporta como un dímero no covalente de dos iones piranoflavilio, que sufren procesos de hidratación secuenciales, sin que exista equilibrio de transferencia de protón. Por el contrario, en el pigmento malvidín 3-glucósido-4-vinilguayacol la modificación del pH conduce a un equilibrio ácido-base simple entre el catión flavilio y las bases quinoidales, sin proceso de hidratación significativo.
10. La caracterización sensorial de procianidinas y prodelfinidinas confirma que presentan un perfil sensorial diferenciado. Las procianidinas se asocian principalmente a sensaciones desagradables, como elevada intensidad de astringencia, amargor, sequedad, rugosidad y verdor; mientras que las prodelfinidinas se asocian a cualidades de astringencia positivas, como suavidad, aterciopelado o viscosidad. La persistencia está más relacionada con las procianidinas que con las prodelfinidinas, lo que además indica que los parámetros considerados negativos son más persistentes que los positivos.
11. Los estudios de simulación de dinámica molecular permiten explicar los resultados obtenidos en el análisis sensorial de flavanoles. La catequina presenta mayor afinidad por el péptido de la saliva humana rico en prolina IB₇₁₄ que la galocatequina, ya que la unión se produce más rápido y durante más tiempo.

Además, la estequiometría para el complejo péptido-catequina era 1:2, mientras que para el complejo péptido-galocatequina fue 1:1. Estas diferencias de comportamiento indican que el número de sustituyentes hidroxilo en el anillo B del núcleo flavánico es determinante para la interacción con las proteínas salivares y el desarrollo de la sensación de astringencia.

The conclusions obtained through the studies carried out in this PhD thesis are the following:

Section I:

1. The degree of maturity has high impact on grape skin composition, both on phenolic and on cell wall composition. The highest anthocyanin contents are found in pre-harvest samples and they decrease as ripening progresses, while the highest proanthocyanidin and flavonol contents are determined in harvest samples. Regarding cell wall, the amount of insoluble material decreases as ripeness progresses, and its composition undergoes slight but continuous changes during ripening.
2. Anthocyanin and proanthocyanidin extractability is strongly influenced by ripeness degree. High ripeness degree status facilitates the extraction of these compounds. However, soluble solid contents do not display an important effect. Total insoluble material has a negative influence on the extraction of both families of compounds. Some cell wall components are positively related to the extraction of these phenolic compounds. High amounts of cellulose, rhamnogalacturonans-II and polyphenols are related to high anthocyanin extraction levels. Cellulose content has also a positive relationship with proanthocyanidin extraction. The other cell wall components show slight oppositions to the extraction of both kinds of compounds.
3. Flavonol extractability is not influenced by ripening degree, nor soluble solid contents nor total cell wall amount. Some cell wall components are related to flavonol extractability, the presence of arabinogalactans and manans causes a lower extraction of flavonols while the high protein contents would increase the extractability of these compounds.

4. The different extractability observed for these families of compounds could be due to their different location both in the tissue and in the cell.

Section II:

5. Proanthocyanidin concentration in the wines and its average polymerization degree do not show relationship with the perceived astringency. Nevertheless, the subunit distribution of proanthocyanidins has an important influence on the astringency perception. The presence of galocatechin in the terminal position or epicatechin in extension positions is related to an increase in astringency perception, while the presence of galocatechin in both terminal or extension positions diminish astringency perception.
6. The smoothing ability of astringency perception of polysaccharides is confirmed in wines for the first time. This effect is especially important for rhamnogalacturonans-II and mannoproteins.
7. The glycosidic residues from the oligosaccharide fraction do not show a clear relationship with astringency perception. Bearing in mind that all the glycosidic residues determined in the oligosaccharide fraction are also found in the polysaccharide fraction, it can be concluded that both molecular size and tridimensional structure, determine the ability of carbohydrates to smooth astringency perception.

Section III:

8. The pigments malvidin-3-glucoside-4-vinylcatechol and malvidin-3-glucoside-4-vinylguaiacol display particular physicochemical and colorimetric characteristics, which are different from the native anthocyanin (malvidin-3-glucoside). These compounds show higher resistance to degradation and to discoloration by bisulfite and by the increase of pH. Additionally, the absorption of flavilium cation of the malvidin-3-glucoside-4-vinylguaiacol pigment shows an extraordinary

increase in the presence of catechin as a copigment. This increase has no equivalence for native anthocyanins and emphasizes the potential of pyranoanthocyanins in the expression of natural colors.

9. The pigments malvidin-3-glucoside-4-vinylcatechol and malvidin-3-glucoside-4-vinylguaiacol show very different characteristics between them, which may indicate that pyranoanthocyanins could contribute to red wine color in a discriminated way depending on the substituents present in their additional aromatic ring. The pigment malvidin-3-glucoside-4-vinylcatechol can be considered as a non-covalent dimer of two pyranoflavylum ions, which undergo two successive hydration steps, without proton transfer. In contrast, pH changes on the solutions of the pigment malvidin-3-glucoside-4-vinylguaiacol drives to a simple acid-base equilibrium, between flavylum cation and quinonoid forms, without significant hydration.
10. Sensory characterization of procyanidins and prodelfinidins confirms that they have a differentiated sensory profile. Procyanidins are mainly related to unpleasant sensations as high astringency intensity, bitterness, dryness, roughness and unripe, while prodelfinidins are related to positive astringency qualities, as smoothness, velvety or viscosity. Persistence is more related to procyanidins than to prodelfinidins, which also could indicate that the unpleasant sensations are more persistent than the positive qualities.
11. Molecular dynamics simulations allow to explain the results obtained from the sensory analysis of flavanols. Catechin displays higher affinity for the human salivary peptide rich in proline IB₇₁₄ than gallocatechin, because the union takes place faster and remains longer. Moreover, the stoichiometry for the complex peptide:catechin was 1:2, while for the complex peptide:gallocatechin was 1:1. These behavior differences indicate that the number of hydroxyl substituents present in B-ring of the flavanic nucleus is decisive for the interaction with salivary proteins and the development of astringency perception.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Jaganath, I.B.; Crozier, A. Dietary flavonoids and phenolic compounds. In *Plant phenolics and human health*, Fraga, C.G., Ed. John Wiley & Sons, Inc.: 2009.
2. Crozier, A.; Clifford, M.N.; Ashihara, H. *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Pub.: Oxford ; Ames, Iowa, 2006.
3. Cheynier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Manchado, P. Los compuestos fenólicos. In *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, Flanzy, C., Ed. AMV Ediciones, Mundi-Prensa: Madrid (España), 2003; pp 114-136.
4. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of enology, volume 2: The chemistry of wine stabilization and treatments*. John Wiley & Sons, Ltd: 2000; Vol. 2.
5. Frankel, E.N.; Waterhouse, A.L.; Teissedre, P.L. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*, 890-894.
6. Gambelli, L.; Santaroni, G.P. Polyphenols content in some italian red wines of different geographical origins. *Journal of Food Composition and Analysis* **2004**, *17*, 613-618.
7. Rentzsch, M.; Wilkens, A.; Winterhalter, P. Non-flavonoid phenolic compounds. In *Wine chemistry and biochemistry*, Moreno-Arribas, M.V.; Polo, M.C., Eds. Springer Science Business Media: 2009; pp 509-527.
8. Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* **2001**, *52*, 67-87.
9. Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J.N. The influence of *Brettanomyces/Dekhera* sp yeasts and lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1995**, *46*, 463-468.
10. Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J.N.; Pons, M. The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1992**, *60*, 165-178.
11. Chatonnet, P.; Dubourdieu, D.; Boidron, J.N.; Lavigne, V. Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1993**, *62*, 191-202.

12. Harris, V.; Ford, C.M.; Jiranek, V.; Grbin, P.R. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2009**, *81*, 1117-1127.
13. Cantos, E.; García-Viguera, C.; de Pascual-Teresa, S.; Tomás-Barberan, F.A. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 4606-4612.
14. Cantos, E.; Espín, J.C.; Fernández, M.J.; Oliva, J.; Tomás-Barberan, F.A. Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 1208-1214.
15. Crupi, P.; Pichierri, A.; Basile, T.; Antonacci, D. Postharvest stilbenes and flavonoids enrichment of table grape cv Redglobe (*Vitis vinifera* L.) as affected by interactive UV-C exposure and storage conditions. *Food Chemistry* **2013**, *141*, 802-808.
16. Smoliga, J.M.; Baur, J.A.; Hausenblas, H.A. Resveratrol and health: a comprehensive review of human clinical trials. *Molecular Nutrition & Food Research* **2011**, *55*, 1129-1141.
17. Baderschneider, B.; Winterhalter, P. Isolation and characterization of novel stilbene derivatives from Riesling wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 2681-2686.
18. Landrault, N.; Larronde, F.; Delaunay, J.C.; Castagnino, C.; Vercauteren, J.; Merillon, J.M.; Gasc, F.; Cros, G.; Teissedre, P.L. Levels of stilbene oligomers and astilbin in french varietal wines and in grapes during noble rot development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 2046-2052.
19. Naugler, C.; McCallum, J.L.; Klassen, G.; Strommer, J. Concentrations of trans-resveratrol and related stilbenes in Nova Scotia wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2007**, *58*, 117-119.
20. Vitrac, X.; Bornet, A.; Vanderlinde, R.; Valls, J.; Richard, T.; Delaunay, J.C.; Merillon, J.M.; Teissedre, P.L. Determination of stilbenes (*delta*-viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, *epsilon*-viniferin) in brazilian wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 5664-5669.
21. Castillo-Muñoz, N.; Fernández-González, M.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. Red-color related phenolic composition of Garnacha

- tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 7883-7891.
22. Busse-Valverde, N.; Gómez-Plaza, E.; López-Roca, J.M.; Gil-Muñoz, R.; Bautista-Ortín, A.B. The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 5450-5455.
 23. Strack, D.; Wray, V. The anthocyanins. In *The flavonoids: Advances in research since 1986*; Harborne, J.B., Ed. Ed.; Chapman and Hall: London, U.K., 1992.
 24. Mazza, G. Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1995**, *35*, 341-371.
 25. Baldi, A.; Romani, A.; Mulinacci, N.; Vincieri, F.F.; Casetta, B. HPLC/MS application to anthocyanins of *Vitis vinifera* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*, 2104– 2109.
 26. Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, 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. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 238-254.
 27. 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* **2012**, *17*, 1483-1519.
 28. Heredia, F.J.; Francia-Aricha, E.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Vicario, I.M.; Santos-Buelga, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes.I. pH effect. *Food Chemistry* **1998**, *63*, 491-498.
 29. Giusti, M.M.; Wrolstad, R.E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal* **2003**, *14*, 217-225.
 30. Fossen, T.; Cabrita, L.; Andersen, O.M. Colour and stability of pure anthocyanins influenced by pH including the alkaline region. *Food Chemistry* **1998**, *63*, 435-440.
 31. García-Viguera, C.; Bridle, P. Influence of structure on colour stability of anthocyanins and flavylum salts with ascorbic acid. *Food Chemistry* **1999**, *64*, 21-26.
 32. Asselin, C.; Delteil, D. Vinificaciones: Principales operaciones unitarias comunes. In *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, Flanzky, C., Ed. AMV Ediciones. Mundiprensa: Madrid (España), 2003; pp 418-442.

33. Berké, B.; Chèze, C.; Vercauteren, J.; Deffieux, G. Bisulfite addition to anthocyanins: Revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Letters* **1998**, *39*, 5771-5774.
34. Brouillard, R.; Dubois, J.E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 1359-1364.
35. Brouillard, R.; Delaporte, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society* **1977**, *99*, 8461-8468.
36. Cabrita, L.; Fossen, T.; Andersen, Ø.M. Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry* **2000**, *68*, 101-107.
37. Morais, H.; Ramos, C.; Forgács, E.; Cserhádi, T.; Oliviera, J. Influence of storage conditions on the stability of monomeric anthocyanins studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2002**, *770*, 297-301.
38. Bordignon-Luiz, M.T.; Gauche, C.; Gris, E.F.; Falcão, L.D. Colour stability of anthocyanins from Isabel grapes (*Vitis labrusca* L.) in model systems. *LWT - Food Science and Technology* **2007**, *40*, 594-599.
39. Janna, O.A.; Khairul, A.K.; Maziah, M. Anthocyanin stability studies in *Tibouchina semidecandra* L. *Food Chemistry* **2007**, *101*, 1640-1646.
40. Morais, H.; Ramos, C.; Forgacs, E.; Cserhati, T.; Matos, N.; Almeida, V.; Oliveira, J. Stability of anthocyanins extracted from grape skins. *Chromatographia* **2002**, *56*, S173-S175.
41. Falcao, L.D.; Gauche, C.; Barros, D.M.; Prudencio, E.S.; Gris, E.F.; Sant'Anna, E.S.; Ogliari, P.J.; Luiz, M.T.B. Stability of anthocyanins from grape (*Vitis vinifera* L.) skins with tannic acid in a model system. *Italian Journal of Food Science* **2004**, *16*, 323-332.
42. Asen, S.; Stewart, R.N.; Norris, K.H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1139-1144.
43. Castañeda-Ovando, A.; Pacheco-Hernández, M.d.L.; Páez-Hernández, M.E.; Rodríguez, J.A.; Galán-Vidal, C.A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry* **2009**, *113*, 859-871.

44. Malien-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M.J. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *49*, 170-176.
45. Figueiredo, P.; George, F.; Tatsuzawa, F.; Toki, K.; Saito, N.; Brouillard, R. New features of intramolecular copigmentation by acylated anthocyanins. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 125-132.
46. He, J.; Carvalho, A.R.F.; Mateus, N.; De Freitas, V. Spectral features and stability of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments isolated from red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 9249-9258.
47. Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C. Anthocyanin copigmentation - evaluation, mechanisms and implications for the colour of red wines. *Current Organic Chemistry* **2012**, *16*, 715-723.
48. Gómez-Míguez, M.; González-Manzano, S.; Escribano-Bailón, M.T.; Heredia, F.J.; Santos-Buelga, C. Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 5422-5429.
49. Brouillard, R.; Dangles, O. Anthocyanin molecular-interactions - the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chemistry* **1994**, *51*, 365-371.
50. Moreno-Arribas, M.V.; Polo, C. *Wine chemistry and biochemistry*. Springer New York: New York, NY, 2008.
51. de Freitas, V.; Mateus, N. Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours (review). *Environmental Chemistry Letters* **2006**, *4*, 175-183.
52. Salas, E.; Guernevé, C.L.; Fulcrand, H.; Poncet-Legrand, C.; Cheynier, V. Structure determination and colour properties of a new directly linked flavanol-anthocyanin dimer. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 8725-8729.
53. Salas, E.; Atanasova, V.; Poncet-Legrand, C.; Meudec, E.; Mazauric, J.P.; Cheynier, V. Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 325-332.
54. Vivar-Quintana, A.M.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *458*, 147-155.

55. Salas, E.; Fulcrand, H.; Meudec, E.; Cheynier, V. Reactions of anthocyanins and tannins in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 7951-7961.
56. Remy, S.; Fulcrand, H.; Labarbe, B.; Cheynier, V.; Moutounet, M. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin–tannin reactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, *80*, 745-751.
57. Hayasaka, Y.; Kennedy, J.A. Mass spectrometric evidence for the formation of pigmented polymers in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2003**, *9*, 210-220.
58. Vidal, S.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Skouroumounis, G.; Hayasaka, Y. Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 7144-7151.
59. Salas, E.; Dueñas, M.; Schwarz, M.; Winterhalter, P.; Cheynier, V.; Fulcrand, H. Characterization of pigments from different high speed countercurrent chromatography wine fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 4536-4546.
60. Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Identification of dimeric anthocyanins and new oligomeric pigments in red wine by means of HPLC-DAD-ESI/MSN. *Journal of Mass Spectrometry* **2007**, *42*, 735-748.
61. Millan, C.; Ortega, J.M. Production of ethanol, acetaldehyde, and acetic-acid in wine by various yeast races: role of alcohol and aldehyde dehydrogenase. *American Journal of Enology and Viticulture* **1988**, *39*, 107-112.
62. de Freitas, V.A.P.; Mateus, N. Updating wine pigments. In *Recent advances in polyphenol research*, Santos-Buelga, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Lattanzio, V., Eds. Wiley-Blackwell: 2010; pp 59-80.
63. Escribano-Bailón, T.; Dangles, O.; Brouillard, R. Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochemistry* **1996**, *41*, 1583-1592.
64. Pissarra, J.; Lourenço, S.; González-Paramás, A.M.; Mateus, N.; Santos-Buelga, C.; De Freitas, V. Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 215-221.
65. Pissarra, J.; Lourenço, S.; González-Paramás, A.M.; Mateus, N.; Santos Buelga, C.; Silva, A.M.S.; de Freitas, V. Structural characterization of new malvidin 3-

- glucoside-catechin aryl/alkyl-linked pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 5519-5526.
66. Pissarra, J.; Lourenço, S.; González-Paramás, A.M.; Mateus, N.; Santos Buelga, C.; Silva, A.M.S.; De Freitas, V. Isolation and structural characterization of new anthocyanin-alkyl-catechin pigments. *Food Chemistry* **2005**, *90*, 81-87.
67. de Freitas, V.; Sousa, C.; Silva, A.M.S.; Santos-Buelga, C.; Mateus, N. Synthesis of a new catechin-pyrylium derived pigment. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 9349-9352.
68. Sousa, C.; Mateus, N.; Perez-Alonso, J.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V. Preliminary study of oaklins, a new class of brick-red catechin-pyrylium pigments resulting from the reaction between catechin and wood aldehydes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 9249-9256.
69. Cameira-dos-Santos, P. J.; Brillouet, J.M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Detection and partial characterisation of new anthocyanin-derived pigments in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1996**, *70*, 204-208.
70. Fulcrand, H.; dos Santos, P.J.C.; Sarni Manchado, P.; Cheynier, V.; Favre Bonvin, J. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* **1996**, 735-739.
71. Schwarz, M.; Wabnitz, T.C.; Winterhalter, P. Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 3682-3687.
72. Hayasaka, Y.; Asenstorfer, R.E. Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 756-761.
73. Mateus, N.; Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V. Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in Port wines. *Food Chemistry* **2002**, *76*, 335-342.
74. Schwarz, M.; Quast, P.; von Baer, D.; Winterhalter, P. Vitisin a content in Chilean wines from *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon and contribution to the color of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 6261-6267.
75. Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Separation of pyranoanthocyanins from red wine by column chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 305-318.

76. Francia Aricha, E.M.; Guerra, M.T.; Rivas Gonzalo, J.C.; Santos Buelga, C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 2262-2266.
77. Cruz, L.; Teixeira, N.; Silva, A.M.S.; Mateus, N.; Borges, J.; de Freitas, V. Role of vinylcatechin in the formation of pyranomalvidin-3-glucoside-(+)-catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 10980-10987.
78. Asenstorfer, R.E.; Hayasaka, Y.; Jones, G.P. Isolation and structures of oligomeric wine pigments by bisulfite-mediated ion-exchange chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 5957-5963.
79. Bakker, J.; Bridle, P.; Honda, T.; Kuwano, H.; Saito, N.; Terahara, N.; Timberlake, C.F. Identification of an anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1375-1382.
80. Bakker, J.; Timberlake, C.F. Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 35-43.
81. Fulcrand, H.; Benabdeljalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry* **1998**, *47*, 1401-1407.
82. He, J.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.M.S.; Mateus, N.; de Freitas, V. Isolation and structural characterization of new anthocyanin-derived yellow pigments in aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 9598-9603.
83. Mateus, N.; Carvalho, E.; Carvalho, A.R.F.; Melo, A.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.M.S.; de Freitas, V. Isolation and structural characterization of new acylated anthocyanin-vinyl-flavanol pigments occurring in aging red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 277-282.
84. Oliveira, J.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.M.S.; de Freitas, V.; Mateus, N. Chromatic and structural features of blue anthocyanin-derived pigments present in Port wine. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 2-9.
85. Oliveira, J.; de Freitas, V.; Silva, A.M.S.; Mateus, N. Reaction between hydroxycinnamic acids and anthocyanin-pyruvic acid adducts yielding new portisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 6349-6356.
86. García-Estévez, I.; Jacquet, R.; Alcalde-Eon, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T.; Quideau, S. Hemisynthesis and structural and chromatic

- characterization of delphinidin 3-O-glucoside-vescalagin hybrid pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 11560-11568.
87. García-Estévez, I.; Gavara, R.; Alcalde-Eon, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Quideau, S.; Escribano-Bailón, M.T.; Pina, F. Thermodynamic and kinetic properties of a new myrtilin-vescalagin hybrid pigment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 11569-11578.
88. Chassaing, S.; Lefeuvre, D.; Jacquet, R.; Jourdes, M.; Ducasse, L.; Galland, S.; Grelard, A.; Saucier, C.; Teissedre, P.-L.; Dangles, O., *et al.* 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* **2010**, 55-63.
89. Souquet, J.M.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 509-512.
90. Hanlin, R.L.; Kelm, M.A.; Wilkinson, K.L.; Downey, M.O. Detailed characterization of proanthocyanidins in skin, seeds, and wine of Shiraz and Cabernet Sauvignon wine grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 13265-13276.
91. Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo-Da-Silva, J.M. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 6475-6481.
92. Karonen, M.; Loponen, J.; Ossipov, V.; Pihlaja, K. Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *522*, 105-112.
93. Wu, Q.L.; Wang, M.F.; Simon, J.E. Determination of proanthocyanidins in grape products by liquid chromatography/mass spectrometric detection under low collision energy. *Analytical Chemistry* **2003**, *75*, 2440-2444.
94. Matthews, S.; Mila, I.; Scalbert, A.; Pollet, B.; Lapierre, C.; du Penhoat, C.; Rolando, C.; Donnelly, D.M.X. Method for estimation of proanthocyanidins based on their acid depolymerization in the presence of nucleophiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, *45*, 1195-1201.

95. Kennedy, J.A.; Jones, G.P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 1740-1746.
96. Santos Buelga, C.; de Freitas, V. Influence of phenolics on wine organoleptic properties. In *Wine chemistry and biochemistry*, Moreno-Arribas, M.V.; Polo, M.C., Eds. Springer Science Business Media: 2009; pp 529-570.
97. Pereira, G.E.; Gaudillere, J.P.; Pieri, P.; Hilbert, G.; Maucourt, M.; Deborde, C.; Moing, A.; Rolin, D. Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 6765-6775.
98. Crozier, A.; Yokota, T.; Jaganath, I.B.; Marks, S.C.; Saltmarsh, M.; Clifford, M.N. Secondary metabolites in fruits, vegetables, beverages and other plant-based dietary components. In *Plant secondary metabolites: Occurrence, structure and role in the human diet*, Crozier, A.; Clifford, M.N.; Ashihara, H., Eds. Blackwell Publishing Ltd: 2006; pp 208-302.
99. Mattivi, F.; Guzzon, R.; Vrhovsek, U.; Stefanini, M.; Velasco, R. Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 7692-7702.
100. Kolb, C.A.; Kopecky, J.; Riederer, M.; Pfundel, E.E. UV screening by phenolics in berries of grapevine (*Vitis vinifera*). *Functional Plant Biology* **2003**, *30*, 1177-1186.
101. Downey, M.O.; Harvey, J.S.; Robinson, S.P. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2004**, *10*, 55-73.
102. 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 in Food Science & Technology* **2006**, *17*, 579-590.
103. Campbell, N.; Reece, J. *Biology*. Pearson Educational as Benjamin Cummings: 2005.
104. 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. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2010**, *16*, 173-188.
105. Arnous, A.; Meyer, A.S. Quantitative prediction of cell wall polysaccharide composition in grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins from

- acid hydrolysis monosaccharide profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 3611-3619.
106. Carpita, N.C.; Gibeaut, D.M. Structural models of primary-cell walls in flowering plants - consistency of molecular-structure with the physical-properties of the walls during growth. *Plant Journal* **1993**, *3*, 1-30.
107. Buchanan, B. *Biochemistry and molecular biology of plants*. 2 ed.; John Wiley & Sons: 2002; p 1448.
108. Ordaz-Ortiz, J.J.; Marcus, S.E.; Knox, J.P. Cell wall microstructure analysis implicates hemicellulose polysaccharides in cell adhesion in tomato fruit pericarp parenchyma. *Molecular Plant* **2009**, *2*, 910-921.
109. Goulao, L.F.; Fernandes, J.C.; Lopes, P.; Amancio, S. Tackling the cell wall of the grape berry. In *The biochemistry of the grape berry*, Gerós, H.; Chaves, M.; Delrot, S., Eds. Bentham Science Publishers: 2012; pp 172-193.
110. Pérez, S.; Rodríguez-Carvajal, M.A.; Doco, T. A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie* **2003**, *85*, 109-121.
111. Vidal, S.; Williams, P.; Doco, T.; Moutounet, M.; Pellerin, P. The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers* **2003**, *54*, 439-447.
112. Pellerin, P.; Cabanis, J.C. Los glúcidos. In *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, Flanzy, C., Ed. AMV Ediciones. MundiPrensa: Madrid, España, 2003; pp 66-96.
113. Riou, V.; Vernhet, A.; Doco, T.; Moutounet, M. Aggregation of grape seed tannins in model wine - effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* **2002**, *16*, 17-23.
114. Dupin, I.V.S.; McKinnon, B.M.; Ryan, C.; Boulay, M.; Markides, A.J.; Jones, G.P.; Williams, P.J.; Waters, E.J. *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins that protect wine from protein haze: Their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 3098-3105.
115. Dufour, C.; Bayonove, C.L. Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 671-677.

116. Chalier, P.; Angot, B.; Delteil, D.; Doco, T.; Gunata, Z. Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chemistry* **2007**, *100*, 22-30.
117. Escot, S.; Feuillat, M.; Dulau, L.; Charpentier, C. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2001**, *7*, 153-159.
118. Ayestarán, B.; Guadalupe, Z.; León, D. Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 29-39.
119. Doco, T.; Williams, P.; Cheynier, V. Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 6643-6649.
120. Doco, T.; Quellec, N.; Moutounet, M.; Pellerin, P. Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1999**, *50*, 25-32.
121. Guadalupe, Z.; Ayestarán, B. Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempranillo red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 10720-10728.
122. Coenen, G.J.; Bakx, E.J.; Verhoef, R.P.; Schols, H.A.; Voragen, A.G.J. Identification of the connecting linkage between homo- or xylogalacturonan and rhamnogalacturonan type I. *Carbohydrate Polymers* **2007**, *70*, 224-235.
123. Pellerin, P.; Vidal, S.; Williams, P.; Brillouet, J.M. Characterization of 5 type-II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic-acid content. *Carbohydrate Research* **1995**, *277*, 135-143.
124. Vidal, S.; Williams, P.; O'Neill, M.A.; Pellerin, P. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: Tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* **2001**, *45*, 315-323.
125. Doco, T.; Brillouet, J.M. Isolation and characterization of a rhamnogalacturonan-II from red wine. *Carbohydrate Research* **1993**, *243*, 333-343.
126. Doco, T.; Brillouet, J.M.; Moutounet, M. Evolution of grape (Carignan noir cv) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration. *American Journal of Enology and Viticulture* **1996**, *47*, 108-110.
127. Bordiga, M.; Travaglia, F.; Meyrand, M.; German, J.B.; Lebrilla, C.B.; Coisson, J.D.; Arlorio, M.; Barile, D. Identification and characterization of complex

- bioactive oligosaccharides in white and red wine by a combination of mass spectrometry and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 3700-3707.
128. Domínguez-Vergara, A.M.; Vázquez-Moreno, L.; Ramos-Clamont Montfort, G. Role of prebiotic oligosaccharides in prevention of gastrointestinal infections: A review. *Archivos Latinoamericanos De Nutricion* **2009**, *59*, 358-368.
129. Ruhaak, L.R.; Lebrilla, C.B. Analysis and role of oligosaccharides in milk. *Bmb Reports* **2012**, *45*, 442-451.
130. Broekaert, W.F.; Courtin, C.M.; Verbeke, K.; Van de Wiele, T.; Verstraete, W.; Delcour, J.A. Prebiotic and other health-related effects of cereal-derived arabinoxylans, arabinoxylan-oligosaccharides, and xylooligosaccharides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2011**, *51*, 178-194.
131. Ducasse, M.-A.; Williams, P.; Canal-Llauberes, R.-M.; Mazerolles, G.; Cheynier, V.; Doco, T. Effect of macerating enzymes on the oligosaccharide profiles of Merlot red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 6558-6567.
132. Ducasse, M.A.; Williams, P.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Doco, T. Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS. *Carbohydrate Polymers* **2010**, *79*, 747-754.
133. Jackson, R.S. *Wine tasting: A professional handbook*. Elsevier Inc.: 2009.
134. CIE. *Colorimetry*. 2^o Edition ed.; CIE: Viena, Austria, 1986.
135. ISO/CIE, J. Colorimetry. In *CIE Standard Illuminants for Colorimetry*, Vol. ISO 11664-2:2007(E)/CIE S 014-2/E:2006.
136. ISO/CIE, J. Colorimetry. In *CIE Standard Colorimetric Observers*, Vol. ISO 11664-1:2007(E)/CIE S 014-1/E:2006.
137. ISO/CIE, J. Colorimetry. In *CIE 1976 L*a*b* Colour Space*, Vol. ISO 11664-4:2008(E)/CIE S 014-4/E:2007.
138. ISO/CIE, J. Colorimetry. In *CIE DE2000 Colour-Difference Formula*, Vol. CIE S 014-6/E:2013.
139. Martínez, J.A.; Melgosa, M.; Pérez, M.M.; Hita, E.; Negueruela, A.I. Note. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Science and Technology International* **2001**, *7*, 439-444.

140. Gawel, R. Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **1998**, *4*, 74–95.
141. Guinard, J.X.; Pangborn, R.M.; Lewis, M.J. The time-course of astringency in wine upon repeated ingestion. *American Journal of Enology and Viticulture* **1986**, *37*, 184-189.
142. de Freitas, V.; Mateus, N. Protein/polyphenol interactions: Past and present contributions. Mechanisms of astringency perception. *Current Organic Chemistry* **2012**, *16*, 724-746.
143. Cala, O.; Pinaud, N.; Simon, C.; Fouquet, E.; Laguerre, M.; Dufourc, E.J.; Pianet, I. NMR and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins: Revisiting astringency from molecular and colloidal prospects. *Faseb Journal* **2010**, *24*, 4281-4290.
144. Schwarz, B.; Hofmann, T. Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *European Food Research and Technology* **2008**, *227*, 1693-1698.
145. Wu, A.M.; Csako, G.; Herp, A. Structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Molecular and Cellular Biochemistry* **1994**, *137*, 39-55.
146. Hagerman, A.E.; Butler, L.G. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *Journal of Biological Chemistry* **1981**, *256*, 4494-4497.
147. Asquith, T.N.; Uhlig, J.; Mehansho, H.; Putman, L.; Carlson, D.M.; Butler, L. Binding of condensed tannins to salivary proline-rich glycoproteins - the role of carbohydrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1987**, *35*, 331-334.
148. Vidal, S.; Courcoux, P.; Francis, L.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Williams, P.; Waters, E.; Cheynier, V. Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference* **2004**, *15*, 209-217.
149. de Freitas, V.; Carvalho, E.; Mateus, N. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry* **2003**, *81*, 503-509.
150. Rawel, H.A.; Meidtner, K.; Kroll, J. Binding of selected phenolic compounds to proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 4228-4235.
151. Hagerman, A.E.; Rice, M.E.; Ritchard, N.T. Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin₁₆ (4→8) catechin

- (procyanidin). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 2590-2595.
152. Vidal, S.; Francis, L.; Williams, P.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, W.; Waters, E. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry* **2004**, *85*, 519-525.
153. Poncet-Legrand, C.; Doco, T.; Williams, P.; Vernhet, A. Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight. *American Journal of Enology and Viticulture* **2007**, *58*, 87-91.
154. Carvalho, E.; Povoas, M.J.; Mateus, N.; de Freitas, V. Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2006**, *86*, 891-896.
155. Carvalho, E.; Mateus, N.; Plet, B.; Pianet, I.; Dufourc, E.; De Freitas, V. Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 8936-8944.
156. Mateus, N.; Carvalho, E.; Luis, C.; de Freitas, V. Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 135-140.
157. Gawel, R.; Oberholster, A.; Francis, I.L. A 'mouth-feel wheel': Terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2000**, *6*, 203-207.
158. Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, J.M.; Rozes, N.; Arola, L.; Zamora, F. New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 742-746.
159. Rinaldi, A.; Gambuti, A.; Moio, L. Precipitation of salivary proteins after the interaction with wine: The effect of ethanol, pH, fructose, and mannoproteins. *Journal of Food Science* **2012**, *77*, C485-C490.
160. Karamanidou, A.; Kallithraka, S.; Hatzidimitrio, E. Fining of red wines: Effects on their analytical and sensory parameters. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **2011**, *45*, 47-60.
161. de Freitas, V.; Mateus, N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 940-945.

162. Carvalho, E.; Mateus, N.; de Freitas, V. Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 97-101.
163. Soares, S.; Mateus, N.; de Freitas, V. Carbohydrates inhibit salivary proteins precipitation by condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 3966-3972.
164. Zanchi, D.; Poulain, C.; Konarev, P.; Tribet, C.; Svergun, D.I. Colloidal stability of tannins: Astringency, wine tasting and beyond. *Journal of Physics-Condensed Matter* **2008**, *20*.
165. Zanchi, D.; Narayanan, T.; Hagenmuller, D.; Baron, A.; Guyot, S.; Cabane, B.; Bouhallab, S. Tannin-assisted aggregation of natively unfolded proteins. *Epl* **2008**, *82*.
166. Scollary, G.R.; Pasti, G.; Kallay, M.; Blackman, J.; Clark, A.C. Astringency response of red wines: Potential role of molecular assembly. *Trends in Food Science & Technology* **2012**, *27*, 25-36.
167. Ribereau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of enology, volume 1. The microbiology of wine and vinifications*. John Wiley and Sons Ltd.: Baffins Lane, Chichester., 2000; Vol. Volume 1.
168. 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 Chemistry* **2011**, *124*, 767-774.
169. Nunan, K.J.; Sims, I.M.; Bacic, A.; Robinson, S.P.; Fincher, G.B. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiology* **1998**, *118*, 783-792.
170. Ortega-Regules, A.; Romero-Cascales, I.; Ros-García, J.M.; López-Roca, J.M.; Gómez-Plaza, E. A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 26-32.
171. Ortega-Regules, A.; Ros-García, J.M.; Bautista-Ortín, A.B.; López-Roca, J.M.; Gómez-Plaza, E. Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera* L.): Technological implications. *European Food Research and Technology* **2008**, *227*, 223-231.
172. Rolle, L.; Torchio, F.; Zeppa, G.; Gerbi, V. Relationship between skin break force and anthocyanin extractability at different ripening stages. *American Journal of Enology and Viticulture* **2009**, *60*, 93-97.

173. Rolle, L.; Segade, S.R.; Torchio, F.; Giacosa, S.; Cagnasso, E.; Marengo, F.; Gerbi, V. Influence of grape density and harvest date on changes in phenolic composition, phenol extractability indices, and instrumental texture properties during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 8796-8805.
174. Romero-Cascales, I.; Ortega-Regules, A.; López-Roca, J.M.; Fernández-Fernández, J.I.; Gómez-Plaza, E. Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. *American Journal of Enology and Viticulture* **2005**, *56*, 212-219.
175. Río Segade, S.; Soto Vázquez, E.; Díaz Losada, E. Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in different cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* **2008**, *21*, 599-607.
176. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 4019-4025.
177. Fournand, D.; Vicens, A.; Sidhoum, L.; Souquet, J.-M.; Moutounet, M.; Cheynier, V. Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 7331-7338.
178. Mattivi, F.; Vrhovsek, U.; Masuero, D.; Trainotti, D. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2009**, *15*, 27-35.
179. Bindon, K.A.; Madani, S.H.; Pendleton, P.; Smith, P.A.; Kennedy, J.A. Factors affecting skin tannin extractability in ripening grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 1130-1141.
180. Hutzler, P.; Fischbach, R.; Heller, W.; Jungblut, T.P.; Reuber, S.; Schmitz, R.; Veit, M.; Weissenbock, G.; Schnitzler, J.P. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany* **1998**, *49*, 953-965.
181. Moskowitz, A.H.; Hrazdina, G. Vacuolar contents of fruit sub-epidermal cells from vitis species. *Plant Physiology* **1981**, *68*, 686-692.

182. Markham, K.R.; Gould, K.S.; Ryan, K.G. Cytoplasmic accumulation of flavonoids in flower petals and its relevance to yellow flower colouration. *Phytochemistry* **2001**, *58*, 403-413.
183. Grandmaison, J.; Ibrahim, R.K. Evidence for nuclear protein binding of flavonol sulfate esters in *Flaveria chloraefolia*. *Journal of Plant Physiology* **1996**, *147*, 653-660.
184. Braidot, E.; Zancani, M.; Petrusa, E.; Peresson, C.; Bertolini, A.; Patui, S.; Macri, F.; Vianello, A. Transport and accumulation of flavonoids in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant signaling & behavior* **2008**, *3*, 626-632.
185. McRae, J.M.; Kennedy, J.A. Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: A review of current research. *Molecules* **2011**, *16*, 2348-2364.
186. Jacquet, G.; Matthews, S.; Deprez, S.; Pollet, B.; Mila, I.; Lapierre, C.; Scalbert, A. Thiolysis and thioacidolysis: Recent progress in the characterisation of phenolic polymers. *Analisis* **1997**, *25*, M26-M29.
187. Preys, S.; Mazerolles, G.; Courcoux, P.; Samson, A.; Fischer, U.; Hanafi, M.; Bertrand, D.; Cheynier, V. Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 126-136.
188. 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2003**, *83*, 564-573.
189. Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A.C. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, *79*, 1123-1128.
190. Apolinar-Valiente, R.; Williams, P.; Romero-Cascales, I.; Gómez-Plaza, E.; López-Roca, J.M.; Ros-García, J.M.; Doco, T. Polysaccharide composition of Monastrell red wines from four different spanish terroirs: Effect of wine-making techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 2538-2547.
191. Gawel, R.; Francis, L.; Waters, E.J. Statistical correlations between the in-mouth textural characteristics and the chemical composition of Shiraz wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 2683-2687.

192. Kennedy, J.A.; Ferrier, J.; Harbertson, J.F.; Peyrot des Gachons, C. Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *American Journal of Enology and Viticulture* **2006**, *57*, 481-485.
193. Landon, J.L.; Weller, K.; Harbertson, J.F.; Ross, C.F. Chemical and sensory evaluation of astringency in Washington state red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2008**, *59*, 153-158.
194. Schwarz, M.; Winterhalter, P. A novel synthetic route to substituted pyranoanthocyanins with unique colour properties. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 7583-7587.
195. Håkansson, A.E.; Pardon, K.; Hayasaka, Y.; de Sa, M.; Herderich, M. Structures and colour properties of new red wine pigments. *Tetrahedron Letters* **2003**, *44*, 4887-4891.
196. 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 939-946.
197. Wollmann, N.; Hofmann, T. Compositional and sensory characterization of red wine polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 2045-2061.
198. McRae, J.M.; Schulkin, A.; Kassara, S.; Holt, H.E.; Smith, P.A. Sensory properties of wine tannin fractions: Implications for in-mouth sensory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 719-727.
199. Ferrer-Gallego, R.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: Synergistic effect and modulation by aromas. *Food Research International* **2014**, *In press*.
200. Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M.N. Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution. *Journal of Sensory Studies* **1997**, *12*, 25-37.
201. Thorngate, J.H.; Noble, A.C. Sensory evaluation of bitterness and astringency of 3R(-)-epicatechin and 3S(+)-catechin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1995**, *67*, 531-535.

202. Ferrer-Gallego, R.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Influence of climatic conditions on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *732*, 73-77.
203. Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 781-784.
204. Bate-Smith, E. Astringency in foods. *Food* **1954**, *23*.
205. Apolinar-Valiente, R.; Romero-Cascales, I.; López-Roca, J.M.; Gómez-Plaza, E.; Ros-García, J.M. Application and comparison of four selected procedures for the isolation of cell-wall material from the skin of grapes cv. Monastrell. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *660*, 206-210.
206. Guadalupe, Z.; Martínez-Pinilla, O.; Garrido, Á.; Carrillo, J.D.; Ayestarán, B. Quantitative determination of wine polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and size exclusion chromatography (SEC). *Food Chemistry* **2012**, *131*, 367-374.
207. Lurie, S.; Levin, A.; Greve, L.C.; Labavitch, J.M. Pectic polymer changes in nectarines during normal and abnormal ripening. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 11-17.
208. Femenia, A.; Sánchez, E.S.; Simal, S.; Rosselló, C. Effects of drying pretreatments on the cell wall composition of grape tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 271-276.
209. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **1976**, *72*, 248-254.
210. Saeman, J.F.; Moore, W.E.; Mitchell, R.L.; Millett, M.A. Techniques for the determination of pulp constituents by quantitative paper chromatography. *Tappi* **1954**, *37*, 336-343.
211. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* **1965**, *16*, 144-158.
212. Vicens, A.; Fournand, D.; Williams, P.; Sidhoum, L.; Moutounet, M.; Doco, T. Changes in polysaccharide and protein composition of cell walls in grape berry skin (cv. Shiraz) during ripening and over-ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 2955-2960.

213. Ferrer-Gallego, R.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. *Lwt-Food Science and Technology* **2011**, *44*, 847-853.
214. González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Pérez-Alonso, J.J.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Characterization of the mean degree of polymerization of proanthocyanidins in red wines using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 4326-4332.
215. García-Marino, M.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *660*, 134-142.
216. Alcalde-Eon, C., García-Estevez, I., Ferreras-Charro, R., Rivas-Gonzalo, J.C., Ferrer-Gallego, R., Escribano-Bailón, M.T. Adding oenological tannin vs. overripe grapes: Effect on the phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis* **2014**, *34*, 99-113.
217. Hernández-Hierro, J.M.; Quijada-Morín, N.; Martínez-Lapuente, L.; Guadalupe, Z.; Ayestarán, B.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree. *Food Chemistry* **2014**, *146*, 41-47.
218. Llaudy, M.d.C.; Canals, R.; Miquel Canals, J.; Zamora, F. Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *European Food Research and Technology* **2008**, *226*, 337-344.
219. Hernández-Hierro, J.M.; Quijada-Morín, N.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *732*, 26-32.
220. Castillo-Muñoz, N.; Gómez-Alonso, S.; García-Romero, E.; Hermosín-Gutiérrez, I. Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 992-1002.

221. Alcalde-Eon, C.; García-Estévez, I.; Martín-Baz, A.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Anthocyanin and flavonol profiles of *Vitis vinifera* L. cv Rufete grapes. *Biochemical Systematics and Ecology* **2014**, *53*, 76-80.
222. Doco, T.; O'Neill, M.A.; Pellerin, P. Determination of the neutral and acidic glycosyl-residue compositions of plant polysaccharides by GC-EI-MS analysis of the trimethylsilyl methyl glycoside derivatives. *Carbohydrate Polymers* **2001**, *46*, 249-259.
223. Dueñas, M.; Salas, E.; Cheynier, V.; Dangles, O.; Fulcrand, H. UV-visible spectroscopic investigation of the 8,8-methylmethine catechin-malvidin 3-glucoside pigments in aqueous solution: Structural transformations and molecular complexation with chlorogenic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 189-196.
224. Malien-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M.J. Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 3299-3305.
225. Quijada-Morín, N.; Regueiro, J.; Simal-Gándara, J.; Tomás, E.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 12355-12361.
226. Green, B.G.; Dalton, P.; Cowart, B.; Shaffer, G.; Rankin, K.; Higgins, J. Evaluating the 'labeled magnitude scale' for measuring sensations of taste and smell. *Chemical Senses* **1996**, *21*, 323-334.
227. Izaguirre, J.A.; Catarello, D.P.; Wozniak, J.M.; Skeel, R.D. Langevin stabilization of molecular dynamics. *Journal of Chemical Physics* **2001**, *114*, 2090-2098.
228. Case, D.A.; Darden, T.A.; Cheatham, T.E.I.; Simmerling, C.L.; Wang, J.; Duke, R.E.; Luo, R.; Walker, R.C.; Zhang, W.; Merz, K.M., et al. *Amber 12, University of California, San Francisco*, 2012.
229. Ryckaert, J.P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H.J.C. Numerical-integration of cartesian equations of motion of a system with constraints - molecular-dynamics of n-alkanes. *Journal of Computational Physics* **1977**, *23*, 327-341.
230. Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M.L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L.G. A smooth particle mesh Ewald method. *Journal of Chemical Physics* **1995**, *103*, 8577-8593.

