



VNIVERSIDAD
D SALAMANCA

**Estudio molecular de las interacciones entre
antocianos y otros compuestos del vino tinto
relevantes para la caracterización de sus
propiedades organolépticas**

Tesis Doctoral

2023

Bárbara Torres Rochera



**ESTUDIO MOLECULAR DE LAS INTERACCIONES ENTRE
ANTOCIANOS Y OTROS COMPUESTOS DEL VINO TINTO
RELEVANTES PARA LA CARACTERIZACIÓN DE SUS
PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS**

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología
Facultad de Farmacia
Grupo de Investigación en Polifenoles

Bárbara Torres Rochera

2023



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: dpto.qanyb@usal.es

La Dra. M^a Teresa Escribano Bailón, Catedrática de Universidad, y el Dr. Ignacio García Estévez, Profesor Contratado Doctor del Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca, directores del trabajo "*Estudio molecular de las interacciones entre antocianos y otros compuestos del vino tinto relevantes para la caracterización de sus propiedades organolépticas*", realizado por **Bárbara Torres Rochera** para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca, AUTORIZAN la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 26 de octubre de 2023

Para la realización de esta Tesis Doctoral se ha contado con las siguientes ayudas institucionales:

- Ayuda para Contratos Predoctorales para la Formación de Doctores (FPI). Referencia: PRE2018-084209. Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Proyecto de investigación “Bases moleculares para la interpretación de la astringencia y de su modulación mediante el uso de biopolímeros” AGL2017-84793-C2-1-R. Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Proyecto de investigación “Funcionalidad tecnológica de polisacáridos de origen microbiano y vegetal para modular características sensoriales y procesos oxidativos de vinos tintos” PID2021-127126OB-C2. Ministerio de Ciencia e Innovación.

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, 26 de junio de 2014 y de 29 de enero de 2015). Los estudios realizados están enmarcados dentro del Proyecto de Investigación “Bases moleculares para la interpretación de la astringencia y de su modulación mediante el uso de biopolímeros”, dando lugar a 3 artículos publicados en revistas JCR del primer cuartil (Q1) a partir de los cuales se ha elaborado esta Memoria:

Torres-Rochera, B., Manjón, E., Brás, N. F., Escribano-Bailón, M.T., & García-Estévez, I. Supramolecular study of the interactions between malvidin-3-*O*-glucoside and wine phenolic compounds: Influence on color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2023**.

Torres-Rochera, B., Manjón, E., Escribano-Bailón, M.T., & García-Estévez, I. Role of anthocyanins in the interaction between salivary mucins and wine astringent compounds. *Foods*, **2023**, *12*(19), 3623.

Torres-Rochera, B., Fernandes Brás, N., Escribano-Bailón, M.T., & García-Estévez, I. Chemical and colorimetric study of the influence of grape soluble polysaccharides on the color and stability of malvidin 3-*O*-glucoside solutions. *LWT - Food Science and Technology*, **2023**, *188*, 115420.

A mis padres y a Gonzalo

ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1. Los compuestos fenólicos de la uva y el vino	3
1.1. No flavonoides.....	5
1.1.1. Ácidos fenólicos.....	5
1.1.2. Taninos hidrolizables.....	7
1.1.3. Estilbenos.....	8
1.2. Flavonoides.....	8
1.2.1. Antocianos.....	9
1.2.2. Flavan-3-oles.....	12
1.2.3. Flavonoles.....	15
2. Polisacáridos de la uva y el vino	17
2.1. Polisacáridos de la pared celular de la uva.....	17
2.2. Polisacáridos de la pared celular de las levaduras.....	22
2.3. Polisacáridos del vino.....	23
3. El color del vino tinto	25
3.1. Influencia del pH en el color del vino.....	27
3.2. Fenómeno de copigmentación.....	29
3.3. Medida del color.....	36
4. Astringencia	42
4.1. Proteínas salivales.....	42
4.2. Mecanismos de astringencia.....	45
5. Análisis de las interacciones supramoleculares	50
5.1. Calorimetría de Titulación Isotérmica.....	50
5.2. Dinámica Molecular.....	56

OBJETIVOS	59
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	63
Capítulo 1: Estudio supramolecular de las interacciones entre la malvidina 3-O-glucósido y diferentes compuestos fenólicos del vino.	65
1.1. Introducción	65
1.2. Objetivos.....	67
1.3. Resumen	68
1.4. Publicación	73
Capítulo 2: Estudio químico y colorimétrico de la influencia de los polisacáridos solubles de la uva en el color y la estabilidad de las soluciones de malvidina 3-O-glucósido.	81
2.1. Introducción.....	81
2.2. Objetivos.....	84
2.3. Resumen	85
2.4. Publicación	91
Capítulo 3: Papel de los antocianos en la interacción entre las mucinas salivales y compuestos del vino con características astringentes.....	99
3.1. Introducción.....	99
3.2. Objetivos.....	102
3.3. Resumen	103
3.4. Publicación	109
CONSIDERACIONES FINALES.....	121
CONCLUSIONES	127
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

INTRODUCCIÓN



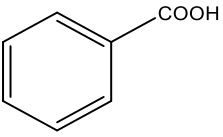
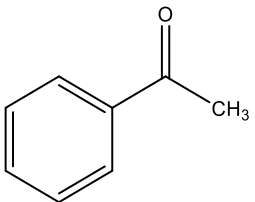
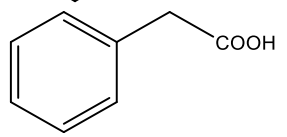
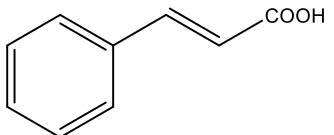
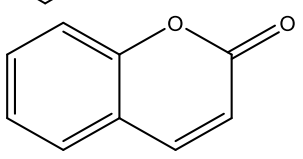
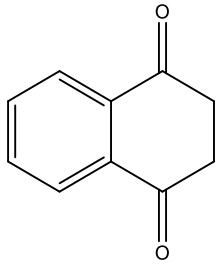
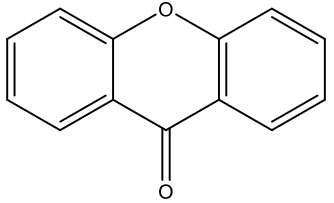
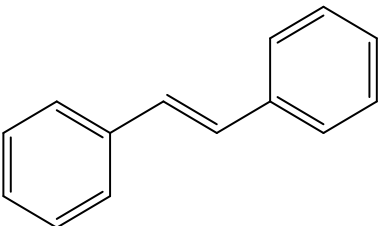
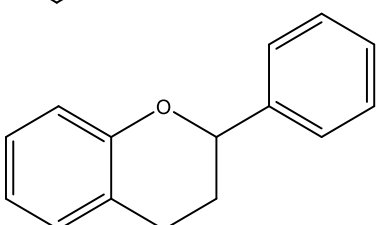
1. Los compuestos fenólicos de la uva y el vino

Según la Organización Internacional de la Viña y el Vino (O.I.V., 06/2016) “El vino es, exclusivamente, la bebida resultante de la fermentación alcohólica, completa o parcial, de uvas frescas, estrujadas o no, o de mosto de uva”. Concretamente, el vino tinto es el producto resultante de la fermentación alcohólica del mosto de uva tinta, en presencia de hollejos.

La calidad de los vinos está íntimamente ligada a su composición, la cual depende en primera instancia de la composición de las uvas, pero también del método de elaboración del vino. En el caso de los vinos tintos, la fermentación se lleva a cabo en presencia de las partes sólidas. Existe, por tanto, una gran extracción de compuestos presentes en hollejos y semillas, al contrario de los vinos blancos o rosados, donde la fermentación se realiza exclusivamente con el mosto obtenido del prensado de las uvas, sin contacto con las partes sólidas. En los últimos años, como consecuencia del cambio climático, el proceso de maduración de las uvas y, por consiguiente, su composición, se están viendo modificadas, lo cual tiene importante repercusión en las propiedades sensoriales del vino tinto, como el color o la astringencia, ya que los compuestos fenólicos juegan un papel importante en estas dos características organolépticas.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios presentes en las plantas que se caracterizan por poseer en su estructura al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (**Tabla 1**).

Tabla 1. Estructura básica de los compuestos fenólicos.

Nº de carbonos	Esqueleto	Estructura básica	Clasificación
7	C6-C1		Ácidos hidroxibenzoicos
8	C6-C2		Acetofenonas
8	C6-C2		Ácidos fenilacéticos
9	C6-C3		Ácidos hidroxicinámicos
9	C6-C3		Cumarinas
10	C6-C4		Naftoquinonas
13	C6-C1-C6		Xantonas
14	C6-C2-C6		Estilbenos
15	C6-C3-C6		Flavonoides

En la uva y el vino se pueden distinguir dos tipos principales: flavonoides y no flavonoides (**Figura 1**). Los compuestos no flavonoides se encuentran, principalmente, en la pulpa, destacando dentro de este grupo los ácidos fenólicos y estilbenos. Sin embargo, los flavonoides se caracterizan por presentar un esqueleto C6-C3-C6 y están representados, principalmente, por antocianos, flavanoles y flavonoles, los cuales se encuentran de forma mayoritaria en los hollejos, semillas y raspones de la uva y son los principales responsables del color y la astringencia de los vinos tintos (Cheynier et al., 2003).

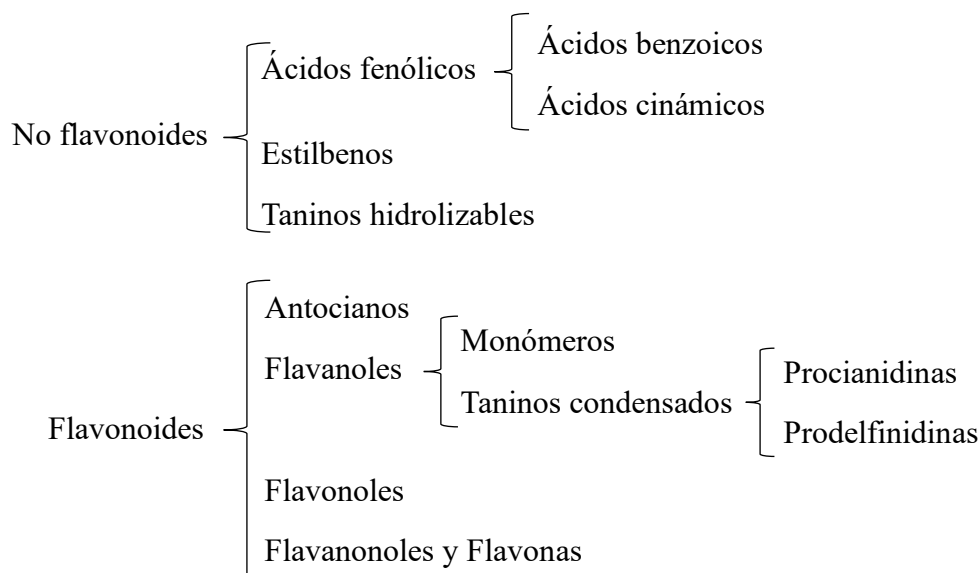


Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos.

1.1. No flavonoides

1.1.1. Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos se encuentran en la uva, y, por consiguiente, en el vino, en forma libre o bien formando glicósidos o ésteres. En función de su estructura, se pueden distinguir dos tipos principales de ácidos fenólicos en los vinos: los ácidos hidroxibenzoicos y los ácidos hidroxicinámicos.

Los ácidos hidroxibenzoicos tienen un esqueleto C6-C1 (**Figura 2**). Los derivados más comunes encontrados en el vino son los ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, siríntrico, vanílicico, gentísico y salicílico. De todos estos, la uva contiene principalmente ácido gálico, del cual en el vino se pueden encontrar, aproximadamente, concentraciones desde 65 hasta 126 mg/L (Frankel et al., 1995).

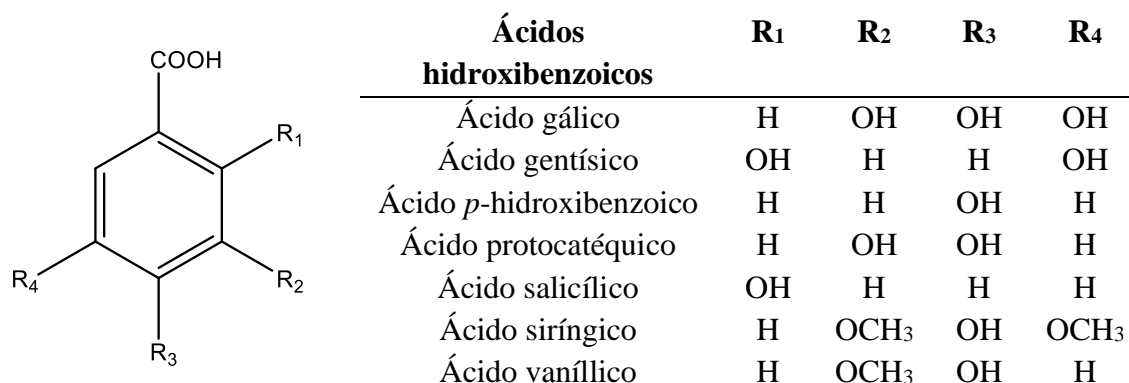
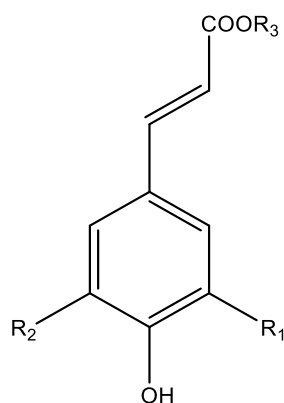


Figura 2. Estructura de los ácidos hidroxibenzoicos.

A diferencia de los anteriores, los ácidos hidroxicinámicos tienen una cadena lateral insaturada y poseen un esqueleto C6-C3. Estos compuestos se encuentran en las vacuolas de las células de hollejo (Ribéreau-Gayon, 1965). La forma natural es la forma *trans* (E) pero también es posible encontrar en el vino, aunque en menor medida, isómeros de geometría *cis* (Z) (Cheynier et al., 2003). Los principales ácidos hidroxicinámicos del vino son el ácido cafeico, caftárico, *p*-cumárico, *p*-cutárico, ferúlico, fertárico y sinápico (**Figura 3**). Concretamente, los ácidos caftárico, cutárico y fertárico son esterificaciones de los ácidos cafeico, *p*-cumárico y ferúlico con ácido tartárico.



Ácidos hidroxicinámicos	R ₁	R ₂	R ₃
Ácido cafeico	OH	H	H
Ácido caftarico	OH	H	Ác. tartárico
Ácido <i>p</i> -cumárico	H	H	H
Ácido <i>p</i> -cutárico	H	H	Ác. tartárico
Ácido ferúlico	OCH ₃	H	H
Ácido fertárico	OCH ₃	H	Ác. tartárico
Ácido sinápico	OCH ₃	OCH ₃	H

Figura 3. Estructura de los ácidos hidroxicinámicos.

Estos compuestos, aunque son incoloros, pueden afectar al color del vino tinto actuando como copigmentos de los antocianos. Por otra parte, estos compuestos no tienen influencia remarcable en el sabor ni el aroma, sin embargo, son precursores de compuestos volátiles, como el 4-vinilfenol y el 4-vinilguayacol, formados a partir de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico, respectivamente, que pueden producir olores poco agradables.

1.1.2. Taninos hidrolizables

Los taninos son también metabolitos secundarios en las plantas (Frazier et al., 2010). En función de la molécula de la que provienen se clasifican en: taninos condensados y taninos hidrolizables. Los taninos condensados pertenecen a la familia de los flavonoides y serán descritos posteriormente (**Apartado 1.2.2.**).

Los taninos hidrolizables están formados por un glúcido cuyos hidroxilos están esterificados por restos de ácido gálico o sus derivados. Estos compuestos no se encuentran de forma natural en la uva y su presencia en el vino tiene que ver con el contacto con la madera de roble de las barricas, ya que estos compuestos están presentes en esta madera, desde donde se extraen al vino en el proceso de envejecimiento de este.

Dentro de este grupo se distinguen los galotaninos y los elagitaninos, en función de que se genere, mediante su hidrólisis, ácido gálico o ácido elágico, respectivamente. Los galotaninos son precursores del ácido gálico y en el vino no están presentes en concentraciones destacables. Por su parte, los elagitaninos generan en su hidrólisis ácido elágico y en el vino pueden jugar un papel relevante para el color de este (García-Estévez, 2014).

1.1.3. Estilbenos

Los estilbenos son un tipo de compuestos fenólicos sintetizados en las plantas como mecanismo de defensa ante el estrés (fitoalexinas). Se caracterizan por presentar un esqueleto C6-C2-C6. Son compuestos que se encuentran en el hollejo de la uva y que se encuentran en el vino a baja concentración (de 3 a 5 mg/L), destacando el resveratrol, el cual se encuentra en la naturaleza en sus dos formas isoméricas, *cis* y *trans* (**Figura 4**).

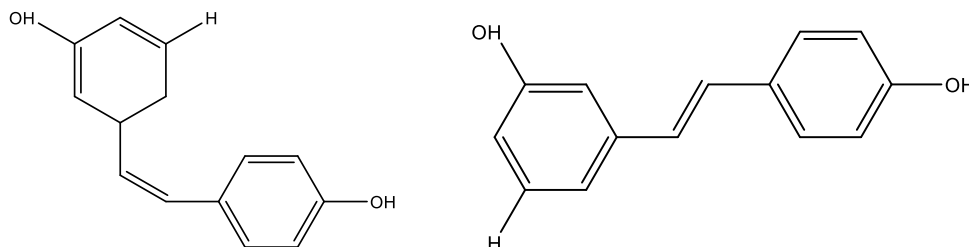


Figura 4. Estructuras *cis*-resveratrol (izquierda) y *trans*-resveratrol (derecha).

1.2. Flavonoides

El término flavo viene del latín *flavus* que significa amarillo. Los compuestos flavonoides se caracterizan por poseer un esqueleto C6-C3-C6. Se dividen principalmente en los siguientes grupos: antocianos, flavonoles, flavan-3-oles y flavanonoles, presentes en la uva y flavonas, presentes en las hojas.

1.2.1. Antocianos (Cheynier et al., 2003; Goto, 1987; Goto & Kondo, 1991; Yoshida et al., 2009)

La palabra antociano proviene del griego, *anthos* significa flor y *kyanos* significa azul. Los antocianos, presentes en los tejidos vegetales, son pigmentos responsables de los colores anaranjados, rojizos, azulados y violáceos de numerosas plantas, frutas y, por tanto, de algunas bebidas derivadas como es el caso del vino tinto. En la uva tinta, por lo general, se encuentran en las células del hollejo y en las 3 ó 4 primeras capas del hipodermo. Sin embargo, en las variedades *tintoreras* se pueden encontrar también en la pulpa (Castillo-Muñoz et al., 2009). Por otra parte, a nivel subcelular, se localizan en un orgánulo especializado de las vacuolas denominado antocianoplasto. Estos compuestos son cedidos al vino durante su proceso de vinificación (Busse-Valverde et al., 2011). Son solubles en agua, así como en metanol y etanol, e insolubles en disolventes lipídicos. Los antocianos más abundantes se encuentran como 3-glucósidos y 3,5-diglucósidos (Goto & Kondo, 1991). Hay que señalar que en las uvas *vinifera*, predominan los 3-glucósidos mientras que los 3,5-diglucósidos están prácticamente ausentes, aunque están presentes en otras uvas de la especie no *vinifera*. El contenido en uva varía desde 500 hasta 3000 mg/kg, mientras que en vinos se encuentran en concentraciones iniciales de 100 hasta 1500 mg/L. Estas concentraciones varían dependiendo de la variedad de uva, la madurez fenólica y tecnológica, la zona de producción, las condiciones climáticas, el proceso de extracción y las técnicas de vinificación empleadas, así como de la edad del vino. Su contenido en vino va disminuyendo después de la maceración de las uvas debido a la precipitación de la materia coloidal, la adsorción en las paredes celulares de las levaduras y la formación de compuestos derivados (Quijada-Morín, 2014), así como su eliminación durante la filtración y clarificación.

A nivel estructural, los antocianos son compuestos heterósidos polihidroxiados y/o metoxilados derivados del ion o catión flavilio (2-fenilbenzopirilio), en el cual la carga positiva está deslocalizada dando lugar al catión oxonio. Su forma general corresponde a las formas agliconas, denominadas antocianidinas. Sin embargo, la deficiencia electrónica del catión flavilio hace que las antocianidinas tengan una alta reactividad y, por eso, en la naturaleza, se suelen encontrar unidas a azúcares, es decir, en su forma heterósido, donde el aglicón está unido a una o varias moléculas de azúcar.

Los principales antocianos presentes en la uva y el vino derivan de las siguientes antocianidinas: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (**Figura 5**), que se diferencian por la posición y el número de hidroxilos y metoxilos localizados en el anillo B. Estas sustituciones confieren a los antocianos características diferenciales de color y estabilidad que van a depender de su estructura. Concretamente, cuando mayor número de hidroxilos posee el anillo B, mayor desplazamiento del máximo de absorción hacia longitudes de onda más altas (efecto batocrómico), lo que confiere un cambio de color a la molécula, como veremos en el **Apartado 3**.

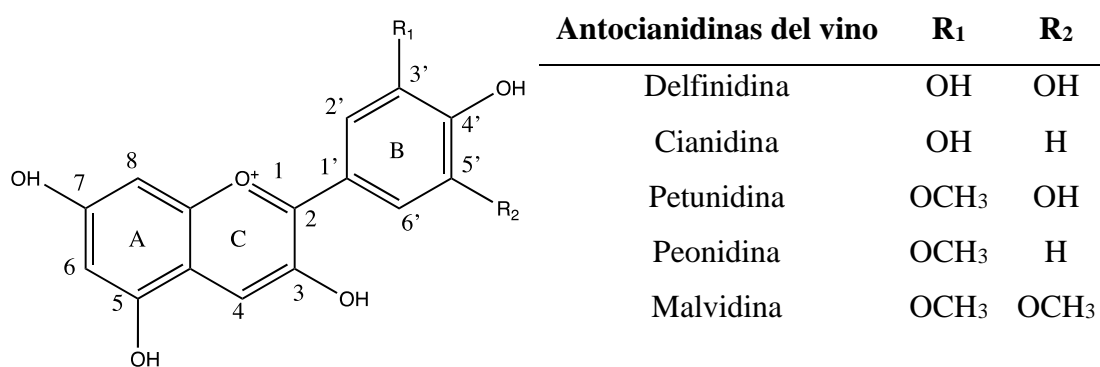


Figura 5. Estructuras de las antocianidinas del vino.

Como se ha dicho anteriormente, los antocianos en la uva de la especie *Vitis vinifera* se encuentran principalmente como 3-monoglucósidos y estos, a su vez, pueden presentar

acilación en la posición C6 de la molécula de glucosa por esterificación, principalmente con los ácidos acético, *p*-cumárico y cafeico. Al igual que ocurre con la cantidad de hidroxilos en el anillo B, la presencia de acilación también puede provocar un efecto batocrómico del máximo de absorción en el visible, proporcionando un cambio de color a la molécula.

Los vinos tintos contienen diferentes antocianos, siendo la malvidina 3-*O*-glucósido (**Figura 6**) la más abundante habitualmente en los vinos tintos jóvenes, la cual suele encontrarse en concentraciones en torno a los 300-500 mg/L (Trouillas et al., 2016). Los antocianos son estables en medios muy ácidos ($\text{pH} \leq 2$) en su forma de catión flavilio, el cual les confiere su característico color rojo. Sin embargo, los antocianos tienen una alta reactividad, pudiendo sufrir alteraciones en su estructura plana, por diferentes reacciones dependiendo del pH del medio, lo que les hace relativamente inestables en soluciones acuosas (Brouillard, 1982). Cuando el pH aumenta, el catión flavilio puede estar involucrado en diferentes reacciones en equilibrio produciendo otras estructuras básicas del antociano, como veremos más adelante. Además, por asociación con otros compuestos, en un fenómeno llamado copigmentación (ver **Apartado 3.2**), es posible mejorar la estabilidad química y colorimétrica de los antocianos. En el vino, el color que aportan los antocianos puede verse modificado por las condiciones del medio, como se ha dicho, del pH, pero también por la presencia de sulfitos, la temperatura, la luz o la copigmentación, entre otros factores. Por otra parte, los antocianos pueden reaccionar con otras moléculas presentes en el vino, formando los pigmentos derivados, entre los que destacan los piranoantocianos y los pigmentos derivados de la condensación entre antocianos y flavanoles, que pueden ser responsables de ciertas coloraciones en los vinos envejecidos.

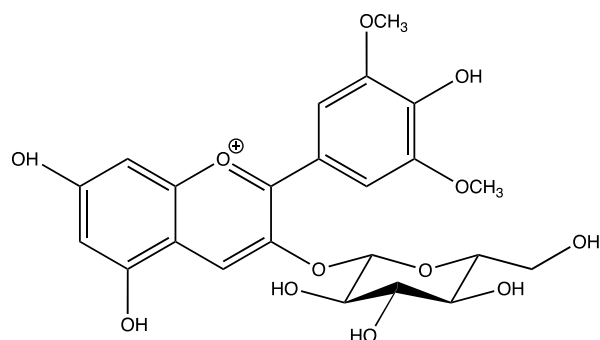
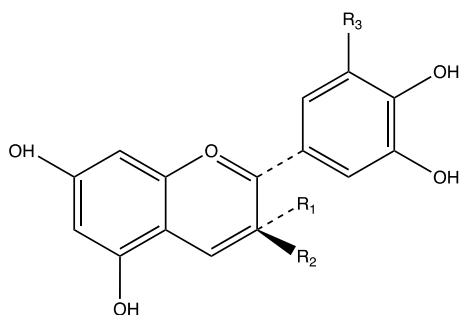


Figura 6. Estructura de la malvidina 3-O-glucósido.

1.2.2. Flavan-3-oles (Cheynier, 2006; Cheynier et al., 2003)

Los flavan-3-oles (flavanoles) son los compuestos de la familia de los flavonoides más abundante en las plantas. En la uva se encuentran principalmente en la semilla y en el hollejo y están presentes como monómeros, oligómeros y polímeros. Estos dos últimos, también se denominan taninos condensados o proantocianidinas y consisten en unidades de flavanol monoméricas unidas mediante enlaces carbono-carbono. La Figura 7 muestra los principales monómeros de los flavanoles presentes en la uva, que son: (+)-catequina y su isómero (–)-epicatequina, junto con los flavanoles trihidroxilados en el anillo B (+)-galocatequina y (–)-epigalocatequina. El grupo hidroxilo que se encuentra en el C3 puede estar esterificado con ácido gálico, dando lugar a derivados galoilados, siendo el más frecuente epicatequina 3-O-galato.



Flavanoles monómeros uva	R ₁	R ₂	R ₃
Catequina	H	OH	H
Galocatequina	H	OH	OH
Epicatequina	OH	H	H
Epigalocatequina	OH	H	OH

Figura 7. Estructura de los flavanoles monómeros de la uva.

En el vino tinto, el contenido de proantocianidinas es mayor que el de flavanoles monómeros, con concentraciones comprendidas entre 1500-5000 mg/L y 150-200 mg/L, respectivamente. Estos compuestos se extraen tanto de la semilla como del hollejo de las uvas durante el proceso de vinificación.

Los flavanoles están implicados en algunas de las propiedades organolépticas de los vinos, como son el color y la astringencia. Con relación al color, a pesar de que son incoloros, pueden interactuar con los antocianos e intervenir en reacciones de copigmentación (Boulton, 2001; Gómez-Míguez et al., 2006). Aunque su capacidad de actuar como copigmentos de los antocianos es menor que la de otros compuestos fenólicos del vino, como flavonoles y ácidos fenólicos (Cabanis et al., 2003), su contribución al color por copigmentación, principalmente por parte de monómeros y dímeros, es elevada debido a la alta concentración en la que se encuentran en el vino. Así mismo, también están implicados en la formación de pigmentos derivados de antocianos en el transcurso de la vinificación. Por otra parte, los oligómeros y polímeros, es decir, los taninos condensados tienen capacidad de interactuar con las proteínas. Así, cuando interactúan con las proteínas salivares producen sensación de sequedad o astringencia, fenómeno que será estudiado en el **Apartado 4**.

La denominación de proantocianidinas hace referencia a que, bajo calentamiento en medio ácido, generan antocianidinas, si bien son menos susceptibles a hidrólisis que los taninos hidrolizables (**Apartado 1.1.2**). Según la antocianidina que generan en su hidrólisis se distinguen dos tipos de proantocianidinas en las uvas y el vino: procianidinas, si la hidrólisis ácida conduce a la formación de cianidina, y prodelfinidinas, si generan delfinidina. Las procianidinas están formadas por condensación de unidades (+)-catequina y/o (-)-epicatequina, mientras que las prodelfinidinas, están formadas por la

condensación de (+)-galocatequina y/o (-)-epigalocatequina. La semilla de uva se caracteriza por presentar únicamente procianidinas, si bien el hollejo presenta tanto procianidinas como prodelfinidinas. Además, en el hollejo generalmente se encuentra un mayor grado de polimerización y una menor proporción de unidades galoiladas (Cheynier et al., 2003).

Las uniones entre monómeros para dar lugar a las proantocianidinas tienen lugar, generalmente, mediante enlaces que se establecen entre C4-C8 ó C4-C6 (da Silva et al., 1991), predominando el primero. Reciben el nombre de *tipo B* las procianidinas dimeras unidas por estos enlaces y *tipo C* si son trímeras. Además, de forma minoritaria puede tener lugar un enlace adicional tipo éter entre el C2 de la subunidad superior y el grupo hidroxilo de los carbonos C5 ó C7 de la unidad inferior, dando lugar a las denominadas procianidinas de *tipo A*.

En la **Figura 8** se muestra la estructura de la proantocianidina tipo B1 (Epicatequina-(4 β →8)-catequina) que es, generalmente, la mayoritaria en vinos (Haslam, 1980).

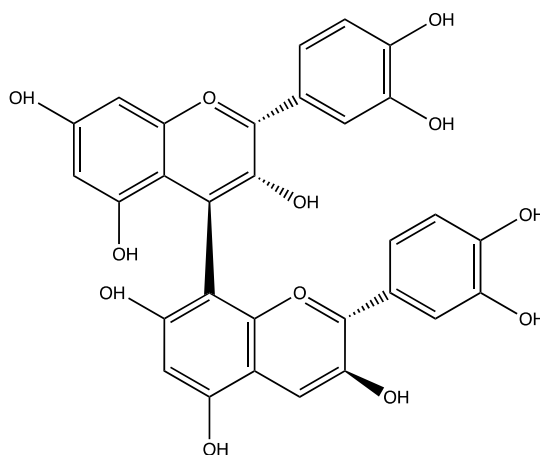


Figura 8. Estructura del dímero B1 con enlace C4-C8.

1.2.3. Flavonoles

Los flavonoles son compuestos flavonoides de color amarillento, que se caracterizan por la presencia de un grupo carbonilo en la posición C4. Estos compuestos están presentes en el hollejo (Cheynier et al., 2003), aunque también pueden estar en pequeñas cantidades en la pulpa (Pereira et al., 2006). La **Figura 9** muestra los principales flavonoles presentes en la uva, en la que se encuentran generalmente en forma de glucósidos en la posición C3; aunque también se han encontrado cantidades importantes de galactosa, xilosa y arabinosa en la posición terminal de los diglicósidos (Cheynier et al., 2003). Estos compuestos son cedidos al vino en el proceso de vinificación, donde pueden sufrir hidrólisis y encontrarse en forma de aglucón.

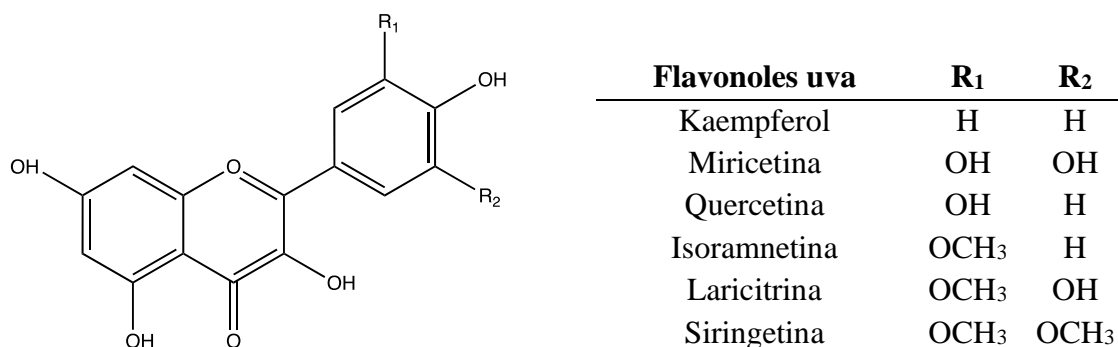


Figura 9. Estructuras de los flavonoles de la uva.

El contenido de los flavonoles en la uva varía entre 10 y 100 mg/kg, mientras que en vino tinto se encuentran concentraciones de aproximadamente 45 mg/L (Ferrer-Gallego et al., 2016). Uno de los flavonoles más estudiados en el vino, y con el cual se ha trabajado en este estudio, es la quercetina 3-*O*-glucósido, cuya estructura se representa en la **Figura 10**. Estos compuestos se consideran buenos copigmentos ya que debido a su planaridad son capaces de formar complejos estables con los antocianos, mediante

interacciones de copigmentación. Además, también pueden tener cierta implicación en el desarrollo de las sensaciones de amargor y astringencia de los vinos.

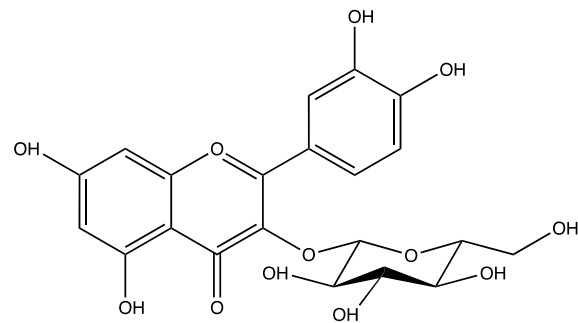


Figura 10. Estructura de la quercetina 3-O-glucósido.

2. Polisacáridos de la uva y el vino

Los polisacáridos son uno de los principales grupos de macromoléculas presentes en los vinos, encontrándose en concentraciones de 200 a 1500 mg/L. Los polisacáridos son biopolímeros constituidos por la unión de 10 o más azúcares simples a través de enlaces glucosídicos. Además, pueden presentar sustituciones con otras muchas moléculas, haciendo difícil su estudio debido a la gran complejidad de su composición y también estructural.

Los polisacáridos pueden afectar a la astringencia en los vinos y también actuar como coloides protectores, influyendo en el color y su estabilidad (F. J. Gonçalves et al., 2018). Un aspecto que a día de hoy no está clarificado es la posible actuación de estas moléculas como copigmentos de los antocianos. Esto será abordado en el **Capítulo 2** de la presente Memoria.

En función de su origen, podemos distinguir dos tipos de polisacáridos en el vino: los polisacáridos procedentes de la pared celular de las uvas y los procedentes de la pared celular de las levaduras.

2.1. Polisacáridos de la pared celular de la uva

Estructuralmente, la pared celular de la uva está formada por 3 capas: lámina media, pared primaria y pared secundaria.

La lámina media está compuesta por pectinas y pequeños prótidos. Por su parte, la pared celular primaria está formada por un 90% de polisacáridos, divididos en tres grupos: hemicelulosa, celulosa y pectinas (Quijada-Morín, 2014; Zhang et al., 2021), cuyos grupos hidroxilo les confieren la capacidad de formar enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con ciertos compuestos fenólicos como los taninos y los

antocianos (Jiménez-Martínez et al., 2019). El 10% restante de pared celular primaria son proteínas estructurales. Por lo que respecta a la pared secundaria, está constituida, mayoritariamente, por celulosa, aunque también contiene hemicelulosa, pectina y lignina (Guadalupe et al., 2014; Quijada-Morín, 2014).

La celulosa es un homopolisacárido no ramificado formado por D-glucosas que se unen mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$ glicosídicos formando cadenas de celobiosa. Así, se forma una fase de microfibras cristalinas o semicristalinas, a través de extensos enlaces de hidrógeno entre hebras individuales, formando lo que se denomina microfibrillas (Goulao et al., 2012). Estas microfibrillas de celulosa representan el constituyente principal de la pared celular, las cuales interactúan con hemicelulosa y polisacáridos pécticos, mejorando la integridad estructural de la pared celular vegetal (Martínez-Lapuente et al., 2020).

Las hemicelulosas son heteropolisacáridos que consisten en un esqueleto cuya estructura se basa en residuos D-glucosa unidos mediante enlaces $\beta(1\rightarrow4)$, y presentan ramificaciones con otros azúcares (Quijada-Morín, 2014). En la uva, principalmente está formada por xiloglucano, que consiste en cadenas de glucosa unidas por dicho enlace $\beta(1\rightarrow4)$ con ramificaciones de xilosa en el 75% de los residuos y que también presenta galactosa y fucosa (Guadalupe et al., 2015). Se distinguen además otros tipos de hemicelulosas en función de los azúcares presentes: mananos, xilanos, arabinoxilanos, glucuronoxilanos o glucuronoarabinoxilanos (Quijada-Morín, 2014). Estos polisacáridos se encuentran en cantidades notables en el mosto de uva ya que se localizan en el hollejo y la pulpa de la baya, sin embargo, se detectan en cantidades muy bajas en el vino debido a que precipitan en la vinificación (Guadalupe & Ayestarán, 2007).

Por su parte, las pectinas son heteropolisacáridos constituidos por cadenas lineales de ácido D-galacturónico que se unen mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, y que presenta

ramificaciones con azúcares. Las pectinas incluyen 3 dominios: homogalacturonanos (HG) y ramnagalacturonanos I (RG-I) y II (RG-II) (Caffall & Mohnen, 2009; Guadalupe et al., 2015), que se diferencian en que el dominio HG no está ramificado, a diferencia de los dominios RG-I y RG-II que sí que están ramificados (Martínez-Lapuente et al., 2020). En menor medida, también se incluyen arabinogalactanos-I (AG-I) y arabinogalactanos-II (AG-II), así como los galacturonanos, aquí según las ramificaciones que presenten podemos distinguir, apiogalacturonanos (AGA) y xilogalacturonanos (XGA) (Goulao et al., 2012). Los polisacáridos pécticos son dominantes en la lámina media y representan un 30% en las paredes primarias (Pellerin & Cabanis, 2003).

Los homogalacturonanos (HG) están formados por cadenas lineales de ácido galacturónico unidos mediante enlaces $\alpha(1\rightarrow4)$, y pueden estar metilados o acilados en mayor o menor medida (Guadalupe et al., 2014). La metilación es importante debido a que neutraliza la carga negativa de las cadenas sin metilar y permite la interacción con los iones Ca^{2+} dando lugar a geles por interacción con otras moléculas pécticas (Goulao et al., 2012). Los HG pueden representar más del 60-65% del total de pectinas vegetales (Goulao et al., 2012) y hasta el 80% de los polisacáridos pécticos de la uva (Guadalupe et al., 2014), sin embargo, se encuentran en cantidades muy bajas en el vino, ya que probablemente son fragmentados por poligalacturonasas durante la vinificación (Guadalupe et al., 2014; Guadalupe & Ayestarán, 2007).

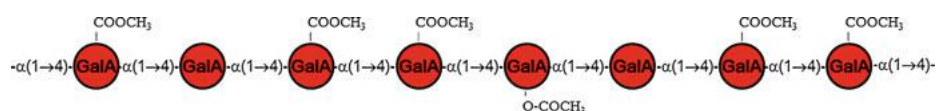


Figura 11. Estructura de homogalacturonanos (HG). Adaptado de (Guadalupe et al., 2014).

Los ramnogalacturonanos tipo I (RG-I) representan el 15% de las pectinas de la uva, sin embargo, su contenido en el vino es bajo, debido a que se degrada parcialmente por enzimas durante la fermentación alcohólica. Estos heteropolisacáridos están formados principalmente por ácido galacturónico, unidos por enlace $\alpha(1\rightarrow4)$, y por residuos de ramnosa alternos, unidos por enlace $\alpha(1\rightarrow2)$ y ramificaciones laterales de arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (Goulao et al., 2012; Guadalupe et al., 2014). Mientras que los arabinanos consisten en cadenas de arabinosa unidas por enlace $\alpha(1\rightarrow5)$ y algunas presentan arabinosa en C3, los galactanos son cadenas lineales de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-galactosa. Por lo que respecta a los arabinogalactanos, hay de dos tipos (I y II). Los arabinogalactanos de tipo I consisten en un esqueleto de $\beta(1\rightarrow4)$ -D-galactosa con ramificaciones en C3 de monómeros u oligómeros de arabinosa y no están presentes en el vino (Guadalupe et al., 2014). Sin embargo, los arabinogalactanos de tipo II, también llamados arabinogalactano-proteínas (AGP), representan más del 35% del total de polisacáridos en el vino tinto (Guadalupe & Ayestarán, 2007; Vidal et al., 2003) y presentan un esqueleto corto de $\beta(1\rightarrow3)$ -D-galactosa con ramificaciones de $\beta(1\rightarrow6)$ -D-galactosa altamente sustituidas por residuos de arabinofuranosilo (Doco & Williams, 2013), y una pequeña región peptídica unida por enlace O-glucosídico, que en vinos representa menos del 5% del peso del polímero (Guadalupe et al., 2014).

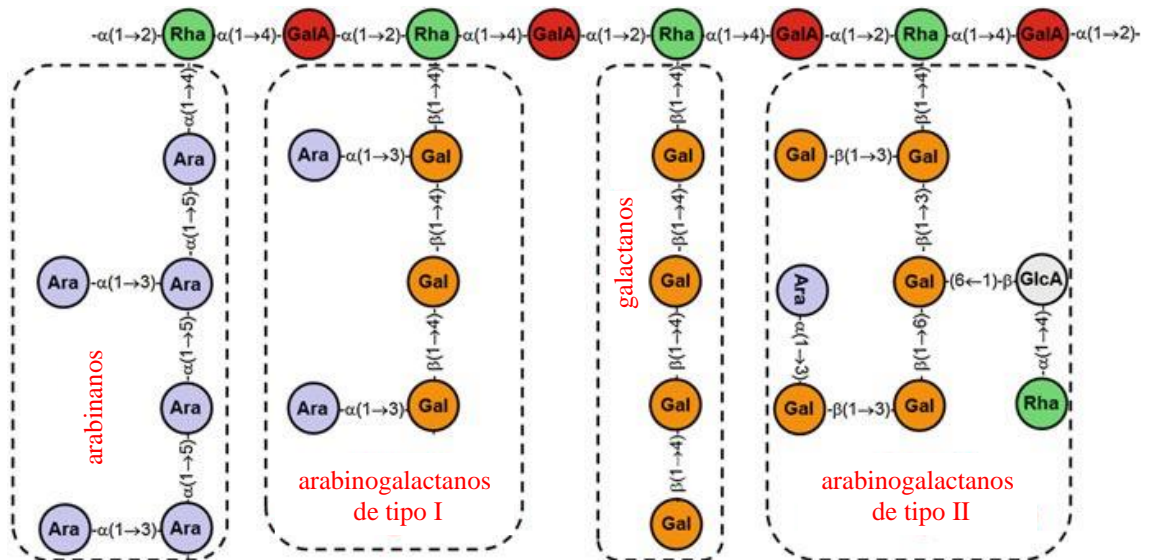


Figura 12. Estructura de ramnoglacturonanos de tipo I (RG-I). Adaptado de (Guadalupe et al., 2014).

Los ramnoglacturonanos tipo II (RG-II) son el tipo de polisacáridos pécticos más complejos que se encuentran en la uva y el vino, debido a que están muy ramificados, y son uno de los principales polisacáridos del vino. Los RG-II están formados por cadenas cortas de ácido galacturónico unidos por enlace $\alpha(1 \rightarrow 4)$, unidos a su vez a cuatro cadenas diferentes, que contienen principalmente ramnosa, arabinosa y galactosa, pero también presentan otros azúcares poco comunes como ácido acético (3-C-carboxi-5-desoxi-L-xilosa), apiosa, Dha (ácido 3-desoxi-D-lixo-2-heptulosárico), Kdo (ácido 3-desoxi-mano-octulosónico), 2-O-metil-fucosa y 2-O-metil-xilosa (Guadalupe et al., 2014). Los RG-II representan, aproximadamente, un 20 % de polisacáridos solubles en vinos tintos (Ayestarán et al., 2004), ya que presenta una resistencia intrínseca a la actividad enzimática (Jones-Moore et al., 2021).

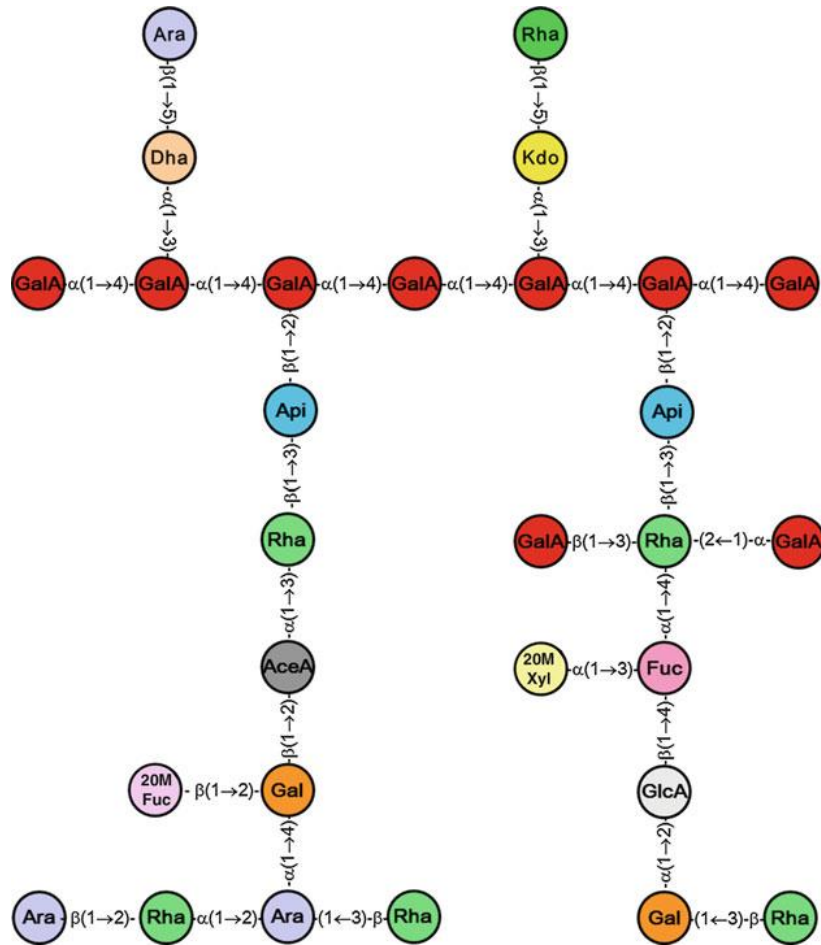


Figura 13. Estructura de ramnogalacturonanos de tipo II (RG-II),
(Guadalupe et al., 2014).

2.2. Polisacáridos de la pared celular de las levaduras

Los polisacáridos de levaduras incluyen mananos, manoproteínas (MP) y glucanos (GL). Se encuentran en la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, y pueden representar hasta el 90 % del peso seco de su pared celular (Guadalupe et al., 2014).

Las manoproteínas son glicoproteínas que se ubican en la capa más externa de la pared celular de las levaduras y están formadas principalmente por D-manosa (>90 % de los azúcares) asociada a residuos de D-glucosa y N-acetil-glucosamina (Jones-Moore et al., 2021; Rodrigues et al., 2012). Su tamaño molecular puede oscilar desde los 5 kDa hasta más de 800 kDa (Doco et al., 2003; Martínez-Lapuente et al., 2019).

2.3. Polisacáridos del vino

Los polisacáridos más abundantes en el vino son los PRAGs (polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa), los ramnagalacturanos de tipo II y los arabinogalactanos de tipo II, así como las manoproteínas procedentes de la pared celular de las levaduras, principalmente de *Saccharomyces cerevisiae* (Guadalupe et al., 2014; Martínez-Lapuente et al., 2019), y en menor medida en ciertos casos, glucanos, también procedentes de la pared celular de las levaduras.

Los PRAGs proceden de la pared celular de la uva y suponen el 40% del total de los polisacáridos en el vino. Dentro de este grupo, destacan los arabinogalactanos de tipo II (AGs), los arabinogalactanos-proteína (AGPs) y los arabinanos (Ayestarán et al., 2004; Vidal et al., 2003). Su contenido en vinos tintos se encuentra entre 100-200 mg/L (Vidal et al., 2003), aunque su concentración va a depender mucho de las técnicas de vinificación empleadas. Los PRAGs se consideran polisacáridos de naturaleza neutra, a diferencia de los homogalacturonanos y los ramnagalacturonanos, que se consideran polisacáridos ácidos.

Los AGs y los AGPs son cedidos al vino a partir de las paredes celulares primarias de la uva y son los polisacáridos más abundantes durante las primeras etapas de vinificación (Guadalupe & Ayestarán, 2007). A diferencia de los AGPs, que son fácilmente extraíbles al vino, los AGs necesitan varias etapas de maceración para que se liberen al vino, por eso su concentración es mayor en vinos tintos que en vinos blancos (Pellerin & Cabanis, 2003).

Los RG-I se encuentran en el vino en bajas concentraciones, inferiores a los 20 mg/L (Quijada-Morín, 2014). Sin embargo, los RG-II representan el 20% de los polisacáridos solubles en el vino tinto (Vidal et al., 2003) y su contenido en vino tinto

varía entre 80-150 mg/L (Quijada-Morín, 2014). Estos últimos son de gran interés en el estudio de la investigación enológica ya que podrían intervenir en la reducción de la sensación de astringencia.

Por lo que respecta a los polisacáridos de la pared celular de la levadura, las manoproteínas liberadas por dichas levaduras fermentativas, representan, aproximadamente, el 35% del contenido polisacárido total del vino (Vidal et al., 2003). Este contenido va a depender de diversos factores como son la cepa de la levadura, las condiciones de vinificación y el envejecimiento del vino. Se pueden distinguir dos tipos de manoproteínas en el vino, las liberadas en la fermentación alcohólica y las que se liberan en el envejecimiento sobre lías durante su autólisis (Guadalupe et al., 2014).

Por último, los glucanos son polisacáridos mayoritarios solo en los vinos espumosos y en vinos envejecidos sobre lías (Guadalupe et al., 2014).

3. El color del vino tinto

El color es una respuesta mental al estímulo que produce una radiación luminosa visible en la retina. Se considera un concepto psicofísico que depende de la fisiología del observador, de la distribución espectral de la radiación incidente y de la capacidad del objeto para transformarla. Por ello, para que se produzca la percepción del color, se necesita un observador que sea capaz de percibir los colores, un objeto que refleje y/o absorba luz y un iluminante que emita luz en la región del visible (380-780 nm). Así, la luz que sea transmitida por el objeto será detectada por la retina del observador e interpretada por el cerebro provocando un estímulo del color.

El estímulo cromático se compone de tres sensaciones que dan al color un carácter tridimensional:

- El matiz o tono: es el atributo que nos permite clasificar a los colores como rojizos, amarillentos, etc. Es un atributo cualitativo del color.
- El brillo o luminosidad: es la característica que permite clasificar a un color como claro u oscuro que, si hablamos de escala de grises, estaría comprendido entre el negro y el blanco. Es una medida relativa a la luz reflejada frente a la absorbida.
- La saturación o pureza: es el atributo que determina, para cada matriz, su grado de diferencia frente al gris del mismo brillo. Es el atributo cuantitativo del color.

El color es la primera característica que el consumidor percibe de un alimento. Así, el color del vino tinto es una de las primeras propiedades organolépticas que es apreciada por el consumidor y resulta especialmente importante a la hora de evaluar su calidad. Como se comentó anteriormente, el color de los vinos jóvenes se debe a los antocianos procedentes de la uva, si bien, como consecuencia de la evolución fenólica a lo largo del proceso de vinificación, el color del vino tinto cambia durante el envejecimiento,

modificándose desde un tono rojo púrpura hacia un tono teja. La **Figura 14** nos muestra la evolución del color a lo largo del envejecimiento del vino tinto y su relación con el espectro de absorción en el UV-Vis.



Figura 14. *Evolución del color del vino tinto con el envejecimiento y su espectro de absorción en el visible. Adaptado de (Zamora, 2003).*

Como vemos en la **Figura 14**, en el vino joven de un año se puede observar un máximo de absorción próximo a 520 nm correspondiente a una componente roja muy importante, pero también se puede observar una cierta absorción a 620 nm, que se relaciona con una componente azul y una menor absorción en torno a 420 nm, relacionado con una componente amarilla. Así, el color de estos vinos tintos, definido por su espectro de absorción en el visible, corresponde con colores rojos con una tonalidad azulada. Estos colores se deben, principalmente, al color de los pigmentos de las propias uvas o también del fenómeno de copigmentación, como se explicará más adelante. Sin embargo, a medida que envejece el vino (5-20 años), la absorbancia a 520 y 620 nm va disminuyendo, en favor de un incremento de la absorbancia a 420 nm. Esto se traduce en que la tonalidad azulada va desapareciendo y gana importancia la amarilla, lo que implica tonalidades de color rojo anaranjado, conocidas como rojo-teja. Estos colores se relacionan con una

menor cantidad de pigmentos nativos de la propia uva y una mayor cantidad de pigmentos derivados, principalmente de tipo piranoantocianos, así como una menor importancia del fenómeno de copigmentación.

Por lo tanto, y como se ha indicado en el **Apartado 1.2.1.**, el color del vino depende no solo de la composición de pigmentos del vino, sino que también del pH y la posible interacción de los antocianos con compuestos no coloreados (copigmentos) mediante el proceso de copigmentación. Además, debido a su deficiencia electrónica, el catión flavilio posee una baja estabilidad, haciendo que los antocianos tengan una alta reactividad, lo que da lugar a que puedan participar en muchas reacciones durante las etapas de vinificación y envejecimiento. Sin embargo, el grado de hidroxilación o de metoxilación también puede afectar al color de los antocianos, así como el grado de glicosilación, ya que al aumentar el número de azúcares aumenta la estabilidad, afectando al espectro visible de absorción, proporcionando un cambio de color a la molécula.

3.1. Influencia del pH en el color del vino

La principal forma coloreada de los antocianos de importancia para el color del vino es el catión flavilio, el cual sólo es estable a pH ácido ($\text{pH} \leq 2$). Sin embargo, la estructura del catión flavilio es muy inestable debido a su deficiencia de electrones, lo que hace que, los antocianos, en medios acuosos ácidos y ligeramente ácidos, estén involucrados en diferentes reacciones de equilibrio dependientes del pH (**Figura 15**).

El color del vino tinto

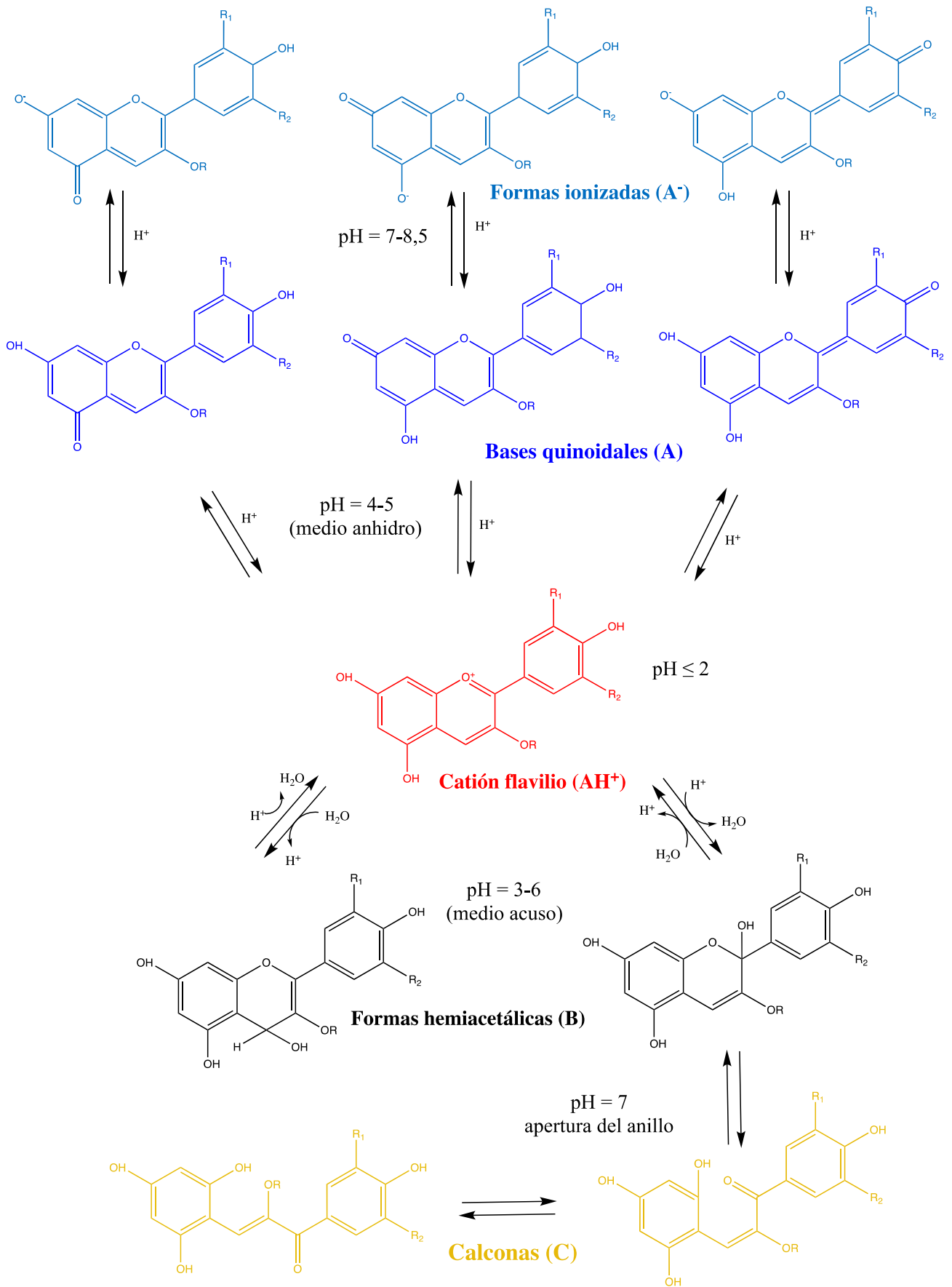


Figura 15. Estructura básica de los antocianos en función del pH, en medios acuosos.

A pH ácido ($\text{pH} \leq 2$) predomina el **catión flavilio (AH^+)**, de color rojo. A un pH ligeramente más alto, el antociano puede participar en diferentes reacciones. Por un lado, mediante un equilibrio ácido-base, a pH comprendidos entre 4,5 y 6, los grupos hidroxilos del catión flavilio situados en la posición 5, 7, ó 4' pierden su protón, lo que implica la pérdida de la carga en la estructura, dando lugar a las correspondientes **bases quinoidales (A)**, de coloración azulada, ya que poseen un máximo de absorción a mayores longitudes de onda que las formas catiónicas. Si el valor de pH sigue aumentando, a valores de pH comprendidos entre 7 y 8,5, más básicos, se pueden generar **formas ionizadas (A^-)** a través de una nueva desprotonación de los hidroxilos de las bases quinoidales. Por otro lado, a pH comprendidos entre 3 y 6, también puede ocurrir la hidratación del catión flavilio en la posición 2 ó 4, lo que genera en el medio las pseudobases carbinol, también denominadas **formas hemiacetálicas (B)**, incoloras. En equilibrio con las formas hemiacetales están las formas abiertas, también denominadas **calconas (C)**, de las que se pueden formar dos isómeros, cis y trans, y que presentan coloración ligeramente amarillenta, pero que son de menor importancia en el vino, dada la estabilidad de sus precursores.

3.2. Fenómeno de copigmentación

Como se ha comentado en el apartado anterior, las soluciones acuosas débilmente ácidas de antocianos puros pueden ser ligeramente coloreadas o casi incoloras dependiendo del valor del pH. Sin embargo, en su medio natural, así como en alimentos como el vino tinto, los antocianos tienen colores rojos, azules o violetas intensos, incluso a pH débilmente ácidos. Esta contradicción puede explicarse por el fenómeno de copigmentación, el principal mecanismo estabilizador del color en las plantas y en alimentos.

El fenómeno de copigmentación fue discutido por primera vez en 1916 por Willstätter y Zollinger, al comprobar que el tono de la malvindina 3-*O*-glucósido cambiaba con la adición de taninos o de ácido gálico (Willstätter & Zollinger, 1917). Posteriormente, la copigmentación fue más ampliamente estudiada por Robinson y Robinson, quienes, además, definieron al copigmento como una “sustancia en solución que intensifica y modifica el color” (Robinson & Robinson, 1931). En vinos, las primeras observaciones se realizaron por Boutaric y colaboradores, quienes en un estudio espectrofotométrico observaron desviaciones de la ley de Lambert-Beer al diluir el vino tinto (Boutaric et al., 1937), puesto que se observaba una relación no lineal entre el color del vino y su concentración.

La copigmentación es un proceso espontáneo y exotérmico que resulta del establecimiento de asociaciones moleculares hidrofóbicas no covalentes entre los núcleos aromáticos de las formas coloreadas de los antocianos (principalmente el catión flavilio, aunque también la base quinoidal) y otras moléculas orgánicas incoloras o ligeramente coloreadas, conocidas como copigmentos (Boulton, 2001; Brouillard, 1982; Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2012). De manera general, el efecto de copigmentación produce una intensificación del color dando lugar a un efecto hiperacrómico en el máximo de absorbancia en el visible hacia valores más altos. Además, la copigmentación puede tener un efecto batocrómico, es decir, da lugar a un desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción hacia longitudes de onda más altas, de 5 a 20 nm más alta, lo que proporciona un cambio de un tono rojo a un tono azul-púrpura. Debido al establecimiento de interacciones hidrofóbicas, la copigmentación estabiliza al antociano química y colorimétricamente.

El fenómeno de copigmentación puede producirse por diferentes mecanismos (**Figura 16**). La copigmentación intermolecular se produce entre dos moléculas diferentes y puede ser, a su vez, de dos tipos: heteromolecular y homomolecular. La copigmentación intermolecular heteromolecular se produce entre un antociano y una molécula de naturaleza diferente como puede ser otro tipo de flavonoide no antociano o algún ácido fenólico, mientras que la homomolecular, también denominada autoasociación, es otro mecanismo para estabilizar el color rojo del catión flavilio, en el que los propios antocianos pueden actuar como copigmentos, siempre que ambos existan en las formas AH^+ , A o A^- , dando lugar a un aumento de la intensidad del color provocando cambios en la banda de absorción en el visible (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2012; Hoshino, 1992; Trouillas et al., 2016). La autoasociación consiste en una desviación positiva de la ley de Beer, que se produce al aumentar la concentración de antocianos en un determinado medio (Boulton, 2001). Hay cierta controversia con respecto a la contribución de la autoasociación en el color de los vinos tintos. Según algunos autores, la autoasociación podría ser responsable del comportamiento del color del vino tinto (Somers & Evans, 1979). En estudios realizados en soluciones de vino modelo con antocianos del vino, se ha observado que la autoasociación puede conducir a un aumento de la absorbancia a 520 nm de entre el 8 y el 60%, dependiendo de la concentración y del tipo de antociano considerado (González-Manzano et al., 2008, 2009). Sin embargo, según Boulton, la autoasociación no es demasiado importante en el color de los vinos tintos jóvenes, dando una mayor relevancia a la copigmentación intermolecular entre los antocianos y ciertos compuestos fenólicos (Boulton, 2001).

Por su parte, en la copigmentación intramolecular el copigmento es una parte de la propia molécula de antociano. Las interacciones intramoleculares se dan cuando los residuos de azúcar de los antocianos se encuentran acilados por ácidos fenólicos

(Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2012). En este tipo de copigmentación, los ácidos fenólicos deben estar unidos a los antocianos de tal forma que permita un plegamiento de la molécula que facilite la interacción del grupo acilo aromático con el sistema π del antociano, protegiéndolo contra el ataque nucleófilo del agua. En la **Figura 16** se representan los diferentes mecanismos de copigmentación mencionados.

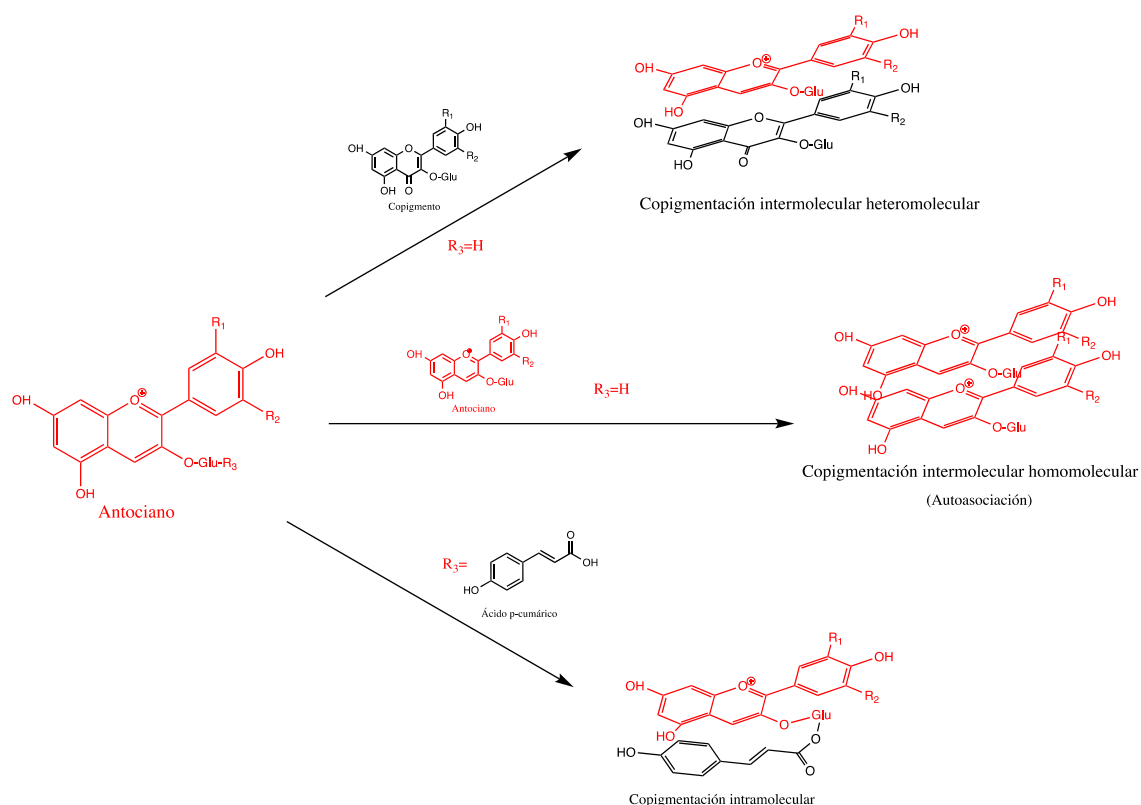


Figura 16. Diferentes mecanismos de copigmentación.

Desde un punto de vista molecular, la copigmentación consiste en interacciones intermoleculares entre los núcleos polarizables planos del antociano y el copigmento, adoptando una estructura tipo sándwich que estabiliza el catión flavilio y lo protege del ataque nucleofílico del agua, evitando la pérdida de color (Goto, 1987; Santos-Buelga & de Freitas, 2009). El copigmento es una molécula incolora que posee un sistema π rico en electrones, capaz de asociarse con el catión flavilio, el cual es deficiente en electrones.

Las interacciones intermoleculares no covalentes involucran fuerzas de van der Waals, enlaces de hidrógeno, fuerzas hidrofóbicas e interacciones π - π . A pesar de que existe un conocimiento limitado de la naturaleza física de los mecanismos de copigmentación, las interacciones π - π y las interacciones hidrofóbicas parecen ser las más fuertes, ya que dan lugar a apilamientos planos (Hoshino, 1992; Hoshino et al., 1982), aunque también se considera que los enlaces de hidrógeno pueden jugar un papel importante (Asen et al., 1972; Timberlake & Bridle, 1976; Zhang et al., 2015; Zhao et al., 2021), donde los restos de glucosa del antociano se unen mediante enlaces de H a moléculas de agua, evitando el proceso de hidratación, ya que se crea un interior de la estructura hidrofóbico al que el agua no tiene acceso. En general, los copigmentos deben tener (i) sistemas conjugados π suficientemente extendidos, que puedan favorecer las interacciones de apilamiento π - π y (ii) grupos donadores/aceptores de enlaces de hidrógeno como OH y grupos C=O (Trouillas et al., 2016).

Para entender mejor el proceso molecular de este fenómeno hay que entender el tipo de fuerzas involucradas. Las fuerzas dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido y las fuerzas de dispersión integran las fuerzas de van der Waals. Sin embargo, estas fuerzas no integran las denominadas fuerzas electrostáticas, conocidas como fuerzas ion-dipolo (Chang, 2010). El efecto hidrofóbico puede darse con la atracción entre dos restos hidrofóbicos (apolares) en el agua o entre un determinante hidrofílico (polar) y uno hidrofóbico (apolar) en el agua (Van Oss et al., 1986). Estas interacciones hacen que cuando se agreguen compuestos apolares en agua, se asocien espontáneamente, dando lugar a un desplazamiento de las moléculas de agua, lo que supone un aumento de la entropía ($\Delta S > 0$) y un cambio negativo en la energía libre de Gibbs ($\Delta H < 0$) en un proceso termodinámicamente favorable (Queiroz et al., 2001; Sun et al., 2022). La asociación intermolecular de grupos hidrofóbicos minimiza el aumento de la energía libre

al disminuir el área de contacto hidrofóbico. Debido a la complejidad que tienen este tipo de interacciones, algunos autores denominan a estos enlaces como “efectos hidrofóbicos” o “fuerzas interfaciales” (Queiroz et al., 2001; Sun et al., 2022; Van Oss et al., 1986). Por su parte, el puente (o enlace) de hidrógeno es un tipo de interacción dipolo-dipolo particularmente fuerte, que se da entre el átomo de hidrógeno de un enlace polar y un átomo electronegativo de O, N o F, entre otros (Chang, 2010). Por lo tanto, podemos decir que, las interacciones hidrofóbicas forman complejos de copigmentación que se mantienen mediante fuerzas de Van de Waals y puentes de hidrógeno, protegiendo al antociano de la hidratación y evitando así, la aparición de la forma hemiacetálica incolora (García-Estévez, 2014). Como resultado, se produce una estabilización de las formas coloreadas del antociano.

El fenómeno de copigmentación es responsable del 30-50% de la coloración en los vinos tintos jóvenes (Trouillas et al., 2016). Sin embargo, hay controversia sobre cómo afecta la copigmentación a lo largo del tiempo. Para algunos autores la adición de copigmentos aumenta la estabilidad del color de los antocianos durante el almacenamiento del vino, es decir, a lo largo del tiempo (Eiro & Heinonen, 2002). Sin embargo, para otros autores disminuye durante el envejecimiento del vino tinto (Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2012), llegando a ser prácticamente insignificante a partir de los 9 meses (Hermosín Gutiérrez et al., 2005). Es muy posible que la controversia sea debida a que el tipo de uva (su composición en pigmentos y copigmentos), los procesos de vinificación que puedan afectar a la composición del vino y las condiciones de almacenamiento y crianza del vino pueden jugar un papel fundamental en este proceso.

Entre los compuestos fenólicos del vino, los flavanoles, los flavonoles y los ácidos hidroxicinámicos parecen ser los principales compuestos que podrían actuar como

copigmentos de los antocianos (Gómez-Míguez et al., 2006). Estos compuestos son los que proporcionan los efectos hipercrómicos, y en ocasiones también batocrómicos, más fuertes y que tienen las energías de asociación de Gibbs más altas con los antocianos (Trouillas et al., 2016). En general, la eficacia de un copigmento está condicionada por su estructura, ya que las moléculas más planas son las que resultan ser mejores copigmentos. Se ha demostrado que el catión flavilio interactúa con flavanoles, como la (-)-epicatequina y la (+)-catequina, siendo el primero mejor copigmento que el segundo (Brouillard et al., 1991). Esto se debe a que, en el caso de la epicatequina, la conformación del anillo B permite que ambos núcleos aromáticos (anillos A y B) sean casi coplanares y participen en el apilamiento con el catión flavilio o las bases quinoidales (Liao et al., 1992). Por su parte, los flavonoles han mostrado una mejor capacidad para actuar como copigmentos (Baranac et al., 1997; Gómez-Míguez et al., 2006; Trouillas et al., 2016), ya que sus constantes de asociación pigmento-copigmento son más altas que las encontradas en las interacciones flavanol-antociano. Esto es debido a que los flavonoles presentan una estructura prácticamente plana, que no presentan los flavanoles. Sin embargo, su contenido en el vino es muy inferior al de estos. Además, la galoilación en C3 de los flavanoles podría mejorar su capacidad como copigmentos (Liao et al., 1992).

Con respecto a los compuestos no flavonoides presentes en el vino, los ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos, entre otros, también son conocidos por estabilizar el color de los vinos tintos (J. Gonçalves et al., 2013). Los ácidos hidroxicinámicos, especialmente el ácido cafeico, han mostrado un fuerte efecto copigmentante, (Darias-Martín et al., 2001, 2002) mientras que los ácidos benzoicos, como el ácido gálico, son generalmente menos eficientes como copigmentos (Eiro & Heinonen, 2002; Trouillas et al., 2016).

Se han descrito algunos copigmentos no fenólicos, como alcaloides, aminoácidos y nucleotídeos; pero su eficacia suele ser mucho menor que la de los compuestos fenólicos (Trouillas et al., 2016) y aún no está claro si tales compuestos pueden contribuir significativamente a la expresión del color en los vinos tintos. Además de los citados anteriormente, los polisacáridos también se han descrito como posibles copigmentos (F. J. Gonçalves et al., 2018; Trouillas et al., 2016). Se ha demostrado la posibilidad de interacciones entre los antocianos y los polisacáridos, por lo que estos compuestos podrían ejercer una influencia importante en el color y la estabilidad del vino (F. J. Gonçalves et al., 2018). Por ello, como veremos en el **Capítulo 2** de este trabajo, se ha hecho un estudio del papel de los polisacáridos como copigmentos de los antocianos, en presencia y ausencia de otros copigmentos presentes en el vino.

3.3. Medida del color

La medida del color se puede afrontar desde dos perspectivas diferentes: la medida sensorial (subjetiva) y la medida instrumental (objetiva). La medida sensorial se realiza mediante la valoración visual del color y requiere de paneles de evaluadores entrenados. También se puede utilizar el análisis visual para la comparación entre colores mediante el uso de patrones (escalas de color, placas de referencia, diccionarios de color, atlas de color, etc.). Por otra parte, los principales métodos existentes para evaluar los colores mediante medidas instrumentales son el espacio de color de la Comisión Internacional de Iluminación, más conocido por sus siglas CIE (Commision Internationale de l'Eclairage) y el estudio del espectro UV-Vis.

CIE es el encargado de estimar los diferentes avances realizados en Colorimetría. 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 de 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 energía radiante espectral del estímulo.

Esto puede ser expresado por un espacio vectorial de tres dimensiones, denominado espacio Triestímulo, en el que cada estímulo de color viene representado por un vector, que expresa las cantidades proporcionales de cada uno de los estímulos primarios (rojo, verde y azul).

Con el objetivo de estandarizar las coordenadas de color, la CIE ha definido a lo largo del tiempo iluminantes y observadores estándar. Como fuente de iluminación propone diferentes tipos de iluminantes, que consisten en distribuciones espectrales de energía radiante teóricas:

- Iluminante A, representa la luz de un radiador total a la temperatura absoluta de 2856 K.
- Iluminante B, representa la luz solar directa y se relaciona con una temperatura de color aproximada de 4874 K.
- Iluminante C, se asimila con la luz diurna media, con temperatura de color de, aproximadamente, 6774 K.
- Iluminante D₆₅, se relaciona con una temperatura de color de aproximadamente 6504 K y representa una fase de la luz de día natural. Es el que recomienda la CIE en la mayoría de los casos y por ello, es actualmente el más utilizado.

- Iluminante D_{55} , relacionado con una temperatura de color de 5503 K.
- Iluminante D_{75} , se relaciona con una temperatura de color de 7504 K y junto con el D_{55} son la alternativa al D_{65} recomendada por la CIE.

Por otra parte, como se ha comentado anteriormente, el color también depende del observador. Por ello, la CIE determinó a partir de las medidas de sensibilidad de conos rojos, verdes y azules de observadores normales, un ángulo de 2° (observador de 2°) que se sustituyó posteriormente en 1964 por un ángulo de 10° (observador de 10°), con un campo visual de igualación más amplio que el observador de 2° , por lo que es más parecido a la realidad (**Figura 17**).

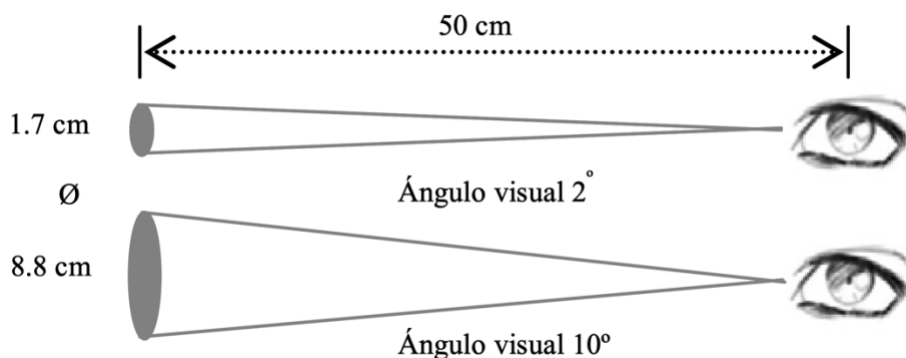


Figura 17. Observadores estándar CIE 1931 y 1964, (Ferrer Gallego, 2011).

Conociendo la cantidad de luz transmitida a cada longitud de onda y la sensibilidad de cada uno de los conos, se puede conocer la respuesta de cada cono a cada longitud de onda. La señal que estos conos envían al cerebro es la suma de todos los estímulos que recibe, y si se suman las respuestas de cada cono a las distintas longitudes de onda se obtiene la señal que cada cono envía al cerebro. Así, el color se define por tres componentes, uno por cono, denominados valores triestímulo, en cuya determinación se tienen en cuenta los tres factores normalizados que hacen posible la percepción del color: objeto, iluminante y observador.

En el caso de los vinos, a partir de las medidas realizadas con espectrofotómetros, podemos conocer la relación entre la intensidad de la luz saliente (I) y la intensidad de la luz incidente (I_0) para cada longitud de onda. Esta relación se denomina transmitancia (T), que se relaciona con la absorbancia (A) a través de la relación: $T=10^{-A}$. A su vez, la absorbancia se relaciona con la concentración a través de la ley de Lambert-Beer: $A = -\log_{10} \frac{I}{I_0} = \varepsilon \times \ell \times c$, siendo ε la absortividad molar, ℓ el paso óptico de la cubeta en la que se ha medido, expresado en cm, y c la concentración molar de la disolución.

A partir del Espacio Triestímulo y de otros sistemas colorimétricos anteriores (Sistema Colorimético CIE, CIEXYZ, Espacio $U^*V^*W^*$, Espacio, CIELUB, etc.), la CIE propuso en 1976 el espacio de color CIE Lab (CIELAB) para evaluar sistemas de coordenadas de color. Actualmente el espacio CIELAB es el recomendado por la CIE y el más empleado.

El espacio CIELAB se define cuando se representan en coordenadas rectangulares los valores para las variables claridad (L^*) y cromaticidad (a^* , b^*), que generan un espacio relativamente esférico (**Figura 18**). El valor L^* corresponde a la luminosidad de las soluciones y varía de 0 a 100, (color blanco y negro, respectivamente); a^* y b^* son coordenadas escalares de cromaticidad donde el eje a^* está etiquetado de color rojo ($+a^*$) a verde ($-a^*$) para valores positivos y negativos, respectivamente, y el eje b^* de amarillo ($+b^*$) a azul ($-b^*$).

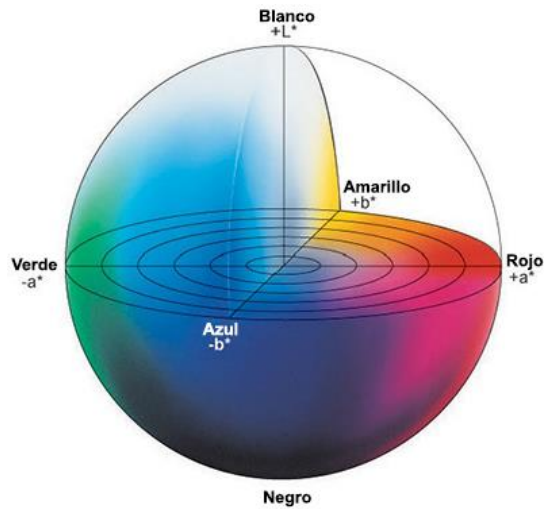


Figura 18. Representación del espacio CIELAB.

A partir de los índices de claridad y cromaticidad se pueden definir otras coordenadas, concretamente el croma (C^*_{ab}), que es un atributo cuantitativo del color, y el ángulo de tonalidad (h_{ab}), que es un atributo cualitativo. El croma hace referencia a la pureza del color y se corresponde con la longitud del vector que va desde el origen de coordenadas CIELAB hasta un punto representado en ese espacio. Por su parte, el tono toma valores de 0° a 360° y se corresponde con el ángulo formado entre el vector que va desde el origen de coordenadas hasta un punto que representa el color y el eje de abscisas.

Por todo esto, asignando los valores de la luminosidad (L^*), croma (C^*_{ab}) y tono (h_{ab}), queda definido cualquier punto en el espacio CIELAB de manera exacta.

Además, al considerarse el espacio CIELAB un espacio uniforme, es posible evaluar diferencias de color entre dos colores diferentes a través de la siguiente ecuación:

$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$, donde ΔL^* , Δa^* y Δb^* son la diferencias entre los parámetros CIELAB de los dos colores que se están comparando. El ojo humano es capaz de discriminar dos colores cuando $\Delta E^*_{ab} \geq 1$ (Gonnet, 1998). Sin embargo, cuando se observa el vino a través de una copa estandarizada, la distinción del color es más

complicada, por lo que los valores susceptibles de ser detectados por el ojo humano para distinguir el color de los vinos aumentan a 3 unidades CIELAB, $\Delta E^*_{ab} > 3$ (Martínez et al., 2001).

4. Astringencia

La palabra astringencia deriva del latín *ad stringem*, que significa “unir”. La astringencia es un atributo sensorial de gran complejidad que se percibe al consumir ciertos alimentos y bebidas y se describe como una sensación de sequedad, rugosidad y aspereza que se siente en la cavidad bucal. De acuerdo con la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales (ASTM) la astringencia se define como “el conjunto de sensaciones debido al encogimiento, estiramiento o arrugamiento del epitelio oral como resultado de la exposición a sustancias como alumbres o taninos” (ASTM, 2004). La astringencia es fundamental para la calidad de muchos alimentos y bebidas, entre los que se encuentra el vino tinto. Los vinos tintos de alta calidad deben tener un nivel equilibrado de astringencia; en defecto tienen sabor plano e insípido mientras que el exceso de astringencia enmascara otros componentes y estos pierden calidad (Gawel, 1998). Como veremos a continuación (**Apartado 4.2.**), uno de los mecanismos más aceptados para explicar la astringencia consiste en la interacción entre compuestos fenólicos y proteínas salivales, formando agregados tanino-proteína que precipitan y pueden llegar a provocar una disminución de la lubricación del epitelio oral (Canon et al., 2013; Rinaldi et al., 2012).

4.1. Proteínas salivales

La saliva es un fluido corporal, producido a partir de la secreción glandular, cuya principal función es la lubricación de la cavidad oral pero también interviene en la masticación, primeras etapas de digestión, mineralización de los dientes, control de microorganismos, en el mantenimiento de los tejidos orales sanos y es fundamental en la preservación y el mantenimiento de la salud bucal (de Almeida et al., 2008; Huq et al., 2007).

El flujo y la composición de la saliva difiere dependiendo de cada individuo y de diversos factores como la edad, el género, el peso o el estado de salud además de otros factores externos como son la dieta, consumo de alcohol, medicación, hidratación, etc.

La saliva está formada principalmente por agua (99%), pero también contiene proteínas, péptidos, enzimas, hormonas, electrolitos, azúcares, lípidos y productos nitrogenados y su pH normal es de 6 a 7 (Humphrey & Williamson, 2001). La saliva proviene de la secreción de las glándulas salivales, especialmente de las glándulas parótida, submandibular y sublingual, pero también existen glándulas salivales menores y líquido crevicular gingival (Huq et al., 2007), cada una de las cuales secreta un espectro característico de proteínas (van Nieuw Amerongen et al., 2004). Las glándulas salivales mayores aportan la mayor parte del volumen de secreción y electrolitos (Humphrey & Williamson, 2001). Las glándulas salivales se inervan tanto por las fibras nerviosas simpáticas como parasimpáticas (Humphrey & Williamson, 2001).

Es de gran interés, desde hace años, el estudio de la saliva en la salud, ya que sus componentes juegan un papel muy importante al interactuar con los microorganismos, afectando a la composición de la microflora bucal (Amerongen & Veerman, 2002). Las proteínas presentes en la saliva participan en la protección de la cavidad oral, entre estas se encuentran las principales glicoproteínas salivales: mucinas, glicoproteínas ricas en prolina (PRP) e inmunoglobulinas, pero también varias (glico)proteínas salivales menores, como la aglutinina, lactoferrina, cistatinas y la lisozima, entre otras (van Nieuw Amerongen et al., 2004).

Las PRPs son consideradas las principales proteínas salivales implicadas en el mecanismo de astringencia. Se caracterizan por tener un alto contenido en residuos de

Astringencia

prolina (25-40% del total de aminoácidos) y se clasifican en ácidas (aPRPs), básicas (bPRPs) y básicas glicosiladas (gPRPs) (Manconi et al., 2016).

Aunque las PRP son las principales proteínas estudiadas para explicar la astringencia, las mucinas también juegan un papel muy importante en la lubricación de la cavidad oral, ya que son los principales componentes lubricantes de la saliva (Humphrey & Williamson, 2001). Los efectos lubricantes de las mucinas favorecen la masticación, el habla y la deglución (Humphrey & Williamson, 2001). Se ha demostrado que muchos compuestos astringentes son capaces de precipitar mucinas, e incluso se ha propuesto que la película mucosa podría ser más importante que la película salival en la percepción de la astringencia (C. A. Lee & Vickers, 2012; Nayak & Carpenter, 2008).

Las mucinas (**Figura 19**) son glicoproteínas de alto peso molecular presentes en el proteoma salival en un porcentaje aproximado del 16 % (Huq et al., 2007). Su peso molecular puede variar entre 500 a 20.000 kDa (Brandão et al., 2017) y están constituidas por un 70-80% de carbohidratos. Entre las principales funciones de la mucina se encuentran la lubricación, la hidratación y la protección de la cavidad oral (Huq et al., 2007). Existen dos tipos principales de mucinas: las de mayor peso molecular altamente glicosiladas y de menor peso molecular, glicosiladas en una sola de sus cadenas peptídicas, denominadas MG1 y MG2, respectivamente (Huq et al., 2007). MG2 presenta propiedades viscoelásticas bajas (Amerongen & Veerman, 2002), sin embargo MG1 gracias su alto contenido de carbohidratos (>80%), sus grandes dimensiones y su estructura filiforme, forma geles hidrofílicos viscoelásticos que funcionan como barreras contra agentes nocivos en el epitelio, como bacterias y virus (Amerongen & Veerman, 2002).

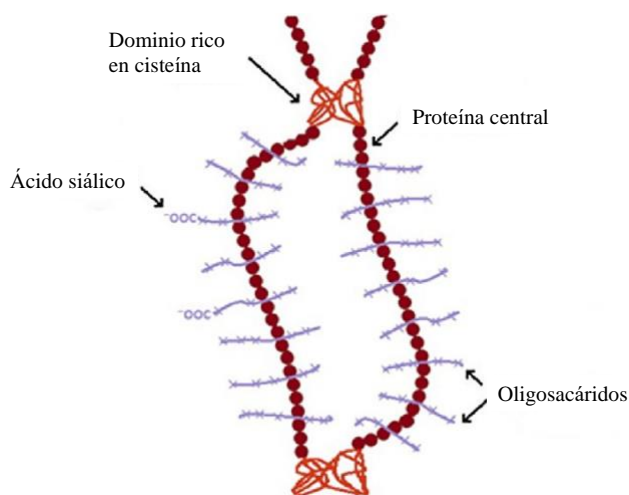


Figura 19. Estructura mucina. Adaptado de (Balabushevich et al., 2019).

En los últimos años se ha postulado que los flavanoles del vino podrían interactuar con las mucinas afectando a su función lubricante y, por tanto, podrían desempeñar un papel importante en la sensación de astringencia (Brandão et al., 2017). En el **Capítulo 3** de esta memoria se recogen los estudios realizados con relación a la capacidad de los compuestos fenólicos del vino de interactuar con las mucinas.

4.2. Mecanismos de astringencia

El principal mecanismo involucrado en la sensación de astringencia es la precipitación de proteínas salivales. Sin embargo, es una sensación muy compleja cuyo mecanismo completo no ha sido elucidado completamente, ya que no todos los compuestos astringentes conducen a una precipitación de proteínas.

El primer mecanismo de astringencia fue descrito por Bate-Smith (1954), quien indicó que su desarrollo era producido por la precipitación de proteínas y mucopolisacáridos de las secreciones mucosas (Bate-Smith, 1954). La interacción de los polifenoles con las proteínas conduce a formar agregados tanino-proteína insolubles, que darían lugar a una pérdida de la capacidad de lubricación de la saliva y por tanto a un aumento de la fricción en la cavidad oral, lo que podría explicar la astringencia. La

Astringencia

mayoría de los estudios sobre astringencia respaldan la idea de que esta es principalmente una sensación táctil (Breslin et al., 1993; Green, 1993; C. B. Lee & Lawless, 1991).

En los vinos, se considera que el principal mecanismo de astringencia es la interacción de los compuestos fenólicos del vino, principalmente flavanoles, con proteínas salivales ricas en prolina, PRP, lo que da lugar a complejos proteína-flavanoles que pueden precipitar, lo que puede resultar en una pérdida de lubricación en la cavidad oral. La asociación de polifenoles con proteínas salivales estaría gobernada tanto por fuerzas hidrofóbicas como por enlaces de hidrógeno. La interacción entre proteínas y flavanoles ha sido descrita como un modelo en tres etapas (Charlton et al., 2002; Jöbstl et al., 2004; Ma et al., 2014), como se muestra en la **Figura 20A**. En la primera etapa se producen interacciones hidrofóbicas entre las superficies planas de los anillos aromáticos de los polifenoles y los sitios hidrofóbicos de las proteínas, generalmente al anillo de pirrolidina de los residuos de prolina de la proteína, dando lugar a complejos solubles, pudiendo unirse varias moléculas de tanino al mismo péptido. Simultáneamente, el enlace de hidrógeno que se produce entre el grupo hidroxilo de los taninos y los sitios aceptores de hidrógeno de las proteínas ayuda a estabilizar los complejos. En la segunda etapa, a medida que aumenta la concentración de polifenoles, estos actúan como cross-linkers entre diferentes complejos proteína-flavanol, formando complejos de gran tamaño. La tercera etapa tiene lugar cuando estos complejos se vuelven insolubles y precipitan, lo que causa la pérdida de lubricación en la cavidad oral provocando una activación de mecanorreceptores localizados en la mucosa, lo que, en conjunto, genera la sensación de astringencia. Sin embargo, otros estudios proponen una interpretación de la astringencia que engloba varios mecanismos que tienen lugar al mismo tiempo (**Figura 20B**) (Ma et al., 2014): I) Los polifenoles libres y los agregados solubles proteína-polifenol pueden producir una alteración en el recubrimiento salival y alcanzar la película oral y activar

receptores específicos del gusto; II) Los agregados insolubles atraviesan el recubrimiento salival y causan una pérdida de lubricación y un incremento de la fricción en la cavidad oral; III) Ocurre una interacción directa entre polifenoles y el epitelio oral.

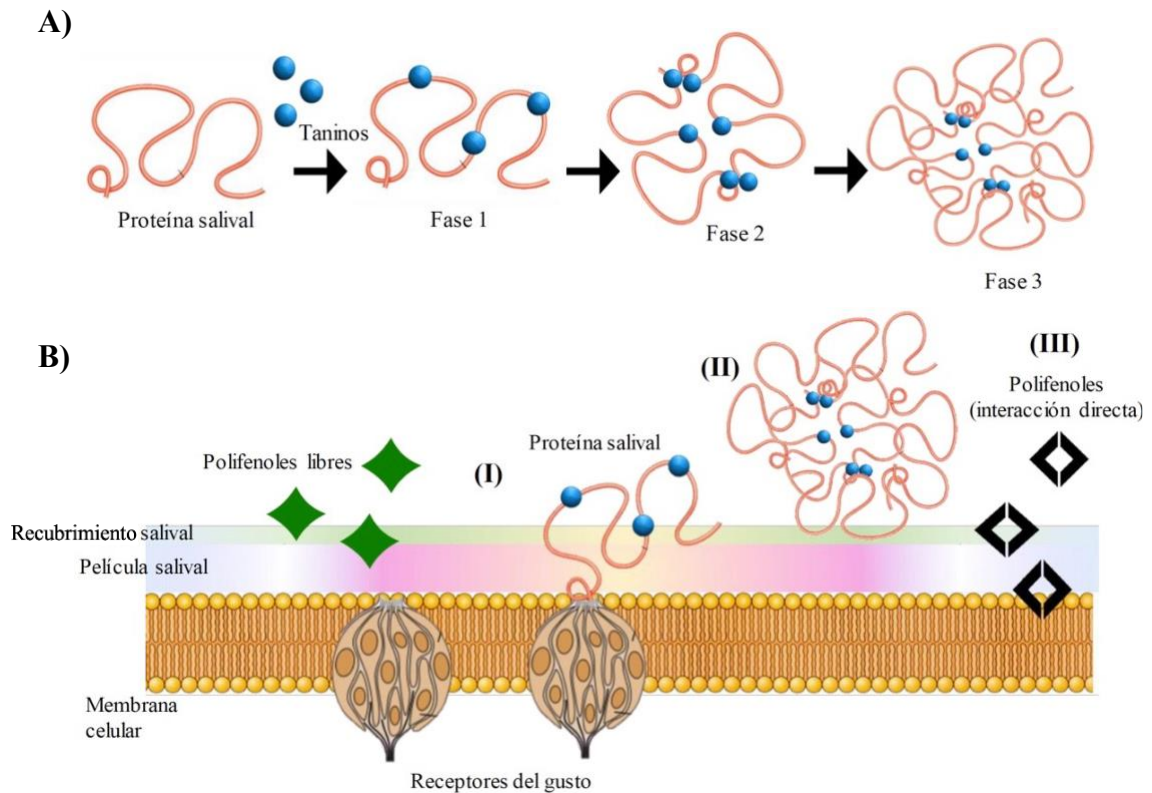


Figura 20. Mecanismos para explicar el desarrollo de la astringencia A) Mecanismo en tres etapas de la interacción entre proteína salivales y polifenoles. B) Otros posibles mecanismos. Adaptado de (Ma et al., 2014; Ramos-Pineda, 2019).

Existen diferentes parámetros que pueden influir sobre la percepción de astringencia, como son el pH del medio, la fuerza iónica, el etanol, la temperatura, el tipo de polifenol y la proteína, así como otros compuestos como los polisacáridos. También se ha sugerido la posible existencia de efectos sinérgicos entre compuestos fenólicos, lo que podría deberse a un comportamiento cooperativo entre dichos compuestos en la unión a proteínas (Ferrer-Gallego et al., 2014; Ramos-Pineda et al., 2017). Sin embargo, las investigaciones sobre la astringencia se han centrado de forma mayoritaria en la

interacción de los polifenoles con las proteínas PRPs. La capacidad de las PRPs para interactuar con los flavanoles puede deberse a su conformación que facilita el acceso a los sitios de unión, por ser extendida e intrínsecamente desestructurada (McRae & Kennedy, 2011). Más recientemente, se ha demostrado que las mucinas salivales pueden estar involucradas en este proceso (Brandão et al., 2017; C. A. Lee et al., 2012). Se ha demostrado que compuestos astringentes como los taninos precipitan las mucinas, aunque sus interacciones no se han estudiado directamente en el contexto de la astringencia.

Como se ha mencionado anteriormente, las interacciones moleculares que participan en la unión entre proteínas y compuestos fenólicos son generalmente hidrofóbicas y enlaces de hidrógeno. Se ha demostrado que las interacciones tanino-proteína son dependientes de la temperatura en la fase inicial, principalmente, y no tanto en las etapas posteriores (McRae et al., 2010). En las interacciones hidrofóbicas, la primera interacción entre taninos y proteínas es endotérmica, ya que se necesita energía para romper la capa de hidratación que se encuentra alrededor de los residuos apolares de los taninos y esta interacción se vuelve cada vez más fuerte (mayor ΔG negativo) a medida que aumenta la temperatura (Kilmister et al., 2016).

Las interacciones hidrofóbicas ocurren vía fuerzas de van der Waals-London entre los aminoácidos más polares de las proteínas y los anillos aromáticos de los compuestos fenólicos, mientras que los enlaces de hidrógeno tienen lugar en las interacciones polares entre el grupo carbonilo y el grupo amino de las proteínas y los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos (McRae et al., 2010; Poncet-Legrand et al., 2007). Además de este tipo de interacciones, se han descrito otros tipos de enlace, como enlaces iónicos o uniones de tipo covalente. Para profundizar en el conocimiento de estas interacciones supramoleculares en los trabajos de esta tesis doctoral se han empleado diferentes técnicas

de estudio, entre las que se encuentra la Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) y la Modelización Molecular (MD), que se explican en el siguiente apartado (**Apartado 5**).

5. Análisis de las interacciones supramoleculares

5.1. Calorimetría de Titulación Isotérmica

La Calorimetría de Titulación Isotérmica es comúnmente denominada ITC, por sus siglas en inglés *Isothermal Titration Calorimetry*. La calorimetría es una técnica que mide directamente el cambio de calor generado o absorbido en un medio. Los primeros calorímetros de titulación se utilizaron en 1966 para estudiar las reacciones químicas (Christensen et al., 1966; Izatt et al., 1966). En 1989 se utilizó lo que se podría llamar el primer ITC comercial diseñado para el estudio de sistemas biológicos (Wiseman et al., 1989). Actualmente, es una técnica muy utilizada para estudios que involucran las interacciones proteína-ligando, las interacciones proteína-proteína, las interacciones proteína-polisacárido, la autoasociación y los procesos de diseño de fármacos y la cinética de enzimas, entre otros (Atri et al., 2015).

La calorimetría de titulación isotérmica permite estudiar las interacciones que envuelven variaciones de entalpía, a través del calor que se libera o absorbe en la formación de un complejo, por lo que es una técnica utilizada para la caracterización de interacciones moleculares, la cual permite obtener la afinidad de la interacción (K), la estequiometría (n), la variación de entalpía (ΔH), la energía libre de Gibbs (ΔG) y la componente entrópica ($-T \cdot \Delta S$) (Holdgate, 2009; Jelesarov & Bosshard, 1999; García-Estévez et al., 2018; Poncet-Legrand et al., 2007; Ramos-Pineda et al., 2017).

Los experimentos llevados a cabo con ITC se realizan a temperatura constante midiendo la transferencia de calor durante una interacción molecular en el calorímetro. Es una técnica muy eficaz con diferentes ventajas: los reactivos están en solución, se puede utilizar incluso cuando las interacciones son débiles, no se ve afectado por las propiedades espectroscópicas de los reactivos y no necesita modificación química o inmovilización de las especies que interactúan (Atri et al., 2015; Frazier et al., 2003).

El calorímetro (**Figura 21**) consta de una celda de referencia y una celda de medición, que se encuentran dentro de una camisa adiabática. Las celdas contienen agua y el componente de enlace (muestra) de composición conocida, respectivamente. Además, el equipo cuenta con una jeringa de agitación, la cual contiene el otro componente de enlace, el ligando, también de composición conocida.

El calorímetro opera en un modo diferencial detectando el calor intercambiado, que puede ser desprendido (reacción exotérmica) o absorbido (reacción endotérmica). En este proceso la jeringa inyecta el ligando en pequeñas alícuotas espaciadas en el tiempo en la celda de muestra, agitando para mezclar bien los reactivos. El calorímetro detecta la diferencia de temperatura entre las celdas de referencia y de medición como consecuencia del calor liberado o absorbido si existe algún tipo de interacción en cada inyección. El sistema de control utiliza una pequeña potencia eléctrica constante para mantener ambas celdas a la temperatura deseada y monitoriza estas temperaturas para ajustar la energía eléctrica de la resistencia de la celda de muestra. Este calor intercambiado es necesario para mantener una temperatura constante y eliminar cualquier diferencia entre ambas celdas.

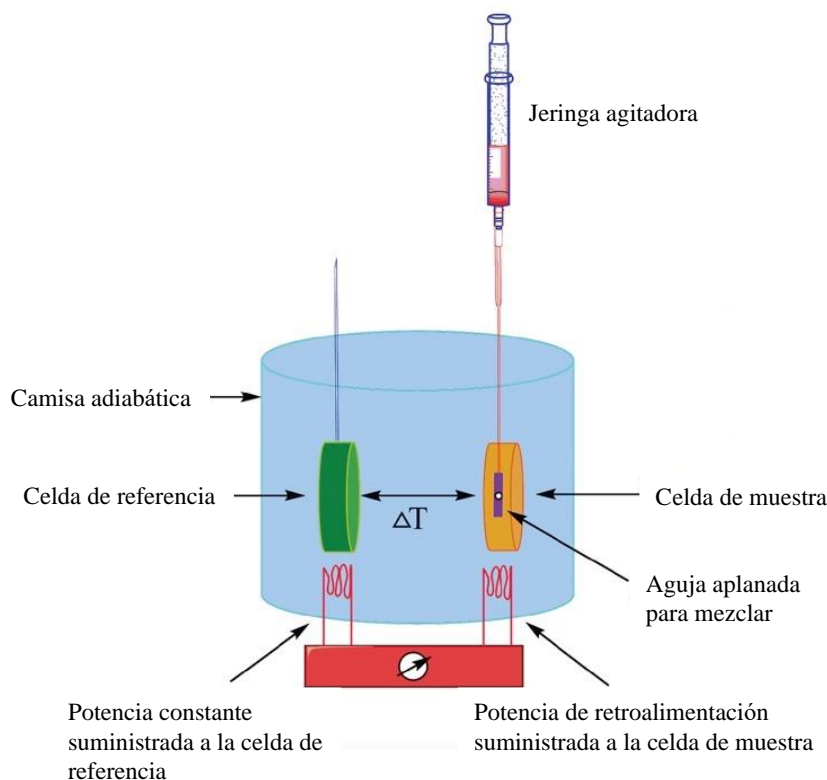


Figura 21. Representación esquemática del calorímetro de titulación.

Adaptado de (Song et al., 2015).

La cantidad de calor generada o absorbida es proporcional a la cantidad de ligando que se une a la molécula. Para cada inyección, se determina el flujo de calor ($\mu\text{cal/s}$) frente al tiempo. Si la reacción es exotérmica (**Figura 22**), la celda de muestra se calienta más que la celda de referencia y da como resultado una gráfica con una señal de picos hacia abajo. Lo contrario ocurre cuando la reacción es endotérmica. A medida que la temperatura de ambas celdas se iguala de nuevo, la señal vuelve a su posición inicial y así sucesivamente hasta inyectar todas las alícuotas según la cantidad que se haya programado. El tiempo entre cada inyección debe ser lo suficientemente largo para permitir que se alcancen los estados de equilibrio. En una situación ideal, la relación molar entre el ligando y la muestra se incrementa progresivamente a medida que se inyecta el ligando, hasta que la celda de la muestra presenta un exceso de este, alcanzando

así el punto de saturación. Dado que la cantidad de la molécula libre disponible disminuye después de cada inyección, la variación de calor también empieza a disminuir, es decir, la magnitud de los picos se vuelve gradualmente más pequeña hasta que se alcanza la saturación completa. Las inyecciones posteriores producen picos similares después de la saturación, correspondientes a diluciones o efectos mecánicos que deben restarse de cada uno de los picos de inyección antes del análisis (Atri et al., 2015).

Debido a que el sistema está en condiciones de temperatura y presión constantes, el parámetro termodinámico clave es la energía de Gibbs (Blandamer et al., 1998).

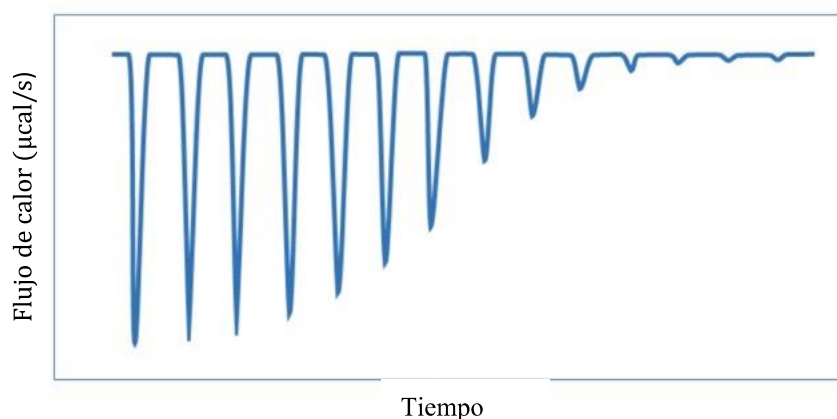


Figura 22. Ejemplo de gráfico de datos sin procesar obtenidos del ITC, representando el flujo de calor ($\mu\text{cal/s}$) frente al tiempo.

El resultado de la integración del área de cada pico con respecto a relación molar ligando/muestra da como resultado una isoterma de titulación (**Figura 23**) de la que, mediante un ajuste matemático, se puede obtener el valor de la constante de la afinidad (K), la estequiometría (n) y la entalpía (ΔH) de la reacción. En este sentido, la relación molar en el centro de la curva es equivalente a la estequiometría de la reacción y la entalpía es la cantidad de calor liberado por mol del enlace del ligando (kcal/mol).

El cambio en la energía libre (ΔG) indica si el proceso es espontáneo (energía libre negativa) o no. Tanto la energía libre de Gibbs (ΔG) como la entropía (ΔS), se pueden obtener mediante la siguiente ecuación, a partir de las constantes calculadas previamente:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

donde R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta en grados Kelvin.

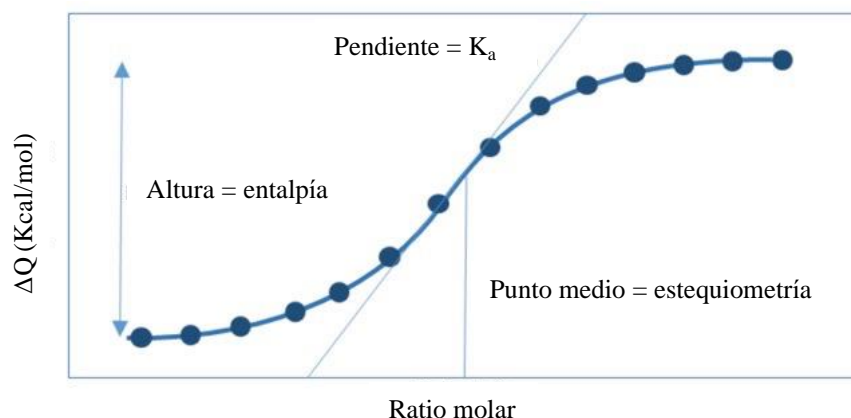


Figura 23. *Isoterma resultante del calor por inyección, obtenido a partir de la integración de las áreas de los picos y la normalización para generar una gráfica del cambio de entalpía molar frente a la relación molar.*

Además, de los resultados de ITC también se pueden deducir las fuerzas impulsoras de estas reacciones. Las interacciones hidrofóbicas son las principales fuerzas cuando el proceso está impulsado por la entropía, lo cual ocurre cuando los valores son positivos para la variación de entalpía y negativos para la componente entrópica ($\Delta H > 0$, $-T \cdot \Delta S < 0$). Estas componentes energéticas se explican ya que el agua estructurada alrededor de residuos apolares tiene mayor capacidad calorífica que el agua en masa (McRae et al., 2010). Por esto, el proceso es endotérmico, ya que se necesita energía para romper la capa de hidratación existente alrededor de los residuos apolares de los compuestos fenólicos, y esta eliminación de la capa de solvatación conlleva una expulsión de

moléculas de agua de la superficie, es decir, hacen que el agua estructurada se desplace, produciendo un cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) y un aumento de la entropía del sistema. En cambio, cuando la interacción está impulsada por la entalpía, es decir, se obtienen valores negativos para la variación de entalpía y positivos para la componente entrópica ($\Delta H < 0$, $-T \cdot \Delta S > 0$), el proceso está relacionado con la existencia de enlaces de hidrógeno, de naturaleza exotérmica, que conllevan una reordenación molecular que produce una reducción de la entropía del sistema. Por otra parte, en el caso de que, tanto la variación de entalpía como la componente entrópica sean negativas, es decir, el proceso sea exotérmico y conlleve un aumento de la entropía, ambos tipos de fuerzas estarán involucradas en la interacción ($\Delta H < 0$, $-T \cdot \Delta S < 0$).

Existen varios modelos matemáticos que permiten el ajuste y análisis de los datos obtenidos del ITC, dependiendo del sistema de interés, ya sea utilizando el modelo de equilibrio estequiométrico, mediante el uso de un modelo de múltiples sitios independientes, o con modelos de n-sets de sitios de unión, entre otros. El método de análisis de datos de ITC utilizado en los trabajos de esta Tesis doctoral utiliza un ajuste de datos integrado en el software AFFINimeter (AFFINimeter Software for Isothermal Titration Calorimetry, Santiago de Compostela, España). Por este método, después de restar la entalpía de dilución de la entalpía de interacción ligando-molécula, se usa un algoritmo de mínimos cuadrados no lineales junto con las concentraciones totales del ligando y la muestra para ajustar el flujo de calor por inyección a una ecuación de enlace de equilibrio, proporcionando el mejor ajuste para los valores de estequiometría (el número de sitios de unión, n), el cambio de entalpía de unión (ΔH) y la afinidad de unión (K) (Atri et al., 2015).

5.2. Dinámica Molecular

Los métodos basados en el estudio *in silico* de la dinámica molecular (MD) analizan la evolución de un sistema molecular a lo largo del tiempo y utilizan las trayectorias para estimar las entalpías y las energías de asociación de Gibbs. La MD se ha convertido en los últimos años en una técnica de gran interés para el estudio de biomoléculas, dando una dimensión dinámica a los datos estructurales y ayudando a comprender los procesos bioquímicos (Hansson et al., 2002), siendo una herramienta complementaria a las técnicas experimentales.

El primer cálculo del movimiento dinámico molecular se realizó en 1957 (Alder & Wainwright, 1957), aunque no fue hasta la década de 1970 cuando tuvieron lugar las primeras simulaciones de dinámica molecular de una proteína (McCammon et al., 1977).

En la actualidad, las simulaciones proporcionan una forma de probar si los modelos teóricos predicen las situaciones experimentales. La base teórica de la MD es la termodinámica estadística. La MD es una herramienta que permite seguir y comprender la estructura y la dinámica con precisión, en una escala en la que se puede rastrear el movimiento de átomos individuales (Lindahl, 2008). Estas simulaciones predicen cómo se moverá cada átomo en un sistema molecular con el tiempo, en base a un modelo general de la física que gobierna las interacciones interatómicas (Hollingsworth & Dror, 2018). Para predecir la posición espacial de cada átomo en función del tiempo, se utilizan las leyes del movimiento de Newton (Hollingsworth & Dror, 2018); Binder et al., 2004).

Las simulaciones de MD involucran una amplia variedad de procesos biomoleculares importantes, como pueden ser el cambio conformacional, la unión de ligandos y el plegamiento de proteínas, y han demostrado ser muy útiles para interpretar

los mecanismos funcionales de las proteínas y otras biomoléculas y para el diseño y la optimización de moléculas pequeñas, péptidos y proteínas (Hollingsworth & Dror, 2018). La MD permite estimar los valores de las energías y la estabilidad de complejos resultantes utilizando sistemas modelo para comprender mejor las interacciones entre diferentes moléculas.

Las fuerzas en MD se calculan utilizando un modelo conocido como campo de fuerza de mecánica molecular, que se ajusta a los resultados de los cálculos de mecánica cuántica y, normalmente, a ciertas medidas experimentales (Hollingsworth & Dror, 2018). Sin embargo, se debe tener en cuenta, al analizar datos de simulación, que estos campos de fuerza son aproximados. Estas simulaciones son muy útiles ya que se puede capturar la posición y el movimiento de cada átomo en cada momento, lo cual es muy difícil con cualquier técnica experimental, además de que se conocen las condiciones de simulación y se pueden controlar (Hollingsworth & Dror, 2018). La parte más complicada de la MD consiste en decidir las simulaciones que se van a realizar y, sobre todo, el análisis de los resultados por la gran cantidad de datos que se obtienen.

Las simulaciones MD son cada vez más accesibles. Hasta no hace mucho, los trabajos realizados mediante MD requerían de supercomputadoras pero, en la actualidad, el hardware y el software para realizar las simulaciones tienen un mejor soporte con simulaciones más largas y económicas y más fáciles de llevar a cabo (Hollingsworth & Dror, 2018). En cuanto al hardware que se utiliza en la actualidad, las unidades de procesamiento central (CPU) son una opción, aunque existe otro hardware informático de gran interés, las unidades de procesamiento gráfico (GPU), que permiten ejecutar simulaciones rápidas a un coste moderado. Los campos de fuerza más comunes son diferentes versiones de AMBER, CHARMM y OPLS (Hollingsworth & Dror, 2018).

Todos estos campos de fuerza se basan en formas funcionales similares pero cada uno tiene ciertas fortalezas y debilidades. Entre las opciones de software más utilizados se encuentran GROMACS, NAMD, AMBER o CHARMM (Hollingsworth & Dror, 2018; Lindahl, 2008). Estos dos últimos programas no deben confundirse con los campos de fuerza del mismo nombre. Muchos de estos programas de simulación admiten un amplio rango de campos de fuerza y realizan cálculos similares, variando en la eficiencia de asignación y la compatibilidad de funciones, por ejemplo, los métodos de muestreo o el control de parámetros del sistema (temperatura y presión) (Hollingsworth & Dror, 2018).

Las simulaciones de MD se pueden utilizar para muestrear el espacio conformacional de las uniones supramoleculares entre compuestos fenólicos del vino (Kunsági-Máté et al., 2006, 2007; Zhang et al., 2015; Nave et al., 2012; Sousa et al., 2014; Košinová et al., 2012; Sirk et al., 2008).

Los mecanismos moleculares asociados a la percepción de la astringencia también han sido evaluados por métodos MD. Por ejemplo, se llevaron a cabo simulaciones MD clásicas para comprender, a nivel molecular, la interacción de diferentes tipos de flavanoles con fragmentos peptídicos y/o proteínas salivales (Ferrer-Gallego et al., 2017; Manjón et al., 2020; Ramos-Pineda et al., 2017). Además, las simulaciones MD han ayudado a caracterizar las interacciones intermoleculares entre los polifenoles del vino y los canales/receptores de proteínas, como los receptores del sabor amargo y los transportadores de glucosa (Han et al., 2020; Soares, Santos Silva, et al., 2018).

OBJETIVOS



Como consecuencia del cambio climático, la vitivinicultura se enfrenta a defectos en la calidad de los vinos que implican a dos importantes características organolépticas: el color y la astringencia. Se hace necesario, por tanto, seguir avanzando en el estudio de los procesos moleculares que conducen al desarrollo de estas propiedades organolépticas. Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido profundizar en el estudio de las interacciones que tienen lugar entre antocianos y compuestos de interés para la estabilidad de estos pigmentos y del desarrollo de la astringencia. Con este fin, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. Profundizar en el estudio de las interacciones moleculares entre el principal pigmento del vino, malvidina 3-*O*-glucósido, y otros compuestos fenólicos y sus implicaciones sobre el color.
2. Estudiar el papel de los polisacáridos en las interacciones de copigmentación y en la estabilidad de la malvidina 3-*O*-glucósido.
3. Evaluar la implicación que los antocianos y las interacciones de copigmentación pueden llegar a tener en el desarrollo de la astringencia a través de su interacción con proteínas salivales de alto peso molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



Capítulo 1



Estudio supramolecular de las interacciones entre la malvidina 3-*O*-glucósido y diferentes compuestos fenólicos del vino

1.1. Introducción

Los antocianos, compuestos fenólicos pertenecientes a la familia de flavonoides, con estructura C6-C3-C6, son conocidos como uno de los pigmentos más importantes responsables del color rojo en muchas frutas, verduras, zumos, mermeladas y, sobre todo, son conocidos como responsables del color rojo del vino tinto (Delgado-Vargas et al., 2000; González-Manzano et al., 2008). En el vino tinto existen diferentes antocianos, siendo la malvidina 3-*O*-glucósido el mayoritario en vinos tintos jóvenes, donde se puede encontrar en concentraciones de alrededor de 300-500 mg/L (Trouillas et al., 2016). El color rojo de los antocianos se debe al catión flavilio, el cual solo es estable a pH ácido ($\text{pH} \leq 2$). Cuando el pH aumenta, el catión flavilio está involucrado en diferentes reacciones de equilibrio que llevan a la formación de otras formas del antociano. Sin embargo, mediante la copigmentación, por asociación de los antocianos con otros compuestos conocidos como copigmentos, es posible mejorar la estabilidad química y colorimétrica de los antocianos en un mayor intervalo de valores de pH. Estas interacciones moleculares tienen lugar por las asociaciones moleculares hidrofóbicas no covalentes entre los núcleos aromáticos de las formas coloreadas de los antocianos y el

Capítulo 1

copigmento, formando complejos de copigmentación de estructuras denominadas tipo *sándwich* antociano-copigmento (Brouillard, 1982; Escribano-Bailón & Santos-Buelga, 2012; González-Manzano et al., 2009). Este fenómeno es responsable del 30-50% de la coloración de vinos tintos jóvenes (Trouillas et al., 2016). Entre los compuestos fenólicos del vino, los flavonoides, como flavanoles y flavonoles, y los ácidos hidroxicinámicos parecen ser los más conocidos que pueden actuar como copigmentos. Entre los compuestos flavonoides, los flavonoles, aunque se encuentran en menor proporción en el vino, son conocidos como mejores copigmentos que los flavanoles (Gómez-Míguez et al., 2006; Trouillas et al., 2016).

El fenómeno de la copigmentación ha sido ampliamente estudiado mediante métodos espectrofotométricos (González-Manzano et al., 2009; Gordillo et al., 2012, 2015; Lambert et al., 2011) y, en los últimos tiempos, la caracterización del color en el espacio CIELAB mediante colorimetría diferencial ha proporcionado una interpretación colorimétrica completa de las interacciones antociano-copigmento, aportando información sobre la química del color. Sin embargo, la espectroscopía UV-Vis no permite caracterizar a nivel supramolecular las interacciones que ocurren en el proceso de copigmentación, por lo que estudios complementarios utilizando técnicas como la simulación de la dinámica molecular (MD) o la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) puede proporcionar información valiosa a nivel supramolecular que permita entender mejor este proceso de estabilización del color.

1.2. Objetivos

El objetivo general del trabajo recogido en el **Capítulo 1** es el análisis, desde un punto de vista supramolecular, de la interacción entre la forma catión flavilio del antociano y diferentes compuestos fenólicos del vino, conocidos como copigmentos. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar las interacciones moleculares entre la malvidina 3-*O*-glucósido y otros compuestos fenólicos presentes en el vino mediante espectroscopía UV-Vis, ITC y MD.
- Estudiar el efecto de estas interacciones en el color de las soluciones de catión flavilio mediante el uso de la colorimetría triestímulo en el espacio CIELAB.
- Establecer relaciones entre los cambios de color expresados por el catión flavilio de la malvidina 3-*O*-glucósido debido a las interacciones con los copigmentos, las fuerzas involucradas en dichas interacciones y las características de los complejos que se forman.

1.3. Resumen

La siguiente publicación recoge los resultados del trabajo llevado a cabo dentro del

Capítulo 1:

Torres-Rochera, B., Manjón, E., F. Brás, N., Escribano-Bailón, M.T., García-Estévez, I. (2023). Supramolecular study of the interactions between malvidin 3-*O*-glucoside and wine phenolic compounds: Influence on color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. DOI: 10.1021/acs.jafc.2c08502

En este trabajo se realizó un estudio supramolecular, usando técnicas como espectroscopía UV-Vis, Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) y simulación de la Dinámica Molecular (MD), de las interacciones entre el antociano mayoritario del vino tinto, la malvidina 3-*O*-glucósido (Mv3G), en su forma de catión flavilio, y diferentes compuestos fenólicos (PC) del vino conocidos como copigmentos. Los PC ensayados han sido flavonoles como la quercetina 3-*O*-glucopiranosido (QG), flavanoles como la (+)-catequina (C) y la (-)-epicatequina (E), ácidos hidroxicinámicos como el ácido cafeico (CA) y ácidos hidroxibenzoicos como el ácido gálico (GA). Se ha trabajado a dos ratios (1:1, 1:2) y a pH 1.1, donde es predominante el catión flavilio y así se consigue evitar la existencia de otras formas del antociano que puedan interferir en los estudios colorimétricos y de interacción.

En el estudio de color mediante espectroscopía UV-Vis y posterior caracterización del color en el espacio CIELAB, se determinaron los parámetros colorimétricos de claridad (L^*) y cromaticidad (a^* , b^*), junto con los valores de los parámetros cromáticos (C^*_{ab}), que es un atributo cuantitativo del color, y el ángulo de tonalidad (h_{ab}), que es un atributo cualitativo. Los resultados indicaron que el mayor efecto en los parámetros de color estudiados se vio como consecuencia de la presencia de QG en las soluciones de

Mv3G. Se observó que, por un lado, los valores de L^* , b^* y h_{ab} disminuyeron, lo que revela un color más oscuro y más azulado en las soluciones de Mv3G en presencia de QG. Esto significaría que la interacción entre el catión flavilio de Mv3G y los anillos aromáticos de QG podría extender la conjugación por todo el sistema bimolecular. Se ha descrito que la alta conjugación con múltiples enlaces dobles en una molécula, conduce a desplazar la absorción a longitudes de onda más largas (Sinnokrot et al., 2002). De hecho, la longitud de onda de absorción máxima (λ_{max}) para las soluciones de Mv3G que contenían QG aumentó en 3 nm en el caso de Mv3G/QG₂ respecto al correspondiente control en ausencia del compuesto fenólico, lo que significa un cambio batocrómico correspondiente a un cambio de color, de rojo a más azulado. Por otro lado, respecto a los otros compuestos fenólicos estudiados, solo se observaron diferencias significativas del parámetro L^* en presencia de E y GA, cuya adición a las soluciones implicaba valores de claridad mayores, expresando una evolución de las soluciones hacia colores menos intensos, lo que podría indicar que, debido a la interacción, el complejo que involucra al catión flavilio y estos PC mostraría coeficientes de absorción molar más bajos que la forma flavilio libre.

Además, se calcularon las diferencias de color (ΔE^*_{ab}) y las contribuciones relativas de claridad ($\% \Delta L$), croma ($\% \Delta C$) y tono ($\% \Delta H$) a estas diferencias de color. En los resultados no se distinguieron visualmente las diferencias de color después de la adición de los compuestos fenólicos, excepto en el caso de las soluciones de Mv3G que contenían además QG, que presentaron valores de ΔE^*_{ab} por encima de 3 unidades, mucho mayores en el caso del ratio 1:2 pigmento:copigmento. Estas diferencias de color eran, principalmente, cualitativas, puesto que la mayor contribución a las mismas se debía al cambio en la tonalidad del color.

Capítulo 1

Los estudios llevados a cabo mediante calorimetría de titulación isotérmica (ITC) permitieron analizar los cambios de energía asociados a las interacciones entre el antociano en su forma flavilio y los diferentes compuestos fenólicos. A partir de esta técnica, mediante un modelo de equilibrio estequiométrico, se obtuvieron, para cada interacción estudiada, la variación de energía libre de Gibbs (ΔG), la constante de unión aparente (K), la variación de entalpía (ΔH) y la componente entrópica ($-T\cdot\Delta S$). A partir de la contribución de las diferentes energías en la interacción se pudieron obtener las fuerzas de unión que tienen lugar en estas interacciones.

En base a los resultados obtenidos, todos los sistemas estudiados se producían interacciones espontáneas, ya que todos los valores de ΔG fueron negativos. Por tanto, todos los PC estudiados interactuaban con el catión flavilio de Mv3G de forma espontánea. Los valores de ΔG más negativos y, por tanto, los valores de K más altos, indicaron que, de entre todos los PC estudiados, la QG es la que presenta mayor afinidad por la Mv3G. De hecho, según los valores de K , la afinidad de Mv3G por los compuestos fenólicos estudiados fue $QG > CA > E > GA > C$. Con respecto al tipo de fuerzas implicadas, en general, las interacciones involucraron ambos tipos de fuerzas, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, con un ligero predominio de los enlaces hidrofóbicos.

Los estudios de simulación de la dinámica molecular (MD) permiten estudiar el comportamiento teórico de las moléculas en disolución. En base a los resultados obtenidos, el mayor número de agregados formados entre la Mv3G y los PC para los ratios molares 1:1 y 1:2 sugirió una tendencia de estas moléculas a formar los complejos de apilamiento “*stacking*”. Con respecto a las energías, estos estudios indican de nuevo que el valor absoluto más alto se obtiene en los estudios que involucran la QG, la cual

parece interactuar con la Mv3G de forma mucho más intensa que el resto de los compuestos ensayados. El orden de afinidad hacia la Mv3G de los otros compuestos fenólicos ensayados en este estudio fue ligeramente diferente al determinado mediante ITC, aunque las diferencias entre estos compuestos son muy pequeñas. En cuanto a los tipos de fuerzas implicadas en las interacciones, predominaron las interacciones de tipo π - π *stacking*, las cuales, junto a las fuerzas de van der Waals, resultan claves para la formación de los complejos de copigmentación involucrando las zonas planares de las moléculas.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el color de las soluciones de cationes de flavilio (pH 1) puede modificarse debido a la presencia de QG, pero que otros compuestos fenólicos que pueden actuar como copigmentos, como C, E, CA o GA, no generan esos cambios. De esta forma, el color de las soluciones de Mv3G a pH 1.1 cambió, debido a la presencia de QG en las soluciones, hacia colores más oscuros y tonalidades más azuladas, lo que se relacionó principalmente con un cambio batocrómico en la banda de flavilio, más importante cuando se incrementa la concentración de QG en la disolución, es decir, el ratio pigmento:copigmento. Estas observaciones apuntan que la estructura de QG permite interacciones con la malvidina que cambiarían el entorno electrónico de la molécula de forma que afectaría al espectro de absorción del pigmento y, por tanto, al color expresado, algo que no ocurre en el caso de las interacciones con el resto de los compuestos fenólicos ensayados. Los estudios de ITC y MD respaldan esta hipótesis, puesto que ambas técnicas demuestran que la QG fue el compuesto con la mayor afinidad por la forma flavilio de la Mv3G. De hecho, también se observó que E tiene mayor afinidad de unión hacia el catión flavilio de la Mv3G que C, lo que podría explicar por qué sólo se observaron diferencias significativas (en el parámetro claridad) con respecto al control de Mv3G en presencia de E, es decir, la

Capítulo 1

capacidad de los compuestos fenólicos para interaccionar con el catión flavilio guarda una relación directa con su capacidad para modificar el color de esta forma coloreada del antociano.

Supramolecular Study of the Interactions between Malvidin-3-O-Glucoside and Wine Phenolic Compounds: Influence on Color

Bárbara Torres-Rochera, Elvira Manjón, Natércia F Brás, María Teresa Escribano-Bailón,* and Ignacio García-Estévez



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08502>



Read Online

ACCESS |



Metrics & More



Article Recommendations



Supporting Information

ABSTRACT: Supramolecular study of the interactions between the major wine anthocyanin, malvidin-3-O-glucoside (Mv3G) and different wine phenolic compounds (quercetin 3-O- β -glucopyranoside (QG), caffeic acid, (-)-epicatechin, (+)-catechin, and gallic acid) has been performed at two different molar ratios (1:1 and 1:2) in acidic medium where flavylium cation predominates (pH \leq 2). Color variations have been evaluated by differential colorimetry using CIELAB color space. These studies have been complemented with isothermal titration calorimetry assays and molecular dynamics simulations. The color of Mv3G flavylium cation is modified by the interaction with QG toward more bluish and intense colors. Interaction constants between the anthocyanin and the different phenolic compounds were obtained, ranging from $9.72 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ for QG to $1.50 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$ for catechin. Hydrophobic interactions and H-bonds are the main driving forces in the pigment/copigment aggregation, except for the interactions where caffeic acid is involved, in which hydrophobic interactions acquire greater preponderance.

KEYWORDS: malvidin-3-O-glucoside, wine phenolic compounds, tristimulus colorimetry, ITC, MD

INTRODUCTION

Anthocyanins, which are phenolic compounds that belong to the flavonoid family (C6–C3–C6), are one of the most important pigments responsible for the red color in many fruits, vegetables, juice, jams, and red wines.^{1,2} Red wines contain different anthocyanins, with malvidin-3-O-glucoside being the most abundant one in young wines, which is usually found in concentrations around 300–500 mg/L.³ The red color of anthocyanins is due to the flavylium cation, which is the stable form at acidic pH (pH \leq 2). However, anthocyanins have a high tendency to undergo alterations in their plane structure by different reactions depending on the pH of the medium, which make them relatively unstable in aqueous solutions.⁴ Hydration reaction, which leads to colorless hemiketal or acid–base equilibria that leads to blue purple quinoidal base, can take place when pH raises, thus decreasing the flavylium cation levels.⁵

The flavylium cation is protected from the nucleophilic attack of water due to copigmentation effect, which consists of a sandwich stacking between the anthocyanin and other organic molecules, known as copigments. This binding is due to noncovalent hydrophobic molecular associations, mainly π – π stacking interactions, between the aromatic nuclei of the colored forms of anthocyanins and copigments.⁶ As a result, the hydration reaction is reduced, which limits the formation of colorless compounds, with copigmentation being responsible for 30–50% of the coloration in red young wines.³ Likewise, self-association is another mechanism to stabilize the red color of the flavylium cation, since anthocyanins can act themselves as copigments, resulting in an increase in the color intensity.^{3,7,8}

Among wine phenolic compounds, flavanoids and hydroxycinnamic acids seem to be the most important compounds that could act as anthocyanin copigments. It is well-known that flavylium cation interacts with flavanols, such as (-)-epicatechin and (+)-catechin, with the former one being a better copigment than the latter.⁹ Likewise, flavanols have shown a great capacity to act as copigments,^{3,10,11} since their pigment–copigment association constants are higher than those found in the flavanol–anthocyanin interactions. However, their quantity in wine is much lower than that of flavanols. With regards to other phenolic compounds, the hydroxycinnamic acids, specially caffeic acid, have also shown a strong copigmentation effect,^{12,13} whereas benzoic acids, like gallic acid, are generally less efficient as copigments.^{3,14}

Copigmentation has been widely studied *via* spectrophotometric methods^{6,15–17} since anthocyanins absorb in the visible range due to their π -conjugated systems. Besides, color characterization in the CIELAB space by differential colorimetry provides a complete colorimetric interpretation of the anthocyanin–copigment interactions, leading to a knowledge about chemistry of the anthocyanin color. However, UV–vis spectroscopy does not allow to characterize the molecular interactions that govern the copigmentation process from a supramolecular point of view.

Special Issue: Highlights of the In Vino Analytica Scientia Conference 2022

Received: December 2, 2022

Revised: January 26, 2023

Accepted: January 26, 2023

Isothermal titration calorimetry (ITC) is an interesting technique that allows for the determination of thermodynamic parameters (ΔG , K , ΔH , and ΔS), in order to study binding mechanisms in supramolecular systems. This technique makes possible to measure the changes of energy that occurs by reversible interactions,^{18–20} even when the interactions are weak or in low affinity systems.^{21,22} Likewise, molecular dynamics (MD) simulation allows for the estimation of binding energies values and the stability of the resulting complexes using model systems to better understand the interactions between different molecules, which makes MD simulations a very useful computational method that can be employed to complement experimental works.

Thus, the objective of this study was to analyze, for the first time, the interaction of the flavylum cation with different phenolic compounds already known as copigments from a supramolecular point of view. Also, this work aimed to establish relationships between the color changes expressed by the flavylum form of Mv3G and the strength of the interaction, the forces involved, and the characteristics of complexes formed. To do this, the interactions between Mv3G and different phenolic compounds (PC), namely, a flavonol (quercetin 3-*O*- β -glucopyranoside (QG)), two flavanols ((-)-epicatechin (E) and (+)-catechin (C)), an hydroxycinnamic acid (caffeic acid (CA)), and an hydroxybenzoic acid (gallic acid (GA)) were analyzed by using UV–vis spectroscopy, ITC, and MD simulations.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Quercetin 3-*O*- β -glucopyranoside ($\geq 99\%$) was purchased from Cymit Quimica (Barcelona, Spain). (-)-Epicatechin ($\geq 90\%$) and (+)-catechin hydrate ($\geq 98\%$) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Caffeic acid ($\geq 99\%$) was purchased from ACROS organics (Morris Plains, New Jersey) and gallic acid ($\geq 98\%$) was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Gradient water purification system (Millipore, Billerica, MA). The pigment malvidin-3-*O*-glucoside was isolated in the laboratory as is explained below.

Isolation of Malvidin-3-*O*-Glucoside. Mv3G was isolated from skins of *Vitis vinifera* cv Tempranillo grapes. Grape skins were extracted by using acidic methanol (methanol/HCl 0.5 N; 95:5 v/v), as described in García-Estévez et al.²³ In order to purify the Mv3G, the residue was loaded on a Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) column, previously conditioned with acidic water as eluent using aqueous HCl (0.1 M, pH 1.0) as described by García-Estévez et al. with minor modifications.²⁴ Briefly, elution was carried out using the aqueous HCl solution, and the first fraction (ca. 20 mL) was collected, which corresponded to Mv3G. This process was repeated to obtain several fractions. The purity of these fractions was checked by HPLC–DAD–MS, and those showing purity higher than 95% were gathered and then freeze-dried to furnish a dark reddish-purple powder.

Model Solutions. All model solutions were prepared at acidic medium (pH 1.1). The pigment concentration was the same in all cases (50 μM), which was selected to minimize self-association effect. Five solutions based on binary combinations of Mv3G with quercetin 3-*O*- β -glucopyranoside (Mv3G/QG), caffeic acid (Mv3G/CA), (-)-epicatechin (Mv3G/E), (+)-catechin hydrate (Mv3G/C), and gallic acid (Mv3G/GA) were prepared at two different pigment/phenolic compound (PC) molar ratios (1:1 and 1:2) to evaluate the effect of the PC concentration. A reference solution of the anthocyanin at the same pH was also prepared. All solutions were prepared in triplicate and stored in darkness at 25 °C for 2 h to reach equilibrium.

Color Analysis. Absorption spectra (190–1100 nm) of the above solutions were recorded on a Hewlett-Packard UV–vis HP3853

spectrophotometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) at constant intervals ($\Delta\lambda = 1 \text{ nm}$), using 10 mm path length quartz cells and acidic water (pH 1.1) as a reference. The analysis of color was studied from the visible spectra (380–770 nm) data, using a CIE 1964 standard observer (10 visual field) and a CIE standard illuminant D65 as references. The CIELAB color parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , and h^*_{ab}) were calculated using the software Cromalab (University of Sevilla, Sevilla, Spain).²⁵

Color differences between the reference solution of the anthocyanin and the binary pigment:PC solutions (ΔE^*_{ab}) were also calculated using the CIELAB color difference equation: $\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$, where ΔL^* , Δa^* , and Δb^* are the differences between the CIELAB parameters. The colorimetric effect of the interactions over the storage period was evaluated by differential colorimetry according to Gordillo et al.^{16,17}

In addition, ΔL^* , ΔC^*_{ab} , and Δh^*_{ab} absolute attributes were also calculated to evaluate the trend of color changes produced. The relative contribution of each color attribute for total color differences was calculated as follows:^{16,17}

$$\% \Delta L = [(\Delta L^*) / (\Delta E^*_{ab})] \times 100$$

$$\% \Delta C = [(\Delta C^*_{ab}) / (\Delta E^*_{ab})] \times 100$$

$$\% \Delta H = [(\Delta H) / (\Delta E^*_{ab})] \times 100$$

The ΔH value was deduced from $\Delta H = [\Delta E^*_{ab} - ((\Delta L)^2 + (\Delta C)^2)^{1/2}]$

Isothermal Titration Calorimetry Assays. ITC experiments were carried out by using a MicroCal PEAQ-ITC system (Malvern, U.K.) in order to obtain the thermodynamic parameters associated with pigment/PC interactions. In all cases, the PC solutions were loaded into the injection syringe, whereas the pigment solution was placed into the 0.2 mL sample cell of the calorimeter, being the content of the sample cell constantly stirred at 750 rpm throughout the experiment. Each assay consisted on a sequence of 19 injections of 2 μL each one, with the time of the injection duration and the time between the successive injections set as 4 and 150 s, respectively. Interactions were studied at 298 K. All solutions were prepared at pH 1.1 at the following concentrations: 200 μM Mv3G/250 μM QG; 400 μM Mv3G/3.000 μM CA; 800 μM Mv3G/10.000 μM E; 1.000 μM Mv3G/10.000 μM C; and 1.000 μM Mv3G/10.000 μM GA. These concentrations were selected to achieve the saturation of the process and enough energy signal recorded. Blank experiments, where the sample cell was filled with acidic water (pH 1.1), were also conducted for each compound at all concentrations previously assayed. All experiments were performed in triplicate.

The software AFFINimeter (Software for Science Developments, Santiago de Compostela, Spain) was used for data treatment. This software allowed us, by using the stoichiometric equilibria model, to obtain the fitting curve (enthalpy change vs molar ratio), as well as the binding apparent constant (K), the Gibbs free energy (ΔG), the enthalpy change (ΔH), and the entropy component ($-T \Delta S$).

Molecular Modeling and Molecular Dynamics (MD) Simulations. The GaussView software²⁶ was used to build the flavylum cation structure of the Mv3G and the different phenolic compounds (PC) assayed. Each system was composed by 5 Mv3G and 11 PC molecules (5:11 pigment/phenolic compound) to reproduce the conditions used in the previous experiments. All compounds were randomly positioned, with a minimum distance between them of 15 Å. An explicit solvation model with pre-equilibrated TIP3P water molecules was used, filling a truncated rectangular box with a minimum distance of 15 Å between the box faces and any atom of each system. The Amber 12 simulation package²⁷ was used to carry out the optimizations and MD simulations. General AMBER force field (GAFF)²⁸ parameters were assigned using the antechamber module with RESP charges²⁹ at the HF/6-31G* level. Similar parameters for malvidin 3-*O*-glucoside, quercetin, caffeic acid, gallic acid, catechin, and epicatechin were used in previous studies.^{20,30–32} Each starting system was minimized and equilibrated for 100 ps, followed by 100 ns of production MD simulation. To increase the

Table 1. CIELAB Color Parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , and h_{ab}) as well as ΔE^*_{ab} and λ_{max} Determined for the Anthocyanin and Each Pigment/PC Solution at Two Different Molar Ratios (1:1, 1:2)^a

	L^*	a^*	b^*	C^*_{ab}	h_{ab}	ΔE^*_{ab}	λ_{max}
Mv3G control	78.5 ± 0.3	46.0 ± 0.6	1.7 ± 0.2	46.1 ± 0.6	2.1 ± 0.3		520
Mv3G/QG	78.0 ± 0.2	45.3 ± 0.2	-1.6 ± 0.2*	45.4 ± 0.2	-2.1 ± 0.2*	3.41 ± 0.15 ^a	521
Mv3G/QG ₂	77.6 ± 0.1*	44.8 ± 0.2*	-4.2 ± 0.1**	45.0 ± 0.2*	-5.4 ± 0.2**	6.11 ± 0.17 ^a	523
Mv3G/CA	79.0 ± 0.4	45.6 ± 0.6	1.3 ± 0.2	45.6 ± 0.6	1.6 ± 0.2	0.84 ± 0.62 ^b	520
Mv3G/CA ₂	79.1 ± 0.5	45.8 ± 1.2	1.1 ± 0.4	45.8 ± 1.2	1.3 ± 0.5	1.33 ± 0.60 ^{bc}	519
Mv3G/E	79.2 ± 0.2*	44.9 ± 0.4	1.2 ± 0.1	44.9 ± 0.4	1.6 ± 0.2	1.36 ± 0.41 ^b	519
Mv3G/E ₂	79.1 ± 0.2*	45.4 ± 0.9	1.4 ± 0.2	45.5 ± 0.9	1.8 ± 0.2	1.09 ± 0.39 ^{bc}	520
Mv3G/C	79.1 ± 0.6	45.9 ± 1.4	1.8 ± 0.4	46.0 ± 1.4	2.2 ± 0.4	1.32 ± 0.64 ^b	520
Mv3G/C ₂	79.1 ± 0.2	46.0 ± 0.3	1.7 ± 0.1	46.0 ± 0.3	2.1 ± 0.2	0.67 ± 0.20 ^c	519
Mv3G/GA	79.2 ± 0.3*	46.3 ± 1.0	1.8 ± 0.4	46.4 ± 1.0	2.3 ± 0.4	1.14 ± 0.38 ^b	520
Mv3G/GA ₂	79.5 ± 0.2*	44.7 ± 0.4	1.3 ± 0.0	44.7 ± 0.4	1.7 ± 0.0	1.72 ± 0.38 ^b	520

^aAn asterisk within each column indicates statistical differences between that solution and the Mv3G control. Two asterisks within each column indicates statistical differences between the two molar ratios assayed for each PC ($p < 0.05$). Different letters within ΔE^*_{ab} column indicates statistical differences ($p < 0.05$).

sampling, three replicates, starting from different initial velocities, were simulated for each Mv3G/PC system. The pressure and the temperature of the systems were controlled by using the Berendsen barostat and the Langevin thermostat.³³ The SHAKE algorithm³⁴ was employed to constrain the bond lengths involving hydrogen atoms. Periodic boundary conditions were considered. Nonbonded interaction pairs were calculated within 10 Å. Beyond that, Coulomb interactions were treated with the Particle-Mesh Ewald (PME) method,³⁵ and vdW interactions were truncated. The MD trajectories were analyzed with the CPPTRAJ module³⁶ of AMBER 12.0 simulations package, combined with the visual molecular dynamics (VMD 1.9.2) program for visualization, analysis, and image rendering.³⁷

The prevalent Mv3G/PC (1:1 complex) of each system was used as starting geometry of a further MD simulation to better understand the interaction mode between the two molecules. The binding energy of each Mv3G/PC complex was determined using the molecular mechanics/Poisson–Boltzmann surface area (MM/PBSA) approach.^{37,38} A total of 100 structures of each MD simulation were used for the analysis. The results are shown as the relative enthalpic binding energies ($\Delta\Delta H_{binding}$) with respect to the most stable geometry.

Statistical Analysis. The statistical significance of the differences between the results from the colorimetric analysis were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) and posthoc Tukey test using the software packing for Windows IBM SPSS 26 (SPSS, Inc. Chicago, IL). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Color Assays. Binary solutions containing Mv3G and PC at two different molar ratios (1:1; 1:2) were prepared at pH 1.1 to evaluate the effect of the Mv3G/PC interaction on the color of the anthocyanin flavylium cation. At this pH, the colored flavylium cation predominates and the determination of the CIELAB parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , and h_{ab}) would allow us to evaluate possible changes of color due to these interactions in relation to the pure anthocyanin.

Table 1 shows the CIELAB color parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , and h_{ab}) determined for the Mv3G control solution and for the Mv3G/PC solutions after 2 h of preparation. L^* value corresponds to the lightness of the solutions and varies from 0 to 100, (black and white color, respectively); a^* and b^* are chromaticity scalar coordinates where a^* axis is labeled from red (+ a^*) to green (- a^*) color for positive and negative values, respectively, and b^* axis from yellow (+ b^*) to blue (- b^*). From the chromaticity, other coordinates can be defined, specifically chroma (C^*_{ab}), which is a quantitative

attribute of color, and the hue angle (h_{ab}), which is a qualitative attribute.

It can be observed that L^* values were higher for the Mv3G/CA, Mv3G/E, Mv3G/C, and Mv3G/GA solutions than that found in the Mv3G control solution at both molar ratios, suggesting a clearing effect with significant differences in the case of Mv3G/E and Mv3G/GA solutions (Table 1). However, Mv3G/QG solution showed the lowest L^* values, denoting a darkest color, especially in the ratio 1:2, which showed significant differences with respect to Mv3G control (Table 1). Regarding a^* , b^* , C^*_{ab} , and h_{ab} parameters, there were only considerable differences between the color of Mv3G/QG solutions and the Mv3G control. As for the a^* parameter, it took positive values, which can be related to the reddish color area, only showing significant differences ($p < 0.05$) between the anthocyanin and the Mv3G/QG₂ solution. Changes were also observed for b^* parameter, where Mv3G/QG and Mv3G/QG₂ interactions resulted in the smallest and the most negative values of b^* , showing color changes that denoted a more bluish color. More negative values were obtained for the ratio 1:2, which means that the flavylium cation undergoes a stronger color shift toward bluish colors as the QG concentration increases (Table 1).

C^*_{ab} values were slightly lower in the solutions containing phenolic compounds than in the Mv3G control solution, although differences were significant only when compared to the solution containing QG in a ratio 1:2 (Table 1). Values for C^*_{ab} were in concordance with a^* parameters. Thus, it seems that color purity slightly decreases after the addition of the different phenolic compounds. The h_{ab} values followed the same trend that b^* parameter, showing significant differences only in the solutions containing QG, where negative values were determined at both ratios (Table 1).

In summary, the addition of QG to the Mv3G solutions at pH 1.1 had the highest effect on the color parameters studied. L^* , b^* , and h_{ab} values diminished, denoting a darkest and more bluish color in the Mv3G solutions in the presence of QG. These could mean that the interaction between the flavylium cation of Mv3G and the aromatic rings of QG extends the conjugation through all the bimolecular system. It is known that lengthen a conjugated system with multiple bonds in a molecule leads to shift the absorption to longer wavelengths.³⁹ In fact, the λ_{max} for QG solutions changed from 520 (Mv3G control solution) to 523 nm in the case of Mv3G/QG₂ (Table

1), which means a bathochromic shift corresponding to a color change from red to more bluish. A bathochromic shift has also been reported in solutions containing malvidin 3,5-di-*O*- β -D-glucoside and 7-*O*-sulfoquercetin at pH 1.³

As for the other PC assayed, only the L^* parameter showed differences and it moved toward higher values, denoting an evolution to the solutions toward achromatic colors, which could indicate that, due to the interaction, the complex involving the flavylium cation and these PC would show lower molar absorption coefficients than the free flavylium form.

To assess if the changes observed in color parameters were high enough to allow the discrimination by the human eye, color differences between control (Mv3G) and Mv3G/PC solutions were calculated. It is generally accepted that values of ΔE^*_{ab} higher than three units are visually detectable.⁴⁰ The color differences (ΔE^*_{ab}) determined here (Table 1) were not visually distinguished after the addition of the phenolic compounds except in the case of Mv3G/QG solutions, which showed values exceeding three units, which were more perceptible in the ratio 1:2 (6.11 units). The relative contributions of lightness (% ΔL), chroma (% ΔC), and hue (% ΔH) to color differences were also calculated for better analyzing the trend of the changes in the color attributes.¹⁶ The results showed quantitative and qualitative changes in color (Figure S1 in the Supporting Information). At the studied pH, a clear predominance of the qualitative contribution to the absolute difference of color is evidenced, with significantly higher contribution of hue % ΔH (93.1% and 94.3% for Mv3G/QG and Mv3G/QG₂, respectively) with respect to lightness % ΔL or chroma % ΔC (between *ca.* 2.5–4.5%).

Hence, in our study, results pointed out that the color of flavylium cation solutions (pH 1) can be modified with the presence of QG, but not with C, E, CA, or GA. These observations lead to two possible alternatives: (i) the flavylium cation only interacts with QG (and not with C, E, CA, or GA; which would be against the current knowledge about the copigmentation effect) or (ii) the QG structure allows for interactions that change the Mv3G/QG electronic environment in a sensitive color way, but it does not occur in the Mv3G/C, Mv3G/E, Mv3G/CA, or Mv3G/GA interactions.

Isothermal Titration Calorimetry. Isothermal titration calorimetry (ITC) has been employed to study the interactions between anthocyanin and the different phenolic compounds, since it is a successfully demonstrated technique for the characterization of molecular interactions.^{20,41–45} ITC experiments allowed us to obtain the thermodynamic parameters, i.e., free Gibbs energy change (ΔG), apparent binding constant (K), enthalpy variation (ΔH), and entropy variation (ΔS) of each anthocyanin/PC interaction that in turn allowed us to obtain the driving forces involved in them (Table 2).

As can be seen in Table 2, all the ΔG values are negative, which indicates that spontaneous interactions are taking place in all the systems studied, and therefore, all PC studied interact with the flavylium cation of Mv3G. It is worth noting that the most negative value of ΔG is found in the samples containing Mv3G and QG, which suggests that, from the phenolic compounds studied, QG could be the one with the highest affinity for Mv3G. This is corroborated by the values of the affinity constant (K), which were notably higher for QG than for the other PC. According to K values, the affinity of Mv3G for the studied phenolic compounds was QG > CA > E > GA > C. These results are in agreement with those published by

Table 2. Thermodynamic Parameters Determined by ITC for each Interaction Mv3G/PC, at pH 1.1

	ΔG (cal·mol ⁻¹)	K (M ⁻¹)	ΔH (cal·mol ⁻¹)	$-T \cdot \Delta S$ (cal·mol ⁻¹)
Mv3G/QG	-1.22×10^4	9.72×10^8	-4.01×10^3	-8.23×10^3
Mv3G/QG ₂	-2.44×10^4	8.40×10^{17}	-1.36×10^2	-2.43×10^4
Mv3G/CA	-5.59×10^3	1.27×10^4	-1.39×10^1	-5.58×10^3
Mv3G/CA ₂	-1.03×10^4	3.85×10^7	2.74×10^2	-1.06×10^4
Mv3G/E	-4.50×10^3	2.01×10^3	-2.56×10^2	-4.24×10^3
Mv3G/E ₂	-8.96×10^3	3.78×10^6	-1.50×10^2	-8.81×10^3
Mv3G/C	-2.96×10^3	1.50×10^2	-2.65×10^3	-3.19×10^2
Mv3G/C ₂	-5.88×10^3	2.08×10^4	-3.16×10^3	-2.72×10^3
Mv3G/GA	-3.09×10^3	1.86×10^2	-1.19×10^3	-1.90×10^3
Mv3G/GA ₂	-6.42×10^3	5.15×10^4	-1.21×10^3	-5.21×10^3

Zhao et al.,⁴⁶ who reported that the binding capacities of these phenolic compounds follow similar order than the reported herein, thus indicating that ITC results can be compared to those obtained by colorimetry in terms of affinity.

Differences were found for the affinity of Mv3G toward the two phenolic acids studied: the K values for CA were higher than those for GA for the two analyzed ratios. As for flavanols, the K values suggest that E had a greater affinity toward Mv3G than C.

Regarding the type of forces involved, when the ΔH values are positive and $-T \cdot \Delta S$ are negative, hydrophobic interactions are the main forces, whereas there is a hydrogen bonding prevalence when the ΔH data is negative and $-T \cdot \Delta S$ has positive values. Both forces, hydrophobic interactions and hydrogen bonds (H-bonds), would take place when both ΔH and $-T \cdot \Delta S$ are negative.⁴⁴ On the basis of the results obtained, in general, the interactions involve both type of forces, H-bonds and hydrophobic bonds, with a slight prevalence of the latter ones.

Molecular Dynamics (MD) Simulations. MD simulations were also used to assess the interaction between the flavylium form of the pigment Mv3G and the PC assayed. The complexes formed were assessed by a cluster analysis of each MD simulation, in which all geometries were collected using the root-mean square deviation of all heavy atoms of the Mv3G as metric (as they are the common molecules of all systems). Only the geometries with frequency higher than 5% along the MD simulation were considered for further analysis.

Table 3 shows the number and nature of the complexes 1:1 to 1:4 and 2:1 to 2:4 pigment/PC obtained from all MD simulations. The larger number of 1:1 and 1:2 pigment/PC

Table 3. [Mv3G]_n/[PC]_n Complexes Formed Throughout the MD Simulations (geometries with a frequency >5%)

pigment/PC	1:1	1:2	1:3	1:4	2:1	2:2	2:3	2:4
Mv3G/caffeic acid	7	6	1	0	2	2	1	1
Mv3G/galic acid	5	6	3	2	1	1	3	2
Mv3G/catechin	7	10	1	0	0	3	2	2
Mv3G/epicatechin	6	9	2	2	1	1	2	0
Mv3G/quercetin	4	2	3	2	1	0	1	1

Table 4. Binding Energy Values (cal/mol) for the Mv3G/PC Complexes of All Systems^a

PC	van der Waals	electrostatic	polar solvation	nonpolar solvation	$\Delta H_{\text{binding}}$
caffeic acid	$(-11.09 \pm 0.23) \times 10^3$	$(-0.74 \pm 0.13) \times 10^3$	$(2.33 \pm 0.11) \times 10^3$	$(4.04 \pm 0.16) \times 10^3$	$(-5.47 \pm 0.19) \times 10^3$
gallic acid	$(-10.76 \pm 0.15) \times 10^3$	$(-0.91 \pm 0.08) \times 10^3$	$(2.34 \pm 0.08) \times 10^3$	$(3.83 \pm 0.11) \times 10^3$	$(-5.50 \pm 0.15) \times 10^3$
catechin	$(-16.12 \pm 0.23) \times 10^3$	$(-1.51 \pm 0.12) \times 10^3$	$(3.36 \pm 0.10) \times 10^3$	$(5.66 \pm 0.14) \times 10^3$	$(-8.61 \pm 0.22) \times 10^3$
epicatechin	$(-17.69 \pm 0.19) \times 10^3$	$(-1.29 \pm 0.12) \times 10^3$	$(3.20 \pm 0.10) \times 10^3$	$(5.86 \pm 0.12) \times 10^3$	$(-9.92 \pm 0.18) \times 10^3$
quercetin	$(-20.58 \pm 0.19) \times 10^3$	$(-1.07 \pm 0.09) \times 10^3$	$(3.45 \pm 0.07) \times 10^3$	$(6.73 \pm 0.09) \times 10^3$	$(-11.46 \pm 0.19) \times 10^3$

^aEnergy values are in cal/mol.

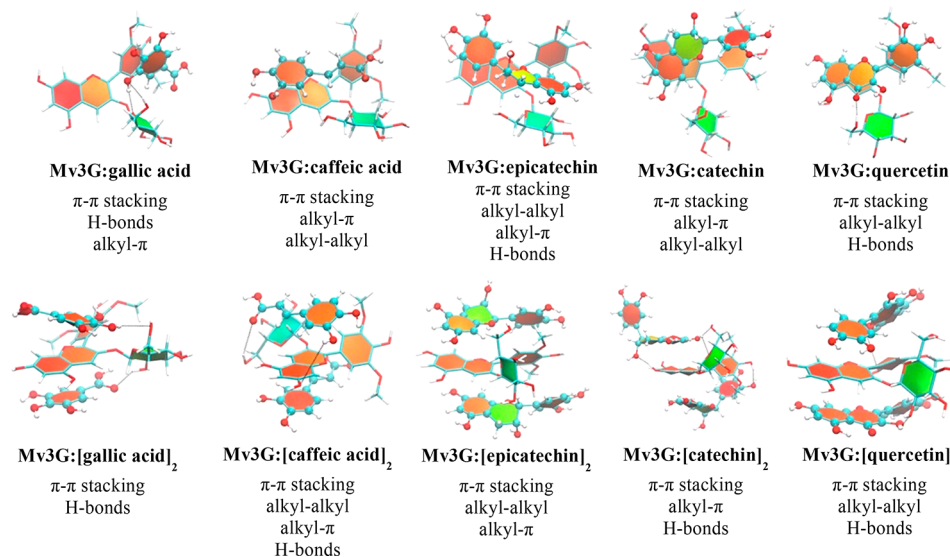


Figure 1. Representation of the most frequent 1:1 complexes pose using the Mv3G as pigment and the GA, CA, C, E, and QG as PC molecules. Mv3G is represented with sticks, while the PC are depicted in balls-and-sticks. All molecules are colored by atom type, with the aromatic and nonaromatic rings of the compounds being colored in orangish and green, respectively. Some H-bonds are also indicated as dashed lines.

aggregates formed suggest a tendency of these molecules to build the stacking complexes. In addition, the formation of PC/PC complexes were observed in all simulations (mainly in the systems with the CA molecules, see [Table S1 of the Supporting Information \(SI\)](#)). Regarding the Mv3G/Mv3G aggregates, they were formed in the simulations with the GA and E, less frequent in the systems with the CA and C, and inexistent in the simulations with the quercetin molecules (see [Table S1 of the Supporting Information](#)). This could mean preferential interaction between the Mv3G and the PC than between two molecules of the pigment (autoassociation).

In addition, MD simulations with 1:1 copigmentation complexes were carried out to assess the binding modes of the various PC to the Mv3G. [Table 4](#) displays the binding energies of each Mv3G/PC complex, while [Figure 1](#) illustrates the representative structure of the most frequent binding pose throughout each MD simulation. The main intermolecular interactions of each complex were also evidenced.

Concerning the enthalpic binding energies ([Table 4](#)), the highest absolute value was found for quercetin. Then, the affinity order to the Mv3G of the other PC molecules assayed was $E \approx C > GA \approx CA$. The presence of more than one aromatic ring in quercetin, epicatechin, and catechin may explain their higher binding affinity and highlights the importance of the π stacking interactions. This computed ranking is rather in line with the ITC results, in which quercetin was by far the compound with the highest affinity to Mv3G. As in ITC results, this could explain the colorimetric studies, in which quercetin caused significant color differences with respect to the control. It was also confirmed that the van

der Waals forces were the main contributors to the binding energies ([Table 4](#)). Besides, the analysis of the intermolecular interactions of all complexes indicated the nonpolar and dispersive contacts as the main driving forces for the interaction of the five PC. In particular, π - π stacking between the aromatic rings of all polyphenolic molecules as well as the alkyl-alkyl interactions involving the methyl groups of Mv3G are present in all pigment/PC complexes. The exception was found in the complexes with gallic acid that did not make pronounced alkyl-alkyl contacts ([Figure 1](#)). Overall, this data agrees with other copigmentation studies involving anthocyanins, in which the π - π stacking and hydrophobic bonds have clearly been identified as driving forces of copigmentation.³ For example, previous MD simulations also pointed out the π - π stacking and van der Waals contacts as essential to drive the copigmentation between the large planar surfaces of the pigments (Mv3G or the malvidin-3,5-diglucoside) and copigments such as vinylcatechin dimers and catechin derivatives.^{47,48}

Additionally, the MD results indicated that alkyl- π interactions were also relevant for the complexes with the caffeic acid, catechin, and epicatechin molecules ([Figure 1](#)). The CHCH moiety between the ring and the carboxylic group of CA promotes both alkyl-alkyl and alkyl- π contacts, while the B ring of C and E interacts with the glucose unit of the Mv3G. This type of interaction was not observed in the complexes involving quercetin, which mainly interact with the Mv3G by aromatic stacking involving their A, C, and B rings. Its double bond between C2-C3 reduces the B ring degrees of freedom, and subsequently, it sterically favors the π - π

stacking. Furthermore, the negative quadrupole of the A ring would be reduced by the electron-withdrawing group in C-4, favoring sandwich and parallel displaced conformations over T-shaped configuration,⁴⁹ as can be observed in Figure 1. This would allow for extending a highly conjugated π -bonding system that changes the visible light absorption of the system to longer wavelengths and that explains the bluish of the cation flavylum solutions evidenced in the colorimetric studies.

H-bonds are also important contacts for the interaction ability of these molecules. These hydrophilic interactions are noteworthy and short (lengths of 1.9–2.5 Å) in the complexes with gallic acid, highlighting the importance and subsequent contribution of the vicinal hydroxyl groups of its aromatic ring to the interaction ability.

Thus, the interaction binding mode obtained here for the Mv3G/C complex was similar to the three more favorable orientations described by Nave et al. for the 3-O-methylmalvidin/catechin complex.⁵⁰ In addition, the binding mode for the malvidin 3-O-glucoside/querceetin complex was quite similar to the one depicted by a recent conformational quantum mechanics study. Like us, these authors also pointed out that the intermolecular ring-stacking and H-bonds play an important role in the malvidin 3-O-glucoside/querceetin stabilization.⁵¹

As conclusion remarks, the results show that, among the five PC studied in this work, the more stable interaction and the highest binding affinity was found between the flavylum cation and QG. The color of Mv3G solutions at acidic pH changed to darker colors and to bluish hues due to the presence of QG in the solutions, which is mainly related to a bathochromic shift in the flavylum band, more important when the QG concentration is increased. As for the other PC assayed, their effect on the color of flavylum form of Mv3G is less noticeable, just affecting the lightness of the solutions in the case of E and GA. The studies by ITC, which were in accordance with the results obtained in the MD simulations, pointed out that, among the PC assayed, the strongest interaction occurs between Mv3G and QG. This may be the reason why the presence of QG in the solutions provided the most important color differences. It was also observed that E has major binding affinity toward Mv3G than C, which could explain why significant differences of lightness regarding Mv3G control were just observed due to the presence of E. With regards to the type of forces, hydrophobic interactions and H-bonds are involved in all pigment/PC aggregates except for Mv3G/CA₂, which is dominated by hydrophobic interactions.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.2c08502>.

Figure of relative contribution of lightness (% ΔL), chroma (% ΔC), and hue (% ΔH) to the total color differences for each pigment/copigment at molar ratio 1:1 and 1:2 and table of [Mv3G]_n: [PC]_n complexes formed throughout the MD simulations (geometries with a frequency >5%) (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

María Teresa Escribano-Bailón – Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Departamento de Química Analítica,

Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca E37007, Spain; orcid.org/0000-0001-6875-2565; Phone: +34 677596272; Email: escriban@usal.es

Authors

Bárbara Torres-Rochera – Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca E37007, Spain; orcid.org/0000-0002-7911-0047

Elvira Manjón – Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca E37007, Spain; orcid.org/0000-0001-5682-3143

Natércia F Brás – LAQV, REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 4169-007 Porto, Portugal; orcid.org/0000-0002-3130-9807

Ignacio García-Estévez – Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca E37007, Spain; orcid.org/0000-0001-8794-8328

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.jafc.2c08502>

Funding

This research was financially supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (Project PID2021-127126OB-C21). E.M. thanks Junta de Castilla y León-FEDER Programme (Project ref. SA0093P20) her postdoctoral contract. B.T.-R. thanks Spanish MICINN for FPI contract ref PRE2018–084209. N.F.B. thanks FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia) for her CEEC grant (CEECIND/02017/2018).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ REFERENCES

- (1) Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A. R.; Paredes-López, O. Natural Pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains — Characteristics, Biosynthesis, Processing, and Stability. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, *40* (3), 173–289.
- (2) González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, T. Colour Implications of Self-Association Processes of Wine Anthocyanins. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226* (3), 483–490.
- (3) Trouillas, P.; Sancho-García, J. C.; De Freitas, V.; Gierschner, J.; Otyepka, M.; Dangles, O. Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (9), 4937–4982.
- (4) Brouillard, R. Chemical Structure of Anthocyanins. In *Anthocyanins As Food Colors*; Elsevier, 1982; pp 1–40.
- (5) Escribano-Bailón, T.; Alvarez-García, M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Heredia, F. J.; Santos-Buelga, C. Color and Stability of Pigments Derived from the Acetaldehyde-Mediated Condensation between Malvidin 3-O-Glucoside and (+)-Catechin. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49* (3), 1213–1217.
- (6) González-Manzano, S.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C. Studies on the Copigmentation between Anthocyanins and Flavan-3-Ols and Their Influence in the Colour Expression of Red Wine. *Food Chem.* **2009**, *114* (2), 649–656.

- (7) Hoshino, T. Self-Association of Flavylum Cations of Anthocyanidin 3,5-Diglucosides Studied by Circular Dichroism and ¹H NMR. *Phytochemistry* **1992**, *31* (2), 647–653.
- (8) Escribano-Bailón, M. T.; Santos-Buelga, C. Anthocyanin Copigmentation - Evaluation, Mechanisms and Implications for the Colour of Red Wines. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16* (6), 715.
- (9) Brouillard, R.; Wigand, M.-C.; Dangles, O.; Cheminat, A. PH and Solvent Effects on the Copigmentation Reaction of Malvin with Polyphenols, Purine and Pyrimidine Derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1991**, *2* (8), 1235–1241.
- (10) Baranac, J. M.; Petranović, N. A.; Dimitrić-Marković, J. M. Spectrophotometric Study of Anthocyan Copigmentation Reactions. 2. Malvin and the Nonglycosidized Flavone Quercetin. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (5), 1694–1697.
- (11) 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. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54* (15), 5422–5429.
- (12) Darias-Martín, J.; Carrillo, M.; Díaz, E.; Boulton, R. B. Enhancement of Red Wine Colour by Pre-Fermentation Addition of Copigments. *Food Chem.* **2001**, *73* (2), 217–220.
- (13) Darias-Martín, J.; Martín-Luis, B.; Carrillo-López, M.; Lamuela-Raventós, R.; Díaz-Romero, C.; Boulton, R. Effect of Caffeic Acid on the Color of Red Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (7), 2062–2067.
- (14) Eiro, M. J.; Heinonen, M. Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50* (25), 7461–7466.
- (15) Lambert, S. G.; Asenstorfer, R. E.; Williamson, N. M.; Iland, P. G.; Jones, G. P. Copigmentation between Malvidin-3-Glucoside and Some Wine Constituents and Its Importance to Colour Expression in Red Wine. *Food Chem.* **2011**, *125* (1), 106–115.
- (16) Gordillo, B.; Rodríguez-Pulido, F. J.; Escudero-Gilete, M. L.; González-Miret, M. L.; Heredia, F. J. Comprehensive Colorimetric Study of Anthocyanic Copigmentation in Model Solutions. Effects of PH and Molar Ratio. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60* (11), 2896–2905.
- (17) Gordillo, B.; Rodríguez-Pulido, F. J.; González-Miret, M. L.; Quijada-Morín, N.; Rivas-Gonzalo, J. C.; García-Estévez, I.; Heredia, F. J.; Escribano-Bailón, M. T. Application of Differential Colorimetry to Evaluate Anthocyanin-Flavonol-Flavanol Ternary Copigmentation Interactions in Model Solutions. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 7645–7653.
- (18) Frazier, R. A.; Deaville, E. R.; Green, R. J.; Stringano, E.; Willoughby, I.; Plant, J.; Mueller-Harvey, I. Interactions of Tea Tannins and Condensed Tannins with Proteins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51* (2), 490–495.
- (19) Frazier, R. A.; Papadopolou, A.; Green, R. J. Isothermal Titration Calorimetry Study of Epicatechin Binding to Serum Albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41* (5), 1602–1605.
- (20) Ramos-Pineda, A. M.; García-Estévez, I.; Brás, N. F.; Martín Del Valle, E. M.; Dueñas, M.; Escribano Bailón, M. T. Molecular Approach to the Synergistic Effect on Astringency Elicited by Mixtures of Flavanols. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (31), 6425–6433.
- (21) Turnbull, W. B.; Daranas, A. H. On the Value of c: Can Low Affinity Systems Be Studied by Isothermal Titration Calorimetry? *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (48), 14859–14866.
- (22) Holdgate, G. Isothermal Titration Calorimetry and Differential Scanning Calorimetry. *Ligand-Macromolecular Interactions in Drug Discovery* **2009**, *572*, 101–133.
- (23) García-Estévez, I.; Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M. T. Flavanol Quantification of Grapes via Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. Application to Differentiation among Clones of *Vitis Vinifera* L. Cv. Rufete Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (31), 6359–6368.
- (24) 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 Pigment. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (47), 11560–11568.
- (25) Heredia, F. J.; Álvarez, C.; González-Miret, M. L.; Ramírez, A. Cromalab, Análisis de Color. *Resigro General de La Propiedad* **2004**.
- (26) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Fox, D. J. *Gaussian 09*; Gaussian, Inc.: Wallingford CT, 2009.
- (27) Case, D. A.; Darden, T. A.; Cheatham, T. E., III; Simmerling, C. L.; Wang, J.; Roe, D. R.; Duke, R. E.; Luo, R.; Walker, R. C.; Zhang, W.; Merz, K. M.; Roberts, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Swails, J.; Götz, A. W.; Kolossváry, I.; Wong, K. F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wolf, R. M.; Liu, J.; Wu, X.; Brozell, S. R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Cai, Q.; Ye, X.; Wang, J.; Hsieh, M.-J.; Cui, G.; Mathews, D. H.; Seetin, M. G.; Salomon-Ferrer, R.; Sagui, C.; Babin, V.; Luchko, T.; Gusarov, S.; Kovalenko, A.; Kollman, P. A. *AMBER 12*; University of California, San Francisco, 2012.
- (28) Wang, J.; Wolf, R. M.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A.; Case, D. A. Development and Testing of a General Amber Force Field. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25* (9), 1157–1174.
- (29) Bayly, C. I.; Cieplak, P.; Cornell, W. D.; Kollman, P. A. A Well-Behaved Electrostatic Potential Based Method Using Charge Restraints for Deriving Atomic Charges: The RESP Model. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97* (40), 10269–10280.
- (30) Han, F.; Oliveira, H.; Brás, N. F.; Fernandes, I.; Cruz, L.; De Freitas, V.; Mateus, N. In Vitro Gastrointestinal Absorption of Red Wine Anthocyanins – Impact of Structural Complexity and Phase II Metabolization. *Food Chem.* **2020**, *317*, 126398.
- (31) Ferrer-Gallego, R.; Quijada-Morín, N.; Brás, N. F.; Gomes, P.; de Freitas, V.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Escribano-Bailón, M. T. Characterization of Sensory Properties of Flavanols—A Molecular Dynamic Approach. *Chem. Senses* **2015**, *40* (6), 381–390.
- (32) Ferrer-Gallego, R.; Hernández-Hierro, J. M.; Brás, N. F.; Vale, N.; Gomes, P.; Mateus, N.; De Freitas, V.; Heredia, F. J.; Escribano-Bailón, M. T. Interaction between Wine Phenolic Acids and Salivary Proteins by Saturation-Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (STD-NMR) and Molecular Dynamics Simulations. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (31), 6434–6441.
- (33) Lzaguirre, J. A.; Catarello, D. P.; Wozniak, J. M.; Skeel, R. D. Langevin Stabilization of Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **2001**, *114* (5), 2090–2098.
- (34) Ryckaert, J. P.; Ciccotti, G.; Berendsen, H. J. C. Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J. Comput. Phys.* **1977**, *23* (3), 327–341.
- (35) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (19), 8577–8593.
- (36) Roe, D. R.; Cheatham, T. E. III. PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data. *J. Chem. Theory Comput* **2013**, *9* (7), 3084–3095.
- (37) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph* **1996**, *14* (1), 33–38.
- (38) Kollman, P. A.; Massova, I.; Reyes, C.; Kuhn, B.; Huo, S.; Chong, L.; Lee, M.; Lee, T.; Duan, Y.; Wang, W.; Donini, O.; Cieplak, P.; Srinivasan, J.; Case, D. A.; Cheatham, T. E. Calculating Structures and Free Energies of Complex Molecules: Combining Molecular Mechanics and Continuum Models. *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33* (12), 889–897.
- (39) Sinnokrot, M. O.; Valeev, E. F.; Sherrill, C. D. Estimates of the Ab Initio Limit for π - π Interactions: The Benzene Dimer. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (36), 10887–10893.
- (40) Martínez, J. A.; Melgosa, M.; Pérez, M. M.; Hita, E.; Negueruela, A. I. Note. Visual and Instrumental Color Evaluation in Red Wines. *Food Sci. Technol. Int.* **2001**, *7* (5), 439–444.
- (41) Poncet-Legrand, C.; Gautier, C.; Cheynier, V.; Imbert, A. Interactions between Flavan-3-Ols and Poly(L-Proline) Studied by Isothermal Titration Calorimetry: Effect of the Tannin Structure. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (22), 9235–9240.

(42) Soares, S.; Santos Silva, M.; García-Estévez, I.; Brandão, E.; Fonseca, F.; Ferreira-da-Silva, F.; Teresa Escribano-Bailón, M.; Mateus, N.; de Freitas, V. Effect of Malvidin-3-Glucoside and Epicatechin Interaction on Their Ability to Interact with Salivary Proline-Rich Proteins. *Food Chem.* **2019**, *276*, 33–42.

(43) García-Estévez, I.; Ramos-Pineda, A. M.; Escribano-Bailón, M. T. Interactions between Wine Phenolic Compounds and Human Saliva in Astringency Perception. *Food Funct* **2018**, *9* (3), 1294–1309.

(44) Manjón, E.; Brás, N. F.; García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M. T. Cell Wall Mannoproteins from Yeast Affect Salivary Protein-Flavanol Interactions through Different Molecular Mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68* (47), 13459–13468.

(45) Blandamer, M. J.; Cullis, P. M.; Engberts, J. B. F. N. Titration Microcalorimetry. *J. Chem. Soc. - Faraday Trans* **1998**, *94* (16), 2261–2267.

(46) Zhao, X.; Ding, B. W.; Qin, J. W.; He, F.; Duan, C. Q. Intermolecular Copigmentation between Five Common 3-O-Monoglucosidic Anthocyanins and Three Phenolics in Red Wine Model Solutions: The Influence of Substituent Pattern of Anthocyanin B Ring. *Food Chem.* **2020**, *326*, 126960.

(47) Cruz, L.; Brás, N. F.; Teixeira, N.; Mateus, N.; Ramos, M. J.; Dangles, O.; De Freitas, V. Vinylcatechin Dimers Are Much Better Copigments for Anthocyanins than Catechin Dimer Procyanidin B3. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58* (5), 3159–3166.

(48) Teixeira, N.; Cruz, L.; Brás, N. F.; Mateus, N.; Ramos, M. J.; de Freitas, V. Structural Features of Copigmentation of Oenin with Different Polyphenol Copigments. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61* (28), 6942–6948.

(49) Sinnokrot, M. O.; Sherrill, C. D. Unexpected Substituent Effects in Face-to-Face π -Stacking Interactions. *Am. Chem. Soc.* **2003**, *107* (41), 8377–8379.

(50) Nave, F.; Brás, N. F.; Cruz, L.; Teixeira, N.; Mateus, N.; Ramos, M. J.; Di Meo, F.; Trouillas, P.; Dangles, O.; De Freitas, V. Influence of a Flavan-3-Ol Substituent on the Affinity of Anthocyanins (Pigments) toward Vinylcatechin Dimers and Proanthocyanidins (Copigments). *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116* (48), 14089–14099.

(51) Li, Y.; Prejanò, M.; Toscano, M.; Russo, N. Oenin and Quercetin Copigmentation: Highlights From Density Functional Theory. *Front. Chem.* **2018**, *6*, 1–9.

Capítulo 2



Estudio químico y colorimétrico de la influencia de los polisacáridos solubles de la uva en el color y la estabilidad de las soluciones de malvidina 3-*O*-glucósido

2.1. Introducción

El color es uno de los principales atributos del vino tinto y está relacionado con la calidad de este, ya que es uno de los principales parámetros de aceptación por los consumidores. Como se ha comentado en el apartado anterior, **Capítulo 1**, el catión flavilio es el responsable del color rojo intenso característico de los vinos tintos jóvenes. Sin embargo, la estructura flavilio es muy inestable debido a su deficiencia de electrones, lo que da lugar a una alta reactividad de los antocianos. A valores de pH ligeramente superiores a pH 2, los antocianos participan en diferentes reacciones dando lugar a diferentes formas estructurales. Por un lado, debido a la desprotonación de los grupos fenol en la estructura del flavilio se generan las bases quinoidales (azules), mientras que la forma hemiacetal (incolora) se produce por hidratación del catión flavilio y su tautomerización lleva a la formación de las formas calconas (amarillas), inmensas en un equilibrio de isomerización (Brouillard & Delaporte, 1977). Aunque el catión flavilio solo es estable a pH ácido ($\text{pH} \leq 2$), mediante el fenómeno de copigmentación es posible mejorar la estabilidad química y, por tanto, colorimétrica de los antocianos, lo que ayuda

Capítulo 2

a obtener colores estables en el vino. Existen diferentes compuestos que pueden actuar como copigmentos: flavonoides como flavonoles y flavanoles; y no flavonoides como los ácidos hidroxicinámicos (Gómez-Míguez et al., 2006). Además, otros compuestos no fenólicos que se pueden encontrar en el vino, como los polisacáridos, también pueden afectar el color del vino.

Los polisacáridos son polímeros de naturaleza biológica constituidos por la unión de 10 o más unidades de azúcares a través de enlaces glucosídicos. Estos compuestos son uno de los principales grupos de macromoléculas presentes en el vino (Jones-Moore et al., 2021), representando concentraciones de 200 a 1500 mg/L. Pueden ser liberados de las paredes celulares de la levadura durante su autólisis, o extraídos de la pared celular de la uva durante la vinificación. En la pared celular de la uva existen tres tipos de polisacáridos: hemicelulosa, celulosa y pectinas (Jones-Moore et al., 2021; Zhang et al., 2021). Los dos últimos representan el 30-40% de los componentes polisacáridos de la pared celular (Nunan et al., 1997), siendo las pectinas las más importantes en la composición del vino, las cuales incluyen, principalmente, homogalacturonanos y ramnogalacturonanos de tipo I y II (Caffall & Mohnen, 2009; Guadalupe et al., 2015). La industria enológica genera, aproximadamente, 110 millones de toneladas de orujos de uva anualmente, lo que supone un problema tanto medioambiental como ecológico para el sector (Apolinar-Valiente et al., 2015). Estos subproductos son ricos en polisacáridos, por lo que su revalorización, a través de la recuperación y reutilización de los polisacáridos que contienen, podrían resultar de gran interés para el sector. Los polisacáridos pueden jugar un papel clave para las propiedades organolépticas de los vinos, principalmente para el color y la astringencia. Los antocianos del vino pueden interactuar con los polisacáridos pécticos, lo que puede afectar directamente a su color (Fernandes, Oliveira, et al., 2020), o favorecer la estabilidad físico-química de los pigmentos, ya que pueden

mejorar su estabilidad coloidal (Jones-Moore et al., 2021) o protegerlos de la pérdida de color debida a los cambios de pH o la reacción con el SO₂ (Weilack et al., 2023). Sin embargo, ni el papel directo de los polisacáridos en las reacciones de copigmentación, actuando directamente como copigmentos por sí mismos, ni su posible efecto indirecto sobre el color, afectando las interacciones de copigmentación entre los compuestos fenólicos y los antocianos, están aún estudiados en detalle.

2.2. Objetivos

El objetivo general del **Capítulo 2** es estudiar el papel que los polisacáridos solubles procedentes de subproductos de vinificación como el orujo pueden jugar sobre el color y la estabilidad de la malvidina 3-*O*-glucósido en presencia y ausencia de diferentes copigmentos a diferentes valores de pH. Para ello, se siguieron los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el efecto de los polisacáridos solubles sobre el color de la forma de catión flavilio y la estabilidad de las soluciones de malvidina 3-*O*-glucósido a diferentes valores de pH.
- Evaluar si el efecto del polisacárido sobre el color de la malvidina 3-*O*-glucósido puede verse afectado por la presencia de otros copigmentos presentes en el vino.
- Evaluar el impacto de la presencia de polisacáridos y copigmentos en el color y la estabilidad química de las soluciones del pigmento durante 5 semanas de almacenamiento.
- Profundizar en el estudio de las interacciones moleculares pigmento:copigmento a pH del vino mediante simulaciones de dinámica molecular.

2.3. Resumen

Los resultados del trabajo llevado a cabo dentro del **Capítulo 2** han sido publicados en el siguiente artículo científico:

Torres-Rochera, Bárbara, Brás, Natércia F., García-Estévez, Ignacio, Escribano-Bailón, M.Teresa. (2023). Chemical and colorimetric study of the influence of grape soluble polysaccharides on the color and stability of malvidin 3-*O*-glucoside solutions. *LWT-Food Science and Technology*, 188, 115420. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.115420

La caracterización del polisacárido péctico (P) obtenido a partir de orujo de uva tinta permitió la determinación de su pose molecular y su composición en azúcares. Mediante cromatografía de exclusión por tamaño (HRSEC-RID) se calculó su peso medio del polisacárido (M_w), obteniendo un valor de 21,3 KDa. Además, se determinó su composición de carbohidratos mediante HPLC-DAD-MS. Los monosacáridos más abundantes en el polisacárido fueron arabinosa, galactosa y manosa, representando aproximadamente el 65% del total de monosacáridos. Por tanto, las familias de polisacáridos presentes en mayor proporción en P fueron manoproteínas y PRAG (polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa). Además, dado el alto nivel de galactosa el polisacárido presenta cadenas laterales de tipo galactano, así como cadenas laterales de arabinogalactano, debido a que la relación galactosa/arabinosa era cercana a 1 ($>0,99$) (Slavov et al., 2017). El ácido galacturónico sólo representa el 5% del total de monosacáridos, lo que indicó una baja presencia de cadenas de homogalacturonano. La relación ácido galacturónico/ramnosa determinada fue muy baja (1,64), lo que sugirió una presencia importante de ramnogalacturonano I en nuestro polisacárido (Fernandes, Brandão, et al., 2020; Slavov et al., 2017). Además, en base a la proporción de (arabinosa

Capítulo 2

+ galactosa)/ramnosa obtenida, se pudo estimar que las moléculas de ramnogalacturonano que componían el polisacárido P tenían una alta proporción de cadenas laterales neutras en su estructura (Apolinar-Valiente et al., 2015).

Por otro lado, en este trabajo se estudió el efecto de diversos compuestos fenólicos (PC) del vino, como quercetina 3-*O*-glucopiranosido (QG), (+)-catequina (C), (-)-epicatequina (E), ácido cafeico (CA) y ácido gálico (GA), así como de un extracto de polisacáridos (P) obtenido a partir del orujo de uva tinta, sobre el color de las soluciones del catión flavilio. Para ello se estudió la modificación del color de disoluciones de malvidina 3-*O*-glucosido (Mv) tras la adición de estos compuestos a pH 1,1. Los resultados es estudio del color de la mezcla binaria Mv:P, en comparación con la solución de control Mv, mostraron una disminución significativa para todos los parámetros de color (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}) debido a la presencia de P. Esto indica que la presencia del polisacárido conduce a soluciones más oscuras (disminución de L^*) y, sobre todo, a tonalidades más azules, puesto que la disminución en el parámetro h_{ab} es el cambio más significativo observado. Además, hubo una disminución del valor del parámetro cromático, es decir, la solución Mv:P tiene un color menos puro que el correspondiente control, lo que podría estar relacionado con la existencia de diferentes formas coloreadas que muestran un color diferente. Esto puede indicar que el polisacárido podría estar favoreciendo la presencia de formas quinoidales del antociano (formas azules) en la solución, junto con el catión flavilio (formas rojas). La interacción entre Mv y P, que podría deberse a las interacciones hidrofóbicas de los polisacáridos, como los dominios ramnogalacturonano de tipo I, los cuales podrían participar en la formación de complejos con el pigmento (Fernandes, Brandão, et al., 2020), podrían ser la causa de las variaciones de color observadas.

En este trabajo también se determinó el color de las soluciones binarias Mv:PC a diferentes relaciones molares (Mv:PC, Mv:PC₂, Mv:PC₃ y Mv:PC₄). Los resultados indican que, de forma similar a lo observado en el **Capítulo 1**, la QG fue el compuesto fenólico que más modifica el color del catión flavilio a todos los ratios ensayados. Para profundizar en el estudio de estos cambios de color, se calculó la diferencia de color entre el control Mv y las soluciones Mv:P o Mv:PC, así como la contribución relativa de cada atributo de color. Estos resultados mostraron que, para obtener una diferencia de color de magnitud similar a la obtenida por la adición del P en una relación molar 1:1 (8,2 unidades CIELAB), se necesita una relación molar de Mv:QG superior a 1:3 (7,3 unidades CIELAB), lo que destaca el importante efecto sobre el color de la presencia de P en las soluciones Mv.

En cuanto a la influencia del polisacárido (P) sobre el color de las soluciones de Mv a pH del vino (pH 3,6), los resultados indican que la adición de P genera grandes cambios de color, similares a los provocados por la presencia de QG, ya que las soluciones de pigmento que además contenían P o QG mostraron los valores de L^* más bajos, así como los valores de C^*_{ab} más altos y los valores para el atributo h_{ab} más negativos. Esto se traduce en soluciones más oscuras y tonalidades azuladas más vivas, aunque hubo diferencias significativas entre ambos en cuanto a los valores alcanzados. Teniendo en cuenta que los flavonoles como QG o la rutina se consideran uno de los mejores copigmentos del vino (Gómez-Míguez et al., 2006; Kunsági-Máté et al., 2006; Teixeira et al., 2013), estos resultados apuntan, de nuevo, al importante papel que podrían tener los polisacáridos sobre el color del vino. Además, debido a la gran cantidad de toneladas de orujos de uva ricos en polisacáridos que genera la industria del vino después de la fermentación, estos resultados podrían ayudar a la revalorización de estos subproductos,

Capítulo 2

poniendo de manifiesto la utilidad que podrían tener los polisacáridos solubles obtenidos a partir del orujo de uva, lo que podría suponer una gran ventaja para la industria del vino.

En este trabajo también se han estudiado las interacciones ternarias Mv:PC:P. Se observaron diferencias significativas en todos los parámetros colorimétricos para todos los PC estudiados con respecto a la correspondiente mezclas binarias, presentando las mezclas ternarias valores de los parámetros colorimétricos intermedios entre la mezcla binaria Mv:P y la correspondiente mezcla Mv:PC. Cabe destacar el caso de la QG, compuesto para el que se pudo observar un cierto efecto aditivo con el polisacárido, puesto que la disminución de los valores de tonalidad es mayor en la solución ternaria que en las correspondientes binarias (aunque las diferencias no son significativas con respecto a la solución Mv:P) y los valores de croma de las soluciones ternarias son los más altos. Esto podría indicar, como se observó un pH de 1,1, que tanto QG como P podrían estar estabilizando las formas quinooidales azules de los antocianos. Una vez más, esto podría explicarse por las interacciones Mv:P, las cuales podrían deberse a la presencia de interacciones hidrofóbicas de los polisacáridos relacionado con las cadenas laterales de azúcar neutras de los ramnogalacturonano de tipo I, que podrían participar en la formación de complejos con la Mv (Fernandes, Brandão, et al., 2020). De esta forma, la presencia del polisacárido afecta significativamente al color de las disoluciones de malvidina 3-O-glucósido al pH del vino, tanto en presencia como en ausencia de otros compuestos fenólicos conocidos como copigmentos.

Los estudios de la estabilidad del color de las soluciones del pigmento a pH 1,1 tras 5 semanas de almacenamiento apuntaron que existe una disminución en los valores de todos los parámetros de color a lo largo del tiempo, dando colores menos intensos y con una componente roja menos importante, lo que puede interpretarse como una disminución

de los niveles del pigmento flavilio, lo que podría relacionarse con una precipitación de esta forma del pigmento por interacción con el polisacárido. Después de 5 semanas las soluciones mostraron colores más azules pero ligeramente menos intensos, lo que podría indicar que la estabilización de las formas quinoidales azules de Mv propuestas anteriormente son estables en el tiempo, pero que el polisacárido no puede estabilizar la forma flavilio, de color rojo. Estos resultados se pueden corroborar con los obtenidos en el análisis de composición de las disoluciones tras 5 semanas de almacenamiento, donde se observa un mayor descenso en el contenido de Mv en la disolución que contiene P con respecto al correspondiente control.

Las simulaciones de la dinámica molecular mostraron que, entre los compuestos fenólicos ensayados, la QG es para el que más agregados con la forma quinoidal se pueden detectar, lo que podría explicar el color azulado de las mezclas que incluyen Mv y QG. De hecho, los cambios en los valores de tono y croma observados anteriormente podrían apuntar a la estabilización de las formas quinoidales azules, es decir, las estructuras formadas cuando los grupos hidroxilo ubicados en la posición 5, 7 o 4' del catión flavilio pierden el protón. Además, no se observaron agregados 1:1 con formas quinoidales en las simulaciones con C y GA. Estos resultados de modelización molecular indican que la estructura de QG podría favorecer las interacciones hidrofóbicas con las formas quinoidales del antociano, lo que favorecería su estabilización.



Chemical and colorimetric study of the influence of grape soluble polysaccharides on the color and stability of malvidin 3-O-glucoside solutions

Bárbara Torres-Rochera^a, Natércia F. Brás^b, Ignacio García-Estévez^{a,*}, M. Teresa Escribano-Bailón^a

^a Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, E37007, Spain

^b LAQV, REQUIMTE, Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 4169-007, Porto, Portugal

ARTICLE INFO

Keywords:

Flavylium cation
Polysaccharides
Wine phenolic compounds
Tristimulus colorimetry
Molecular dynamics simulations

ABSTRACT

Red wine color is mainly due to anthocyanins' flavylium cation. In wine, these pigments are involved in a pH-dependent equilibrium involving other forms, both colored and non-colored. This equilibrium is affected by the presence of other phenolic compounds, the so-called copigments. Moreover, other non-phenolic compounds that can be found in wine, such as polysaccharides, can also affect wine color. In this work, molecular dynamics simulations, tristimulus colorimetry and HPLC-DAD analyses have been performed to assess the effect of soluble polysaccharides (P) on the color and stability of malvidin 3-O-glucoside (Mv) solutions at different pH values, both in presence and absence of other compounds that can establish copigmentation interactions with the pigment. Results showed that P shifts the color of flavylium solutions towards a more intense color with bluer hues, which can be related to a stabilization of the blue quinoidal forms of anthocyanins. This effect is similar to that observed for quercetin 3- β -glucopyranoside (QG), although, in the case of P, it seems to be more relevant. This behavior could be due to the presence of hydrophobic regions in P that allows the interaction with the quinoidal forms, which in the case of the polysaccharide might be related to the type I rhamnogalacturonans.

1. Introduction

Color is one of the main attributes of red wine that can be related to its quality since it affects the wine acceptance by consumers. The intense red color of young wines is due to the flavylium cation of anthocyanins. However, flavylium structure is very unstable due to its deficiency on electrons, which explains the high reactivity of anthocyanins. At slightly higher pH values, the anthocyanins participate in a complex equilibrium involving the quinonoid bases (blue), that are formed by a deprotonation of phenol groups in the flavylium structure, the hemiketal form (colorless), formed by hydration of the flavylium cation and the chalcones (yellow), which are given raised by tautomerization of the hemiketal and isomerization reactions (Brouillard & Delaporte, 1977). Although the flavylium cation is only stable at acidic pH ($\text{pH} \leq 2$), in wine matrix it is stabilized by the interactions with other wine compounds (the so-called copigments), through the copigmentation

phenomenon (Boulton, 2001; He et al., 2012). Hence, the copigmentation phenomenon is essential to improve the chemical colorimetric stability of anthocyanins, which, in turn, is the main reason of the stability of wine color, being responsible for 30–50% of the coloration in young red wines (Trouillas et al., 2016). This phenomenon occurs due to intermolecular interactions through non-covalent hydrophobic molecular associations between the aromatic nuclei of the colored forms of anthocyanins and the copigments (usually colorless) (Mazza & Brouillard, 1990; Santos-Buelga & de Freitas, 2009), which can take place in aqueous medium like red wine. Also, intramolecular interactions (Dangles et al., 1993) and self-association, where copigmentation involved just anthocyanin molecules, can play an important role in wine color (Trouillas et al., 2016).

In wine matrix, there are different compounds that can act as copigments. Flavonoids such as flavonols and flavanols, and non-flavonoids, such as hydroxycinnamic acids (Gómez-Míguez et al., 2006), are the main copigments found in wine. In binary pigment:

* Corresponding author.

E-mail addresses: barbara.torres@usal.es (B. Torres-Rochera), nbras@fc.up.pt (N.F. Brás), igarest@usal.es (I. García-Estévez), escriban@usal.es (M.T. Escribano-Bailón).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115420>

Received 13 June 2023; Received in revised form 13 October 2023; Accepted 15 October 2023

Available online 17 October 2023

0023-6438/© 2023 The Author(s). Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abbreviations

(Mv)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside
(P)	polysaccharide
(PC)	phenolic compounds
(QG)	quercetin 3- β -glucopyranoside
(CA)	caffeic acid
(E)	(-)-epicatechin
(C)	(+)-catechin
(GA)	gallic acid
(Mv:P)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:polysaccharide binary interaction
(Mv:QG)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:quercetin 3- β -glucopyranoside binary interaction
(Mv:CA)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:caffeic acid binary interaction
(Mv:E)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:epicatechin binary interaction
(Mv:C)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:catechin binary interaction
(Mv:GA)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:gallic acid binary interaction
(Mv:PC:P)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:each phenolic compounds: polysaccharide ternary interaction
(Mv:QG:P)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:quercetin 3- β -glucopyranoside:polysaccharide ternary interaction
(Mv:CA:P)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:caffeic acid:polysaccharide ternary interaction
(Mv:E:P)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:epicatechin:polysaccharide ternary interaction
(Mv:C:P)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:catechin:polysaccharide ternary interaction
(Mv:GA:P)	malvidin 3- <i>O</i> -glucoside:gallic acid:polysaccharide ternary interaction

copigment complexes, it has been reported that both flavonoids and non-flavonoids copigments give rise to a more stable color of anthocyanins, although in a different extend (Baranac et al., 1997; Gonçalves et al., 2013; Gordillo et al., 2012). From a molecular point of view, the copigmentation complex made up of the pigment and the copigment shows a sandwich configuration in which the most important forces are hydrophobic interactions (π - π stacking). The flavylium cation is protected from nucleophilic water attack due to this sandwich configuration, which implies the stabilization of the colored forms of the anthocyanin and, in turn, leads to a higher intensity of color (hyperchromic effect). Moreover, in some cases, the presence of copigments also leads to a displacement in the maximum absorption wavelength (bathochromic effect), *i.e.*, to bluer solutions (Gordillo et al., 2012).

Polysaccharides are biopolymers constituted by the union of 10 or more sugar units through glycosidic bonds. These compounds are one of the main groups of macromolecules present in wine (Jones-Moore et al., 2021), since they can be found at concentrations ranging from 200 to 1.500 mg/L. Polysaccharides can be released from yeast during autolysis or be extracted from grape cell wall during winemaking. The cell wall of grapes is mainly composed by three types of polysaccharides: hemicellulose, cellulose and pectins (Jones-Moore et al., 2021; Zhang et al., 2021). The last two represent 30–40% of the polysaccharide components of the cell wall (Nunan et al., 1997), being pectins the most important group regarding wine composition. Pectin composition mainly includes homogalacturonans and rhamnogalacturonans I and II (Caffall & Mohnen, 2009; Guadalupe et al., 2015). Polysaccharides are important in wine since, among others, they can play a key role in organoleptic properties of wines, such as color or astringency. Wine anthocyanins can interact with pectic polysaccharides, which can directly affect their color by increasing the intensity (Fernandes, Oliveira, et al., 2020), or increase their physico-chemical stability, by increasing their colloidal stability (Jones-Moore et al., 2021), and by

protecting them from discoloration by pH changes and SO₂-bleaching (Weilack et al., 2023). With regards wine astringency, it seems that polysaccharides can both interact with wine flavanols and reduce their content in wine, which can be related to a reduction in wine astringency levels (Manjón et al., 2023). Moreover, polysaccharides can affect the interaction between salivary proteins and tannins, reducing their aggregation and, therefore, reducing astringency (Carvalho et al., 2006; Brandão et al., 2017). However, the direct role of polysaccharides in copigmentation reactions, acting as sort of copigments by their own and their potential indirect effect on color, affecting the copigmentation interactions between phenolic compounds and anthocyanins are still fully unraveled. Moreover, the wine industry generates approximately 110 million tons of pomace after fermentation, which is an economic and ecological problem (Apolinar-Valiente et al., 2015). Thus, the re-valorization of these by-products from the winemaking (for instance, the recovery of polysaccharides from grape pomace) may be an important advantage for wine industry. Hence, the use polysaccharide obtained from winemaking by-products such as grape pomace could be an interesting approach for the stabilization of wine color, which could, in turn, could imply the re-valorization of winemaking by-products. To better understand copigmentation process, it is necessary an analysis of the spectral variations due to the noncovalent interactions. Tristimulus Colorimetry allows, by using the color space CIELAB, the characterization of the copigmentation effect in the whole visible spectral (380–770 nm), both in a qualitative and a quantitative way. Moreover, Molecular Dynamics (MD) simulations complement the experiments by using molecular models to provide a better knowledge on the copigmentation behavior between the pigment and the copigments. Indeed, MD simulations envisage the preferred number of molecules involved in the interactions and use several conformations to obtain an estimation of the Gibbs energies association ($\Delta G_{\text{binding}}$) (Trouillas et al., 2016).

In this work, we have studied the effect of soluble polysaccharides (P) on the color of flavylium cation form of anthocyanins by assessing the effect of P on the color and stability of malvidin 3-*O*-glucoside (Mv) solutions at different pH values. Furthermore, to evaluate if the effect of polysaccharide on Mv color can be affected by other wine compounds that can establish copigmentation interactions with the pigment, we have studied whether the presence of phenolic compounds (PC), known as wine copigments, could modify the effect of P on the color of the solutions. To achieve these objectives, this work was performed on model solutions at two different pH values: at pH 1.1, to avoid the existence of other equilibrium forms than flavylium cation and at pH 3.6, the most usual pH value found in red wines. MD simulations were performed to study the copigmentation molecular interactions and tristimulus colorimetry and HPLC-DAD to assess the color and stability of the pigment solutions, respectively. Thus, in this paper, a comprehensive study of the role of soluble polysaccharides on the color of the anthocyanin solutions is performed for the first time, by evaluating both the direct effect of these compounds on the colored forms of anthocyanins and the effect on their stabilization by copigmentation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Quercetin 3- β -glucopyranoside was purchased from Cymit Quimica.com (Barcelona, Spain). (-)-Epicatechin ($\geq 90\%$), (+)-catechin hydrate ($\geq 98\%$), pullulan standard set, 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) and trifluoroacetic acid (99%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Caffeic acid ($\geq 99\%$) and gallic acid were purchased from ACROS organics (Morris Plains, NJ) and from Merck (Darmstadt, Germany), respectively. 2-Deoxy-D-ribose 1-rhamnose, D-(+)-galacturonic acid, D-(+)-glucose, D-(+)-xylose, D-(+)-galactose, D-(+)-mannose, D-galacturonic acid, D-(+)-fucose, D-(+)-arabinose standards were acquired from Sigma Aldrich (St Louis, MO) and Alfa-Aesar (Karlsruhe, Germany). Methanol, acetonitrile (UHPLC-MS grade) and formic acid

(98%) were purchased from Macron Fine Chemicals (Deventer, Netherlands), from Scharlab S.L. (Barcelona, Spain) and from VWR Prolabo (Paris, France), respectively. LiNO₃ was purchased from Thermo Scientific (Waltham, MA). Ethanol, ammonium acetate, ammonia solution and chloroform were purchased from Scharlab S. L. (Barcelona, Spain), VWR Prolabo (Paris, France) and Labken (Madrid, Spain). Purified water was obtained from a MilliQ Gradient water purification system (Millipore, Billerica, MA). Malvidin 3-O-glucoside was isolated in the laboratory and its extraction and purification process is outlined below.

2.2. Isolation of malvidin 3-O-glucoside

The pigment malvidin 3-O-glucoside (Mv) was extracted from the skins of *Vitis vinifera* cv Tempranillo red grapes using acidic methanol (methanol/HCl 0.5N; 95:5 v/v) as described by García-Estévez et al. (García-Estévez et al., 2017). Mv purification was performed as described in García-Estévez et al. (García-Estévez et al., 2013): the concentrated extract was loaded onto a Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) column, previously conditioned by acidic water (HCl 3N, pH 1.1). Elution was carried out using the same aqueous HCl solution. The first fraction eluted, which corresponds to Mv, was collected and freeze-dried to furnish a reddish purple powder whose purity (>97%) was assessed by HPLC-DAD.

2.3. Obtaining and analysis of soluble grape skin cell wall material (CWM)

Pomace obtained from red grape (*V. vinifera* cv Tempranillo) were manually separated to remove any seed or stem. Then, the isolated skins were put into boiling water for 2h (30g grape skins per liter) for polysaccharide extraction, based on the procedure described by Manjón and coworkers (Manjón et al., 2023). The extract was freeze-dried and the polysaccharides characteristics, i.e. its molecular weight and monosaccharide composition, were determined by HPLC. The molecular weight of the polysaccharides was estimated by using high resolution size exclusion chromatography coupled to a refractive index detector (HRSEC-RID). Sample was dissolved in the same solvent employed at mobile phase (0.1 M LiNO₃). HRSEC was performed using an Agilent 1260 Infinity HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) equipped with a refractive index detector (RID), using two serial Shodex OHPak SB-803 HQ and SB-804 HQ columns (8 mm Å, 300 mm) (Showa Denko Europe GmbH, Munich, Germany) thermostatted at 60 °C. Elution was performed using a flow rate of 1 mL/min of 0.1 M LiNO₃, as previously described Guadalupe et al. (Guadalupe & Ayestarán, 2007). Calibration was carried out with several pullulan molecular weight standards (P1, Mw = 342 Da; P2, Mw = 1320 Da; P3, Mw = 6200 Da; P4, Mw = 10,000 Da; P5, Mw = 21,700 Da; P6, Mw = 48,800 Da; P7, Mw = 113,000 Da; P8, Mw = 200,000 Da; P9, Mw = 348,000 Da; P10, Mw = 805,000 Da). The analysis was performed in triplicate.

2.4. Monosaccharide characterization by HPLC-DAD-MS

The monosaccharide composition of the obtained polysaccharides was determined by HPLC-DAD-MS (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), after acid hydrolysis of the extracted polysaccharides and subsequent derivatization with 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazonone (PMP) following an adaptation of the method reported by Ruiz-García et al. (Ruiz-García et al., 2014). Briefly, polysaccharides were hydrolyzed in TFA 2M at 100 °C for 3h and the hydrolysate was submitted to a derivatization with 0.5M 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone (PMP) in 1M NH₄OH for 1h at 70 °C, using deoxyglucose as internal standard. The excess of PMP was removed by a liquid-liquid extraction with chloroform and the monosaccharide derivatives were analyzed by HPLC-DAD-MS-MRM. The monosaccharides were characterized according to their mass spectrum, fragmentation pattern and retention

times, and were compared with the available sugar standards. Quantification of the monosaccharide derivatives was performed using the chromatograms were registered at 250 nm and the calibration curves constructed for L-rhamnose, D-(+)-galacturonic acid, D-(+)-glucose, D-(+)-xylose, D-(+)-galactose, D-(+)-mannose, D-galacturonic acid, D-(+)-fucose, D-(+)-arabinose standards under the same analysis conditions. All analyzes were carried out in triplicate. The results were expressed as the mean ± standard deviation of the triplicate corresponding to each sample analyzed (see Supplementary material for further details).

2.5. Model solutions

All the model solutions were prepared both at pH 1.1 and at pH 3.6 (wine pH). The pigment concentration was the same in all cases (50 µM). Binary mixtures containing Mv and the isolated soluble polysaccharides (P) were prepared at molar ratios 1:1 (for both pH studied) and 1:0.5 (pH 3.6). Moreover, five solutions based on binary combinations of Mv with different phenolic compounds (PC), namely quercetin 3-β-glucopyranoside (Mv:QG), 3,4-dihydroxycinnamic acid (Mv:CA), (-)-epicatechin (Mv:E), (+)-catechin hydrate (Mv:C) and gallic acid (Mv:GA) were prepared at four different pigment/copigment concentrations, corresponding to 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 M ratio. A reference solution of anthocyanin at each pH was also prepared. Ternary mixtures containing Mv, each PC and P were also prepared at 1:1:0.5 M ratio (pH 3.6). All solutions were prepared in triplicate and stored in the dark at 25 °C for 2h to reach equilibrium. Furthermore, solutions at pH 1.1 were stored in the dark 25 °C for 5 weeks to monitor color and pigment stability.

2.6. Colorimetric measurements

The absorption spectra of the solutions were recorded on a Hewlett-Packard UV-Vis HP3853 spectrophotometer (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) at constant intervals ($\Delta\lambda = 1$ nm) using 10 mm path length quartz cells and acidic water (pH 1.1 and 3.6) as a reference. CIELAB color parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , and h_{ab}) were obtained from the visible spectra (380–770 nm), employing as references the CIE 1964 standard observer (10° visual field) and the Standard Illuminant D65. The CIELAB parameters were calculated using the software Cromalab™ (Heredia et al., 2004).

The effect of copigmentation interactions on color was evaluated by differential colorimetry (Gordillo et al., 2012, 2015), comparing the color of the pigment solution in absence and in presence of the different compounds assayed as copigments. Color difference (ΔE^*_{ab}) between samples was calculated using the CIELAB color difference formula $\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ where ΔL^* , Δa^* , and Δb^* are the differences between the CIELAB parameters. The total color was also calculated as the color difference between the L^* , a^* and b^* values of each sample respect of those of the water as an achromatic reference ($L^* = 100$, $a^* = 0$ and $b^* = 0$), following the equation:

$$\text{Total color} = [(L^*-100)^2 + (a^*-0)^2 + (b^*-0)^2]^{1/2}$$

In addition, relative contribution of each color attribute (ΔL^* , ΔC^*_{ab} and Δh_{ab}) was calculated and used to evaluate the trend of the individual attribute (Gordillo et al., 2012, 2015):

$$\% \Delta L = [(\Delta L^*) / (\Delta E^*_{ab})] \times 100$$

$$\% \Delta C = [(\Delta C^*_{ab}) / (\Delta E^*_{ab})] \times 100$$

$$\% \Delta H = [(\Delta H) / (\Delta E^*_{ab})] \times 100$$

Where the ΔH value is deduced from: $\Delta H = [\Delta E^*_{ab} - ((\Delta L^*)^2 + (\Delta C^*)^2)]^{1/2}$

2.7. HPLC-DAD analysis

The chemical stability of Mv was monitored by means of HPLC-DAD,

using a Hewlett-Packard 1100 series liquid chromatograph (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), following a previously developed methodology (Alcalde-Eon et al., 2006). Briefly, an AQUA C18 reversed-phase, 5 μm , 150 mm \times 4.6 mm column (Phenomenex®, Torrance, CA, USA) thermostatted at 35 °C was used. The flow rate was set a 0.5 mL min⁻¹ and the solvents employed were an aqueous solution (0.1%) of trifluoroacetic acid (A) and 100% acetonitrile (B), establishing the following gradient: from 10 to 15% B for 10 min, isocratic at 15% B for 5 min, 15–18% B for 5 min and 18–35% B for 10 min, followed by column washing and re-equilibration to initial conditions. Detection was carried out at 520 nm as preferred wavelength. Spectra were recorded from 220 to 600 nm. Identification of anthocyanins and derived pigments was carried out from the chromatographic retention times.

2.8. Molecular modeling and molecular dynamics (MD) simulations

The computational protocol of modelling and MD simulations were performed as in our previous study (Torres-Rochera et al., 2023), but in this study, in addition to the malvidin 3-*O*-glucoside flavylium form, the quinoidal base (Mv-quinoid) structures were also considered. The three possible tautomers of the Mv quinoidal base (keto grupo at C7, C5 and C4') are hereinafter called Mv-C7, Mv-C5 and Mv-C4' for simplicity. Therefore, each system was composed by 4 Mv, 1 quinoidal base and 11 molecules of PC, based on the theoretical flavylium:quinoidal proportions that could be found at that pH (Cruz et al., 2022) and to reproduce the experimental conditions. Three MD simulations for each PC were carried out to include a different quinoidal base tautomeric form in each system. The Amber 12 simulation package (Case et al., 2012) was used to carry out the optimizations and MD simulations. The details of the MD procedure are provided in the Supplementary material. The prevalent pigment:copigment (1:1) aggregate of the systems with caffeic acid, epicatechin and quercetin 3- β -glucopyranoside was used as starting geometry of a further MD simulation to clarify the binding mode between both molecules. The binding energy of each complex was determined using the Molecular Mechanics/Poisson Boltzmann Surface Area (MM/PBSA) approach (Humphrey et al., 1996). A total of 100 structures of each MD simulation were used for the analysis. The results are present as relative enthalpic binding energies ($\Delta\Delta H_{\text{binding}}$) with respect to the most stable complex.

2.9. Statistical analysis

The statistical significance of the differences between the obtained results were evaluated by one-way analysis of variance (ANOVA) and posthoc Turkey test, by using the software packing for Windows IBM SPSS 26 (SPSS, Inc. Chicago, IL). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Pectic polysaccharide characterization

Once the polysaccharides (P) were extracted from red grape pomace, their molecular weight (Mw) was calculated by using size exclusion chromatography (HRSEC-RID) and their carbohydrate composition was determined by HPLC-DAD-MS (for further information, see Supplementary material). The results showed that the Mw of P was 21.3 KDa. Regarding the carbohydrate composition (see Table S1 in the Supplementary material), the most abundant monosaccharides of P were arabinose, galactose and mannose (these three monosaccharides represent ca. 65% of the total monosaccharide content). Therefore, the families of polysaccharides found in the highest proportion in P were MP (mannoproteins) and pectic PRAGs (polysaccharides rich in arabinose and galactose). Furthermore, the high level of galactose in P suggests the presence of galactan-type side chains. Indeed, in our study, the galactose/arabinose ratio was close to one (>0.99), which, according to the

literature, indicates the presence of arabinogalactan side chains (Slavov et al., 2017). Galacturonic acid only represents 5% of total monosaccharides, indicating low presence of homogalacturonan chains. Moreover, the galacturonic acid/rhamnose ratio determined was very low (1.64), which suggests an important presence of rhamnagalacturonan I in our polysaccharide (Fernandes, Oliveira, et al., 2020; Slavov et al., 2017). Also, according to Apolinar-Valiente and coworkers, the ratio of (arabinose + galactose)/rhamnose can be used to estimate the relative importance of the neutral side-chains to the rhamnagalacturonan backbone. The ratio obtained in the case of P is higher (14.10), than those reported previously (6.52–8.10) (Apolinar-Valiente et al., 2015), which may indicate that rhamnagalacturonan molecules that composed the polysaccharide P has a high proportion of neutral side-chains in its structure.

3.2. Effect of the presence of P or PC on the color of flavylium cation solutions (pH 1.1)

Color analysis was performed using the CIELAB space at pH 1.1 in order to study the effect of the copigments on the color of solutions of the flavylium cation without the interferences of the presence of other anthocyanins forms, since, at that pH, the existence of other molecular forms apart from the flavylium cation of Mv is avoided. First, the effect of P was assessed by studying the color parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}) of the binary mixture Mv:P compared to Mv control solution after 2h of storage. Results (Table 1) showed a significant decrease for all color parameters of the solutions due to the presence of P. The presence of P leads to a decrease in L^* value, i.e. to darker solutions. However, the most affected parameter is the hue value (h_{ab}), ca. 7 CIELAB units, indicating a displacement of the color of the solution toward bluer hues. Thus, the presence of P shifts the color of flavylium solution towards a darker and, mostly, towards a bluer color. Also, there is a decrease of chroma value, that is, the solution has a less pure color, which could be related to the existence of different colored forms that show different colors. This can indicate that the polysaccharide could be favoring the presence of quinoidal forms of the anthocyanin (blue forms) in the solution, along with the flavylium cation (red). This variation of color could be related to the Mv:P interaction, which may involve the hydrophobic domains of the polysaccharides, such as rhamnagalacturonan-I domains that could participate in the formation of complexes with the pigment (Fernandes, Oliveira, et al., 2020).

The color of Mv:PC solutions prepared at different molar ratios (Mv:PC, Mv:PC₂, Mv:PC₃ and Mv:PC₄) was also determined using the CIELAB space. As expected, the PC that most changed the flavylium cation color was QG (data not shown), which is in agreement with the results obtained in a previous study (Torres-Rochera et al., 2023). To go deeper on the study of these color changes, the color differences between Mv control and Mv:P or Mv:PC solutions were calculated, as well as the relative contribution of each color attribute in those color differences (Table 2). This also allows to determine which color variations could be detected by human eye, since values higher than 3 are appreciable by the human eye (Martínez et al., 2001). A higher value of 3 for ΔE^*_{ab} can be observed for Mv:P and Mv:QG at all pigment:PC ratios assayed. It is worth noting that, in the case of QG (a PC recognized as a good copigment), to obtain a difference of color of similar magnitude to that

Table 1
Color parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}) obtained at pH 1.1 for Mv control and Mv:P (1:1) solutions after 2h of storage.

	L^*	a^*	b^*	C^*_{ab}	h_{ab}
Mv	66.9 \pm 0.3 ^a	61.5 \pm 0.1 ^a	14.2 \pm 0.3 ^a	63.1 \pm 0.2 ^a	13 \pm 0.3 ^a
Mv: P	66.2 \pm 0.1 ^b	59.9 \pm 0.3 ^b	6.2 \pm 0.1 ^b	60.3 \pm 0.3 ^b	5.9 \pm 0.1 ^b

Mv: malvidin 3-*O*-glucoside. P: polysaccharide. Different letters within each column indicate statistical differences ($p < 0.05$, $n = 3$).

Table 2

Color differences (ΔE^*_{ab}) at pH 1.1 between malvidin (Mv) control solution and the solutions added with phenolic compounds, at four different molar ratios (1:1, 1:2, 1:3 and 1:4), or polysaccharides and relative contribution of each color attribute (% ΔL , % ΔC , % ΔH).

	ΔE^*_{ab}	% ΔL	% ΔC	% ΔH
Mv:P	8.2 ± 0.1 ^{a,b}	0.8 ± 0.2 ^b	12.3 ± 2.1 ^{a,b}	86.9 ± 2.3 ^a
Mv:QG	3.4 ± 0.2 ^d	2.4 ± 2.1 ^b	4.5 ± 2.1 ^{a,b}	93.1 ± 1.6 ^a
Mv:QG ₂	6.1 ± 0.2 ^c	2.6 ± 0.6 ^b	3.2 ± 1.1 ^{a,b}	94.3 ± 0.9 ^a
Mv:QG ₃	7.6 ± 0.2 ^b	5.5 ± 3.0 ^{a,b}	1.5 ± 1.3 ^b	93.0 ± 3.6 ^a
Mv:QG ₄	9.5 ± 0.2 ^a	3.0 ± 0.2 ^b	1.9 ± 1.2 ^{a,b}	95.0 ± 1.3 ^a
Mv:CA	0.8 ± 0.6 ^e	35.6 ± 35.8 ^{a,b}	24.5 ± 32.3 ^{a,b}	39.9 ± 46 ^{b,c,d}
Mv:CA ₂	1.3 ± 0.6 ^e	25.5 ± 26.1 ^{a,b}	53.4 ± 42.5 ^{a,b}	21.1 ± 16.5 ^{b,c,d}
Mv:CA ₃	1.6 ± 0.4 ^e	21.8 ± 17.0 ^{a,b}	22.8 ± 17.8 ^{a,b}	55.4 ± 22.3 ^{a,b,c}
Mv:CA ₄	2.1 ± 0.2 ^{d,e}	10.1 ± 3.5 ^{a,b}	27.2 ± 6.9 ^{a,b}	62.7 ± 7.3 ^{a,b}
Mv:E	1.4 ± 0.4 ^e	22.4 ± 1.7 ^{a,b}	68.6 ± 6.4 ^{a,b}	8.9 ± 4.7 ^d
Mv:E ₂	1.1 ± 0.4 ^e	36.5 ± 32.6 ^{a,b}	58.7 ± 29.5 ^{a,b}	4.8 ± 3.1 ^d
Mv:E ₃	1.0 ± 0.3 ^e	41.4 ± 35.9 ^{a,b}	35.2 ± 25.4 ^{a,b}	23.4 ± 12.3 ^{b,c,d}
Mv:E ₄	1.1 ± 0.3 ^e	12.4 ± 9.2 ^{a,b}	28.2 ± 22.7 ^{a,b}	59.4 ± 22.7 ^{a,b,c}
Mv:C	1.3 ± 0.6 ^e	30.7 ± 26.1 ^{a,b}	65.1 ± 20.1 ^{a,b}	4.1 ± 6.1 ^d
Mv:C ₂	0.7 ± 0.2 ^e	77.3 ± 23.2 ^a	19.9 ± 22.4 ^{a,b}	2.8 ± 1.4 ^d
Mv:C ₃	1.3 ± 0.3 ^e	20.1 ± 10.7 ^{a,b}	70.1 ± 9.1 ^{a,b}	9.8 ± 2.8 ^d
Mv:C ₄	1.5 ± 1.3 ^e	55.1 ± 45.5 ^{a,b}	38.1 ± 47.6 ^{a,b}	6.8 ± 2.8 ^d
Mv:GA	1.1 ± 0.4 ^e	51.6 ± 46.5 ^{a,b}	42.8 ± 41.7	5.6 ± 5.2 ^d
Mv:GA ₂	1.7 ± 0.4 ^e	34.2 ± 5.7 ^{a,b}	61.8 ± 7.6	4.0 ± 1.8 ^d
Mv:GA ₃	1.4 ± 0.1 ^e	17.6 ± 16.1 ^{a,b}	77.1 ± 18.5 ^a	5.3 ± 2.5 ^d
Mv:GA ₄	1.1 ± 0.5 ^e	24.3 ± 25.8 ^{a,b}	56.6 ± 41.4	19.2 ± 17.3 ^{c,d}

Mv: malvidin 3-O-glucoside. QG: quercetin 3- β -glucopyranoside. CA: caffeic acid, E: epicatechin, C: catechin. GA: gallic acid. Different letters in each column indicate significant differences ($p < 0.05$, $n = 3$).

obtained for Mv:P at a molar ratio 1:1 (8.2 CIELAB units), a molar ratio of Mv:QG higher than 1:3 (7.3 CIELAB units) is needed. This highlights the important effect on color of the presence of P in the Mv solutions. It was also observed that, for Mv:P and Mv:QG solutions, the absolute color differences were mainly qualitative (% ΔH), whereas for the rest of phenolic compounds in solution with Mv, in general, the main relative contribution was quantitative (% ΔL and % ΔC). This indicates that the main change on the color of solutions due to the presence of P or QG leads to bluer solutions, which might be related to a stabilization of blue forms of anthocyanins, mainly in the case of P, where the change in the chroma attribute is also relevant.

3.3. Effect of the presence of P and/or PC on the color of mv solutions at wine pH (pH 3.6)

The influence of the presence of P on the color of Mv solutions at wine pH (pH 3.6) has been assessed both in absence and presence of the different PC assayed as copigments, in order to assess the potential role of these compounds for the different anthocyanin forms that are present at wine pH. Table 3 shows the results of this colorimetric study. The addition of P causes important changes in color, which are similar to those caused by QG. It seems that the interaction between P and Mv and that between QG and Mv lead to similar changes in color, since the solutions added with P or QG showed lower L^* values, higher C^*_{ab} values and more negative values for h_{ab} attribute, that is, darker and more vivid bluish hues, although there were significant differences between both of them regarding the achieved values. Taking into account that flavonols as QG or rutin are considered to be one of the best copigments in wine (Gómez-Míguez et al., 2006; Kunsági-Máté et al., 2006; Teixeira et al., 2013), these results point out the important role that P could have in wine color.

Going further, in general, ternary interactions showed significant differences in all the colorimetric parameters for all PC studied, with lower L^* values, higher C^*_{ab} values and more negative values for h_{ab} attribute, which, once again, can be related to darker and more vivid bluish hues. As an exception, in the case of QG, certain additive effect could be observed, since the decrease in hue values is higher in the ternary solution than in the binary ones (although differences are not

Table 3

Color parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}) obtained at pH 3.6 for Mv control and for binary (Mv:P and Mv:PC) and ternary (Mv:PC:P) solutions.

	L^*	a^*	b^*	C^*_{ab}	h_{ab}
Mv	95.3 ± 0.1 ^a	8.7 ± 0.04 ^a	-0.6 ± 0.02 ^a	8.7 ± 0.04 ^a	-3.7 ± 0.1 ^a
Mv:P	93.6 ± 0.2 ^b	10.0 ± 0.3 ^b	-2.7 ± 0.2 ^b	10.4 ± 0.2 ^b	-15.4 ± 1.4 ^b
Mv:QG	94.1 ± 0.1 ^c	10.4 ± 0.1 ^c	-2.20 ± 0.01 ^c	10.6 ± 0.1 ^b	-12.10 ± 0.01 ^c
Mv:QG:P	93.40 ± 0.01 ^b	10.7 ± 0.1 ^c	-3.3 ± 0.1 ^c	11.2 ± 0.1 ^c	-17.4 ± 0.8 ^b
Mv:CA	95.0 ± 0.1 ^a	9.0 ± 0.1 ^a	-0.8 ± 0.0 ^a	9.0 ± 0.1 ^c	-5.1 ± 0.1 ^a
Mv:CA:P	94.1 ± 0.1 ^c	9.7 ± 0.1 ^b	-2.0 ± 0.1 ^c	9.9 ± 0.1 ^d	-11.5 ± 0.4 ^c
Mv:E	95.2 ± 0.1 ^a	8.80 ± 0.03 ^a	-0.7 ± 0.1 ^a	8.80 ± 0.01 ^a	-4.6 ± 0.4 ^a
Mv:E:P	94.20 ± 0.01 ^c	9.2 ± 0.1 ^c	-1.9 ± 0.1 ^c	9.4 ± 0.1 ^c	-11.5 ± 0.7 ^c
Mv:C	95.3 ± 0.1 ^a	8.8 ± 0.01 ^a	-0.8 ± 0.01 ^a	8.80 ± 0.01 ^a	-4.9 ± 0.1 ^a
Mv:C:P	94.7 ± 0.3 ^c	9.4 ± 0.1 ^c	-1.8 ± 0.1 ^c	9.50 ± 0.01 ^c	-10.7 ± 0.9 ^c
Mv:GA	95.2 ± 0.2 ^a	8.8 ± 0.1 ^a	-0.7 ± 0.03 ^a	8.8 ± 0.1 ^a	-4.6 ± 0.2 ^a
Mv:GA:P	94.20 ± 0.01 ^c	9.5 ± 0.1 ^c	-1.9 ± 0.0 ^c	9.6 ± 0.1 ^c	-11.3 ± 0.2 ^c

Mv: malvidin 3-O-glucoside. P: polysaccharide. PC: phenolic compounds. QG: quercetin 3- β -glucopyranoside. CA: caffeic acid. E: epicatechin. C: catechin (C). GA: gallic acid. Different letters within each column indicate significant differences ($p < 0.05$, $n = 3$) between Mv, Mv:P and each Mv:PC and Mv:PC:P interactions.

significant when compared to Mv:P solution). Also, in this case, the chroma values of ternary solutions are the highest. This might point out, as it was observed a pH 1.1, that both QG and P could be stabilizing the blue forms of anthocyanins. Indeed, the changes in hue and chroma values observed at this pH could point to the stabilization of the blue quinoidal forms, i.e. the structures formed when the hydroxyl groups located in position 5, 7, or 4' of the flavylium cation lost the proton, as it will be discussed later on MD studies. Therefore, at wine pH, the presence of P significantly affects the color of Mv solutions, both in absence and in presence of copigments. This could be explained by P-Mv interactions due to the presence of hydrophobic domains in the polysaccharides related to the less neutral sugar sidechains of the rhamnogalacturonan-I domains, which could participate in complexation with Mv (Fernandes, Oliveira, et al., 2020).

The calculated color difference values (Fig. 1) are in agreement with these results, since the highest ΔE^*_{ab} were reached for the ternary solution Mv:QG:P, followed by the binary solution Mv:P. Actually, those solutions showed color differences with regards to Mv solutions that could be detected by the human eye ($\Delta E^*_{ab} > 3$). Also, as explained before, the addition of both P and QG seems to exert an additive effect, since the color differences detected in that ternary solutions are significant higher than those detected in the corresponding binary solutions (Mv:P and Mv:QG). On the contrary, although the color differences detected in the ternary solutions containing CA, E, C or GA are higher than the corresponding binary solutions, they were lower than that calculated for Mv:P binary solution.

3.4. Color stability of mv solutions

In order to go further on the effect of the presence of P on the stability and color of flavylium form of Mv, the color and chemical composition of the solutions were studied after 5 weeks of storage. The color parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}) obtained for Mv and Mv:P solutions after the storage time for 5 weeks at pH 1.1 are shown in Table 4. It can be

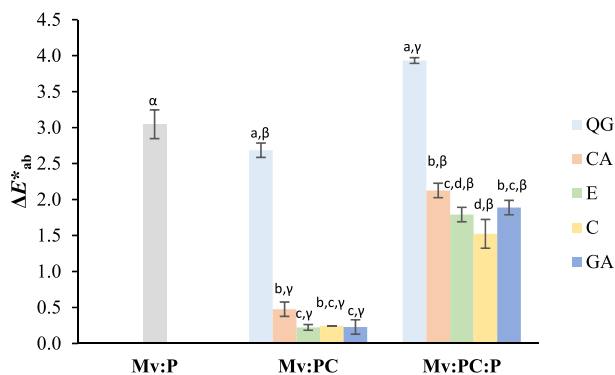


Fig. 1. Influence of polysaccharide (P) and/or phenolic compounds (PC) on ΔE^*_{ab} value (calculated respecting to malvidin 3-O-glucoside (Mv) solution) of binary and ternary solutions at pH 3.6. Different Latin letters (a,b,c,d) within each group (binary or ternary interactions) indicate significant differences ($p < 0.05$, $n = 3$). Different Greek letters (α, β, γ) indicate significant differences ($p < 0.05$, $n = 3$) between Mv:P and each Mv:PC and Mv:PC:P interactions.

Table 4

Color parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}) obtained for Mv control and for Mv:P solutions over the storage time (5 weeks, 25 °C) at pH 1.1.

	L^*	a^*	b^*	C^*_{ab}	h_{ab}
2h Mv	66.9 ± 0.3 _{e,f}	61.5 ± 0.1 ^a	14.2 ± 0.3 ^a	63.1 ± 0.2 ^a	13.0 ± 0.3 ^a
2h Mv:P	66.2 ± 0.1 _f	59.9 ± 0.3 ^b _{c,d}	6.2 ± 0.1 ^c	60.3 ± 0.3 ^c	5.9 ± 0.1 ^c
1W Mv	67.6 ± 0.1 _{d,e}	60.9 ± 0.1 ^a _b	13.2 ± 0.1 ^b	62.3 ± 0.1 _{a,b}	12.2 ± 0.1 ^b
1W Mv:P	67.3 ± 0.3 _{d,e}	57.9 ± 0.3 ^f	3.4 ± 0.2 _d	58.0 ± 0.3 _d	3.4 ± 0.2 _d
2W Mv	67.9 ± 0.1 _{c,d}	60.3 ± 0.1 ^b	13.1 ± 0.2 ^b	61.7 ± 0.1 _b	12.3 ± 0.1 ^b
2W Mv:P	68.1 ± 0.8 _{c,d}	58.1 ± 0.8 ^e _f	3.0 ± 0.1 _d	58.2 ± 0.8 _d	3.0 ± 0.2 _d
3W Mv	68.2 ± 0.2 _{c,d}	60.5 ± 0.3 ^a _b	13.3 ± 0.2 ^b	62.0 ± 0.3 _{a,b}	12.4 ± 0.2 ^b
3W Mv:P	69.8 ± 0.4 _b	59.1 ± 0.3 ^c _{d,e}	2.1 ± 0.2 _e	59.2 ± 0.3 _{c,d}	2.0 ± 0.2 _e
5W Mv	68.6 ± 0.1 _c	60.2 ± 0.6 ^b _c	13.0 ± 0.4 ^b	61.5 ± 0.7 _b	12.2 ± 0.3 ^b
5W Mv:P	71.3 ± 0.1 _a	58.9 ± 0.2 ^d _{e,f}	1.8 ± 0.3 _e	58.9 ± 0.2 _d	1.7 ± 0.2 _e

Mv: malvidin 3-O-glucoside. P: polysaccharide. Different letters within each column indicate significant differences ($p < 0.05$, $n = 3$).

observed that, in all cases, there was a decrease in the values of all color parameters over time. The changes in the color parameters, i.e., the increase in L^* and the decrease in a^* values, along with a very little modification in b^* values in the case of Mv solutions, point to less intense colors with a less important red component, which could be interpreted as a decrease of Mv (flavylium) levels. This could be related to a partial precipitation of Mv due to its interaction with P, as it has been previously reported (Weilack et al., 2023). Moreover, the significant differences between Mv and Mv:P solutions are maintained from the beginning to the end of the experiment in almost all color parameters, but mainly in the case of chroma and hue values. Indeed, as for hue, the changes observed on color due to the presence of P increase over time. After 5 weeks, Mv:P solutions showed higher L^* values, lower C^*_{ab} values and much lower h_{ab} values than Mv solutions, i.e., those solutions showed bluer but slightly less intense colors. This could point out that the stabilization of the blue quinoidal forms of Mv proposed before is stable over time, but that P cannot stabilize the flavylium form or, even, lead to a partial precipitation of this form, which is the main one at that pH. The chemical study of the solutions during storage also points in that

direction. Table 5 shows the evolution of Mv in the binary solutions. Results showed that the addition of P leads to a significant decrease in Mv content both compared to Mv control and to the other binary solutions involving the PC, which, in turn, seems to slightly stabilize the Mv. Thus, it seems that, despite the slight loss of pigments due to precipitation, P seems to stabilize blue forms of anthocyanins but not the red one.

3.5. MD simulations

In silico approaches were also employed to evaluate the copigmentation behavior between the different PC assayed against the pigment Mv. The presence of minor amounts of Mv quinoidal forms was considered in order to assess possible stabilization effect of quinoidal forms throughout the anthocyanins:copigments interaction. A cluster analysis of each MD simulation was performed to collect, in groups, all geometries of each copigmentation complex. The root-mean square deviation of the heavy atoms of the Mv, since they are the prevalent and common pigment of all systems, was used as clustering metric. The geometries with a frequency higher than 5% along the MD simulation were considered for further analysis. The number and nature of all complexes obtained from MD simulations were also studied (Table S2 in Supplementary material, in which copigmentation aggregates composed by quinoidal base forms are highlighted in parenthesis). When the 1:1 aggregates were analyzed, it can be observed that the number of Mv:copigment are much higher than those copigmentation complexes with quinoidal bases, which is expected due to the different amount of flavylium/quinoidal (4/1) molecules employed in each system. However, it seems that QG was the PC for which, proportionally, more quinoidal:PC aggregates were detected, which could explain the bluish color of the mixtures including Mv and QG. Moreover, no 1:1 aggregates with quinoidal forms were observed in the simulations with C and GA.

Further MD simulations were performed to assess the binding modes of 1:1 copigmentation complexes, involving the CA, E and QG in the interaction with the flavylium or quinoidal base forms of pigment. Fig. 2 illustrates the representative structures of the prevalent binding pose throughout each simulation, whilst Table 6 shows the enthalpic binding energies of each complex. It was verified that, in all studied complexes, the van der Waals (VdW) forces were the interactions that contribute the most to the binding and subsequent copigmentation effect (Table 6), which is in agreement with literature (Trouillas et al., 2016). According to the binding energies of the copigmentation complexes with CA, it was verified that it has rather similar affinities for the flavylium and quinoidal base (Mv-C5 and Mv-C7) forms of pigment ($\Delta\Delta H_{\text{binding}}$ of 0.34 ± 0.25 kcal/mol and -0.41 ± 0.24 kcal/mol in relation to the Mv, respectively). A higher affinity was observed for the Mv-C7:QG vs. Mv:QG complexes ($\Delta\Delta H_{\text{binding}}$ of -0.65 ± 0.23 kcal/mol) whereas the contrary was observed in the case of Mv:E vs. Mv-C5:E complexes ($\Delta\Delta H_{\text{binding}}$ of 0.68 ± 0.28 kcal/mol). This minor affinity arises from the VdW contacts (Table 6). The equivalent binding affinities are reasonable

Table 5

Mv content in the binary solutions during the storage time (5 weeks, 25 °C) at pH 1.1 expressed as percentage (%) calculated with respect to the Mv control solution.

	2h	5 weeks
% Mv:P	92.7 ± 9.5 ^a	81.8 ± 8.1 ^b
% Mv:QG	102.3 ± 1.7 ^a	111.5 ± 7.5 ^a
% Mv:CA	101.2 ± 2.9 ^a	114.9 ± 4.4 ^a
% Mv:E	101.9 ± 2.1 ^a	108.7 ± 5.5 ^a
% Mv:C	102.0 ± 2.2 ^a	108.4 ± 16.2 ^a
% Mv:GA	101.2 ± 3.0 ^a	113.5 ± 4.2 ^a

Mv: malvidin 3-O-glucoside. P: polysaccharide. PC: phenolic compounds. QG: quercetin 3- β -glucopyranoside. CA: caffeic acid. E: epicatechin. C: catechin (C). GA: gallic acid. Each letter within each column indicates statistical differences ($p < 0.05$, $n = 3$).

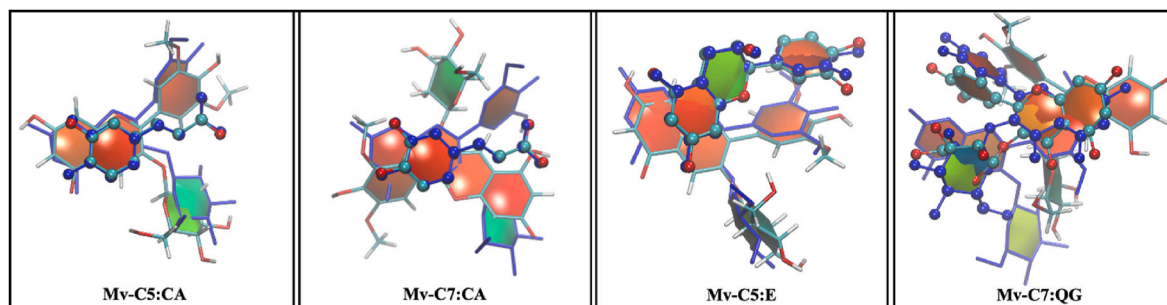


Fig. 2. Illustration of the representative geometry of the most frequent 1:1 copigmentation poses. Pigments and copigments are depicted in sticks and balls-and-sticks, respectively. As reference complexes, the Mv:copigment molecules are colored at dark blue, whilst the complexes with quinoidal bases are colored by atom type. The superimposition was carried out using the common copigment molecules. Aromatic and non-aromatic rings of all compounds are colored in orangish and green, respectively. Enthalpic binding energies of the interaction with quinoidal bases are in relation to the Mv values. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Table 6

Binding energy values (kcal/mol) for some [pigment]₁: [copigment]₁ complexes.

pigment:copigment	Van der Waals	Electrostatic	Polar Solvation	Non-Polar Solvation	$\Delta H_{\text{binding}}$	$\Delta\Delta H_{\text{binding}}$
Mv:CA	-11.09 ± 0.23	-0.74 ± 0.13	2.33 ± 0.11	4.04 ± 0.16	-5.47 ± 0.19	0.00 ± 0.26
Mv-C5:CA	-10.52 ± 0.20	-0.84 ± 0.11	2.29 ± 0.10	3.95 ± 0.15	-5.13 ± 0.16	0.34 ± 0.25
Mv-C7:CA	-11.42 ± 0.15	-1.01 ± 0.10	2.33 ± 0.09	4.23 ± 0.10	-5.88 ± 0.15	-0.41 ± 0.24
Mv:E	-17.69 ± 0.19	-1.29 ± 0.12	3.20 ± 0.10	5.86 ± 0.12	-9.92 ± 0.18	0.00 ± 0.26
Mv-C5:E	-16.78 ± 0.22	-0.71 ± 0.09	2.55 ± 0.08	5.69 ± 0.12	-9.24 ± 0.21	0.68 ± 0.28
Mv:QG	-22.54 ± 0.19	-2.03 ± 0.11	4.66 ± 0.10	7.87 ± 0.10	-12.04 ± 0.18	0.00 ± 0.26
Mv-C7:QG	-23.48 ± 0.16	-1.91 ± 0.10	4.36 ± 0.07	8.34 ± 0.07	-12.69 ± 0.14	-0.65 ± 0.23

Mv: malvidin 3-O-glucoside. Mv-C5 and Mv-C7: malvidin 3-O-glucoside quinoidal bases. P: polysaccharide. PC: phenolic compounds. QG: quercetin 3- β -glucopyranoside. CA: caffeic acid. E: epicatechin. C: catechin (C). GA: gallic acid.

due to the structural resemblance of the Mv and respective quinoidal bases, which made similar number and nature of interactions with the solvent or copigment molecules (upon the water release). Indeed, this is highlighted by the comparison of the prevalent pigment:copigment geometries showed in Fig. 2. The Mv-C5:CA and Mv-C5:E are analogous and, in the case of Mv-C7:QG, the main intermolecular interactions are rather similar (π - π stacking and CH- π contacts). In addition, the magnitude of the effect from the different charge character is rather small because the positive charge of the Mv is delocalized along its aromatics rings as well as all copigments are non-charged polar molecules (alike the solvent). These results point out that the interaction between QG and the quinoidal forms of anthocyanins is slightly favored compared to the other PC assayed, which could be related to the structure of QG that favors the hydrophobic interactions with the anthocyanin.

4. Conclusions

In this work, we have studied the effect of soluble polysaccharides (P) obtained from red grape pomace on the color of malvidin 3-O-glucoside (Mv) solutions. The results show that the presence of P shifts the color of flavylium solutions towards a more intense color with bluer hues. This may indicate that P could favor the existence of quinoidal forms of the anthocyanin (blue forms) in the solution. This bluish effect is also observed for quercetin 3- β -glucopyranoside (QG), a phenolic compound recognized as a good copigment. However, in that case, higher levels of the phenolic compound are needed to obtain a difference of color of similar magnitude to that obtained for P. This highlights the potential relevant role that P could play in wine color. The obtained results also show that the presence of phenolic compounds slightly modifies the effect of P on the color of Mv solutions, although in the case of QG, a certain additive effect is observed.

As for the stabilization of Mv due to P, it seems that the presence of P leads to the stabilization of the blue quinoidal forms of Mv, but it cannot

stabilize the flavylium form. This might be related to the interaction of P with the blue forms of the anthocyanin, in a similar way that observed for other copigments, such as QG. Indeed, MD simulation studies performed showed that the structure of QG favors the hydrophobic interactions with the quinoidal forms of the anthocyanin. Altogether, these results could indicate that the presence of hydrophobic regions of the polysaccharide (related to the presence of type I rhamnoglucuronans) could be responsible for that behavior.

Funding sources

This research was financially supported by Grant PID2021-127126OB-C21 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by "ERDF A way of making Europe". B. Torres thanks to Spanish MICINN for FPI contract ref. PRE2018-084209. N.F. Brás thanks to FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia) for her CEEC grant (CEECIND/02017/2018). Thanks are also due to Junta de Castilla y León-FEDER Programme for the Strategic Research Programs for Units of Excellence (Escalera de Excelencia CLU-2018-04).

CRedit authorship contribution statement

Bárbara Torres-Rochera: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data curation, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft. **Natércia F. Brás:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Visualization, Writing – review & editing. **Ignacio García-Estévez:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Validation, Supervision, Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition. **M. Teresa Escribano-Bailón:** Conceptualization, Methodology, Validation, Supervision, Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

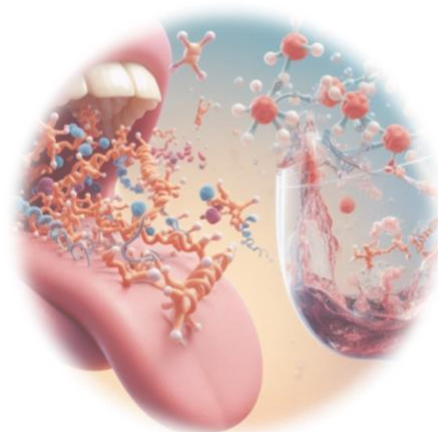
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115420>.

References

- Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M. T., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2006). Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, *563*(1–2), 238–254.
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., & Ros-García, J. M. (2015). Cell wall compounds of red grapes skins and their grape marcs from three different winemaking techniques. *Food Chemistry*, *187*, 89–97.
- Baranac, J. M., Petranović, N. A., & Dimitrić-Marković, J. M. (1997). Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 2. Malvin and the nonglycosidized flavone quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(5), 1694–1697.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(2), 67–87.
- Brandão, E., Silva, M. S., García-Estévez, I., Williams, P., Mateus, N., Doco, T., ... Soares, S. (2017). The role of wine polysaccharides on salivary protein-tannin interaction: A molecular approach. *Carbohydrate Polymers*, *177*, 77–85.
- Brouillard, R., & Delaporte, B. (1977). 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*, *99*(26), 8461–8468.
- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, *344*(14), 1879–1900.
- Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., & De Freitas, V. (2006). Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(23), 8936–8944.
- Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., III, Simmerling, C. L., Wang, J., Roe, D. R., Duke, R. E., Luo, R., Walker, R. C., Zhang, W., Merz, K. M., Roberts, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Swails, J., Götz, A. W., Kolossváry, I., ... Kollman, P. A. (2012). *Amber 12*. San Francisco: University of California.
- Cruz, L., Basílio, N., Mateus, N., De Freitas, V., & Pina, F. (2022). Natural and synthetic flavylum-based dyes: The chemistry behind the color. *Chemical Reviews*, *122*(1), 1416–1481.
- Dangles, O., Saito, N., & Brouillard, R. (1993). Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*, *34*(1), 119–124.
- Fernandes, A., Oliveira, J., Fonseca, F., Ferreira-da-Silva, F., Mateus, N., Vincken, J. P., & de Freitas, V. (2020). Molecular binding between anthocyanins and pectic polysaccharides—Unveiling the role of pectic polysaccharides structure. *Food Hydrocolloids*, *102*, Article 105625.
- Fernandes, A., Brandão, E., Raposo, F., Maricato, É., Oliveira, J., Mateus, N., Coimbra, M. A., & de Freitas, V. (2020). Impact of grape pectic polysaccharides on anthocyanins thermostability. *Carbohydrate Polymers*, *239*, Article 116240.
- García-Estévez, I., Alcalde-Eon, C., & Escribano-Bailón, M. T. (2017). Flavanol quantification of grapes via multiple reaction monitoring mass spectrometry. Application to differentiation among clones of *Vitis vinifera* L. cv Rufete grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(31), 6359–6368.
- García-Estévez, I., Jacquet, R., Alcalde-Eon, C., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T., & Quideau, S. (2013). Hemisynthesis and structural and chromatic characterization of delphinidin 3-O-glucoside—vescalagin hybrid pigment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(47), 11560–11568.
- Gómez-Míguez, M., González-Manzano, S., Escribano-Bailón, M. T., Heredia, F. J., & Santos-Buelga, C. (2006). Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(15), 5422–5429.
- Gonçalves, J., Silva, C. L., Castilho, P. C., & Câmara, J. S. (2013). An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. *Microchemical Journal*, *106*, 129–138.
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F. J., Escudero-Gilete, M. L., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2012). Comprehensive Colorimetric study of anthocyanic copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(11), 2896–2905.
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L., Quijada-Morín, N., Rivas-Gonzalo, J. C., García-Estévez, I., Heredia, F. J., & Escribano-Bailón, M. T. (2015). Application of differential colorimetry to evaluate anthocyanin-flavonol-flavanol ternary copigmentation interactions in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(35), 7645–7653.
- Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2007). Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempranillo red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(26), 10720–10728.
- Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Williams, P., & Doco, T. (2015). Determination of must and wine polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and size-exclusion chromatography (SEC). In *Polysaccharides: Bioactivity and biotechnology* (pp. 1265–1297). Cham: Springer.
- He, F., Liang, N.-N., Mu, L., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C.-Q. (2012). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, *17*(2), 1571–1601.
- Heredia, F. J., Alvarez, C., González-Miret, M. L., & Ramírez, A. (2004). *CromaLab, análisis de color*. Registro General de la Propiedad.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, *14*(1), 33–38.
- Jones-Moore, H. R., Jelley, R. E., Marangon, M., & Fedrizzi, B. (2021). The polysaccharides of winemaking: From grape to wine. *Trends in Food Science and Technology*, *111*, 731–740.
- Kunsági-Máté, S., Szabó, K., Nikfardjam, M. P., & Kollár, L. (2006). Determination of the thermodynamic parameters of the complex formation between malvidin-3-O-glucoside and polyphenols. Copigmentation effect in red wines. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *69*(1–2), 113–119.
- Manjón, E., Li, S., Dueñas, M., García-Estévez, I., & Escribano-Bailón, M. T. (2023). Effect of the addition of soluble polysaccharides from red and white grape skins on the polyphenolic composition and sensory properties of Tempranillo red wines. *Food Chemistry*, *400*, Article 134110.
- Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Note. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Science and Technology International*, *7*(5), 439–444.
- Mazza, G., & Brouillard, R. (1990). The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, *29*(4), 1097–1102.
- Nunan, K. J., Sims, I. M., Bacic, A., Robinson, S. P., & Fincher, G. B. (1997). Isolation and characterization of cell walls from the mesocarp of mature grape berries (*Vitis vinifera*). *Planta*, *203*, 93–100.
- Ruiz-García, Y., Smith, P. A., & Bindon, K. A. (2014). Selective extraction of polysaccharide affects the adsorption of proanthocyanidin by grape cell walls. *Carbohydrate Polymers*, *114*, 102–114.
- Santos-Buelga, C., & de Freitas, V. (2009). Influence of phenolics on wine organoleptic properties. In *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 529–570). New York, NY: Springer New York.
- Slavov, A., Denev, P., Panchev, I., Shikov, V., Nenov, N., Yantcheva, N., & Vasileva, I. (2017). Combined recovery of polysaccharides and polyphenols from *Rosa damascena* wastes. *Industrial Crops and Products*, *100*, 85–94.
- Teixeira, N., Cruz, L., Brás, N. F., Mateus, N., Ramos, M. J., & de Freitas, V. (2013). Structural features of copigmentation of oenin with different polyphenol copigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(28), 6942–6948.
- Torres-Rochera, B., Manjón, E., Brás, N. F., Escribano-Bailón, M. T., & García-Estévez, I. (2023). Supramolecular study of the interactions between malvidin-3-O-glucoside and wine phenolic compounds: Influence on color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c08502>
- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chemical Reviews*, *116*(9), 4937–4982.
- Weilack, I., Mehren, L., Schieber, A., & Weber, F. (2023). Grape-derived pectic polysaccharides alter the tannin and pigment composition of Cabernet Sauvignon red wines. *Current Research in Food Science*, *6*, Article 100506.
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., & Zhou, Y. (2021). The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, *63*(1), 251–272.

Capítulo 3



Papel de los antocianos en la interacción entre las mucinas salivales y compuestos del vino con características astringentes

3.1. Introducción

El color y la astringencia, dos de los atributos organolépticos más importantes para la calidad del vino tinto, se ven afectados como consecuencia del cambio climático debido al desfase que se está generando entre los momentos en que las uvas alcanzan la madurez fenólica y la tecnológica. Estas dos características organolépticas están determinadas, principalmente por la composición fenólica del vino. En los capítulos anteriores de esta Tesis se han tratado distintos aspectos relacionados con el color del vino tinto, mientras que este último capítulo de Tesis se dedica a profundizar sobre los mecanismos que conducen al desarrollo de la sensación de astringencia. La astringencia es una experiencia sensorial que se percibe al consumir ciertos alimentos y bebidas como el vino tinto, dando como resultado una sensación de sequedad, rugosidad o aspereza en la boca. Una astringencia equilibrada es fundamental para los vinos de calidad, ya que cuando esta sensación se percibe con alta intensidad es considerada desagradable por los consumidores y, por otra parte, si es excesivamente baja, los vinos pueden ser calificados como planos y sin cuerpo. El principal mecanismo relacionado con esta sensación es la interacción de ciertos compuestos fenólicos del vino, como flavanoles y flavonoles, con

Capítulo 3

proteínas salivales ricas en prolina (PRP) (Gawel, 1998; Soares et al., 2020), formando complejos proteína-polifenol que pueden precipitar, dando lugar a una pérdida de lubricación en la cavidad bucal (Baxter et al., 1997). Sin embargo, se trata de una sensación muy compleja cuyo mecanismo no ha sido completamente elucidado.

Como se ha visto en los capítulos anteriores, los flavanoles y flavonoles también participan en la estabilización de formas coloreadas de malvidina 3-*O*-oglucósido mediante el efecto de copigmentación. Sin embargo, estos compuestos son especialmente importantes para la astringencia y, además, se ha puesto de manifiesto que algunas mezclas de flavanoles:antocianos presentan un efecto sinérgico hacia la interacción con las PRP en comparación con los polifenoles individuales (Soares et al., 2019).

Aunque las PRP son las principales proteínas salivales estudiadas para explicar la astringencia, existen otros tipos de proteínas en la saliva que podrían jugar un papel determinante, como las mucinas. Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular (500-20.000 kDa) que representan las principales proteínas del proteoma salival. Estas proteínas están altamente glicosiladas y constan de un 80% de carbohidratos, principalmente N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucosa, galactosa y ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) y trazas de manosa y sulfato (Bansil & Turner, 2006). El interés por las mucinas está aumentando en los últimos años, debido a sus propiedades biológicas y por su implicación en la lubricación, hidratación y protección de la cavidad bucal (Davies et al., 2014; Dhanisha et al., 2018). Además, ha sido descrito que las mucinas también pueden interactuar con los polifenoles de los alimentos (Davies et al., 2014; C. A. Lee & Vickers, 2012; Nayak & Carpenter, 2008), y más concretamente con los flavanoles del vino (Brandão et al., 2017), lo que puede afectar su función lubricante, por lo que estas proteínas también podrían desempeñar un papel importante en la

percepción de la astringencia. Aunque la importancia de las mucinas en la lubricación bucal está ampliamente documentada, aún se desconoce el papel que podrían tener las mucinas salivales en el desarrollo de la astringencia. Por ello, es importante profundizar en el estudio de las interacciones de estas proteínas con compuestos fenólicos del vino para obtener nuevos conocimientos sobre los mecanismos que producen la sensación de astringencia, sensación altamente relevante para la calidad del vino tinto.

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica de gran utilidad para obtener los parámetros termodinámicos que gobiernan las interacciones proteína:ligando (Cala et al., 2010; Ramos-Pineda et al., 2017; Watrelot et al., 2015), incluso cuando la interacción es débil. El calorímetro detecta si el calor desprendido por la interacción es exotérmico o endotérmico y, debido al cambio de entalpía que implican estas interacciones, se puede estudiar la termodinámica de las interacciones proteína:ligando, así como los tipos de fuerzas involucradas (De Freitas & Mateus, 2012). Además, esta técnica es especialmente atractiva porque no implica ninguna modificación química ni inmovilización de ninguna de las especies que interactúan. Sin embargo, la interpretación de los resultados de esta técnica es compleja porque la interacción polifenol:proteína no sigue el modelo clásico de llave-cerradura (*lock and key*) y es necesario ajustar los datos siguiendo un modelo que contemple múltiples sitios de unión independientes (Soares, García-Estévez, et al., 2018).

3.2. Objetivos

El objetivo principal del **Capítulo 3** es evaluar el papel de las mucinas, proteínas salivales de alto peso molecular, en la sensación de astringencia, al interactuar con compuestos fenólicos del vino. Además, se pretende estudiar si las interacciones entre mucinas y flavanoles y mucinas y flavonoles se ven afectadas, a su vez, por la interacción de copigmentación de estos compuestos fenólicos con los antocianos. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar y caracterizar la interacción de las mucinas salivales con diferentes compuestos fenólicos del vino (catequina, epicatequina y quercetina 3- β -glucopiranosido), mediante ITC.
- Profundizar en el conocimiento sobre los mecanismos de astringencia del vino, estudiando el papel de la malvidina 3-*O*-glucósido en las interacciones con las mucinas salivales.
- Estudiar, mediante ITC, interacciones ternarias que involucran las mucinas con malvidina 3-*O*-glucósido y flavanoles (catequina, epicatequina) o bien el flavonol quercetina 3- β -glucopiranosido.

3.3. Resumen

La siguiente publicación recoge los trabajos que constituyen el **Capítulo 3**:

Torres-Rochera, B., Manjón, E., Escribano-Bailón, M. T., & García-Estévez, I. (2023). Role of Anthocyanins in the Interaction between Salivary Mucins and Wine Astringent Compounds. *Foods*, 12(19), 3623. DOI: 10.3390/foods12193623

En este trabajo se estudió, mediante ITC y a pH de 3,6, (valor de pH habitual en el vino), la interacción entre mucinas salivales y diferentes compuestos fenólicos del vino (mucina:catequina (MC), mucina:epicatequina (ME), mucina:quercetina 3- β -glucopiranosido (MQG)), con el objetivo de determinar si estas proteínas podrían llegar a tener un papel en el desarrollo de la astringencia. Además, un estudio reciente señaló el posible papel del pigmento cianidina 3-*O*-glucósido en el desarrollo de la astringencia (Mao et al., 2023). Sin embargo, el principal antociano de los vinos es la malvidina 3-*O*-glucósido, por lo que este trabajo se focalizó en el estudio de las interacciones entre malvidina 3-*O*-glucósido (Mv) y las mucinas salivales (mucina:malvidina 3-*O*-glucósido (MMv)). Además, para determinar si las interacciones de copigmentación, entre antocianos y otros compuestos fenólicos, concretamente flavanoles y flavonoles, que se producen en la matriz del vino podrían afectar a las interacciones de estos compuestos con la mucina, también se estudiaron las interacciones ternarias, flavanol:antociano (mucina:malvidina 3-*O*-glucósido:catequina (MMvC), mucina:malvidina 3-*O*-glucósido:epicatequina (MMvE)) y flavonol:antociano (mucina:malvidina 3-*O*-glucósido:quercetina 3- β -glucopiranosido (MMvQG)) con las proteínas salivales de alto peso molecular estudiadas en este trabajo. Dentro de las concentraciones habituales del vino para los compuestos ensayados, para los experimentos de ITC se seleccionaron aquellas que permitían registrar una señal energética suficiente hasta que se alcanzó la

Capítulo 3

saturación del proceso. El modelo que mejor se ajustó a los datos isotérmicos considera dos sets (Set 1 y Set 2) de sitios de unión independientes. Los mecanismos de unión se evaluaron comparando el cambio en la entalpía (ΔH) y en la componente entrópica ($T \cdot \Delta S$) de los sistemas. Cuando el proceso está impulsado por la entalpía, lo que significa valores negativos de ΔH , las interacciones están asociadas con enlaces de hidrógeno (McRae et al., 2010). Sin embargo, cuando el proceso está impulsado por la entropía, es decir, se obtienen valores negativos de $-T \cdot \Delta S$, las fuerzas principales son las interacciones hidrofóbicas (McRae et al., 2010), cuyo establecimiento conduce al desplazamiento de las moléculas de agua hacia el exterior. Cuando tanto la entalpía como la componente entrópica tienen valores negativos, se consideran ambas fuerzas. Asimismo, los valores negativos del cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) indican siempre que las interacciones resultantes son espontáneas. Los ajustes también permiten obtener las constantes de unión (K); de forma que cuanto mayor sea el valor de K , más fuerte será la interacción proteína:polifenol (McRae et al., 2015).

Los resultados obtenidos muestran que todas las interacciones presentan valores negativos en la energía libre de Gibbs liberada, por lo que todos los procesos estudiados en este trabajo fueron espontáneos. Los estudios que involucran la presencia de C en el medio de interacción mostraron una mayor afinidad de la Mv con la M en comparación con la que presenta la propia C hacia la proteína, por lo que parece que los antocianos tienen mayor afinidad que la C por la M. Esto indicaría que los pigmentos podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de la astringencia que involucra proteínas salivales de alto peso molecular. Respecto a las fuerzas impulsoras involucradas en estos procesos, se puede observar que para ambas interacciones binarias MC y MMv ambos tipos de fuerzas, tanto interacciones hidrofóbicas como enlaces de hidrógeno, participan en la interacción, ya que ΔH y $T \cdot \Delta S$ mostraron valores negativos (Manjón et

al., 2020). Estos resultados están de acuerdo con estudios previos realizados con flavanoles y proteínas salivales, que indican que este tipo de interacciones ambos tipos de fuerzas están involucradas (De Freitas et al., 2003; Ferrer-Gallego et al., 2015; Poncet-Legrand et al., 2007; Ramos-Pineda et al., 2017). Además, estos resultados también mostraron nueva información sobre el mecanismo que tiene lugar entre las proteínas de alto peso molecular y los antocianos, ya que los antocianos podrían interactuar de forma similar a los flavanoles con las mucinas. Sin embargo, cuando se analiza la interacción ternaria MMvC, las fuerzas involucradas cambian en comparación con su interacción binaria, dentro de cada Set de sitios de unión. Para el Set 1, la interacción entre M y C (MMvC (C)) está impulsada por interacciones hidrofóbicas mientras que Mv (MMvC (Mv)) parece unirse a la mucina por enlaces de H. En cambio, ocurre lo contrario para el Set 2, en el que C interactúa con M por enlaces de H, mientras que Mv interactúa con M mediante fuerzas hidrofóbicas. Por lo tanto, estos resultados mostraron que, en algunos puntos de unión, las interacciones podrían ocurrir mediante fuerzas hidrofóbicas entre las superficies planas del polifenol y los planos del anillo de los aminoácidos de mucina, mientras que en otros, los enlaces de H establecidos por interacciones polares entre los grupos carbonilo y amino de la M y los grupos hidroxilo de la C dirigirían la interacción, lo que concuerda con estudios previos sobre interacciones flavanol:PRPs (McRae et al., 2010; Poncet-Legrand et al., 2007). Además, los resultados respecto a las constantes de afinidad señalaron que, cuando Mv y C están juntos en la solución, la interacción de ambos compuestos con la M es menos intensa, es decir, se ve dificultada, por lo que parece que la formación de los complejos de copigmentación entre Mv y C podría dificultar la interacción con las mucinas. Esto podría explicar también la diferente forma en que se produce la interacción cuando ambos compuestos están en solución frente a cuando están aislados junto a la mucina, como indica el cambio en las fuerzas

Capítulo 3

involucradas en las interacciones. Estos resultados estarían sugiriendo un papel indirecto del antociano en la interacción entre los flavanoles y las proteínas salivales de alto peso molecular, destacando la importancia de los pigmentos del vino para los mecanismos de astringencia relacionados con la mucina.

Por otra parte, respecto a la epicatequina, los resultados mostraron que la interacción de este compuesto con la mucina no liberó ni consumió suficiente calor como para ser detectado por el microcalorímetro. Según estudios previos realizados con ITC que involucran E (Soares et al., 2019), este flavanol sí interactúa espontáneamente con PRP básicas, pero no se observa interacción utilizando esta técnica entre E y PRP ácidas, por lo que parece que la interacción entre E y las proteínas salivales depende en gran medida de la estructura de la proteína involucrada. En el caso de la interacción ternaria que involucra a la Mv y la E, se observa que la interacción entre M y Mv presenta mayor afinidad de unión que la interacción entre M y E, de forma equivalente a lo que ocurriría en el caso de la catequina, por lo que vemos nuevamente la importancia que los pigmentos del vino pueden tener en el desarrollo de los mecanismos de astringencia que relacionados con las mucinas. Sin embargo, en este caso, la interacción binaria entre Mv y M es menos fuerte que la interacción entre esos dos compuestos en la mezcla ternaria MMvE. Por lo tanto, parece que la presencia de E en la solución incrementa la capacidad de la Mv para interactuar con las M. Igualmente, la presencia de Mv en la solución favorece la interacción de E con M, puesto que al contrario que en la mezcla binaria, en la mezcla ternaria sí existe interacción entre este flavanol y la mucina. Por tanto, la presencia conjunta de Mv y E favorece la interacción de ambos compuestos con la mucina, lo que concuerda con estudios previos que demostraron que las mezclas Mv:E tienen mayor afinidad hacia otras proteínas salivales, como las PRP (Soares et al., 2019). De esta manera, podemos decir que los antocianos podrían tener un fuerte efecto indirecto sobre

el papel de la E en el desarrollo de la astringencia del vino relacionada con las mucinas. En cuanto a las fuerzas impulsoras implicadas en estas interacciones, ambas fuerzas, hidrofóbica y enlaces H, están involucradas en la interacción binaria entre M y Mv. Además, como en el caso de C, cuando observamos la interacción ternaria MMvE, las fuerzas involucradas son diferentes a las de la interacción binaria MMv. En este caso, las fuerzas involucradas en la interacción entre los compuestos fenólicos y la mucina en el proceso ternario son las mismas dentro de cada Set, siendo las interacciones hidrofóbicas las predominantes en el Set 1 y los enlaces de H para el Set 2. Estos resultados indican que la formación de los complejos de copigmentación MvE puede modificar la forma y la intensidad en la que estos compuestos interactúan con las mucinas.




Por lo que respecta a los resultados de los ensayos de interacción entre mucinas y quercetina 3- β -glucopiranosido, se observó que la interacción no liberó ni consumió suficiente calor como para ser detectada por el microcalorímetro, al igual que ocurría con la interacción ME, por lo que se puede decir que, a la concentración a la que se suele encontrar en el vino, la QG no es capaz de interactuar con las mucinas salivales, lo que podría indicar que los flavonoles no estarían involucrados en el mecanismo de astringencia en el que intervienen las proteínas salivales de alto peso molecular como la mucina. Además, cuando se incluye Mv en el sistema, es decir, cuando se estudia la interacción ternaria MMvQG, no se observa ninguna interacción en la mezcla ternaria, lo que indicaría que la presencia del antociano no modifica ni favorece la interacción entre la QG y la M y, además, la Mv tampoco es capaz de interactuar con la mucina, lo que podría indicar que la fuerte interacción de copigmentación que existe entre la Mv y la QG, tal y como se demostró en el primer capítulo de esta tesis (Torres-Rochera et al., 2023), podría dificultar la interacción de estos compuestos con las mucinas.

Capítulo 3

Por tanto, podemos señalar la importancia de los antocianos en las interacciones con proteínas salivales de alto peso molecular como las mucinas, ya que la malvidina 3-*O*-glucósido es el compuesto fenólico que muestra, cuando se ensaya de forma aislada, la mayor afinidad hacia la mucina. En cambio, parece que los flavonoles no intervienen en las interacciones con este tipo de proteínas a la concentración a la que se suelen encontrar en los vinos tintos. La copigmentación podría ser también relevante para las interacciones entre compuestos fenólicos y mucinas, ya que la presencia de malvidina 3-*O*-glucósido en las soluciones modifica la intensidad y la forma en la que ocurren las interacciones entre flavanoles y mucinas, aunque de forma diferente dependiendo de la estructura de cada flavanol. Por ello, estos resultados apuntan a que los antocianos podrían desempeñar un papel importante, tanto de forma directa como indirecta, en el desarrollo de la astringencia cuando intervienen proteínas de alto peso molecular como las mucinas.

Article

Role of Anthocyanins in the Interaction between Salivary Mucins and Wine Astringent Compounds

Bárbara Torres-Rochera , Elvira Manjón, María Teresa Escribano-Bailón *  and Ignacio García-Estévez 

Department of Analytical Chemistry, Nutrition and Food Science, Universidad de Salamanca, E37007 Salamanca, Spain; barbara.torres@usal.es (B.T.-R.); elvira87@usal.es (E.M.); igarest@usal.es (I.G.-E.)
* Correspondence: escriban@usal.es; Tel.: +34-923294537

Abstract: Wine astringency is a very complex sensation whose complete mechanism has not been entirely described. Not only salivary proline-rich proteins (PRPs) are involved in its development; salivary mucins can also play an important role. On the other hand, it has been described that anthocyanins can interact with PRPs, but there is no information about their potential role on the interactions with mucins. In this work, the molecular interactions between salivary mucins (M) and different wine phenolic compounds, such as catechin (C), epicatechin (E) and quercetin 3- β -glucopyranoside (QG), as well as the effect of the anthocyanin malvidin 3-O-glucoside (Mv) on the interactions with mucins, were assessed by isothermal titration calorimetry (ITC). Results showed that the interaction between anthocyanin and mucins is stronger than that of both flavanols analyzed, since the affinity constant values were 10 times higher for anthocyanin than for catechin, the only flavanol showing interaction in binary assay. Moreover, at the concentration at which polyphenols are usually found in wine, flavonols seem not to be involved in the interactions with mucins. These results showed, for the first time, the importance of wine anthocyanins in the mechanisms of astringency involving high-molecular-weight salivary proteins like mucins.

Keywords: high-molecular-weight salivary proteins; phenolic compounds; ITC; astringency; copigmentation



Citation: Torres-Rochera, B.; Manjón, E.; Escribano-Bailón, M.T.; García-Estévez, I. Role of Anthocyanins in the Interaction between Salivary Mucins and Wine Astringent Compounds. *Foods* **2023**, *12*, 3623. <https://doi.org/10.3390/foods12193623>

Academic Editors: Christian Coelho and Niel Van Wyk

Received: 31 July 2023

Revised: 18 September 2023

Accepted: 25 September 2023

Published: 29 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

As a consequence of climate change, grape harvesting is performed when grapes have not yet reached phenolic maturity [1]. Therefore, the sensory properties of wine are affected, such as color and astringency, which are two of the most important organoleptic attributes for red wine quality since phenolic compounds play an important role in these two organoleptic features.

The red color of anthocyanins is due to the flavylium cation, only stable at acidic pH ($\text{pH} \leq 2$). When the pH increases, the flavylium cation is involved in different equilibrium reactions producing mainly non-colored forms of anthocyanin. The association of anthocyanins with other compounds, in a phenomenon called copigmentation, shifts this equilibrium towards the flavylium cation, thus leading to an improvement in the chemical and colorimetric stability of the anthocyanin. Hence, the intense red color of young red wines (pH ca. 3.6) is mostly due to the interactions between the flavylium cation and other wine compounds such as flavanols, flavonols and phenolic acids [2,3]. When physical-chemical studies of the interaction flavanol:anthocyanin are performed, it is observed that association constants are higher than in the case of flavanols. However, their quantity in wine is much lower than the flavanol content, so major interactions between flavanols and anthocyanins are envisaged [4]. Among flavanols, it is well known that (–)-epicatechin is a better copigment than (+)-catechin due to its B ring conformation [5].

Astringency is a sensory experience perceived when consuming certain foods and drinks such as wine, resulting in a sensation of dryness, rugosity or roughness that is

generated in the mouth. The interaction of wine phenolic compounds, such as flavanols and flavonols, with salivary proline-rich proteins (PRPs) is the main mechanism related to astringency sensation [6,7]. This leads to protein:polyphenol complexes that can precipitate, thus resulting in a loss of lubrication in the oral cavity [8]. However, it is a very complex sensation whose complete mechanism has not been totally described. It has also been suggested that anthocyanins can also be considered to understand astringency perception, since it has been proved that they can form complexes with the PRPs [9]. Furthermore, a synergic effect of flavanol:anthocyanin mixtures towards the interaction with PRPs when compared to the individual polyphenol has also been observed [10].

PRPs are the main proteins studied to explain astringency. However, there are other types of proteins in saliva such as mucins, which are high-molecular-weight glycoproteins (500 to 20,000 kDa), that are present at the highest concentration in unstimulated whole human saliva (20–30% of the total protein) [11–13] and whose relationship with the development of astringency has been barely studied. Mucins are highly glycosylated, consisting of 80% carbohydrates, primarily *N*-acetylgalactosamine, *N*-acetylglucosamine, fucose, galactose, and sialic acid (*N*-acetylneuraminic acid) and traces of mannose and sulfate [14]. Moreover, mucins are attracting more interest for their biological properties and for their involvement in lubrication, hydration and protection of the oral cavity [15,16]. It has been already described that mucins can also interact with food polyphenols, which may affect their lubricating function, so these proteins could also play an important role in astringency [17–19] perception [16–19]. Even though the importance of mucins in oral lubrication is well documented, the study of the role of salivary mucins in the development of astringency is still lacking. Therefore, a more profound study of the interactions between these proteins and wine phenolic compounds is important to learn more details about the factors that could affect the mechanisms of astringency sensation, which, in turn, is very relevant for the acceptable wine quality.

Isothermal titration calorimetry (ITC) is an excellent technique to characterize protein binding to flavanols [10,20–22], even when the interaction is weak [10,20–22]. The calorimeter detects whether the heat given off by the interaction is exothermic or endothermic and, due to the enthalpy change that these interactions imply, the thermodynamics of protein:ligand interactions and the types of forces involved can be studied [23]. Moreover, this technique is particularly attractive because it does not involve any chemical modification or immobilization of either interacting species, which allows approaching wine tasting at a molecular level. However, the interpretation of the results from this technique can be difficult because polyphenol:protein interaction does not follow the classical “lock and key” model [24,25], and it is necessary to fit the data following one model that contemplates multiple independent binding sites [26].

To obtain new insights about the role of mucins in astringency sensation, the main objective of this work was to study and to characterize, by ITC and at an acidic pH of 3.6, in which wine is found, the interaction of salivary mucins (M) with different wine phenolic compounds (catechin (C), epicatechin (E) and quercetin 3- β -glucopyranoside (QG)). Recently, it has been reported that cyaniding 3-*O*-glucoside is able to interact with mucins mainly when oxidized to its quinone form and that that interaction is driven by hydrogen bond and van der Waals forces, according to ITC studies [27]. This points out a potential role of anthocyanins in astringency development. However, the main anthocyanin in most wines is malvidin 3-*O*-glucoside, which, in turn, is involved in the interaction with other phenolic compounds present in wines due to copigmentation. This way, this research further explored the knowledge about the mechanisms of wine astringency by including different phenolic compounds and mainly by studying the role of the main anthocyanin in wines (malvidin 3-*O*-glucoside) on the interactions with salivary mucins. Furthermore, and due to the significance of the copigment interactions in wine, it was assessed for the first time whether the interactions between mucins and flavanols and mucins and flavonols are affected, in turn, by the copigmentation interaction. To achieved this, the ternary

interactions involving malvidin 3-*O*-glucoside (Mv), the phenolic compound (flavanols (C and E) or flavonol QG) and salivary mucin were also deeply characterized by ITC.

2. Materials and Methods

Chemicals. (+)-catechin hydrate ($\geq 98\%$) (C), (–)-epicatechin ($\geq 90\%$) (E) and mucin (M) from bovine submaxillary glands were acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Quercetin 3- β -glucopyranoside ($\geq 99\%$) (QG) was purchased from Cymit Quimica (Barcelona, Spain). Ultrapure water came from a water purification system of MiliQ Gradient (Millipore, Billerica, MA, USA). The malvidin 3-*O*-glucoside pigment was obtained by isolation in the laboratory as it is explained below.

Isolation of Malvidin 3-*O*-Glucoside (Mv). Skins of *Vitis vinifera* cv Tempranillo grapes were used as source of Mv for isolation. The extraction of the grape skins was performed by using acidic methanol (methanol/HCl 0.5 N; 95:5 *v/v*) as described in García-Estévez et al. [28]. To purify the Mv, a Sephadex LH-20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) column was employed. This column was 40 cm high and had a diameter of 3.5 cm, which was previously conditioned using acidic water as eluent (HCl 0.1 M, pH 1.0) before the extract was loaded, as described in García-Estévez et al., with some minor modifications [29]. Skin extract was loaded into the column and then the elution was performed using the aqueous HCl solution. Mv eluted in the first fraction collected (*ca.* 20 mL). The process was repeated to obtain several fractions, and their purity was checked by HPLC-DAD-MS, showing values of purity $>95\%$, and then collected and freeze-dried to provide a dark reddish purple powder.

Isothermal Titration Calorimetry Assays. The thermodynamic parameters associated with binary and ternary mucin:polyphenol interactions were obtained from the ITC experiments using a MicroCal PEAQ-ITC system (Malvern, Worcestershire, UK). Studies were performed at 298 K (25 °C), which is the temperature of the mouth when wine is tasted. In all cases, the phenolic compound (PC) solution was charged into the injection syringe while the mucin was put into the 0.2 mL sample cell of the calorimeter, and the content of the sample cell was constantly stirred at 1200 rpm. All the assays consisted of a sequence of 19 injections of 2 μ L each, with the time of the injection duration and the time between successive injections set as 2 s and 250 s, respectively. All solutions were prepared at wine pH (pH 3.6). The mucin solution was prepared at 500 nM and PC solutions were prepared at the following concentrations: 250 μ M QG, 500 μ M E and 2000 μ M C. Mv solutions were prepared at the same concentration of each PC and 1:1 PC:Mv mixtures were also prepared at those concentrations (250 μ M QG:250 μ M Mv; 500 μ M E:500 μ M Mv and 2000 μ M C:2000 μ M Mv). These concentrations were selected within the usual concentrations in wine to achieve the saturation of the process and to record sufficient energy signal. Blank experiments, where acidic water (pH 3.6) filled the sample cell, were also performed at all concentrations for each compound previously mentioned. All experiments were performed in triplicate. Data treatment was carried out using software AFFINimeter (Version 1.2.3) (Software for Science Developments, Santiago de Compostela, Spain), which allowed the use of an independent sites model with two different types of sites for the interaction (two sets of sites) to obtain the fitting curve (enthalpy change vs. molar ratio). From that fitting, the binding apparent constant (*K*), the Gibbs free energy (ΔG), the enthalpy change (ΔH) and the entropy component ($-T\cdot\Delta S$) were calculated.

Statistical Analysis. The statistical significance of the differences between the results were assessed by using one-way analysis of variance (ANOVA) and post hoc Tukey test employing software GraphPad Prism (Version 5.02). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

ITC is an interesting technique used to obtain the thermodynamic parameters that govern protein:ligand interactions [24,25,30]. Binary interactions between different PC, i.e., flavanols (C, E) or a flavonol (QG) with mucin were studied by this technique to determine

whether these phenolic compounds could interact with high-molecular-weight salivary glycoproteins and whether that way these proteins could participate in the astringency perception. Furthermore, ternary interactions, flavanol–anthocyanin or flavonol–anthocyanin with mucin, were also studied to figure out whether a previous interaction established between the phenolic compounds, the so-called copigmentation interactions that occur in the wine matrix, could affect the interactions with the protein.

In this study, C and its isomer E were chosen because flavanols are frequently the most abundant phenolic compounds found in red wines, and QG was used because it is well known that flavonols easily interact with anthocyanins establishing copigmentation adducts due to their quasi-planarity. As has been mentioned in Section 2, the concentrations assayed for the ITC experiments were selected within the usual concentrations found in wine to record sufficient energy signal until process saturation was reached.

The model that best fit the isothermal data considered two sets (Set 1 and Set 2) and independent sites. The mechanisms of binding were evaluated by comparing the change in enthalpy (ΔH) and in the entropic component ($-T \cdot \Delta S$) of the systems. When the process is driven by enthalpy, which means negative values of ΔH , interactions are associated with hydrogen bonding [21], which may occur in a first step when polyphenol and protein interact to form the complexes and/or between those complexes in a second step to form aggregates. However, the process is driven by entropy when negative values of $-T \cdot \Delta S$ are obtained, and then, the main forces are hydrophobic interactions [21] that lead to the displacement of water molecules. In all cases, the negative values of the change in Gibbs free energy (ΔG) indicate that the resulting interactions are spontaneous. Furthermore, the binding constants (K) were also obtained; the higher the K value, the stronger the protein:polyphenol interaction [31].

3.1. Interaction Assays Corresponding to Catechin System

Figure 1 shows the isotherm fitting for the binary interactions (MC and MMv₂₀₀₀, Figure 1A,B, respectively) and the corresponding ternary interaction (MMvC, Figure 1C) systems. The thermodynamic parameters obtained (K , ΔG , ΔH and $-T \cdot \Delta S$) for each system are shown in Table 1. In all cases, it was observed that the released energy indicated spontaneous processes (ΔG values were all negative), so both C and Mv are able to interact with M both separately or when they are mixed. However, exothermic and endothermic processes occur depending on the interaction, as is explained below. In the literature, similar results have been reported for the interaction of individual flavanols and other proteins such as salivary proteins [25], PRPs [10] and other model proteins such as poly-(L-proline) [22] and bovine serum albumin [32]. However, as can be seen in Table 1, the most negative ΔG values were found for the MMv₂₀₀₀ interaction for Set 1 and Set 2 (-1.43×10^4 and -1.22×10^4 , respectively), which indicates a higher affinity of Mv to M when compared to C, as the highest binding constant (3.22×10^{10} and $8.92 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) for the MMv₂₀₀₀ interaction also pointed out. Thus, it seems that the anthocyanin has a higher affinity to mucins than catechin, which might indicate that pigments could play an important role in the astringency development involving high-molecular-weight salivary proteins. MMvC ternary interaction showed values indicating the weakest interaction for both compounds, C and Mv, and in both sets (see K values of MMvC (C) and MMvC (Mv) in Table 1). Moreover, when Mv and C were together in the solution, both compounds showed very similar affinity towards M, whereas, as explained before, when these compounds were assayed isolated, Mv showed a much stronger interaction than C.

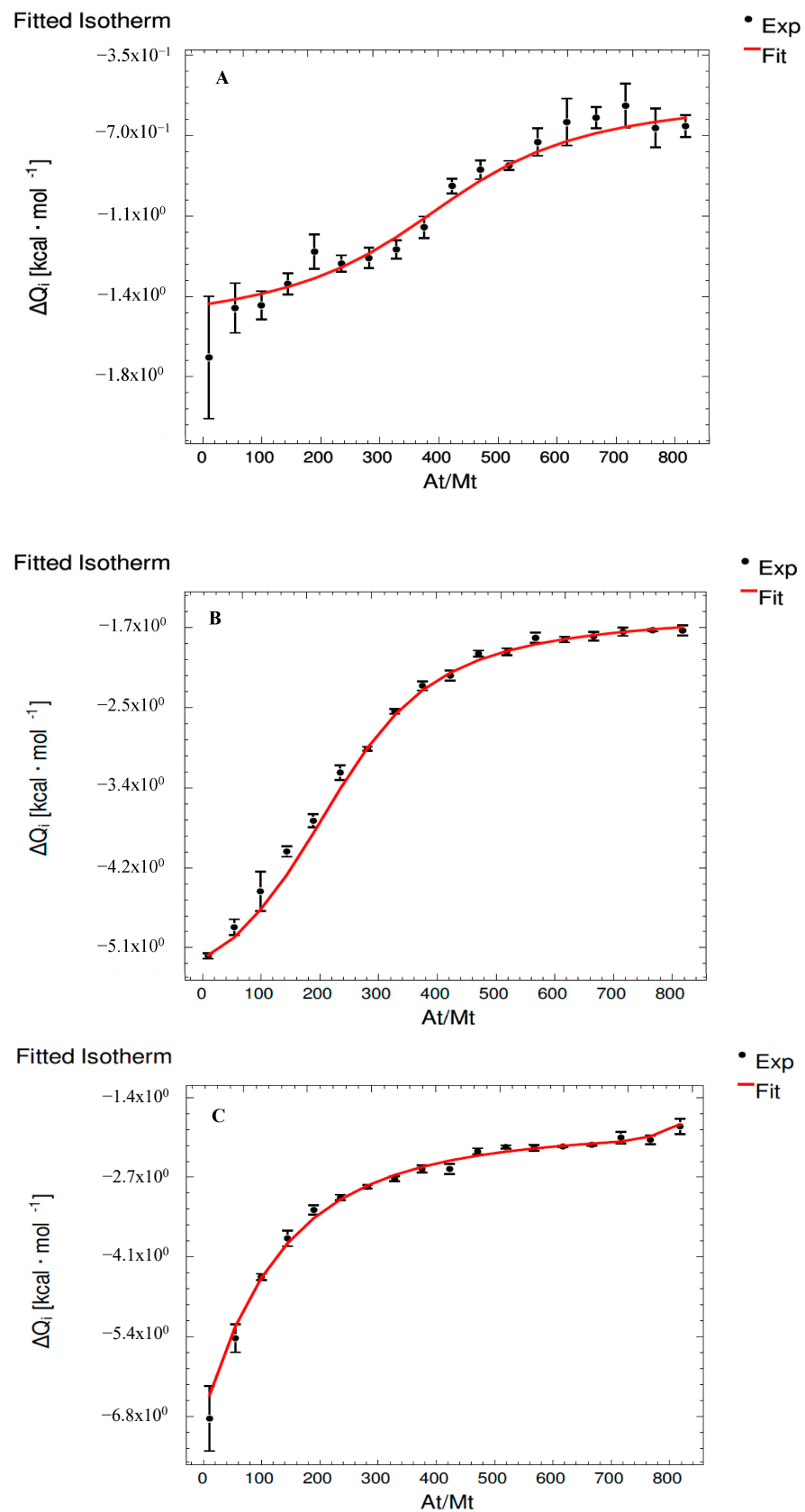


Figure 1. Isotherm fitting for (A) MC, (B) MMv₂₀₀₀ and (C) MMvC systems. At/Mt: ratio M/C, ratio M:MMv₂₀₀₀ and ratio M/Mv:C, respectively.

Table 1. Thermodynamic parameters for binary (M:C and M:Mv) and ternary (M:Mv:C) interactions.

Set 1	MC	MMvC (C)	MMvC (Mv)	MMv ₂₀₀₀
K_1 (M^{-1})	$(1.92 \pm 0.21) \times 10^9$ b	$(5.11 \pm 0.21) \times 10^7$ c	$(1.97 \pm 0.08) \times 10^7$ c	$(3.22 \pm 0.03) \times 10^{10}$ a
ΔH_1 (cal·mol ⁻¹)	$(-1.02 \pm 0.02) \times 10^3$ b	$(1.00 \pm 0.06) \times 10^5$ a	$(-4.03 \pm 0.13) \times 10^5$ c	$(-6.01 \pm 0.01) \times 10^3$ b
ΔG_1 (cal·mol ⁻¹)	$(-1.26 \pm 0.13) \times 10^4$ a,b	$(-1.05 \pm 0.04) \times 10^4$ a	$(-9.93 \pm 0.40) \times 10^3$ a	$(-1.43 \pm 0.01) \times 10^4$ b
$-T \cdot \Delta S_1$ (cal·mol ⁻¹)	$(-1.16 \pm 0.14) \times 10^4$ b	$(-1.10 \pm 0.06) \times 10^5$ c	$(3.93 \pm 0.13) \times 10^5$ a	$(-8.30 \pm 0.14) \times 10^3$ b
Set 2	MC	MMvC (C)	MMvC (Mv)	MMv ₂₀₀₀
K_2 (M^{-1})	$(6.09 \pm 0.08) \times 10^7$ b	$(1.00 \pm 0.01) \times 10^7$ c	$(1.02 \pm 0.02) \times 10^7$ c	$(8.92 \pm 0.20) \times 10^8$ a
ΔH_2 (cal·mol ⁻¹)	$(-1.55 \pm 0.10) \times 10^2$ b	$(-1.13 \pm 0.01) \times 10^5$ d	$(9.10 \pm 0.01) \times 10^4$ a	$(-1.36 \pm 0.01) \times 10^3$ c
ΔG_2 (cal·mol ⁻¹)	$(-1.06 \pm 0.01) \times 10^4$ b	$(-9.53 \pm 0.09) \times 10^3$ a	$(-9.54 \pm 0.19) \times 10^3$ a	$(-1.22 \pm 0.03) \times 10^4$ c
$-T \cdot \Delta S_2$ (cal·mol ⁻¹)	$(-1.04 \pm 0.01) \times 10^4$ b	$(1.04 \pm 0.01) \times 10^5$ a	$(-1.01 \pm 0.01) \times 10^5$ c	$(-1.08 \pm 0.03) \times 10^4$ b

MMvC (C): the interaction parameters of C in the ternary system; MMvC (Mv): the interaction parameters of Mv in the ternary system. Different letters in each row indicate statistical differences ($p < 0.05$) according to post hoc Tukey test.

Regarding the driving forces involved in these processes, it can be observed that in both binary interactions (MC and MMv), both types of forces, hydrophobic interactions and hydrogen bonds (H-bonds), take place, since both ΔH and $-T \cdot \Delta S$ show negative values [33] (Table 1). From previous studies performed involving salivary proteins and flavanols, it is widely known that this interaction usually involves both types of bonds, i.e., hydrophobic interactions and hydrogen bonding [22,25,34,35]. Our results show that anthocyanins interact in a similar way with mucins, which gives rise to new information about the mechanism that takes place between high-molecular-weight proteins and anthocyanins. However, when the Mv:C mixture is assayed towards the interaction with M, the forces involved in the interaction change when compared to the corresponding binary interaction. Also, within each set of sites, the forces involved in the interaction of Mv with M and in that between C and M are different (Table 1). Indeed, in Set 1, the interaction between C and M (see MMvC (C)) is mainly driven by hydrophobic interactions ($\Delta H > 0$ and $-T \cdot \Delta S < 0$), whereas Mv (see MMvC (Mv)) seems to bind to M mainly through H-bonds ($\Delta H < 0$ and $-T \cdot \Delta S > 0$). Likewise, the contrary effect occurs in Set 2, in which C interacts with M by H-bonds, whereas the M:Mv interaction is driven by hydrophobic forces.

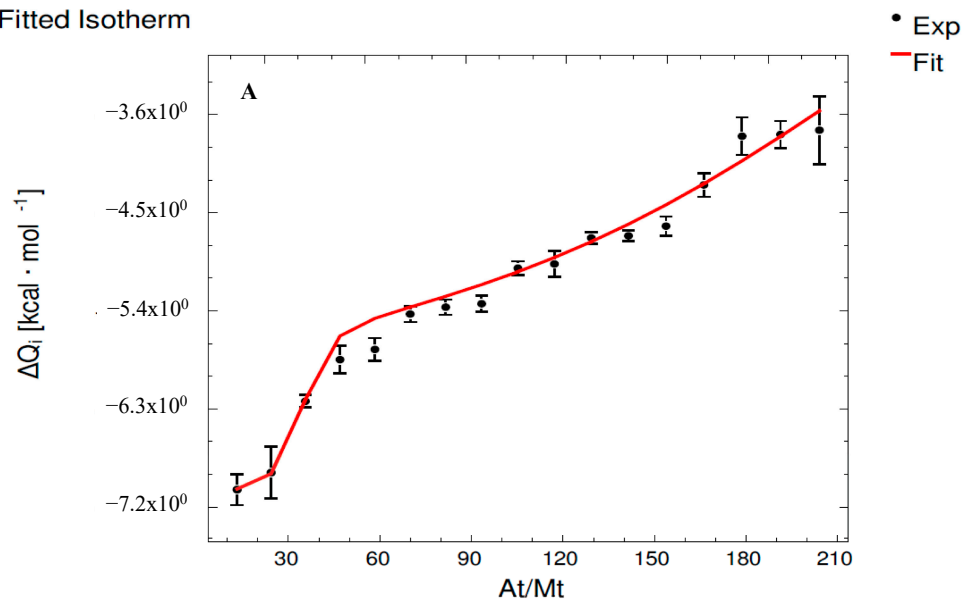
Therefore, the studied interactions might occur by hydrophobic bonds between the planar surfaces of the polyphenol and the ring planes of the mucin amino acids, whereas hydrogen bonds may occur by polar interactions among the carbonyl and amino groups of the mucin and the hydroxyl groups on the catechin. This is in agreement with studies reported in the literature about flavanol:salivary protein interaction that show that hydrophobic interactions (π - π bonding) occur between heterocyclic proline rings of PRPs and the planar surfaces of the aromatic rings of flavanols, whereas hydrogen bonds happen between hydroxyl groups of flavanols and the carbonyl and amino groups of the protein residues [21,22].

Thus, these results point out that the interaction between Mv and C that occurs when these compounds are in the same solution hinders the interaction of both compounds with M, so the formation of the copigmentation complexes Mv:C complicates the interaction with the protein. This could be due to both lesser availability of the interaction points of these compounds due to the previous formation of the copigmentation complex and a potential steric hindrance of this complex that does not allow the interaction with mucin. These results indicate that the presence of Mv in the same concentration as that of C reduces the interaction of this flavanol with mucins, which could be related to the changes in the way in which the interaction occurs, as the change in the forces involved indicates. This may suggest an indirect role of the anthocyanin in the interaction between flavanols and high-molecular-weight salivary proteins, highlighting the importance of wine pigments for the mucin-related mechanisms of astringency.

3.2. Interaction Assays Corresponding to Epicatechin System

Figure 2 shows the isotherm fittings for MMv₅₀₀ (Figure 2A) and MMvE (Figure 2B) systems. The binary interaction between M and E did not release or consume enough heat to be detected by the microcalorimeter, so no fitting can be performed. However, according to previous ITC studies involving E [10], this flavanol spontaneously interacts with basic PRPs, but no interaction is observed using this technique between E and acidic PRPs, so it seems that the interaction between E and salivary proteins is highly dependent on the structure of the protein involved.

Fitted Isotherm



Fitted Isotherm

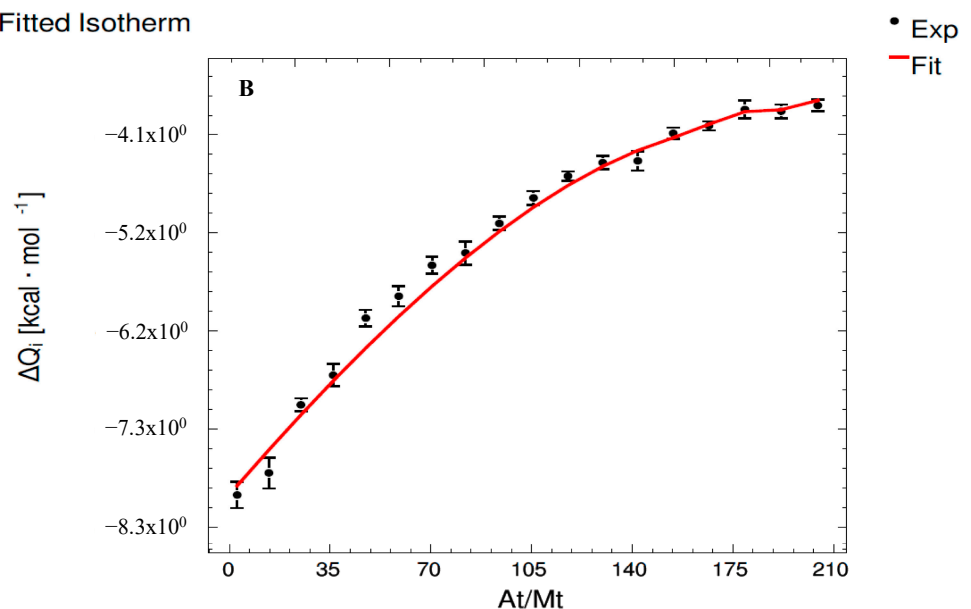


Figure 2. Isotherm fitting for (A) MMv₅₀₀ and (B) MMvE systems. At/Mt: ratio M:MMv₅₀₀ and ratio M/MMv:E, respectively.

In the case of the interaction between M and Mv and in the ternary interaction, as can be observed in Table 2, the released energy indicates spontaneous processes ($\Delta G < 0$). Moreover, as for the C system, Mv presents a higher binding affinity towards M than E, which is also observed in the case of PRPs [10]. This points out, again, the importance that wine pigments may have on astringency development.

Table 2. Thermodynamic parameters for binary (M:E and M:Mv₅₀₀) and ternary (M: Mv:E) interactions.

Set 1	ME	MMvE (E)	MMvE (Mv)	MMv ₅₀₀
K_1 (M ⁻¹)	-	$(9.29 \pm 0.35) \times 10^8$ a	$(6.97 \pm 0.15) \times 10^8$ b	$(6.20 \pm 1.70) \times 10^7$ c
ΔH_1 (cal·mol ⁻¹)	-	$(2.03 \pm 0.10) \times 10^5$ a	$(1.37 \pm 0.10) \times 10^5$ b	$(-6.61 \pm 0.07) \times 10^3$ c
ΔG_1 (cal·mol ⁻¹)	-	$(-1.22 \pm 0.04) \times 10^4$ a	$(-1.20 \pm 0.03) \times 10^4$ a	$(-1.06 \pm 0.29) \times 10^4$ a
$-T \cdot \Delta S_1$ (cal·mol ⁻¹)	-	$(-2.16 \pm 0.10) \times 10^5$ c	$(-1.49 \pm 0.10) \times 10^5$ b	$(-4.01 \pm 2.98) \times 10^3$ a
Set 2	ME	MMvE (E)	MMvE (Mv)	MMv ₅₀₀
K_2 (M ⁻¹)	-	$(6.06 \pm 0.14) \times 10^8$ a	$(3.16 \pm 0.10) \times 10^8$ b	$(9.49 \pm 0.76) \times 10^4$ c
ΔH_2 (cal·mol ⁻¹)	-	$(-2.76 \pm 0.03) \times 10^5$ b	$(-3.57 \pm 0.18) \times 10^5$ c	$(-5.66 \pm 0.12) \times 10^3$ a
ΔG_2 (cal·mol ⁻¹)	-	$(-1.20 \pm 0.03) \times 10^4$ b	$(-1.16 \pm 0.04) \times 10^4$ b	$(-6.78 \pm 0.54) \times 10^3$ a
$-T \cdot \Delta S_2$ (cal·mol ⁻¹)	-	$(2.64 \pm 0.03) \times 10^5$ b	$(3.46 \pm 0.18) \times 10^5$ a	$(-1.12 \pm 0.66) \times 10^3$ c

MMvE (E): the interaction parameters of E in the ternary system; MMvE (Mv): the interaction parameters of Mv in the ternary system. Different letters in each row indicate statistical differences ($p < 0.05$) according to post hoc Tukey test.

However, in this case, the binary interaction between Mv and M is less strong than the ternary interaction, where both compounds, Mv and E, show higher affinity constants in the interaction with M than in that with the isolated Mv. Thus, the presence of both E and Mv in the solution enhances the ability of those compounds to interact with M, which is more noticeable for E since it is not able to interact with M when it is isolated. This is in agreement with previous studies that showed that Mv:E mixtures have the highest affinity towards other salivary proteins, namely PRPs [10], so it seems that, contrarily to that observed for C, the involvement of E and Mv in the copigmentation adducts may favor the interaction with salivary proteins, both low- and high-molecular-weight proteins. That way, anthocyanins can have a strong indirect effect on the role of E on the wine astringency development.

Moreover, the driving forces involved in these systems can be deduced from these ITC results (Table 2). As previously indicated, both forces, hydrophobic and H-bonds, are involved in the binary interaction between M and Mv ($\Delta H < 0$ and $-T \cdot \Delta S < 0$). Also, as in the case of C, when we observe the ternary interaction MMvE, the forces involved are different from those in the binary interaction MMv. However, in this case, the forces involved in the interaction between M and E and Mv in the ternary process are the same within each set of sites. In Set 1, results show that hydrophobic interactions ($\Delta H > 0$ and $-T \cdot \Delta S < 0$) are predominant, whereas H-bonds ($\Delta H < 0$ and $-T \cdot \Delta S > 0$) are the main driving forces for Set 2. These results indicate that the formation of the copigmentation adducts Mv:E modifies the way in which these compounds interact with M, regarding both the strength of the interaction and the type of forces involved. As for that previously reported for other salivary proteins of lower molecular weight than that of mucin, Mv seems to drive the interaction, and its presence seems to favor the interaction of E with M, which could be explained by two reasons. On the one hand, it could be explained since the formation of Mv:E copigmentation complexes allows the molecules the establishment of interactions with mucins through more prone interaction points, which, in turn, explains the modifications in the forces involved in the interaction. Indeed, it has been reported for PRPs that when E is isolated, A and mostly B rings from this flavanol are involved in the interaction, whereas in the presence of Mv:E, both phenolic compounds start to interact with PRPs through their ring B, which involved not only the phenolic parts of the molecules but also the methyl groups of the Mv B ring, as well as with the glucose moiety [10]. On the other hand, previous studies performed to assess the copigmentation interactions between flavanols and Mv by molecular dynamic simulations [36] showed that Mv:E are smaller than Mv:C adducts, since the distance between Mv and E in the adduct is shorter (4.5 Å) than that between Mv and C (4.8 Å). Thus, the Mv:E adducts might have less steric hindrance, which would favor their interaction with mucin.

3.3. Interaction Assays Corresponding to QG System

As in the case of E, the interactions in which QG is involved do not release or consume enough heat to be detected by the microcalorimeter, so it can be deduced that, at the concentration at which this compound is usually found in wine, it is not able to interact with mucin. This points out that flavonols might not be involved in the mechanism of astringency related to high-molecular-weight proteins, and the astringency reported for these phenolic compounds [37] may be explained by their ability to interact with PRPs [37] and with oral cells [38]. Also, when Mv is included in the system, no interaction is observed in the ternary assay, which points out that, in this case, the presence of the anthocyanin does not modify or favor the interaction between QG and M. This could be explained since, among the assayed phenolic compounds, the most stable interaction and the highest binding affinity is found, by far, between QG and Mv [36], so it seems that the strong interaction between QG and Mv hinders the interaction of those compounds with M.

4. Conclusions

In order to obtain insights about the potential role of mucins in wine astringency sensation, the molecular interactions between salivary mucins (M) and different wine phenolic compounds, such as catechin (C), epicatechin (E) and quercetin 3- β -glucopyranoside (QG), as well as the effect of copigmentation involving malvidin 3-O-glucoside (Mv) on the interactions with mucin, were assessed by ITC. Results pointed out the importance of anthocyanins in the interactions with high-molecular-weight salivary proteins such as mucins, since Mv is a phenolic compound showing, when isolated, the strongest affinity towards mucin. On the other hand, it seems that flavonols, such as QG, are not involved in the interactions with this type of protein at the concentration that they are usually found in red wines. Copigmentation seems to be also relevant for the interactions between phenolic compounds and mucins, since the presence of Mv in the solutions modifies the intensity and the characteristics (regarding the forces involved) of the interactions between flavanols and mucins, although in a different way depending on the flavanol structure. Thus, anthocyanins could play an important role, both directly and indirectly, in the astringency development involving high-molecular-weight salivary proteins like mucins.

Author Contributions: Conceptualization, B.T.-R., M.T.E.-B. and I.G.-E.; methodology, B.T.-R., E.M. and I.G.-E.; validation, E.M. and M.T.E.-B.; formal analysis, B.T.-R.; investigation, B.T.-R.; resources, B.T.-R., E.M.; visualization, B.T.-R.; writing—original draft preparation, B.T.-R., M.T.E.-B. and I.G.-E.; writing—review and editing, M.T.E.-B., E.M. and I.G.-E.; supervision, E.M., M.T.E.-B. and I.G.-E.; project administration, M.T.E.-B. and I.G.-E.; funding acquisition, M.T.E.-B. and I.G.-E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was financially supported by Grant PID2021-127126OB-C21 funded by MCIN/AEI/10.13039/501100011033 and by “ERDF A way of making Europe”. B.T.R. thanks Spanish MICIN for her FPI contract ref PRE2018–084209.

Data Availability Statement: The data used to support the findings of this study can be made available by the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

Catechin (C), epicatechin (E), malvidin 3-O-glucoside (Mv), mucin (M), mucin:catechin binary interaction (MC), mucin:epicatechin binary interaction (ME), mucin:malvidin 3-O-glucoside binary interaction (MMv), mucin:malvidin 3-O-glucoside:catechin ternary interaction (MMvC), mucin:malvidin 3-O-glucoside:epicatechin ternary interaction (MMvE), phenolic compounds (PC), quercetin 3- β -glucopyranoside (QG).

References

1. Mira de Orduña, R. Climate Change Associated Effects on Grape and Wine Quality and Production. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1844–1855. [[CrossRef](#)]
2. Boulton, R. The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *52*, 67–87. [[CrossRef](#)]
3. He, F.; Liang, N.-N.; Mu, L.; Pan, Q.-H.; Wang, J.; Reeves, M.J.; Duan, C.-Q. Anthocyanins and Their Variation in Red Wines I. Monomeric Anthocyanins and Their Color Expression. *Molecules* **2012**, *17*, 1571–1601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. González-Manzano, S.; Dueñas, M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C. Studies on the Copigmentation between Anthocyanins and Flavan-3-Ols and Their Influence in the Colour Expression of Red Wine. *Food Chem.* **2009**, *114*, 649–656. [[CrossRef](#)]
5. Brouillard, R.; Wigand, M.-C.; Dangles, O.; Cheminat, A. PH and Solvent Effects on the Copigmentation Reaction of Malvin with Polyphenols, Purine and Pyrimidine Derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1991**, *2*, 1235–1241. [[CrossRef](#)]
6. Gawel, R. Red Wine Astringency: A Review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **1998**, *4*, 74–95. [[CrossRef](#)]
7. Soares, S.; Brandão, E.; Guerreiro, C.; Soares, S.; Mateus, N.; de Freitas, V. Tannins in Food: Insights into the Molecular Perception of Astringency and Bitter Taste. *Molecules* **2020**, *25*, 2590. [[CrossRef](#)]
8. Baxter, N.J.; Lilley, T.H.; Haslam, E.; Williamson, M.P. Multiple Interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein Repeat Result in Complexation and Precipitation. *Biochemistry* **1997**, *36*, 5566–5577. [[CrossRef](#)]
9. Ferrer-Gallego, R.; Soares, S.; Mateus, N.; Rivas-Gonzalo, J.; Escribano-Bailón, M.T.; De Freitas, V. New Anthocyanin-Human Salivary Protein Complexes. *Langmuir* **2015**, *31*, 8392–8401. [[CrossRef](#)]
10. Soares, S.; Santos Silva, M.; García-Estévez, I.; Brandão, E.; Fonseca, F.; Ferreira-da-Silva, F.; Escribano-Bailón, M.T.; Mateus, N.; de Freitas, V. Effect of Malvidin-3-Glucoside and Epicatechin Interaction on Their Ability to Interact with Salivary Proline-Rich Proteins. *Food Chem.* **2019**, *276*, 33–42. [[CrossRef](#)]
11. Huq, N.L.; Cross, K.J.; Ung, M.; Myroforidis, H.; Veith, P.D.; Chen, D.; Stanton, D.; He, H.; Ward, B.R.; Reynolds, E.C. A Review of the Salivary Proteome and Peptidome and Saliva-Derived Peptide Therapeutics. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2007**, *13*, 547–564. [[CrossRef](#)]
12. Dinu, V.; Gillis, R.B.; MacCalman, T.; Lim, M.; Adams, G.G.; Harding, S.E.; Fisk, I.D. Submaxillary Mucin: Its Effect on Aroma Release from Acidic Drinks and New Insight into the Effect of Aroma Compounds on Its Macromolecular Integrity. *Food Biophys.* **2019**, *14*, 278–286. [[CrossRef](#)]
13. van Nieuw Amerongen, A.; Bolscher, J.G.M.; Veerman, E.C.I. Salivary Proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology? *Caries Res.* **2004**, *38*, 247–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Bansil, R.; Turner, B.S. Mucin Structure, Aggregation, Physiological Functions and Biomedical Applications. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* **2006**, *11*, 164–170. [[CrossRef](#)]
15. Dhanisha, S.S.; Guruvayoorappan, C.; Drishya, S.; Abeesh, P. Mucins: Structural Diversity, Biosynthesis, Its Role in Pathogenesis and as Possible Therapeutic Targets. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2018**, *122*, 98–122. [[CrossRef](#)]
16. Davies, H.S.; Pudney, P.D.A.; Georgiades, P.; Waigh, T.A.; Hodson, N.W.; Ridley, C.E.; Blanch, E.W.; Thornton, D.J. Reorganisation of the Salivary Mucin Network by Dietary Components: Insights from Green Tea Polyphenols. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108372. [[CrossRef](#)]
17. Brandão, E.; Santos Silva, M.; García-Estévez, I.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Soares, S. Molecular Study of Mucin-Procyanidin Interaction by Fluorescence Quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. *Food Chem.* **2017**, *228*, 427–434. [[CrossRef](#)]
18. Nayak, A.; Carpenter, G.H. A Physiological Model of Tea-Induced Astringency. *Physiol. Behav.* **2008**, *95*, 290–294. [[CrossRef](#)]
19. Lee, C.A.; Vickers, Z.M. Astringency of Foods May Not Be Directly Related to Salivary Lubricity. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, 302–306. [[CrossRef](#)]
20. Frazier, R.A.; Deaville, E.R.; Green, R.J.; Stringano, E.; Willoughby, I.; Plant, J.; Mueller-Harvey, I. Interactions of Tea Tannins and Condensed Tannins with Proteins. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 490–495. [[CrossRef](#)]
21. McRae, J.M.; Falconer, R.J.; Kennedy, J.A. Thermodynamics of Grape and Wine Tannin Interaction with Polyproline: Implications for Red Wine Astringency. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 12510–12518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Poncet-Legrand, C.; Gautier, C.; Cheynier, V.; Imberty, A. Interactions between Flavan-3-Ols and Poly(L-Proline) Studied by Isothermal Titration Calorimetry: Effect of the Tannin Structure. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 9235–9240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. De Freitas, V.; Mateus, N. Protein/Polyphenol Interactions: Past and Present Contributions. Mechanisms of Astringency Perception. *Curr. Org. Chem.* **2012**, *16*, 724–746. [[CrossRef](#)]
24. 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 J.* **2010**, *24*, 4281–4290. [[CrossRef](#)]
25. Ramos-Pineda, A.M.; García-Estévez, I.; Brás, N.F.; Martín Del Valle, E.M.; Dueñas, M.; Escribano Bailón, M.T. Molecular Approach to the Synergistic Effect on Astringency Elicited by Mixtures of Flavanols. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 6425–6433. [[CrossRef](#)]
26. Soares, S.; García-Estévez, I.; Ferrer-Galego, R.; Brás, N.F.; Brandão, E.; Silva, M.; Teixeira, N.; Fonseca, F.; Sousa, S.F.; Ferreira-da-Silva, F.; et al. Study of Human Salivary Proline-Rich Proteins Interaction with Food Tannins. *Food Chem.* **2018**, *243*, 175–185. [[CrossRef](#)]

27. Mao, M.; Li, K.; Liao, M.; Chen, F.; Hu, X.; Ma, L.; Ji, J. Study on the Interactions Between Oral Mucin and Cyanidin 3-O-Glucoside: The Effect of Oxidized Quinone. *Food Bioprocess Technol.* **2023**. [[CrossRef](#)]
28. García-Estévez, I.; Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.T. Flavanol Quantification of Grapes via Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. Application to Differentiation among Clones of *Vitis vinifera* L. Cv. Rufete Grapes. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 6359–6368. [[CrossRef](#)]
29. 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 Pigment. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 11560–11568. [[CrossRef](#)]
30. Watrelot, A.A.; Renard, C.M.G.C.; Le Bourvellec, C. Comparison of Microcalorimetry and Haze Formation to Quantify the Association of B-Type Procyranidins to Poly-L-Proline and Bovine Serum Albumin. *LWT—Food Sci. Technol.* **2015**, *63*, 376–382. [[CrossRef](#)]
31. McRae, J.M.; Ziora, Z.M.; Kassara, S.; Cooper, M.A.; Smith, P.A. Ethanol Concentration Influences the Mechanisms of Wine Tannin Interactions with Poly(L-proline) in Model Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 4345–4352. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Frazier, R.A.; Papadopoulou, A.; Green, R.J. Isothermal Titration Calorimetry Study of Epicatechin Binding to Serum Albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2006**, *41*, 1602–1605. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Manjón, E.; Brás, N.F.; García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M.T. Cell Wall Mannoproteins from Yeast Affect Salivary Protein-Flavanol Interactions through Different Molecular Mechanisms. *J. Agric. Food Chem.* **2020**, *68*, 13459–13468. [[CrossRef](#)]
34. De Freitas, V.; Carvalho, E.; Mateus, N. Study of Carbohydrate Influence on Protein-Tannin Aggregation by Nephelometry. *Food Chem.* **2003**, *81*, 503–509. [[CrossRef](#)]
35. Ferrer-Gallego, R.; Quijada-Morín, N.; Brás, N.F.; Gomes, P.; de Freitas, V.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Characterization of Sensory Properties of Flavanols—A Molecular Dynamic Approach. *Chem. Senses* **2015**, *40*, 381–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Torres-Rochera, B.; Manjón, E.; Brás, N.F.; Escribano-Bailón, M.T.; García-Estévez, I. Supramolecular Study of the Interactions between Malvidin-3-O-Glucoside and Wine Phenolic Compounds: Influence on Color. *J. Agric. Food Chem.* **2023**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Ferrer-Gallego, R.; Brás, N.F.; García-Estévez, I.; Mateus, N.; Rivas-Gonzalo, J.C.; De Freitas, V.; Escribano-Bailón, M.T. Effect of Flavonols on Wine Astringency and Their Interaction with Human Saliva. *Food Chem.* **2016**, *209*, 358–364. [[CrossRef](#)]
38. Guerreiro, C.; Brandão, E.; de Jesus, M.; Gonçalves, L.; Pérez-Gregório, R.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Soares, S. New Insights into the Oral Interactions of Different Families of Phenolic Compounds: Deepening the Astringency Mouthfeels. *Food Chem.* **2022**, *375*, 131642. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

CONSIDERACIONES FINALES



Como consecuencia del cambio climático, la vitivinicultura se está enfrentando a diversos retos derivados del desfase que se produce entre la madurez tecnológica, que cada vez es más temprana, y la madurez fenólica, que cada vez es más tardía, lo que implica defectos en los vinos principalmente en dos importantes propiedades organolépticas: el color y la astringencia.

En esta Tesis se llevan a cabo estudios, desde un punto de vista supramolecular, de interacciones entre compuestos fenólicos del vino y entre estos y polisacáridos con importancia en la estabilidad del color. Así mismo, se aborda por primera vez el papel que pueden llegar a tener las proteínas salivales de alto peso molecular en la astringencia y el posible efecto que los antocianos y las interacciones de copigmentación podrían ejercer. Conocer estos mecanismos es fundamental para sentar las bases de procesos de modulación de esas características sensoriales, lo que resulta de gran interés para el sector vitivinícola, de cara a la obtención de vinos de calidad, ya que podría permitir a los enólogos llegar, en un futuro, a poder estabilizar el color y a afinar niveles de astringencia no balanceados.

Los resultados de los trabajos de esta Tesis mostraron que, entre los cinco compuestos fenólicos estudiados correspondientes a las familias de flavanoles, flavonoles y ácidos fenólicos (tanto ácidos hidroxicinámicos o hidroxibenzoicos), el flavonol, concretamente la quercetina 3- β -glucopiranosido, presenta la interacción más estable y la mayor afinidad de unión con el catión flavilio de malvidina 3-*O*-glucósido (estudios a pH 1,1). El color de las soluciones de catión flavilio, determinado en el espacio CIELAB, resultaba, como consecuencia de la interacción con este flavonol, más oscuro y con tonalidades más azuladas, debido a un desplazamiento batocrómico del espectro de absorción en el visible, algo que se ve incrementado conforme aumenta la concentración

Consideraciones finales

de dicho flavonol. La mayor afinidad del flavonol por el pigmento fue puesta de manifiesto tanto por ITC como en los estudios de simulación MD. Estos estudios permitieron concluir que tanto las fuerzas hidrofóbicas como los enlaces de H estaban involucrados en la interacción entre las dos especies. Por otra parte, también se observó que la presencia de polisacáridos conducía a mayores cambios en el color de las soluciones del catión flavilio, que presentaban valores de tono más bajo, lo que indicaba un mayor desplazamiento hacia tonalidades azuladas. Esto parece indicar que el polisacárido podría favorecer la existencia de formas quinoidales en la solución. Estos resultados resaltan, de forma novedosa, el papel potencial que podrían desempeñar los polisacáridos en el color del vino tinto.

Además, al pH en el que se encuentra normalmente el vino tinto (pH 3,6), la presencia de polisacáridos afectaba significativamente al color de las soluciones de malvidina 3-*O*-glucósido, tanto en ausencia como en presencia del resto de copigmentos estudiados. Las diferencias absolutas de color observadas fueron principalmente cualitativas (al igual que para quercetina 3- β -glucopiranosido) y se postula que podrían ser debidas a la formación de complejos entre el pigmento y el polisacárido a través de las regiones hidrofóbicas del biopolímero, relacionadas con la presencia de ramificaciones neutras en el ramnogalacturonano-I. En los estudios realizados en presencia de otros copigmentos, los mayores valores de diferencia de color se obtuvieron para la solución ternaria Mv:QG:P, lo que parece mostrar que los polisacáridos y la quercetina 3- β -glucopiranosido no compiten en su interacción con el pigmento sino que muestran un cierto efecto aditivo, ya que las diferencias de color para la solución ternaria son significativamente mayores que las observadas en las correspondientes binarias, Mv:QG y Mv:P. Además, se observó que las diferencias podían ser detectadas por el ojo humano ($\Delta E^*_{ab} > 3$). Sin embargo, en el caso de la quercetina 3- β -glucopiranosido, la cual

es conocida como un buen copigmento, para obtener una diferencia de color similar a la de la que se observa en la solución Mv:P en una relación molar 1:1 (8,2 unidades CIELAB), se necesitó una relación molar Mv:QG superior a 1:3, lo que nos muestra, una vez más, la importancia que podrían tener los polisacáridos en la definición del color de los vinos tintos.

También se estudió la posible estabilización de la malvidina 3-*O*-glucósido por parte del polisacárido, observándose una estabilización de las formas quinoidales azules de malvidina 3-*O*-glucósido, ya que después de cinco semanas de almacenamiento, las soluciones mostraron tonos más azules, aunque eran ligeramente menos intensos. Sin embargo, el polisacárido no pudo estabilizar la forma flavilio, ya que, a lo largo del tiempo, las soluciones de malvidina 3-*O*-glucósido tenían colores menos intensos y una componente roja menos importante, lo que podría estar relacionado con una precipitación parcial del antociano debido a su interacción con el polisacárido, como se ha reportado previamente (Weilack et al., 2023).

La posibilidad de que los pigmentos antociánicos y las interacciones de copigmentación, además de en el color, pudieran participar en el desarrollo de la astringencia, fue la base de los ensayos llevados a cabo por ITC en los que se estudió la posible interacción de los antocianos con proteínas salivales de alto peso molecular, concretamente con mucinas, glicoproteínas de alto peso molecular que representan la principal familia de proteínas del proteoma salival. Así mismo, se evaluó el posible efecto que podría ejercer la presencia de moléculas de copigmento en esta interacción.

Los resultados de este estudio indican una alta capacidad de interacción de los antocianos con las mucinas. La intensidad de esta interacción era sensiblemente más alta que la establecida entre esas proteínas y el flavanol catequina y, además, se observó una

Consideraciones finales

ausencia total de interacción con epicatequina. Por otra parte, la copigmentación también parece ejercer un papel relevante en el establecimiento de estas interacciones de los compuestos fenólicos y las mucinas, ya que la presencia de malvidina 3-*O*-glucósido modifica las fuerzas involucradas y la intensidad de las interacciones entre los flavanoles ensayados (catequina y epicatequina) y la mucina. Además, según los resultados obtenidos, el flavonol quercetina 3- β -glucopiranosido, a la concentración que habitualmente se encuentran en los vinos tintos, no intervendría en las interacciones con proteínas salivales de alto peso molecular, ya que las interacciones en las que intervino el flavonol no liberaron ni consumieron suficiente calor como para ser detectados por la microcalorimetría.

Por tanto, en este estudio se demostró que la adición de polisacáridos pécticos, obtenidos a partir de subproductos del proceso de vinificación (orujos), contribuye a la estabilización del color de las soluciones de antocianos, casi al mismo nivel de uno de los compuestos fenólicos conocido como excelente copigmento, como es la quercetina 3- β -glucopiranosido, abriendo la posibilidad de explotar estos subproductos de la vinificación, proporcionando así una mejora económica y medioambiental. Además, en este estudio se ha puesto de manifiesto por vez primera que los antocianos podrían desempeñar un papel importante, tanto directa como indirectamente, en el desarrollo de la astringencia que involucra proteínas salivales de alto peso molecular, como son las mucinas.

CONCLUSIONES



Las principales conclusiones obtenidas en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. Según los estudios de Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC) y simulación de la Dinámica Molecular (MD), de las familias de compuestos fenólicos estudiadas en su interacción con los antocianos, los flavonoles son los que presentan interacciones moleculares más estables y de mayor afinidad de unión con el catión flavilio del antociano. Estas interacciones explican la menor claridad y las tonalidades más azuladas que presentan las soluciones del catión flavilio en presencia del flavonol.

2. Los polisacáridos podrían desempeñar un papel relevante en el color de los vinos tintos ya que estos compuestos parecen estabilizar las formas quinoidales de los antocianos en disolución y, como consecuencia, favorecer cambios del color hacia valores de tono más bajos (más azules), que son perceptibles por el ojo humano.

3. Los cambios de color observados por la presencia de polisacáridos en las disoluciones de antocianos podrían ser debidos a la formación de complejos entre el pigmento y el polisacárido a través de regiones hidrofóbicas del mismo, relacionadas con la presencia de ramnogalacturonanos de tipo I.

4. A pH fuertemente ácido, el polisacárido es capaz de estabilizar las formas quinoidales azuladas del antociano; pero no las formas flavilio, que incluso pueden llegar a precipitar.

5. La importancia que podrían tener los polisacáridos en la definición del color de los vinos tintos se evidencia, una vez más, por la menor relación pigmento:polisacárido necesaria para obtener una diferencia de color similar a la que se obtiene con quercetina 3- β -glucopiranosido, reconocida como buen copigmento.

Conclusiones

6. En las interacciones ternarias, el flavonol y el polisacárido no compiten por su interacción con el pigmento, sino que muestran cierto efecto aditivo, al contrario de lo que ocurre con el resto de los compuestos fenólicos estudiados, donde su presencia reduce el efecto del polisacárido sobre el color del pigmento.

7. Los antocianos presentan alta capacidad para interactuar con las mucinas salivales, mostrando valores de constante de interacción notablemente más altos que las determinadas para el resto de los compuestos fenólicos ensayados. Esto indica el posible papel que estos pigmentos pueden llegar a tener en el desarrollo de la astringencia.

8. La copigmentación también podría ser relevante en la interacción entre las mucinas salivales y los compuestos fenólicos, ya que la presencia del antociano en las soluciones modifica la intensidad y características de la interacción entre flavanoles y mucinas; aunque de forma diferente en función de la estructura del flavanol.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Alder, B. J., & Wainwright, T. E. (1957). Phase transition for a hard sphere system. *The Journal of Chemical Physics*, 27(5), 1208–1209.
- Amerongen, A. van N., & Veerman, E. C. I. (2002). Saliva - The defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8(1), 12–22.
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., & Ros-García, J. M. (2015). Cell wall compounds of red grapes skins and their grape marcs from three different winemaking techniques. *Food Chemistry*, 187, 89–97.
- Asen, S., Stewart, R. N., & Norris, K. H. (1972). Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, 11(3), 1139–1144.
- Atri, M. S., Saboury, A. A., & Ahmad, F. (2015). Biological applications of isothermal titration calorimetry. *Physical Chemistry Research*, 3(4), 319–330.
- Ayestarán, B., Guadalupe, Z., & León, D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 29–39.
- Balabushevich, N. G., Kovalenko, E. A., Mikhalchik, E. V., Filatova, L. Y., Volodkin, D., & Vikulina, A. S. (2019). Mucin adsorption on vaterite CaCO₃ microcrystals for the prediction of mucoadhesive properties. *Journal of Colloid and Interface Science*, 545, 330–339.
- Bansil, R., & Turner, B. S. (2006). Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. In *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 11, 164–170.
- Baranac, J. M., Petranović, N. A., & Dimitrić-Marković, J. M. (1997). Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 2. Malvin and the nonglycosidized flavone quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(5), 1694–1697.
- Bate-Smith, E. C. (1954). Astringency in foods. *Food Process. Package*, 23, 124–127.
- Baxter, N. J., Lilley, T. H., Haslam, E., & Williamson, M. P. (1997). Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry*, 36(18), 5566–5577.
- Blandamer, M. J., Cullis, P. M., & Engberts, J. B. F. N. (1998). Titration microcalorimetry. *Journal of the Chemical Society - Faraday Transactions*, 94(16), 2261–2267.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67–87.

Referencias bibliográficas

- Boutaric, A., Ferre, L., & Roy, M. (1937). Reserches spectrophotometriques sur la couleur des vins. *J. Annal. Falsific*, 30, 196–209.
- Brandão, E., Santos Silva, M., García-Estévez, I., Mateus, N., de Freitas, V., & Soares, S. (2017). Molecular study of mucin-procyanidin interaction by fluorescence quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. *Food Chemistry*, 228, 427–434.
- Breslin, P. A. S., Gilmore, M. M., Beauchamp, G. K., & Green, B. G. (1993). Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation. *Chemical Senses*, 18(4), 405–417.
- Brouillard, R. (1982). Chemical Structure of Anthocyanins. In *Anthocyanins As Food Colors* (pp. 1–40). Elsevier.
- Brouillard, R., & Delaporte, B. (1977). 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*, 99(26), 8461–8468.
- Brouillard, R., Wigand, M.-C., Dangles, O., & Cheminat, A. (1991). pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *J. Chem. Soc. Perkin Trans*, 2(8), 1235–1241.
- Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., & Bautista-Ortín, A. B. (2011). 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*, 59(10), 5450–5455.
- Cabanis, J. C., Cabanis, M. T., Cheynier, V., & Teissedre, P. L. (2003). Tablas de composición. In C. Flanzly (Ed.), *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos* (2ª, pp. 218–231). AMV Ediciones, Mundi-Prensa: Madrid (España).
- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900.
- Cala, O., Pinaud, N., Simon, C., Fouquet, E., Laguerre, M., Dufourc, E. J., & Pianet, I. (2010). NMR and molecular modeling of wine tannins binding to saliva proteins: revisiting astringency from molecular and colloidal prospects. *The FASEB Journal*, 24, 4281–4290.
- Canon, F., Paté, F., Cheynier, V., Sarni-Manchado, P., Giuliani, A., Pérez, J., Durand, D., Li, J., & Cabane, B. (2013). Aggregation of the salivary proline-rich protein IB5 in the presence of the tannin EgCG. *Langmuir*, 29(6), 1926–1937.

- Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2009). Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7883–7891.
- Chang, R. (2010). *Química* (10th ed.). McGraw-Hill.
- Charlton, A. J., Baxter, N. J., Khan, M. L., Moir, A. J. G., Haslam, E., Davies, A. P., & Williamson, M. P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1593–1601.
- Cheyrier, V. (2006). Flavonoids in Wine. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications* (pp. 263–318). CRC Press.
- Cheyrier, V., Moutounet, M., & Sarni-Manchado, P. (2003). Los compuestos fenólicos. In C. Flanzy (Ed.), *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos* (2ª, pp. 114–136). AMV Ediciones, Mundi-Prensa: Madrid (España).
- Christensen, J. J., Izatt, R. M., Hansen, L. D., & Partridge, J. A. (1966). Entropy titration. A calorimetric method for the determination of ΔG , ΔH , and ΔS from a single thermometric titration. *The Journal of Physical Chemistry*, 70(6), 2003–2010.
- da Silva, R., Rigaud, J., Cheyrier, V., Cheminat, A., & Moutounet, M. (1991). Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, 30(4), 1259–1264.
- Darias-Martín, J., Carrillo, M., Díaz, E., & Boulton, R. B. (2001). Enhancement of red wine colour by pre-fermentation addition of copigments. *Food Chemistry*, 73(2), 217–220.
- Darias-Martín, J., Martín-Luis, B., Carrillo-López, M., Lamuela-Raventós, R., Díaz-Romero, C., & Boulton, R. (2002). Effect of caffeic acid on the color of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(7), 2062–2067.
- Davies, H. S., Pudney, P. D. A., Georgiades, P., Waigh, T. A., Hodson, N. W., Ridley, C. E., Blanch, E. W., & Thornton, D. J. (2014). Reorganisation of the salivary mucin network by dietary components: Insights from green tea polyphenols. *PLoS ONE*, 9(9).
- de Almeida, P. del V., Grégio, A. M., Machado, M. A., de Lima, A. A., & Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: A comprehensive review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 9(3).
- De Freitas, V., Carvalho, E., & Mateus, N. (2003). Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*, 81, 503–509.

Referencias bibliográficas

- De Freitas, V., & Mateus, N. (2012). Protein/polyphenol interactions: Past and present contributions. Mechanisms of astringency perception. *Current Organic Chemistry*, *16*, 724–746.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., & Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *40*(3), 173–289.
- Dhanisha, S. S., Guruvayoorappan, C., Drishya, S., & Abeesh, P. (2018). Mucins: Structural diversity, biosynthesis, its role in pathogenesis and as possible therapeutic targets. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *122*, 98–122.
- Doco, T., Vuchot, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2003). Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees. *Am J. Enol. Vitic.*, *54*(3), 150.
- Doco, T., & Williams, P. (2013). Purification and structural characterization of a type II arabinogalactan-protein from Champagne wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *64*(3), 364–369.
- Eiro, M. J., & Heinonen, M. (2002). Anthocyanin color behavior and stability during storage: Effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(25), 7461–7466.
- Escribano-Bailón, M. T., & Santos-Buelga, C. (2012). Anthocyanin copigmentation - Evaluation, mechanisms and implications for the colour of red wines. *Current Organic Chemistry*, *16*(5).
- Fernandes, A., Brandão, E., Raposo, F., Maricato, É., Oliveira, J., Mateus, N., Coimbra, M. A., & de Freitas, V. (2020). Impact of grape pectic polysaccharides on anthocyanins thermostability. *Carbohydrate Polymers*, *239*, 116240.
- Fernandes, A., Oliveira, J., Fonseca, F., Ferreira-da-Silva, F., Mateus, N., Vincken, J. P., & de Freitas, V. (2020). Molecular binding between anthocyanins and pectic polysaccharides – Unveiling the role of pectic polysaccharides structure. *Food Hydrocolloids*, *102*.
- Ferrer Gallego, R. (2011). *Estudio analítico y de la funcionalidad de la fracción fenólica de Vitis vinifera L. cv. Graciano y su importancia en el color y la composición del vino*. Universidad de Salamanca.
- Ferrer-Gallego, R., Brás, N. F., García-Estévez, I., Mateus, N., Rivas-Gonzalo, J. C., De Freitas, V., & Escribano-Bailón, M. T. (2016). Effect of flavonols on wine astringency and their interaction with human saliva. *Food Chemistry*, *209*, 358–364.

- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Brás, N. F., Vale, N., Gomes, P., Mateus, N., De Freitas, V., Heredia, F. J., & Escribano-Bailón, M. T. (2017). Interaction between wine phenolic acids and salivary proteins by saturation-transfer difference nuclear magnetic resonance spectroscopy (STD-NMR) and molecular dynamics simulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(31), 6434–6441.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2014). Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: synergistic effect and modulation by aromas. *Food Research International*, *62*, 1100–1107.
- Ferrer-Gallego, R., Quijada-Morín, N., Brás, N. F., Gomes, P., de Freitas, V., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2015). Characterization of sensory properties of flavanols—A molecular dynamic approach. *Chemical Senses*, *40*(6), 381–390.
- Frankel, E. N., Waterhouse, A. L., & Teissedre, P. L. (1995). Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *43*(4), 890–894.
- Frazier, R. A., Deaville, E. R., Green, R. J., Stringano, E., Willoughby, I., Plant, J., & Mueller-Harvey, I. (2010). Interactions of tea tannins and condensed tannins with proteins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *51*(2), 490–495.
- Frazier, R. A., Papadopoulou, A., Mueller-Harvey, I., Kisson, D., & Green, R. J. (2003). Probing protein–tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(18), 5189–5195.
- García-Estévez, I. (2014). *Influencia de los taninos en el color del vino tinto durante su envejecimiento*. Universidad de Salamanca.
- García-Estévez, I., Ramos-Pineda, A. M., & Escribano-Bailón, M. T. (2018). Interactions between wine phenolic compounds and human saliva in astringency perception. *Food and Function*, *9*(3), 1294–1309.
- Gawel, R. (1998). Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *4*(2), 74–95.
- Gómez-Míguez, M., González-Manzano, S., Escribano-Bailón, M. T., Heredia, F. J., & Santos-Buelga, C. (2006). Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(15), 5422–5429.

Referencias bibliográficas

- Gonçalves, F. J., Fernandes, P. A. R., Wessel, D. F., Cardoso, S. M., Rocha, S. M., & Coimbra, M. A. (2018). Interaction of wine mannoproteins and arabinogalactans with anthocyanins. *Food Chemistry*, *243*, 1–10.
- Gonçalves, J., Silva, C. L., Castilho, P. C., & Câmara, J. S. (2013). An attractive, sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quantification of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. *Microchemical Journal*, *106*, 129–138.
- Gonnet, J. F. (1998). Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited - 1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chemistry*, *63*(3), 409–415.
- González-Manzano, S., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T., & Santos-Buelga, C. (2009). Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chemistry*, *114*(2), 649–656.
- González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, T. (2008). Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins. *European Food Research and Technology*, *226*(3), 483–490.
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F. J., Escudero-Gilete, M. L., González-Miret, M. L., & Heredia, F. J. (2012). Comprehensive colorimetric study of anthocyanic copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(11), 2896–2905.
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L., Quijada-Morín, N., Rivas-Gonzalo, J. C., García-Estévez, I., Heredia, F. J., & Escribano-Bailón, M. T. (2015). Application of differential colorimetry to evaluate anthocyanin-flavonol-flavanol ternary copigmentation interactions in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(35), 7645–7653.
- Goto, T. (1987). Structure, stability and color variation of natural anthocyanins. *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 113–158.
- Goto, T., & Kondo, T. (1991). Structure and molecular stacking of anthocyanins- flower color variation. *Angewandte Chemie International Edition*, *30*(1), 17–33.
- Goulao, L. F., Fernandes, J. C., Lopes, P., & Amancio, S. (2012). Tackling the cell wall of the grape berry. In *The Biochemistry of the Grape Berry* (pp. 172–193).
- Green, B. G. (1993). Oral astringency: a tactile component of flavor. *Acta Psychologica*, *84*(1), 119–125.

- Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2007). Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of tempranillo red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10720–10728.
- Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Williams, P., & Doco, T. (2014). Determination of must and wine polysaccharides by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) and size-exclusion chromatography (SEC). In *Polysaccharides* (pp. 1–28). Springer International Publishing.
- Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Williams, P., & Doco, T. (2015). Determination of must and wine polysaccharides by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and size-exclusion chromatography (SEC). In *Polysaccharides: Bioactivity and Biotechnology* (pp. 1265–1297). Springer, Cham.
- Han, F., Oliveira, H., Brás, N. F., Fernandes, I., Cruz, L., De Freitas, V., & Mateus, N. (2020). In vitro gastrointestinal absorption of red wine anthocyanins – Impact of structural complexity and phase II metabolism. *Food Chemistry*, 317.
- Hansson, T., Oostenbrink, C., & van Gunsteren, W. F. (2002). Molecular dynamics simulations. *Current Opinion in Structural Biology*, 12(2), 190–196.
- Haslam, E. (1980). In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*, 19(12), 2577–2582.
- Hermosín Gutiérrez, I., Sánchez-Palomo Lorenzo, E., & Vicario Espinosa, A. (2005). Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry*, 92(2), 269–283.
- Holdgate, G. (2009). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry. In *Ligand-Macromolecular Interactions in Drug Discovery* (Vol. 572, pp. 101–133).
- Hollingsworth, S. A., & Dror, R. O. (2018). Molecular dynamics simulation for all. *Neuron*, 99(6), 1129–1143.
- Hoshino, T. (1992). Self-association of flavylium cations of anthocyanidin 3,5-diglucosides studied by circular dichroism and ¹H NMR. *Phytochemistry*, 31(2), 647–653.
- Hoshino, T., Matsumoto, U., Goto, T., & Harada, N. (1982). Evidence for the self-association of anthocyanins IV. PMR spectroscopic evidence for the vertical stacking of anthocyanin molecules. *Tetrahedron Letters*, 23(4), 433–436.
- Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 85(2), 162–169.

Referencias bibliográficas

- Huq, N. L., Cross, K. J., Ung, M., Myroforidis, H., Veith, P. D., Chen, D., Stanton, D., He, H., Ward, B. R., & Reynolds, E. C. (2007). A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 13(4), 547–564.
- Izatt, R. M., Rytting, J. H., Hansen, L. D., & Christensen, J. J. (1966). Thermodynamics of proton dissociation in dilute aqueous solution. V. An entropy titration study of adenosine, pentoses, hexoses, and related compounds 1a,b. *Journal of the American Chemical Society*, 88(12), 2641–2645.
- Jelesarov, I., & Bosshard, H. R. (1999). Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*, 12(1), 3–18.
- Jiménez-Martínez, M. D., Bautista-Ortín, A. B., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2019). Fining with purified grape pomace. Effect of dose, contact time and varietal origin on the final wine phenolic composition. *Food Chemistry*, 271, 570–576.
- Jöbstl, E., O’Connell, J., Fairclough, J. P. A., & Williamson, M. P. (2004). Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules*, 5(3), 942–949.
- Jones-Moore, H. R., Jelley, R. E., Marangon, M., & Fedrizzi, B. (2021). The polysaccharides of winemaking: From grape to wine. *Trends in Food Science and Technology*, 111, 731–740.
- Kilmister, R. L., Faulkner, P., Downey, M. O., Darby, S. J., & Falconer, R. J. (2016). The complexity of condensed tannin binding to bovine serum albumin - An isothermal titration calorimetry study. *Food Chemistry*, 190, 173–178.
- Kunsági-Máté, S., Ortmann, E., Kollár, L., & Nikfardjam, M. P. (2007). Effect of the solvation shell exchange on the formation of malvidin-3-*O*-glucoside-ellagic acid complexes. *Journal of Physical Chemistry B*, 111(40), 11750–11755.
- Kunsági-Máté, S., Szabó, K., Nikfardjam, M. P., & Kollár, L. (2006). Determination of the thermodynamic parameters of the complex formation between malvidin-3-*O*-glucoside and polyphenols. Copigmentation effect in red wines. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 69(1–2), 113–119.
- Lambert, S. G., Asenstorfer, R. E., Williamson, N. M., Iland, P. G., & Jones, G. P. (2011). Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chemistry*, 125(1), 106–115.
- Lee, C. A., Ismail, B., & Vickers, Z. M. (2012). The role of salivary proteins in the mechanism of astringency. *Journal of Food Science*, 77(4).

- Lee, C. A., & Vickers, Z. M. (2012). Astringency of foods may not be directly related to salivary lubricity. *Journal of Food Science*, *77*(9), 302–306.
- Lee, C. B., & Lawless, H. T. (1991). Time-course of astringent sensations. *Chemical Senses*, *16*(3), 225–238.
- Liao, H., Cai, Y., & Haslam, E. (1992). Polyphenol interactions. Anthocyanins: Copigmentation and colour changes in red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *59*(3), 299–305.
- Lindahl, E. R. (2008). Molecular dynamics simulations. In A. Kukol (Ed.), *Molecular Modeling of Proteins* (Vol. 443, pp. 3–23). Humana Press, Totowa, NJ.
- Ma, W., Guo, A., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Y., & Li, H. (2014). A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends in Food Science and Technology*, *40*, 6–19.
- Manconi, B., Castagnola, M., Cabras, T., Olianias, A., Vitali, A., Desiderio, C., Sanna, M. T., & Messana, I. (2016). The intriguing heterogeneity of human salivary proline-rich proteins: Short title: Salivary proline-rich protein species. *Journal of Proteomics*, *134*, 47–56.
- Manjón, E., Brás, N. F., García-Estévez, I., & Escribano-Bailón, M. T. (2020). Cell wall mannoproteins from yeast affect salivary protein-flavanol interactions through different molecular mechanisms. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(47), 13459–13468.
- Mao, M., Li, K., Liao, M., Chen, F., Hu, X., Ma, L., & Ji, J. (2023). Study on the interactions between oral mucin and cyanidin 3-*O*-glucoside: The effect of oxidized quinone. *Food and Bioprocess Technology*.
- Martínez, J. A., Melgosa, M., Pérez, M. M., Hita, E., & Negueruela, A. I. (2001). Note. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Science and Technology International*, *7*(5), 439–444.
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2019). Properties of wine polysaccharides. In *Pectins: Extraction, Purification, Characterization and Applications*.
- McCammon, J. A., Gelin, B. R., & Karplus, M. (1977). Dynamics of folded proteins. *Nature*, *267*(5612), 585–590.
- McRae, J. M., Falconer, R. J., & Kennedy, J. A. (2010). Thermodynamics of grape and wine tannin interaction with polyproline: Implications for red wine astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*(23), 12510–12518.

Referencias bibliográficas

- McRae, J. M., & Kennedy, J. A. (2011). Wine and grape tannin interactions with salivary proteins and their impact on astringency: A review of current research. *Molecules*, *16*, 2348–2364.
- McRae, J. M., Ziora, Z. M., Kassara, S., Cooper, M. A., & Smith, P. A. (2015). Ethanol concentration influences the mechanisms of wine tannin interactions with Poly(L-proline) in model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *63*(17), 4345–4352.
- Nayak, A., & Carpenter, G. H. (2008). A physiological model of tea-induced astringency. *Physiology and Behavior*, *95*(3), 290–294.
- Nunan, K. J., Sims, I. M., Bacic, A., Robinson, S. P., & Fincher, G. B. (1997). Isolation and characterization of cell walls from the mesocarp of mature grape berries (*Vitis vinifera*). *Planta*, *203*, 93–100.
- Pellerin, P., & Cabanis, J. C. (2003). Los Glúcidos. In C. Flanzy (Ed.), *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos* (2ª, pp. 66–96). AMV Ediciones, Mundi-Prensa: Madrid (España).
- Pereira, G. E., Gaudillere, J. P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., & Rolin, D. (2006). Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(18), 6765–6775.
- Poncet-Legrand, C., Gautier, C., Cheynier, V., & Imberty, A. (2007). Interactions between flavan-3-ols and Poly(L-proline) studied by isothermal titration calorimetry: Effect of the tannin structure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *55*(22), 9235–9240.
- Queiroz, J. A., Tomaz, C. T., & Cabral, J. M. S. (2001). Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *Journal of Biotechnology*, *87*, 143–159.
- Quijada-Morín, N. (2014). *Influencia de la composición fenólica y polisacarídica en las características organolépticas de los vinos tintos*. Universidad de Salamanca.
- Ramos-Pineda, A. M. (2019). *Estudio de las interacciones supramoleculares entre compuestos fenólicos y proteínas salivales y su relación con la astringencia*. Universidad de Salamanca.
- Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., Brás, N. F., Martín Del Valle, E. M., Dueñas, M., & Escribano Bailón, M. T. (2017). Molecular approach to the synergistic effect on astringency elicited by mixtures of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *65*(31), 6425–6433.
- Ribéreau-Gayon, P. (1965). Identification d'esters des acides cinnamiques et de l'acide tartrique dans les limbes et les baies de V. Vinifera. *CR Acad Sci*, 260–341.

- Rinaldi, A., Gambuti, A., & Moio, L. (2012). Precipitation of salivary proteins after the interaction with wine: The effect of ethanol, pH, fructose, and mannoproteins. *Journal of Food Science*, 77(4), 485–490.
- Rodrigues, A., da Silva, J. M. R., Lucas, C., & Laureano, O. (2012). Effect of commercial mannoproteins on wine colour and tannins stability. *Food Chemistry*, 131(3), 907–914.
- Santos-Buelga, C., & de Freitas, V. (2009). Influence of phenolics on wine organoleptic properties. In *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 529–570).
- Sinnokrot, M. O., Valeev, E. F., & Sherrill, C. D. (2002). Estimates of the Ab initio limit for π - π interactions: The benzene dimer. *Journal of the American Chemical Society*, 124(36), 10887–10893.
- Slavov, A., Denev, P., Panchev, I., Shikov, V., Nenov, N., Yantcheva, N., & Vasileva, I. (2017). Combined recovery of polysaccharides and polyphenols from *Rosa damascena* wastes. *Industrial Crops and Products*, 100, 85–94.
- Soares, S., Brandão, E., Guerreiro, C., Soares, S., Mateus, N., & de Freitas, V. (2020). Tannins in food: Insights into the molecular perception of astringency and bitter taste. *Molecules*, 25(11), 2590.
- Soares, S., García-Estévez, I., Ferrer-Galego, R., Brás, N. F., Brandão, E., Silva, M., Teixeira, N., Fonseca, F., Sousa, S. F., Ferreira-da-Silva, F., Mateus, N., & de Freitas, V. (2018). Study of human salivary proline-rich proteins interaction with food tannins. *Food Chemistry*, 243, 175–185.
- Soares, S., Santos Silva, M., García-Estévez, I., Brandão, E., Fonseca, F., Ferreira-da-Silva, F., Escribano-Bailón, M. T., Mateus, N., & de Freitas, V. (2019). Effect of malvidin-3-glucoside and epicatechin interaction on their ability to interact with salivary proline-rich proteins. *Food Chemistry*, 276, 33–42.
- Soares, S., Santos Silva, M., García-Estévez, I., Großmann, P., Brás, N., Brandão, E., Mateus, N., De Freitas, V., Behrens, M., & Meyerhof, W. (2018). Human bitter taste receptors are activated by different classes of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(33), 8814–8823.
- Somers, C. T., & Evans, M. E. (1979). Grape pigment phenomena: Interpretation of major colour losses during vinification. *J. Sci. Food Agric*, 30, 623–633.
- Song, C., Zhang, S., & Huang, H. (2015). Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Frontiers in Microbiology*, 6.

Referencias bibliográficas

- Sun, Q., Fu, Y., & Wang, W. (2022). Temperature effects on hydrophobic interactions: Implications for protein unfolding. *Chemical Physics*, 559.
- Teixeira, N., Cruz, L., Brás, N. F., Mateus, N., Ramos, M. J., & de Freitas, V. (2013). Structural features of copigmentation of oenin with different polyphenol copigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(28), 6942–6948.
- Timberlake, C. F., & Bridle, P. (1976). Interactions between anthocyanins, phenolic compounds, and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 27(3), 97–105.
- Torres-Rochera, B., Manjón, E., Brás, N. F., Escribano-Bailón, M. T., & García-Estévez, I. (2023). Supramolecular study of the interactions between malvidin-3-*O*-glucoside and wine phenolic compounds: Influence on color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Trouillas, P., Sancho-García, J. C., De Freitas, V., Gierschner, J., Otyepka, M., & Dangles, O. (2016). Stabilizing and modulating color by copigmentation: Insights from theory and experiment. *Chemical Reviews*, 116(9), 4937–4982.
- van Nieuw Amerongen, A., Bolscher, J. G. M., & Veerman, E. C. I. (2004). Salivary proteins: Protective and diagnostic value in cariology? *Caries Research*, 38(3), 247–253.
- Van Oss, C. J., Good, R. J., & Chaudhury, M. K. (1986). Nature of the antigen-antibody interaction. Primary and secondary bonds: Optimal conditions for association and dissociation. *Journal of Chromatography*, 376, 111–119.
- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2003). The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 439–447.
- Watrelet, A. A., Renard, C. M. G. C., & Le Bourvellec, C. (2015). Comparison of microcalorimetry and haze formation to quantify the association of B-type procyanidins to poly-L-proline and bovine serum albumin. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 376–382.
- Weilack, I., Mehren, L., Schieber, A., & Weber, F. (2023). Grape-derived pectic polysaccharides alter the tannin and pigment composition of Cabernet Sauvignon red wines. *Current Research in Food Science*, 6.
- Willstätter, R., & Zollinger, E. H. (1917). XVI. Über Die Farbstoffe Der Weintraube Und Der Heidelbeere, II. *Justus Liebigs Ann. Chem*, 412(2), 195–216.

- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., & Lin, L.-N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Analytical Biochemistry*, *179*, 131–137.
- Yoshida, K., Mori, M., & Kondo, T. (2009). Blue flower color development by anthocyanins: from chemical structure to cell physiology. *Natural Product Reports*, *26*(7), 857–964.
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos* (1ª). Mundi-Prensa Libros.
- Zhang, B., Gao, Y., Zhang, L., & Zhou, Y. (2021). The plant cell wall: Biosynthesis, construction, and functions. In *Journal of Integrative Plant Biology* (Vol. 63, Issue 1, pp. 251–272). Blackwell Publishing Ltd.
- Zhang, B., Liu, R., He, F., Zhou, P. P., & Duan, C. Q. (2015). Copigmentation of malvidin-3-O-glucoside with five hydroxybenzoic acids in red wine model solutions: Experimental and theoretical investigations. *Food Chemistry*, *170*, 226–233.



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Facultad de Farmacia

