



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

Influencia de los taninos en el color del vino tinto durante su envejecimiento

- Facultad de Farmacia -
Departamento de Química Analítica Nutrición Y Bromatología

Ignacio García Estévez

2014



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Facultad de Farmacia

Grupo de Investigación en Polifenoles



**VNiVERSiDAD
DSALAMANCA**

**INFLUENCIA DE LOS TANINOS EN EL COLOR
DEL VINO TINTO DURANTE SU
ENVEJECIMIENTO**

**INFLUENCE OF TANNINS ON RED WINE COLOR
DURING AGING**

Ignacio García Estévez

2014



UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA

DPTO. QUIMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA

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

Dr. Julián C. Rivas Gonzalo, Catedrático de Nutrición y Bromatología, Dra. M^a Teresa Escribano Bailón, Profesora Titular de Tecnología de Alimentos y Dra. Cristina Alcalde Eon, directores del trabajo “*Influencia de los taninos en el color del vino tinto durante su envejecimiento*”, realizado por **Ignacio García Estévez** 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, 27 de enero de 2014

Julián C. Rivas Gonzalo

M^a Teresa Escribano Bailón

Cristina Alcalde Eon

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

- Beca de postgrado para la formación de personal universitario (FPU). Ref: AP2008-03871. Ministerio de Educación.
- Proyecto de investigación "Composición detallada de flavanoles y su relación con la madurez fenólica en la uva tinta para vinificación" (AGL2008-05569-C02-01) Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Proyecto de investigación "Influencia del cambio climático en la composición flavanólica y antociánica de la uva y vino: nuevas tecnologías de vinificación: Proyecto CENIT *Demeter*". Consorcio CENIT "Demeter".
- Proyecto de investigación "Estudio de la composición fenólica de vinos tintos de calidad elaborados con uva Tempranillo de Ribera de Duero, aplicando distintas técnicas vitivinícolas". Bodegas La Horra.
- Proyecto de investigación "Papel de los flavanoles y flavonoles en la intensidad y calidad de la astringencia de vinos y su interacción con el color". (AGL2011-30254-C02-01) Ministerio de Economía y Competitividad.
- Proyecto de investigación "Funcionalidad Biológica y Tecnológica de los flavonoides de los alimentos" (EDU/894/2009) Junta de Castilla y León.

La realización de esta tesis doctoral no habría sido posible sin la ayuda y apoyo de muchas personas a las que quiero expresar mi agradecimiento:

En primer lugar, a mis directores de Tesis, Julián Rivas Gonzalo, María Teresa Escribano Bailón y Cristina Alcalde Eon. Esta tesis ha sido posible únicamente gracias a ellos, a sus consejos, su implicación y dedicación incondicional, pero también a su cercanía en todo momento, facilitando mucho las cosas.

A los compañeros del laboratorio, entre los que puedo contar grandes amigos. No haré diferencias entre los que siguen en el departamento o han tomado ya otro camino porque, en cualquier caso, cada uno ha aportado algo que, en conjunto, hará que siempre tenga un recuerdo magnífico de esta etapa. A Raúl, Jose Miguel y Felipe, porque juntos, y por separado, han sido una parte imprescindible de estos años. A Montse, Natalia, Rebeca, Susana, José Luis, Begoña, Laura, Kike, Mati y Andrea, porque aunque de maneras diferentes, han sido de gran ayuda en los peores momentos y una gran compañía en los mejores. Y a Cris, porque, aunque ya lo he dicho antes, también es compañera y además merece doble agradecimiento por su esfuerzo por compatibilizar (y por las meriendas, claro). También quiero acordarme de los que han estado en el departamento de paso, porque cada uno, con su idioma o acento, nos ha traído un pedazo de mundo al laboratorio, compensando las horas que pasamos *viendo* el sol desde un (*sem*)sótano.

Igualmente quiero que dar las gracias a todos los profesores del departamento, Alfonso, Ana, César, Milagros, Pilar, Rafael y Tino, por su cercanía, interés y simpatía y porque, a pesar de la distancia profesional en algún caso, personalmente han resultado como un compañero más. Especialmente quiero agradecer a Concha su amabilidad y ayuda y a María Jesús su cercanía y su humor, necesario en muchos momentos.

Y por supuesto, un agradecimiento especial a José Joaquín y María José. Ambos han colaborado de diversas formas a hacer mucho más fácil todo este proyecto, implicándose en muchos momentos para echar una mano en solucionar esas *dudas varias y problemillas técnicos* que hacen *interesante* el trabajo diario.

Al Prof. Stéphane Quideau, por aceptarme en su grupo de investigación en el *Institut Européen de Chimie et Biologie* de la *Université de Bordeaux*, y a todo su grupo, que me hizo sentir como uno más, especialmente a Rémi, Mélanie, Emilie y Hélène, por su ayuda fundamental durante esos meses. Igualmente quiero agradecer al Prof. Fernando

Pina haberme permitido trabajar en su grupo de investigación de la *Faculdade de Ciências e Tecnologia* de la *Universidade Nova de Lisboa*, y a Raquel, por su implicación y dedicación tanto durante mi estancia allí como después.

A Bodegas Roda y Bodegas La Horra, así como a Laffort España, por proporcionarnos las muestras analizadas en este trabajo. Especialmente a Esperanza Tomás y Victor Puentes, por estar disponibles para resolvernos cualquier duda.

Pero esta Tesis ha sido posible gracias también al apoyo de mucha gente fuera del ámbito profesional. En especial a mis padres, Ana y Meli, por su confianza absoluta en mí, y por estar orgullosos sin tener claro a lo que dedico tanto tiempo. A mi hermana, que siempre se ha preocupado por mí, ha sido un apoyo necesario y además me ha regalado una sobrina genial, que siempre me saca una sonrisa simplemente con sus mil maneras de decir mi nombre. Y al resto de la familia, por todo el cariño y la confianza.

Los amigos siempre son una parte fundamental, pero hay ocasiones en las que han sido vitales. Además de darles las gracias, tengo que pedirles perdón por llegar tarde o *llamar* menos poniendo siempre como excusa el trabajo. Gracias a la gente del pueblo por los ratos *increíbles*; especialmente a Sara, por todos los pequeños momentos que hacen un mucho. A los ex-aquimiseros (y Susana) por todos los ratos de risas impagables; y a la gente de la facultad, especialmente a Sandra, Mariam y Sheyla, por mantenerse ahí como siempre y prestar su apoyo a pesar del tiempo y la distancia. Y a muchos otros que en ciertos momentos han aportado su granito para ayudarme a desconectar. Gracias a todos.

A Lucía, por su confianza, apoyo y comprensión, por intentar ponerse en mi lugar cuando en vez de hablar, pienso; pero sobre todo por la sonrisa constante. Las mejores páginas de esta memoria de tesis son obra tuya...

A todos, gracias, por haber estado ahí en este camino.... ha sido mucho más fácil así.

A mi familia y a ti

ÍNDICE



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

INTRODUCCIÓN

I. El vino tinto: Composición y elaboración.	5
1. Principales componentes del vino tinto.	5
1.1. Ácidos fenólicos.	7
1.2. Flavonoles.	9
1.3. Taninos.	10
1.3.1. Taninos condensados.	10
1.3.2. Taninos hidrolizables.	14
1.4. Antocianos.	16
1.5. Pigmentos derivados.	19
1.5.1. Productos de condensación directa entre antocianos y flavan-3-oles.	20
1.5.2. Productos de condensación directa entre antocianos y otros compuestos.	26
1.5.3. Productos de condensación mediada por aldehídos.	28
1.5.4. Piranoantocianos.	33
2. Etapas en la elaboración del vino tinto.....	41
2.1. Maceración y fermentación alcohólica.	41
2.2. Fermentación maloláctica.	42
2.3. Envejecimiento.	42
2.3.1. Envejecimiento en barrica.	43
II. El color del vino tinto.	51
1. El color de los antocianos: Dependencia del pH.	52
2. Fenómeno de copigmentación.	57
3. Introducción a la medida del color.	60
3.1. Espacio CIELAB.	63
3.2. Medida instrumental del color.	65
III. Elagitaninos: Origen, propiedades y métodos de análisis.	67
1. Estructura y propiedades de los elagitaninos de roble.	67
2. Principales fuentes naturales: La madera de roble.	73
3. Métodos de análisis de elagitaninos de roble.	75
3.1. Métodos de fraccionamiento para el análisis de elagitaninos.	75
3.2. Análisis mediante cromatografía líquida de alta resolución y espectrometría de masas.	77

OBJETIVOS.	85
-------------------------	----

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

BLOQUE I: Análisis de elagitaninos en vinos.

<u>Capítulo 1:</u> Puesta a punto de un método de fraccionamiento para el análisis de elagitaninos de roble.	91
1.1. Objetivos.	93
1.2. Resumen.	94
1.3. Publicación.	95
<u>Capítulo 2:</u> Validación de un método de espectrometría de masas para la cuantificación de elagitaninos de roble en vinos.	101
2.1. Objetivos.	102
2.2. Resumen.	103
2.3. Publicación.	105
<u>Capítulo 3:</u> Perfil de elagitaninos del vino tinto en función del tipo de madera de roble empleada en el proceso de elaboración y envejecimiento.	113
3.1. Objetivos.	114
3.2. Resumen.	115
3.3. Publicación.	117

BLOQUE II: Efecto de la adición de taninos hidrolizables y condensados en la composición de pigmentos y el color del vino.

<u>Capítulo 4:</u> Estudio de la adición de taninos hidrolizables y condensados sobre la evolución de los pigmentos y el color en soluciones modelo y vinos experimentales.	139
4.1. Objetivos.	140
4.2. Resumen.	141
4.3. Publicación.	143
<u>Capítulo 5:</u> Efecto de la adición de taninos hidrolizables y taninos condensados sobre la composición fenólica y el color del vino tinto.	169
5.1. Objetivos.	170
5.2. Resumen.	171
5.3. Publicación.	175

BLOQUE III: Pigmentos híbridos antociano-elagitanino.

<u>Capítulo 6</u> : Hemisíntesis y caracterización estructural y cromática de pigmentos híbridos delfinidina 3- <i>O</i> -glucósido-vescalagina.	223
6.1. Objetivos.	224
6.2. Resumen.	225
6.3. Publicación.	227
<u>Capítulo 7</u> : Propiedades termodinámicas y cinéticas de un nuevo pigmento híbrido delfinidina 3- <i>O</i> -glucósido-vescalagina.	237
7.1. Objetivos.	238
7.2. Cálculo de los parámetros termodinámicos y cinéticos del sistema.	239
7.3. Resumen.	252
7.4. Publicación.	253
SUMMARY.	265
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.	307
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	317

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

La presente Memoria de Tesis está elaborada utilizando el formato de compendio de artículos/publicaciones establecido por la Comisión de Doctorado (15 de Febrero de 2013) al amparo del Artículo 14 del Capítulo II del Reglamento de Doctorado de la Universidad de Salamanca (25 de Octubre de 2011, modificado el 18 de julio de 2013). Los trabajos realizados están enmarcados dentro de los proyectos de investigación “*Influencia del cambio climático en la composición flavanólica y antociánica de la uva y vino: nuevas tecnologías de vinificación: Proyecto CENIT Demeter*” y “*Estudio de la composición fenólica de vinos tintos de calidad elaborados con uva Tempranillo de Ribera de Duero, aplicando distintas técnicas vitivinícolas*”, dando lugar a la siguiente producción científica a partir de la cual se ha elaborado esta memoria:

García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Alcalde-Eon, C. Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines. *Analytica Chimica Acta*, **2010**, 660, 171-176.

García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Alcalde-Eon, C. Validation of a mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins in wine samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2012**, 60, 1373-1379.

García-Estévez, I.; Jacquet, R.; Alcalde-Eon, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T.; Quideau, S. Hemisynthesis and structural and chromatic characterization of delphinidin 3-O-glucoside-vescalagin hybrid pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, 61, 11560-11568.

García-Estévez, I.; Gavara, R.; Alcalde-Eon, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Quideau, S.; Escribano-Bailón, M.T.; Pina, F. Thermodynamic and kinetic properties of a new myrtilin-vescalagin hybrid pigment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, 61, 11569-11578.

Alcalde-Eon, C.; García-Estévez, I.; Ferreras-Charro, R.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Ferrer-Gallego, R.; Escribano-Bailón, M.T. Adding oenological tannin *vs.* overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2014**. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.01.004 (*aceptada para su publicación*).

García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Alcalde-Eon, C. Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile. (*redactado*).

García-Estévez, I.; Alcalde-Eon, C.; Puente, V.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigment composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines. (*redactado*).

INTRODUCCIÓN

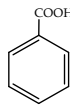
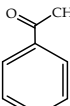
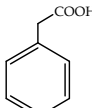
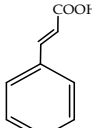
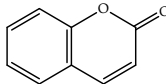
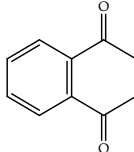
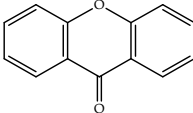
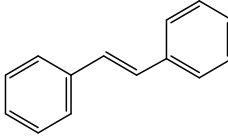
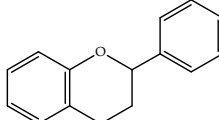


I. El vino tinto: Composición y elaboración.

1. Principales componentes del vino tinto. (Cheynier *et al.*, 2003; Ribéreau-Gayon, 1968; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003; de Rosa, 1987).

El vino tinto es el producto resultante de la fermentación alcohólica del mosto obtenido a partir de la uva tinta. Durante el complejo proceso de fermentación se forman diferentes sustancias que, junto con las presentes originariamente en la uva, y en función de la tecnología empleada para la elaboración y envejecimiento del vino, determinan la composición del mismo. El vino está constituido principalmente por agua, glúcidos, prótidos, lípidos, elementos minerales y compuestos fenólicos. Aunque en el mundo se utilizan diferentes variedades de uva para la elaboración de vinos tintos, prácticamente todas ellas tienen en común un conjunto de compuestos que posteriormente estarán presentes en el vino, modulando sus características. Entre ellos, los compuestos fenólicos, presentes en las plantas como metabolitos secundarios y caracterizados por poseer en su estructura al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo. Estos compuestos pueden clasificarse en función del número y la disposición de los átomos de carbono de su estructura (**Tabla I.1**). Poseen un especial interés los compuestos de estructura flavonoide, tanto por su contribución a las propiedades sensoriales del vino (color, sabor, astringencia y amargor) (Arnold *et al.*, 1980; Haslam, 1980), como por el posible efecto fisiológico que pueden tener como consecuencia de su actividad antioxidante y captadora de radicales libres (Hertog *et al.*, 1993; Teissedre *et al.*, 1996; Nardini *et al.*, 1991). Estos compuestos se encuentran principalmente en la piel y la semilla de la uva, desde donde son extraídos al medio líquido durante el proceso de vinificación. La clasificación de los compuestos flavonoides se realiza de acuerdo al grado de insaturación y al número y tipo de sustituyentes del heterociclo (anillo C, **Figura I.1**). Las estructuras más características de los flavonoides están recogidas en la **Figura I.1**. Dentro de cada clase, los distintos compuestos se diferencian principalmente por el número de sustituyentes y el patrón de sustitución del anillo B.

Tabla I.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

Además, en el vino existen otros compuestos que no proceden de la uva, sino que se generan por acción de las levaduras y bacterias responsables de las fermentaciones, o que pasan al vino desde la madera de los depósitos empleados en el proceso de elaboración. Estos compuestos pueden resultar muy importantes para la evolución de las propiedades del vino durante el proceso de vinificación y envejecimiento.

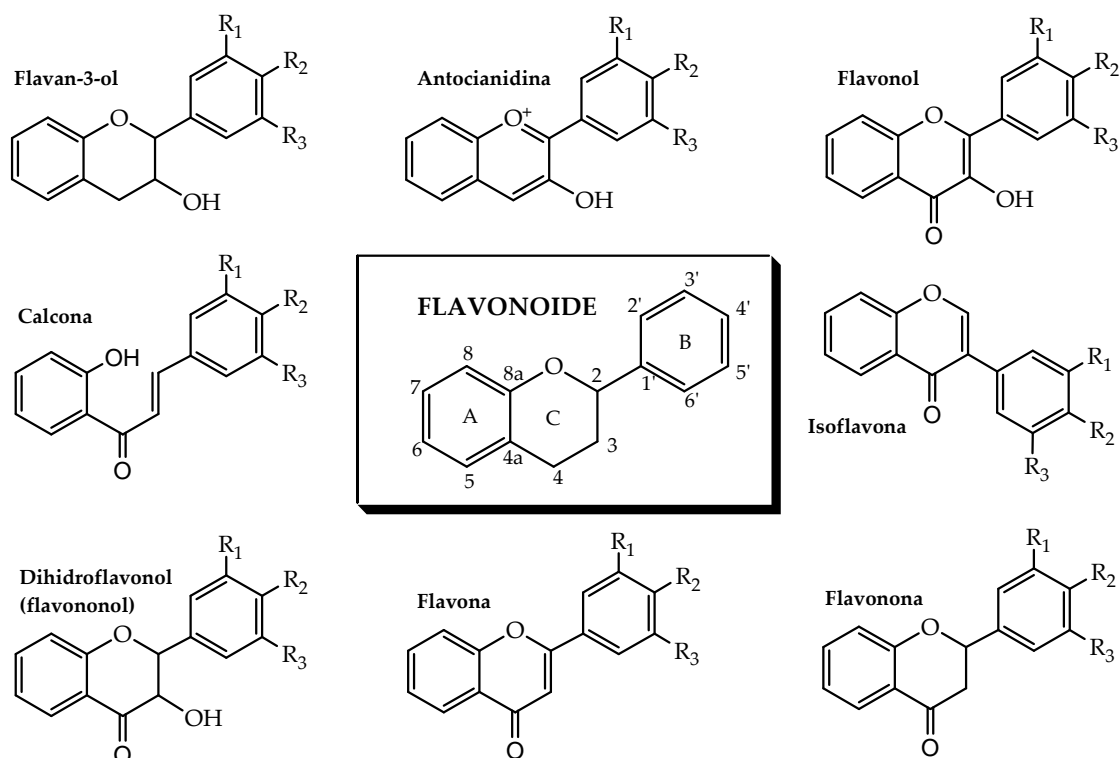


Figura I.1: Estructuras básicas de los principales grupos de flavonoides.

A continuación se describen brevemente las características de los principales grupos de compuestos fenólicos presentes en el vino tinto.

1.1. Ácidos fenólicos.

Son compuestos de estructura no flavonoide presentes en las uva, y por tanto, en los vinos. Es posible distinguir dos tipos de ácidos fenólicos: los ácidos benzoicos, con un esqueleto carbonado C6-C1, y los ácidos hidroxicinámicos, con un esqueleto C6-C3 (**Figura I.2**). Los principales ácidos benzoicos presentes en el vino tinto son el ácido protocatéquico ($R_1=R_4=H$; $R_2=R_3=OH$), el ácido gálico ($R_1=H$, $R_2=R_3=R_4=OH$), el ácido siríngico ($R_1=H$; $R_2=R_4=OCH_3$; $R_3=OH$) y el ácido vanílicico ($R_1=R_4=H$; $R_2=OCH_3$, $R_3=OH$). En la uva la mayor parte de los ácidos benzoicos se encuentran combinados con azúcares o, en el caso del ácido gálico, formando ésteres con los flavanoles. Este ácido está presente además, junto al ácido siríngico y vanílicico, en la madera de roble empleada durante el envejecimiento (Puech *et al.*, 2003), lo que hace que sus concentraciones en el vino aumenten con el envejecimiento, pudiendo alcanzarse, en el

caso del ácido gálico, concentraciones superiores a 100 mg/L en vinos tintos (Cabanis *et al.*, 2003).

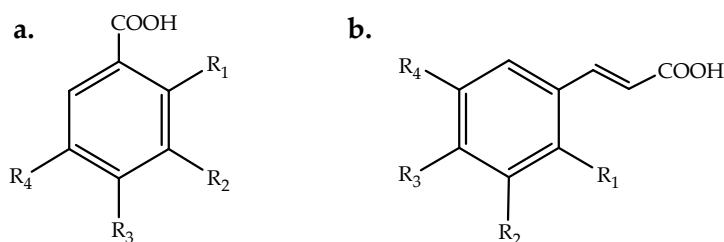


Figura I.2: Estructura básica de los ácidos benzoicos (a.) e hidroxicinámicos (b.).

Por su parte, los ácidos hidroxicinámicos se pueden encontrar tanto libres como esterificados con otros compuestos tanto de naturaleza flavonoide (por ejemplo los antocianos), como no flavonoides (por ejemplo, el ácido tartárico). Estos ácidos se encuentran principalmente en las vacuolas de las células del hollejo, aunque también se detectan en la pulpa en concentraciones menores. La estructura natural de estos compuestos posee el doble enlace en geometría *trans* (E), aunque también es posible detectar en los vinos los isómeros de geometría *cis* (Z). Los principales ácidos hidroxicinámicos son el ácido *p*-cumárico ($R_1=R_2=R_4=H$; $R_3=OH$), el ácido cafeico ($R_1=R_4=H$; $R_2=R_3=OH$) y el ácido ferúlico ($R_1=R_4=H$; $R_2=OCH_3$; $R_3=OH$), así como sus ésteres tartáricos, denominados ácidos cutárico, caftárico y fertárico en función de si el ácido esterificado es el *p*-cumárico, cafeico o ferúlico, respectivamente. Durante el proceso de vinificación, estos ésteres pueden hidrolizarse de manera que en el vino coexisten las formas libres y las formas esterificadas. Además, las formas libres pueden generarse por hidrólisis de las formas aciladas de los antocianos procedentes del hollejo de la uva.

Estos compuestos no presentan influencia en el sabor ni en el aroma de los vinos, pero sí son precursores de compuestos fenólicos volátiles que pueden afectar a estas propiedades organolépticas, como el 4-vinilfenol y el 4-vinilguayacol, formados a partir de los ácidos *p*-cumárico y ferúlico, respectivamente. Además, estos compuestos, así como los ácidos originales, pueden afectar al color del vino ya que han demostrado ser capaces de reaccionar con los antocianos originando pigmentos derivados del tipo piranoantociano (Schwarz *et al.*, 2003b), como se explicará más adelante. Los ácidos

libres, principalmente los de estructura hidroxicinámico, pueden afectar también indirectamente al color del vino ya que son capaces de actuar como copigmentos de los antocianos, modificando su color y estabilidad. Además se ha demostrado que la adición de este tipo de ácidos durante etapas prefermentativas modifica la extracción de los antocianos (Darias-Martín *et al.*, 2001; Schwarz *et al.*, 2005).

1.2. Flavonoles.

Los flavonoles constituyen una familia de compuestos con colores de blanco a amarillo cuya estructura flavonoide se caracteriza por la presencia de un grupo carbonilo en posición 4 (**Figura I.3**). Se encuentran en el vino principalmente como heterósidos (glucósidos, galactósidos, ramnósidos o rutinósidos) de kaempferol ($R_1=R_3=H$; $R_2=OH$), quercetina ($R_1=R_2=OH$; $R_3=H$), miricetina ($R_1=R_2=R_3=OH$), isoramnetina ($R_1=OCH_3$; $R_2=OH$; $R_3=H$), laricitrina ($R_1=OCH_3$; $R_2=R_3=OH$) y siringetina ($R_1=R_3=OCH_3$; $R_2=OH$), pudiendo encontrarse también los aglicones libres como resultado de la hidrólisis ácida que tiene lugar durante el proceso de elaboración y envejecimiento del vino.

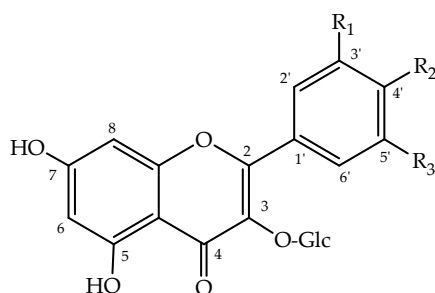


Figura I.3: Estructura básica de los flavonoles.

Estos compuestos se encuentran principalmente en los hollejos de las uvas (Cheynier y Rigaud, 1986), aunque también han sido detectado en pulpa (Pereira *et al.*, 2006) y hojas, pero no en semillas (Rodríguez-Montealegre *et al.*, 2006). Están relacionados con la sensación de amargor y astringencia de los vinos y además contribuyen al color del mismo, aunque no directamente, ya que aunque su color se ve totalmente enmascarado por el de los antocianos debido a su menor concentración

(entre 10 y 100 mg/kg de uva). Su contribución al color se basa en su papel como copigmentos de los antocianos. Su estructura plana les permite interactuar con estos pigmentos mediante fuerzas débiles de *van der Waals* modificando la tonalidad e intensidad del color y estabilizando a los pigmentos frente al pH y otros agentes que conllevan la pérdida de su color.

1.3. Taninos.

Esta denominación procede de la capacidad de estos compuestos para producir combinaciones estables con proteínas y polisacáridos llevando a su precipitación. Por esta razón estos compuestos pueden ser los responsables de la astringencia del vino, ya que precipitan las proteínas de la saliva generando una sensación de sequedad en la boca. Se pueden diferenciar dos grupos principales de taninos: los taninos condensados o taninos catéquicos, formados por la polimerización de unidades flavan-3-ol, y los taninos hidrolizables, constituidos por un glúcido cuyos grupos hidroxilos se encuentran esterificados por restos de ácido gálico o sus derivados.

1.3.1. Taninos condensados.

Se trata de compuestos de estructura flavonoide procedentes de la polimerización de unidades de flavan-3-ol. En la uva se pueden encontrar en el hollejo, aunque la mayor parte están localizados en las semillas. Pueden encontrarse tanto en forma monómera (catequinas y galocatequinas), como formando oligómeros y polímeros mediante uniones carbono-carbono a partir de los monómeros (taninos condensados o proantocianidinas). Generalmente las catequinas y galocatequinas monoméricas no están incluidas en el grupo de los taninos debido a que apenas interactúan con proteínas (Escribano-Bailón, 1993). Las estructuras monoméricas a partir de las cuales se forman oligómeros y polímeros son: (+)-catequina ($R_1=R_3=H$; $R_2=OH$), (-)-epicatequina ($R_1=OH$; $R_3=R_2=H$), (+)-galocatequina ($R_1=H$; $R_2=R_3=OH$) y (-)-epigalocatequina ($R_1=R_3=OH$; $R_2=H$) (**Figura I.4**). Las uniones entre monómeros tienen lugar mediante enlaces carbono-carbono de tipo C4-C8 o C4-C6 (Ricardo da Silva *et al.*,

1991), aunque en ciertos tipos de proantocianidinas existe además un enlace adicional tipo éter entre el C2 de la subunidad superior con el hidroxilo en posición 5 o 7 de la inferior (Passos *et al.*, 2007). En el vino se han detectado desde monómeros hasta polímeros de más de diez unidades, pasando por las formas dímeras y trímeras, bastante abundantes. Mientras que los dímeros y oligómeros (entre 3 y 10 subunidades) son bastante solubles, los polímeros formados por más de 10 moléculas de flavanoles son normalmente poco solubles en medios acuosos (Goldstein y Swain, 1963), lo que podría conllevar su precipitación en el vino.

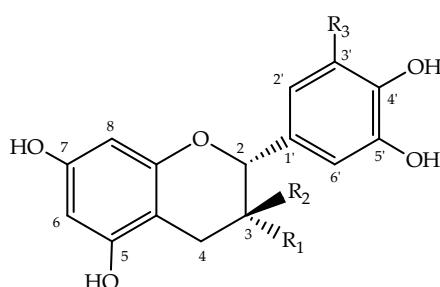


Figura I.4: Estructura básica de los flavan-3-oles monómeros presentes en la uva y el vino.

Estos compuestos necesitan unas condiciones de acidez y temperatura relativamente fuertes para hidrolizarse generando en el medio antocianidinas, de donde procede la denominación de proantocianidinas. En este proceso, tras la hidrólisis del enlace interflavánico, la oxidación de la subunidad superior liberada lleva a la formación de la antocianidina. Según la antocianidina que se genera, las proantocianidinas de la uva y del vino pueden clasificarse en procianidinas (formadas por la condensación de (+)-catequina y/o (-)-epicatequina), puesto que generan cianidina en su hidrólisis; o prodelfinidinas (formadas por la condensación de (+)-galocatequina y/o (-)-epigalocatequina), ya que generan delfinidina.

Se puede además distinguir entre oligómeros/polímeros homogéneos, si todas las subunidades son del mismo tipo (por ejemplo, catequinas) y heterogéneos, si existen ambos tipos de subunidades (catequinas y galocatequinas). Es común también encontrar derivados en los cuales el hidroxilo del carbono 3 del flavanol se encuentra esterificado por un ácido gálico. En los vinos se encuentra únicamente la epicatequina 3-O-galato, tanto en su forma monómera como formando parte de polímeros, como

consecuencia de su extracción desde las semillas de la uva. Las catequinas y procianidinas están presentes tanto en el hollejo como en la semilla de la uva, mientras que las galocatequinas y prodelfinidinas sólo se encuentran en los hollejos (Escribano-Bailón *et al.*, 1992; Escribano-Bailón *et al.*, 1995). Tradicionalmente, además, las proantocianidinas se han denominado mediante un sistema alfanumérico para describir el tipo de enlace existente entre las unidades de flavanol (Thompson *et al.*, 1972). Así, los compuestos formados únicamente por enlaces carbono-carbono C4-C8 o C4-C6 se denominan proantocianidinas tipo B (dímeros) y tipo C (trímeros), mientras que se denomina proantocianidinas tipo A a los compuestos en los que además del enlace carbono-carbono existe un enlace adicional de tipo éter entre el carbono 2 de la subunidad superior y el grupo hidroxilo de la posición 5 o 7 de la subunidad inferior (**Figura I.5**). Los dímeros son las proantocianidinas más frecuentemente descritas en los alimentos, presentando normalmente uniones interflavánicas mediante enlaces C4-C8 o C4-C6 (tipo B), estando favorecida la unión tipo C4-C8 frente a C4-C6.

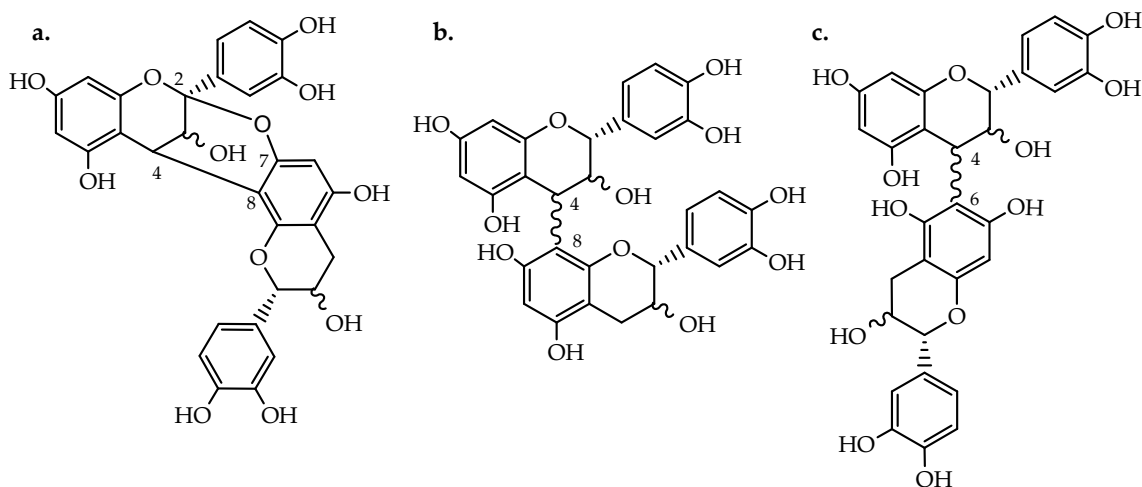


Figura I.5: Estructura básica de las proantocianidinas dímeras: **a.** Dímero tipo A. **b.** Dímero tipo B (enlace C4-C8). **c.** Dímero tipo B (enlace C4-C6).

La **Tabla I.2** resume las características estructurales de los dímeros y trímeros más habituales en plantas y alimentos. Entre ellos, cabe destacar el dímero tipo B1, por ser la proantocianidina mayoritaria en vinos (Lea *et al.*, 1979; Haslam, 1980; Ricardo da Silva *et al.*, 1991).

La principal característica funcional de las proantocianidinas es la capacidad para unirse a sustancias como proteínas, polisacáridos, alcaloides, radicales libres e iones metálicos. Algunos autores (Lea, 1992; Lee y Jaworski, 1990) han señalado que la capacidad para combinarse con proteínas aumenta con la polimerización de estos compuestos desde dímeros hasta heptámeros, grado a partir del cual esta capacidad comienza a disminuir debido a que altos grados de polimerización conllevan un importante descenso de la solubilidad de estos compuestos, impidiendo su interacción con las proteínas y, por tanto, su contribución a la sensación de astringencia. Otros autores (Bacon y Rhodes, 2000; Vidal *et al.*, 2003) sugieren que cuando se trata de proteínas salivares y por lo tanto de la sensación de astringencia, la capacidad de combinarse con proteínas aumenta con el peso molecular del tanino, así como con el grado de galoilación de la molécula. Recientemente se ha observado una fuerte correlación entre el peso molecular de los taninos y la astringencia (Sun *et al.*, 2011). Además estos compuestos están relacionados con ciertas sensaciones de amargor. Las proantocianidinas tetrámeras son las más amargas, disminuyendo el amargor al aumentar o disminuir el grado de polimerización (Lea, 1992).

Tabla I.2: Estructura básica de las proantocianidinas más comunes en plantas y alimentos.

Tipo	Nomenclatura
B1	Epicatequina-(4 β →8)-catequina
B2	Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina
B3	Catequina-(4 α →8)-catequina
B4	Catequina-(4 α →8)-epicatequina
B5	Epicatequina-(4 β →6)-epicatequina
B6	Catequina-(4 α →6)-catequina
B7	Epicatequina-(4 β →6)-catequina
B8	Catequina-(4 α →6)-epicatequina
A1	Epicatequina-(4 β →8,2 β →O→7)-catequina
A2	Epicatequina-(4 β →8,2 β →O→7)-epicatequina
C1	Epicatequina-(4 β →8)-epicatequina-(4 β →8)-epicatequina
C2	Catequina-(4 α →8)-catequina-(4 α →8)-catequina

Se ha puesto de manifiesto que, al pH del vino, puede producirse de manera espontánea la ruptura de los enlaces interflavánicos de las proantocianidinas (Haslam,

1980; Vidal *et al.*, 2002), originándose carbocationes a partir de la subunidad superior de la estructura. Estos carbocationes son altamente reactivos y pueden unirse a otras moléculas presentes en el vino, como otras proantocianidinas o, más frecuentemente, a monómeros de flavanoles, pudiendo así afectar a las sensaciones de amargor y astringencia. Asimismo, es posible que los carbocationes formados reaccionen con los antocianos originando pigmentos derivados con características y propiedades diferentes a las de los antocianos originales, influyendo así en el color del vino.

Tanto las proantocianidinas oligómeras como los flavanoles monómeros pueden reaccionar con los aldehídos presentes en el vino (principalmente acetaldehído) generando productos intermedios que pueden reaccionar con los antocianos a través del aldehído unido al tanino, originando pigmentos derivados de tonalidades azuladas que influyen en el color del vino. Los taninos pueden afectar también a esta característica sensorial del vino a través del proceso de copigmentación. Aunque su capacidad de actuar como copigmentos es menor que la de los ácidos fenólicos y flavonoles (Boulton, 2001; Darias-Martín *et al.*, 2001; Gómez-Míguez *et al.*, 2006), las concentraciones de proantocianidinas en el vino son muy superiores a las de estos compuestos (Cabanis *et al.*, 2003), por lo que el efecto de copigmentación debido a las proantocianidinas podría ser también superior.

1.3.2. Taninos hidrolizables.

Bajo la denominación de taninos hidrolizables se engloba un amplio y complejo grupo de compuestos que se caracterizan por ser fácilmente hidrolizables tanto por vía química como por vía enzimática. Estos compuestos están constituidos en su estructura básica por un poliol, normalmente una molécula glucídica, sobre la que se encuentra esterificado el ácido gálico o alguno de sus derivados, como ácido hexahidroxi-difénico (HHDP). Aunque existen en la uva compuestos que por su estructura pertenecen a este grupo, la principal fuente de taninos hidrolizables en el vino es la madera de roble de la que están fabricados los depósitos que normalmente se utilizan para su envejecimiento. Existen dos grupos de taninos hidrolizables: los taninos gálicos o galotaninos, que generan en su hidrólisis ácido gálico, y los taninos

elágicos o elagitaninos, en cuya estructura se encuentra al menos un resto hexahidroxidifénico, por lo que generan en su hidrólisis ácido elágico, entre otros. Los taninos gálicos, menos abundantes en este tipo de madera, poseen normalmente en su estructura una molécula de glucosa en forma piranosa cuyos grupos hidroxilo están esterificados total o parcialmente con moléculas de ácido gálico, por lo que son una fuente importante de este ácido en el vino. Los taninos elágicos presentan mayor interés tanto por su mayor abundancia como por su contribución a las propiedades organolépticas del vino. La estructura básica de los elagitaninos procedentes de la madera de roble más frecuentes en los vinos tintos, castalagina y vescalagina (**Figura I.6.a**), está formada por una molécula de glucosa en forma lineal cuyos grupos hidroxilo están esterificados por el ácido hexahidroxidifénico (HHDP) y por el ácido nonahidroxitrifénico (NHTP). Además, en estos compuestos existe un enlace carbono-carbono entre el resto NHTP y el C1 del azúcar. Su hidrólisis total genera en el medio un resto HHDP que por lactonización forma el ácido elágico (**Figura I.6.b**). Además de estos elagitaninos, es posible detectar en vino sus formas glicosiladas (grandinina y roburina E, **Figura I.6.a**), así como sus dímeros (roburinas A-D). Estos elagitaninos C-glucosídicos tienen especial relevancia ya que, debido a su compleja estructura, poseen interesantes propiedades de las que los taninos hidrolizables presentes en la uva carecen como consecuencia de una estructura más sencilla, normalmente con un único grupo HHDP unido al azúcar y sin el enlace C-C con el resto glucídico.

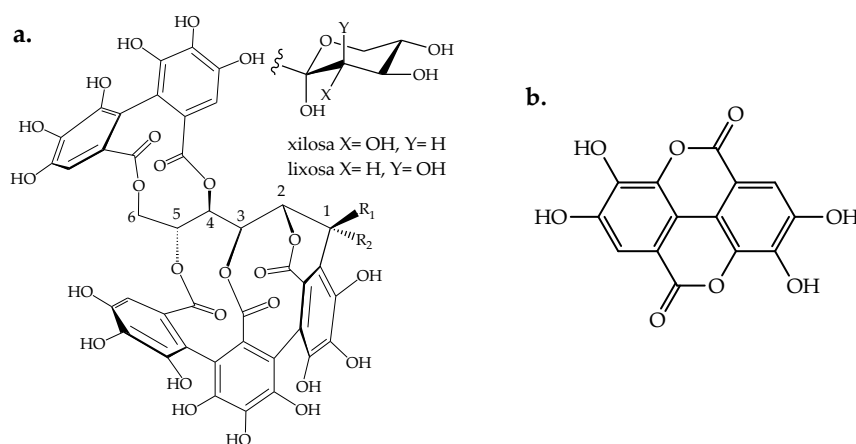


Figura I.6: **a.** Estructura de los elagitaninos C-glucosídicos: castalagina (R₁=H; R₂=OH), vescalagina (R₁=OH; R₂=H), grandinina (R₁=lixosa (X=H, Y=OH); R₂=H) y roburina E (R₁=xilosa (X=OH, Y=H); R₂=H). **b.** Estructura del ácido elágico.

Así, los elagitaninos de roble poseen propiedades biológicas como posibles inhibidores de la proliferación de ciertos tipos de células cancerosas (Fridrich *et al.*, 2008; Quideau *et al.*, 2005), así como la capacidad de actuar como protectores frente a la oxidación de otros compuestos del vino (Vivas y Glories, 1996). Las características y propiedades de estos compuestos, así como su posible influencia en las propiedades organolépticas del vino, se explicarán detalladamente más adelante.

1.4. Antocianos.

Los antocianos son una familia de compuestos de naturaleza flavonoide presentes en diversos tejidos vegetales donde son los responsables de una amplia variedad de colores: naranjas, rojos, violetas y azules. Se localizan principalmente en las vacuolas celulares de flores y frutos, aunque también se pueden encontrar en otras partes de la planta, como hojas y tallos. Dentro de las vacuolas están localizados en unos orgánulos delimitados por una membrana, conocidos como antocianoplastos, formados durante la síntesis de estos pigmentos (Pecket y Small, 1980). En el caso de las uvas, estos orgánulos se localizan en las células del hollejo, en las 3 o 4 primeras capas del hipodermo. No obstante, existen variedades denominadas *tintoreras* que presentan antocianos también en la pulpa. Estos compuestos son muy importantes en las uvas y en el vino tinto tanto cuantitativa como cualitativamente, ya que se encuentran en cantidades bastante elevadas (desde 500 hasta 3000 mg/kg de uva), siendo los responsables del color característico de estos productos. Su estructura (**Figura I.7**), derivada del ion flavilio polihidroxilado, es una estructura de resonancia en la cual la carga positiva está deslocalizada por todo el sistema heterocíclico, dando lugar a un catión oxonio heteroaromático en el que la mayor densidad relativa de carga positiva se localiza sobre los carbonos C2 y C4 (Brouillard *et al.*, 1982). Los antocianos se encuentran normalmente en forma de heterósidos, donde el aglicón está unido a una o varias moléculas de azúcar, las cuales a su vez pueden estar esterificadas (antocianos acil-heterósidos) o no con ácidos orgánicos. Los azúcares que pueden encontrarse unidos a las antocianidinas son diversos, aunque en las uvas la forma glucosilada es la más común, habiendo sido descritos también los derivados galactósidos (Alcalde-Eon

et al., 2006a; Wang *et al.*, 2003a), aunque siempre en concentraciones inferiores a los correspondientes glucósidos. El azúcar se encuentra normalmente unido al hidroxilo de las posiciones 3 y/o 5 del antociano. En las uvas pertenecientes a la especie *vinifera* los 3-monoglucósidos son los derivados más comunes, estando prácticamente ausentes los 3,5-diglucósidos, los cuales representan porcentajes mucho más importantes en algunas de las especies no *vinifera*.

Según el patrón de hidroxilación y/o metoxilación del anillo B se pueden distinguir 6 antocianidinas principales (**Figura I.7**): pelargonidina ($R_1=R_2=H$), delfinidina ($R_1=R_2=OH$), cianidina ($R_1=OH$; $R_2=H$), petunidina ($R_1=OH$; $R_2=OCH_3$), peonidina ($R_1=OCH_3$; $R_2=H$), y malvidina ($R_1=OCH_3$; $R_2=OCH_3$). Aunque se han descrito 25 antocianidinas monoméricas (Andersen y Jordheim, 2006), el 90% de los antocianos presentes en la naturaleza contiene alguna de estas seis antocianidinas, mientras que el resto están formados por antocianidinas de estructuras ligeramente diferentes (3-desoxiantocianidinas, antocianidinas metiladas o antocianidinas hidroxiladas en posición 6). Los antocianos presentes en la uva y el vino derivan de las antocianidinas delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, mientras que la presencia de derivados de pelargonidina sólo se ha podido comprobar en unas variedades de uva muy concretas y, por tanto, en los vinos elaborados con ellas (Wang *et al.*, 2003a), y siempre en cantidades bastante menores que los derivados de las otras antocianidinas.

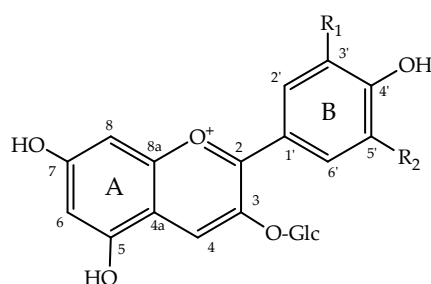


Figura I.7: Estructura básica de las antocianidinas 3-O-glucósido.

La estructura de los antocianos está íntimamente ligada con su color. Por una parte, la mayor o menor sustitución del anillo B o la acilación de la glucosa modifican cualitativamente el color y a su vez, la estabilidad de la molécula. Se ha demostrado que la estabilidad de los antocianos aumenta con el número de metoxilos en el anillo B

y disminuye al aumentar el número de grupos hidroxilo, al igual que el grado de glicosilación también muestra un claro efecto en la estabilidad (Bridle y Timberlake, 1997; Delgado-Vargas *et al.*, 2000; Markakis, 1982).

Como se ha indicado anteriormente, es común detectar en uvas y vinos además de las formas glucósiladas, las formas aciladas de las antocianos 3-monoglucósido, donde ácidos como el ácido acético, el ácido *p*-cumárico y el ácido cafeico se encuentran esterificando el hidroxilo de la posición 6 de la glucosa. La presencia de acilación provoca generalmente un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción en el visible, modificando así el color de los antocianos originales. Además, los compuestos que presentan grupos acilantes pueden sufrir procesos de copigmentación intramolecular con la consecuente variación en el color del antociano (Dangles *et al.*, 1993; Eiro y Heinonen, 2002). La acilación también aumenta la resistencia de los antocianos frente a la degradación por factores como la luz o la temperatura, probablemente por la posibilidad de establecerse una conformación plegada, favorecida sobre todo por grupos acilo de gran longitud, que protegería a los antocianos de la degradación. Estos compuestos pueden sufrir hidrólisis ácida durante el proceso de vinificación o envejecimiento, liberando al medio los correspondientes ácidos orgánicos.

Por otra parte, la posibilidad de resonancia de la carga y de la incorporación de una molécula de agua a la estructura del antociano tiene como consecuencia que, en disolución acuosa, estos compuestos estén involucrados en un conjunto de reacciones dependientes del pH. Este conjunto de reacciones lo conforman una serie de equilibrios que se establecen entre los cuatro tipos de estructuras básicas del antociano (catión flavilio, base quinoidal, forma hemiacetálica y chalcona). Estas estructuras presentan colores diferentes, por lo que el color de la disolución depende de la estructura predominante, que a su vez es dependiente del pH del medio. Este conjunto de reacciones se explicará con detalle más adelante.

El color de los antocianos puede además verse afectado por la existencia de procesos de copigmentación. Este tipo de procesos son posibles gracias a la estructura plana de los antocianos y de los compuestos con los que interacciona mediante fuerzas débiles, denominados copigmentos. Como se ha indicado anteriormente, los ácidos

fenólicos, los flavonoles y los flavan-3-oles pueden actuar como copigmentos. La copigmentación se expondrá posteriormente de forma más detallada.

Los antocianos están involucrados además en gran cantidad de reacciones a partir de las cuales se generan otros pigmentos derivados, entre los que destacan los piranoantocianos y los pigmentos derivados de la condensación entre antocianos y flavanoles. Estos pigmentos derivados, debido principalmente a su mayor estabilidad química, pueden ser responsables de ciertas tonalidades del color en los vinos envejecidos. Sus características se detallan a continuación.

1.5. Pigmentos derivados de antocianos. (Fulcrand *et al.*, 2006; Monagas y Bartolomé, 2009)

Durante el proceso de envejecimiento del vino, se observa un cambio en la tonalidad del color del mismo desde tonos rojo-azulados hacia rojo-anaranjados. Este cambio se debe principalmente a la desaparición de los antocianos nativos de la uva, tanto por su degradación como por su transformación en otros pigmentos. Al disminuir la cantidad de antocianos originales de la uva y aumentar el de los pigmentos derivados, el color del vino se modifica según el tipo y las cantidades de pigmentos formados. Estos pigmentos de nueva formación se originan básicamente como consecuencia de dos tipos de reacciones: reacciones de condensación y reacciones de cicloadición. En las primeras suelen estar implicados compuestos de naturaleza flavanólica y pueden ocurrir bien de manera directa, o bien por mediación de alguna sustancia presente en el vino, siendo el acetaldehído el mediador más frecuente. Es posible también que se formen pigmentos de condensación entre antocianos y otros compuestos no flavanólicos, como los elagitaninos (Quideau *et al.*, 2005). En las reacciones de cicloadición se produce la adición de diversos compuestos presentes en el vino sobre el carbono en posición 4 y el grupo hidroxilo en posición 5 del antociano, originándose un nuevo anillo pirano en la estructura. Por este motivo estos compuestos se denominan de manera genérica piranoantocianos.

Los antocianos tienen algunas posiciones que, debido a la distribución de carga de la molécula, son más sensibles a actuar como centro de las reacciones. Como

consecuencia, los antocianos pueden actuar tanto como nucleófilos o como electrófilos (**Figura I.8**). Los antocianos pueden reaccionar con compuestos electrófilos actuando como nucleófilos a través de los carbonos 6 y 8 del anillo A, además de a través de los grupos hidroxilo. En esta situación lo más común es que el antociano se encuentre en su forma hemiacetálica, sin carga, favoreciendo la capacidad nucleofílica del antociano. Adicionalmente, los antocianos pueden sufrir un ataque nucleofílico sobre los carbonos 2 y 4 del anillo C, principalmente como consecuencia de la deficiencia electrónica de este anillo a causa de la carga positiva (de Freitas y Mateus, 2006).

Entre los compuestos involucrados en las reacciones con antocianos destacan, además de los flavanoles de la uva, algunos metabolitos de levaduras, especialmente los compuestos de tipo carbonilo. Durante la fermentación del vino, las levaduras liberan al medio ciertos compuestos que pueden participar directamente en las reacciones con los antocianos. Cabe destacar el ácido pirúvico, el ácido glioxílico, el acetaldehído y otros aldehídos superiores y el ácido acetoacético. Alguno de estos aldehídos puede generarse además por la oxidación del etanol y otros alcoholes superiores presentes en el vino (Wilensky y Singleton, 1974).

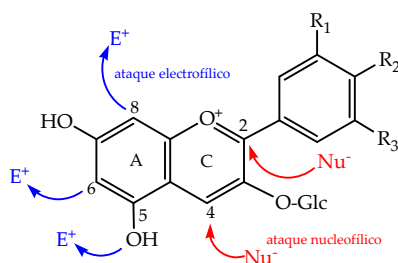


Figura I.8: Posiciones más reactivas de la estructura del antociano (adaptado de de Freitas y Mateus, 2006).

1.5.1. Productos de condensación directa entre antocianos y flavan-3-oles.

Los antocianos tienen la capacidad de reaccionar directamente con los flavanoles presentes en el vino generando nuevos compuestos. A finales de los años sesenta y principios de los setenta, Jurd y Somers (Jurd, 1967; Jurd y Somers, 1970; Somers, 1971) propusieron diferentes mecanismos para la formación de este tipo de pigmentos derivados de antocianos. Su presencia en el vino y su estructura química han sido demostradas mediante HPLC-MS (Vivar-Quintana *et al.*, 1999), tiolisis (Remy-Tanneau

et al., 2000), hemisíntesis (Salas *et al.*, 2004), patrones de fragmentación en espectrometría de masas (Alcalde-Eon *et al.*, 2004; Alcalde-Eon *et al.*, 2006b; González-Paramás *et al.*, 2006; Salas *et al.*, 2004) y RMN (González-Manzano *et al.*, 2008; Salas *et al.*, 2004). Este tipo de pigmentos también han sido encontrados en frutas y verduras (Fossen *et al.*, 2004; González-Manzano *et al.*, 2008; González-Paramás *et al.*, 2006; McDougall *et al.*, 2005), por lo que no sólo son productos formados durante la elaboración del vino, sino que pueden encontrarse de forma natural en las plantas.

Los dos mecanismos diferentes descritos para la formación de estos productos son consecuencia de la posibilidad descrita anteriormente de los antocianos para actuar tanto como electrófilos como nucleófilos. Los productos resultantes de cada mecanismo poseen estructuras y propiedades colorimétricas diferentes, ya que la condensación puede dar lugar a dos tipos de productos según el mecanismo: condensados tipo A-F (antociano en la posición superior y flavanol en la inferior) o tipo F-A (flavanol en la superior y antociano en la inferior). En general, los productos de estas reacciones están más asociados a estructuras oligoméricas que a poliméricas (Remy-Tanneau *et al.*, 2000), aunque Hayasaka y Kennedy detectaron masas moleculares de polímeros de ambos tipos hasta un nivel de octámeros (Hayasaka y Kennedy, 2003).

1.5.1.a. Productos de la condensación directa antociano-flavanol (A-F):

Estos pigmentos derivados se generan a través de la reacción de los antocianos en forma de flavilio a través de su posición 4 (de carácter electrófilo) con las posiciones 8 o 6 (de carácter nucleófilo) de un flavanol monómero u oligómero, originando un producto de condensación conocido generalmente como compuesto A-F (A-T si denominamos tanino al flavanol oligómero) (**Figura I.9**). Somers (Somers, 1971) propuso que esta reacción podría darse en vinos dando lugar a un flaveno lábil e incoloro que, a través de un proceso oxidativo, generase de nuevo la forma flavilio. Otra posibilidad, relacionada con la aparición de tonalidades amarillentas en el vino, es que el condensado en forma flaveno sufra un proceso de deshidratación y oxidación generando un derivado xantilio (**Figura I.9**), de color amarillo (Baranowski y Nagel, 1983; Liao *et al.*, 1992; Santos-Buelga *et al.*, 1995; Santos-Buelga *et al.*, 1999). Esta vía de condensación entre antocianos y flavanoles ha sido ampliamente aceptada por muchos

autores aunque no existen pruebas de su clara existencia en vinos. Su formación en medios modelo fue verificada por Escribano-Bailón y colaboradores (Escribano-Bailón *et al.*, 1996), quienes también demostraron que el paso de forma flaveno a forma flavilio sólo es posible si la posición 5 del flaveno está libre, situación que no ocurre en el caso de los antocianos. Sin embargo, la transformación a compuestos de tipo xantilio era clara. El paso de forma flaveno a flavilio fue observado por Malien-Aubert y colaboradores (Malien-Aubert *et al.*, 2002) en un compuesto de condensación entre la malvidina 3-O-glucósido y un trímero de procianidina. Por lo tanto, parece que la existencia de un grupo hidroxilo en la posición 5 del antociano dificulta la conversión de la forma flaveno en la forma flavilio del producto de condensación con un flavanol, a no ser que este sea de naturaleza oligomérica.

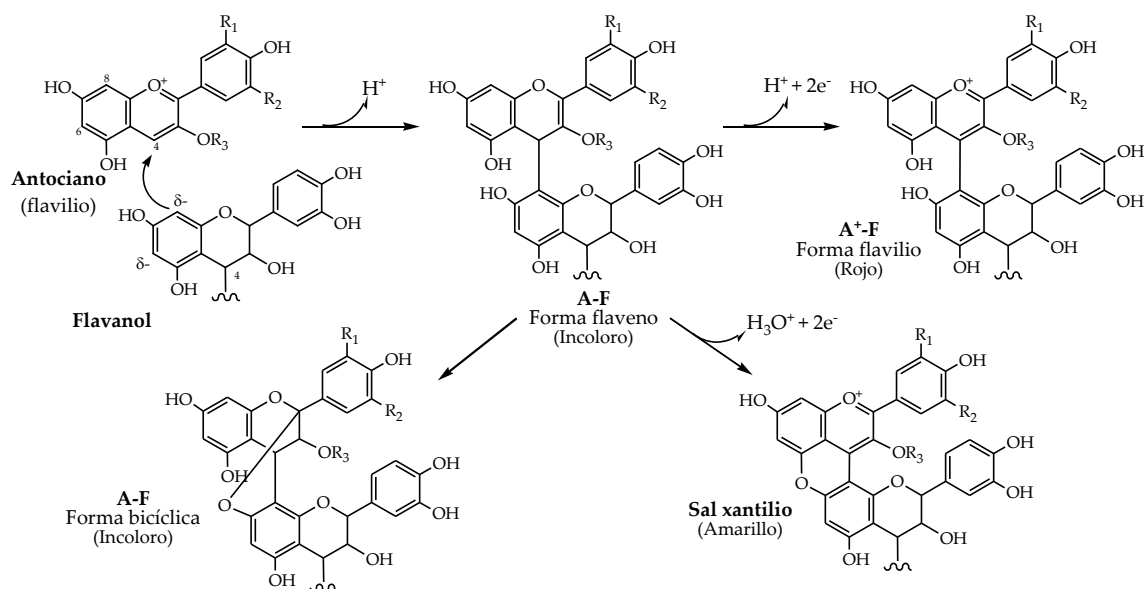


Figura I.9: Mecanismo de formación de los posibles productos resultantes de la condensación directa antociano-flavanol (A-F).

También se ha demostrado la existencia de otra posible estructura para los dímeros entre antociano y flavanoles donde existe un tipo de unión similar al descrito en las procianidinas dímeras de tipo A, formando un producto bicíclico. La primera evidencia de un producto incoloro de condensación bicíclica de tipo A-F fue aportada por Bishop y Nagel (Bishop y Nagel, 1984), quienes, en disoluciones modelo, lograron detectar e identificar por RMN el dímero malvidina 3,5-diglucósido-(C4-C8,C2-O-C7)-

epicatequina. La formación de un producto similar en ensayos realizados en disoluciones modelo que contenían malvidina 3-O-glucósido y (epi)catequina fue posteriormente constada por Remy-Tanneau y colaboradores (Remy-Tanneau *et al.*, 2000; Remy-Tanneau *et al.*, 2003), realizando su identificación mediante HPLC-ESI/MS y tras demostrar que estos productos eran resistentes a procedimientos de tiolisis, de manera análoga a las procianidinas de tipo A.

Además, en 2006, Dueñas y colaboradores (Dueñas *et al.*, 2006a; Dueñas *et al.*, 2006b) observaron que, en los medios que contenían malvidina 3-O-glucósido y (-)-epicatequina, a pH comprendido entre 3,6 y 6, se formaban compuestos que mostraban una coloración amarilla y espectros de absorción en el UV-visible propios de los iones xantilio. Estos autores propusieron el mecanismo de formación de estos compuestos así como dos estructuras posibles basándose en los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas y RMN (**Figura I.10**).

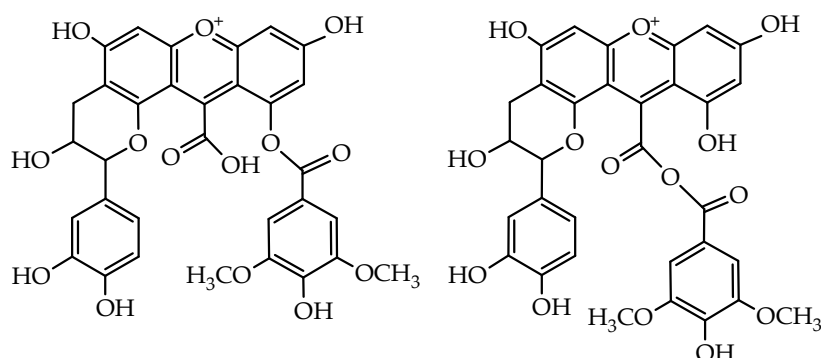


Figura I.10: Posibles estructuras propuestas por Dueñas y colaboradores (Dueñas *et al.*, 2006b) para los iones xantilio derivados de los productos de condensación tipo A-F.

1.5.1.b. Productos de la condensación directa flavanol-antociano (F-A):

En el segundo mecanismo posible para la formación de productos de condensación entre antocianos y flavanoles es el antociano el que actúa como nucleófilo. Para ello, el antociano debe encontrarse en forma hemiacetálica, es decir, tiene que hidratarse, perdiendo la carga positiva. Este mecanismo contempla, además, el hecho de que el enlace interflavánico de las proantocianidinas condensadas se puede romper en medio ácido (Haslam, 1980), dando lugar a carbocationes (iones carbonio) formados a partir de la unidad o unidades que se encuentran en posición superior al enlace, y que

actúan como electrófilos. Se produce entonces el ataque por parte del antociano a través de sus posiciones nucleofílicas C6 o C8 (**Figura I.11**). Vidal y colaboradores (Vidal *et al.*, 2002) detectaron que en disoluciones modelo la ruptura de los enlaces interflavánicos es posible, observando además que los iones carbonio formados a partir de las proantocianidinas oligómeras pueden reaccionar también con otros flavanoles, generando nuevas moléculas de proantocianidinas, que pueden conducir a un aumento del grado medio de polimerización. Además, al pH del vino, el 80% de los antocianos debería encontrarse en su forma hidratada (Brouillard, 1982), de manera que es probable que se produzca esta reacción de condensación. Se genera por tanto un condensado del tipo F-A en forma hemiacetálica que, tras un proceso de deshidratación, genera un compuesto coloreado del tipo F-A⁺, como demostraron Remy y colaboradores (Remy *et al.*, 2000) al detectar este tipo de compuestos en vinos. Posteriormente, Salas y colaboradores (Salas *et al.*, 2004a) fueron capaces de sintetizar este tipo de condensados directos a partir de malvidina 3-O-glucósido y el dímero epicatequina-(4,8)-epicatequina 3-O-galato. Estos autores detectaron en el medio, además del dímero F-A⁺ formado por la epicatequina y el antociano, trímeros del tipo F-F-A⁺ formados por un dímero epicatequina-epicatequina y el antociano. Así, el ion carbonio generado por ruptura del dímero de procianidina podía reaccionar también con los flavanoles presentes en el medio, confirmando los resultados obtenidos por Vidal y colaboradores (Vidal *et al.*, 2002). A partir de los oligómeros formados pueden, además, generarse nuevos iones carbonio de mayor grado de polimerización. De esta manera el antociano compite con los flavanoles en la reacción con el ion carbonio en la formación de estos productos de condensación. Este tipo de uniones también han sido descritas para dímeros entre antocianos, formando compuestos del tipo A-A⁺, que han sido detectados en extractos de hollejos y en vinos (Alcalde-Eon *et al.*, 2007; Salas *et al.*, 2005a; Salas *et al.*, 2005b; Vidal *et al.*, 2004a; Vidal *et al.*, 2004b); así como para oligómeros formados por un residuo flavanol unido directamente a un antociano dímero (pigmentos tipo F-A-A⁺), pigmentos que fueron detectados en el vino tras su fraccionamiento (Alcalde-Eon *et al.*, 2007).

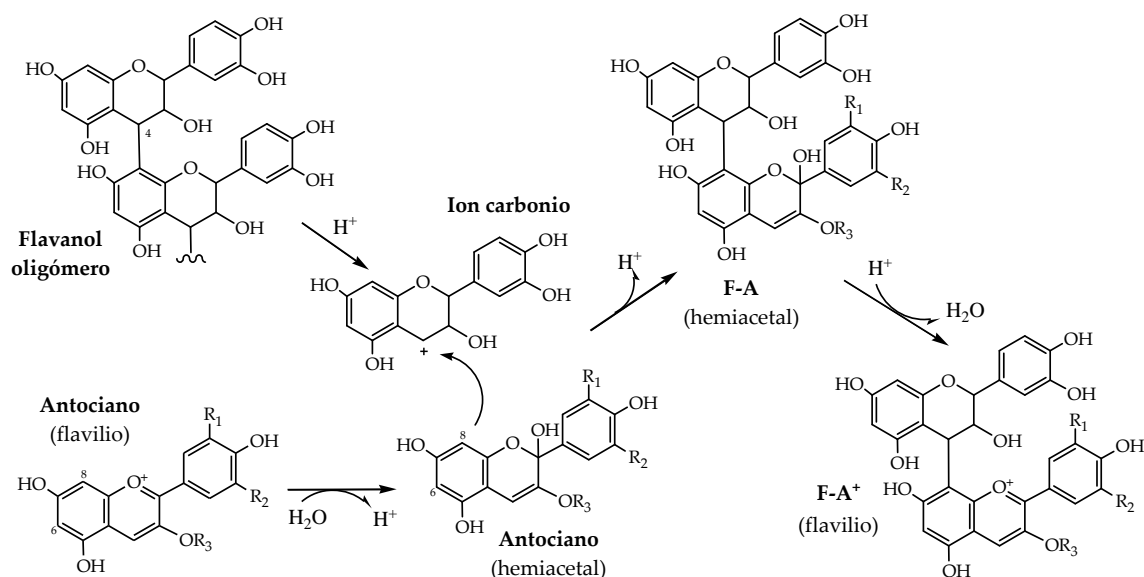


Figura I.11: Mecanismo de condensación directa flavanol-antociano (F-A).

La presencia de productos de condensación del tipo F-A⁺ en vinos ha sido ampliamente comprobada, siendo el dímero malvidina 3-O-glucósido-(epi)catequina el compuesto identificado con mayor frecuencia (Vivar-Quintana *et al.*, 1999; Vivar-Quintana *et al.*, 2002; Monagas *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003b; de Villiers *et al.*, 2004). Además se han detectado en vinos condensados directos de hasta 8 unidades (Hayasaka y Kennedy, 2003), de las cuales una corresponde al antociano y el resto conforma un flavanol oligómero.

Los compuestos de condensación del tipo F-A⁺ muestran una coloración roja, con un espectro de absorción característico de antocianos con una λ de absorción máxima en la región del visible ligeramente desplazada batocrómicamente con respecto a los antocianos originales (Fossen *et al.*, 2004; González-Paramás *et al.*, 2006). La reacción de condensación no afecta a las posiciones C2 o C4 del antociano por lo que los nuevos pigmentos F-A⁺ no están más protegidos frente a la decoloración mediante ataque nucleofílico por diversos agentes (agua, dióxido de azufre, etc.) que la forma monomérica del antociano (Salas *et al.*, 2004).

1.5.2. Productos de la condensación directa entre antocianos y otros compuestos.

Los antocianos tienen la capacidad de reaccionar directamente, además de con los flavanoles, con otros compuestos fenólicos presentes en el vino generando nuevos compuestos resultantes de una reacción de condensación directa. Entre los compuestos con los que pueden reaccionar se pueden destacar los elagitaninos (Quideau *et al.*, 2005; Jourdes *et al.*, 2009) y los ácidos hidroxicinámicos (incluidos sus ésteres tartáricos) (Sarni-Manchado *et al.*, 1997). En cuanto a los ácidos hidroxicinámicos, ha sido descrito el derivado formado entre el antociano y el ácido caftárico, formado a través de reacciones enzimáticas de oxidación, y que presenta una coloración rojiza (Sarni-Manchado *et al.*, 1997).

Los elagitaninos, como se ha indicado anteriormente, están presentes en el vino principalmente como consecuencia de su envejecimiento en depósitos fabricados con madera, normalmente de roble. Las características de estos compuestos hacen que puedan jugar un papel relevante en la evolución del color del vino tinto durante el envejecimiento. Recientemente se ha demostrado la posibilidad de que los elagitaninos puedan reaccionar directamente con los antocianos generando pigmentos resultantes de una condensación directa (Quideau *et al.*, 2005; Chassaing *et al.*, 2010). Entre los elagitaninos presentes en el vino, sólo la vescalagina (**Figura I.6.a**) ha demostrado ser reactiva con los antocianos, generando nuevos pigmentos a través de una reacción en la que el antociano actúa como nucleófilo (**Figura I.12**): La vescalagina en medio ácido sufre un proceso de deshidratación, perdiendo el hidroxilo en posición 1 de la glucosa y generando un carbocatión sobre el que ataca el antociano. La reacción sigue un mecanismo de sustitución nucleofílica con retención de la configuración, de forma que se genera un nuevo aducto en el que el carbono C1 del elagitanino mantiene la configuración espacial. Se ha demostrado la posibilidad de formación de estos compuestos mediante la reacción entre la vescalagina y la malvidina y entre la vescalagina y la malvidina 3-O-glucósido, reacción que además ha sido verificada en vinos (Chassaing *et al.* 2010). Aunque el antociano podría actuar como nucleófilo a través de sus posiciones C6 y C8, estos autores sólo han identificado el aducto formado

a través del carbono C8 del antociano. Los pigmentos derivados obtenidos a través de esta reacción muestran una coloración diferente a los antocianos originales, con una tonalidad morada que se corresponde con un desplazamiento batocrómico de aproximadamente 20 nm en la banda visible del espectro de absorción del pigmento. Aunque estos pigmentos no serán mayoritarios en el vino, sí pueden estar involucrados en la modulación del color del vino durante el proceso de envejecimiento en barricas de roble. Su color está en concordancia con las tonalidades violáceas y carmesí mostradas por vinos jóvenes (Jourdes *et al.*, 2009), las cuales se intensifican en presencia de elagitaninos (Vivas y Glories, 1996).

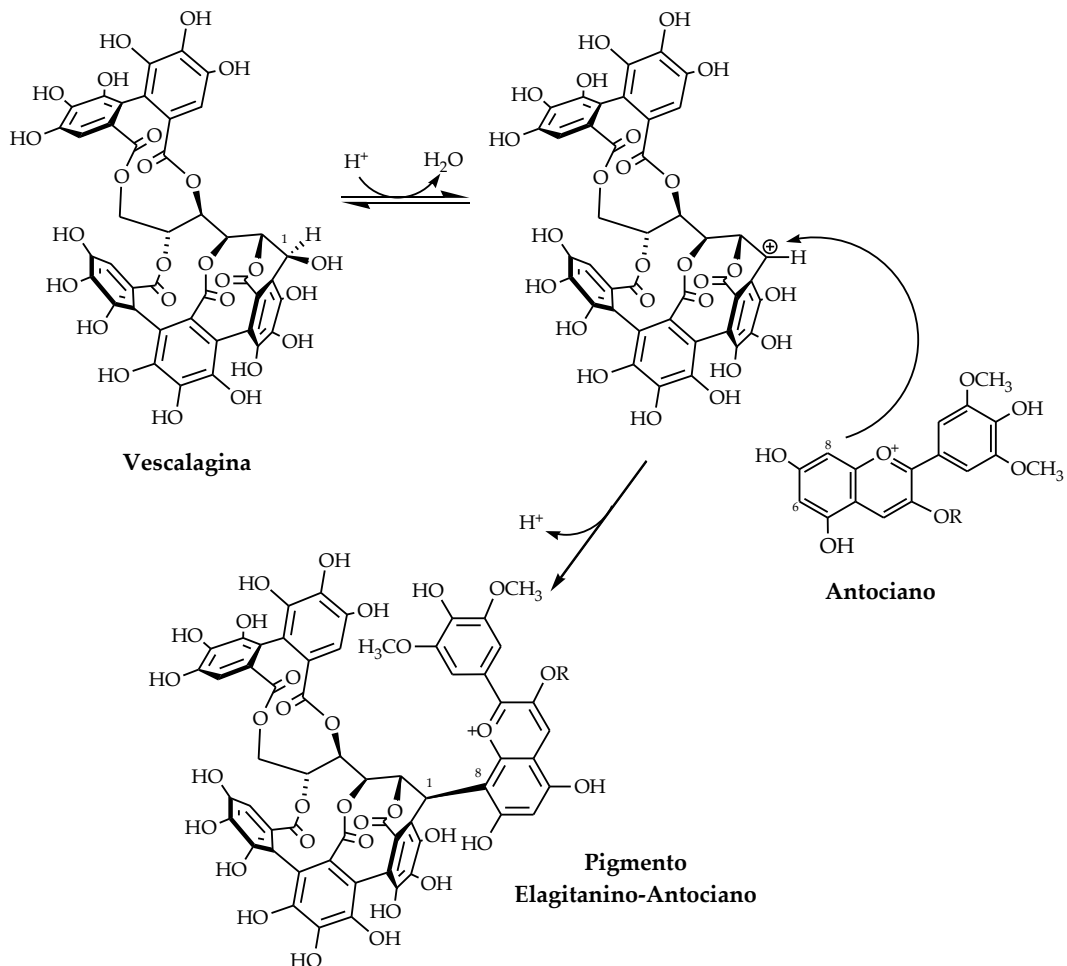


Figura I.12: Mecanismo de formación de los pigmentos de condensación entre elagitaninos y antocianos. R=H: malvidina; R=glucosa: malvidina 3-O-glucósido.

1.5.3. Productos de la condensación mediada por aldehídos.

1.5.3.a. Productos de la condensación mediada por acetaldehído:

El acetaldehído es un compuesto que se forma en los vinos durante el proceso de vinificación y envejecimiento por dos vías diferentes. Por un lado este compuesto es un subproducto resultante del metabolismo de las levaduras durante la fermentación alcohólica (Romano *et al.*, 1994; Bayonove *et al.*, 2003), mientras que por otro puede generarse por a la oxidación del etanol acoplada a la autooxidación de compuestos fenólicos presentes también en el vino (por ejemplo, los elagitaninos) (Wilénradt y Singleton, 1974; Vivas y Glories, 1996).

La implicación del acetaldehído en los cambios del color del vino se ha investigado ampliamente. Timberlake y Bridle (1976) observaron aumentos del color y desplazamientos en el tono de medios modelo que contenían antocianos, flavanoles y acetaldehído; cambios que atribuyeron a la aparición de nuevos pigmentos de características diferentes a los antocianos originales. Estos autores propusieron un mecanismo de formación para este tipo de compuestos en el cual el acetaldehído, en medio ácido, forma un carbocatión capaz de reaccionar con el flavanol a través de su posición C6 o C8. El aducto flavanol-acetaldehído, tras la pérdida de una molécula de agua, da lugar a un nuevo carbocatión que puede ser atacado por un antociano a través de su posición C6 o C8 o por otro flavanol (**Figura I.13**), también a través del carbono C6 o C8 (Es-Safi *et al.*, 1999b; Fulcrand *et al.*, 1996; Saucier *et al.*, 1997a; Saucier *et al.*, 1997b). Así, el aducto flavanol-acetaldehído puede reaccionar con el antociano, generando un nuevo pigmento, o con otros flavanoles, generando taninos poliméricos. Además, en vinos envejecidos, los aductos entre flavanoles y antocianos pueden ser transformados en otros compuestos a través de las reacciones típicas de los flavanoles (Nave *et al.*, 2010b).

A través del estudio de las disoluciones modelo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), Roggero y colaboradores (Roggero *et al.*, 1987) determinaron que a partir de cada pareja antociano/flavanol en presencia de acetaldehído se podían formar dos nuevos pigmentos, diferenciables cromatográficamente, que según su hipótesis, se diferenciaban en la posición de unión en el antociano (C6 o C8), siendo

mayoritario el compuesto que eluía en último lugar. Sin embargo, Rivas-Gonzalo y colaboradores (Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995) postularon que, como consecuencia de que el carbono situado en el puente etilo era asimétrico, los dos pigmentos detectados podrían ser diastereoisómeros entre sí, en lugar de isómeros de posición como se había propuesto hasta entonces. Posteriormente esta hipótesis se confirmó mediante diversos estudios de RMN (Escribano-Bailón *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2004). Más recientemente, Atanasova y colaboradores, mediante técnicas de HPLC-MS y RMN (Atanasova *et al.*, 2002), caracterizaron la estructura de diferentes compuestos formados en los medios modelo que contenían, entre otros, malvinida 3-O-glucósido y acetaldehído. Estos autores detectaron la existencia de dímeros del antociano resultantes de la condensación mediada por acetaldehído, así como trímeros y tetrameros, unidos por puentes etilo, demostrando que el acetaldehído puede también atacar directamente al antociano, así como que es posible que el antociano, una vez ocupada su posición 8, pueda seguir reaccionando a través de su posición 6.

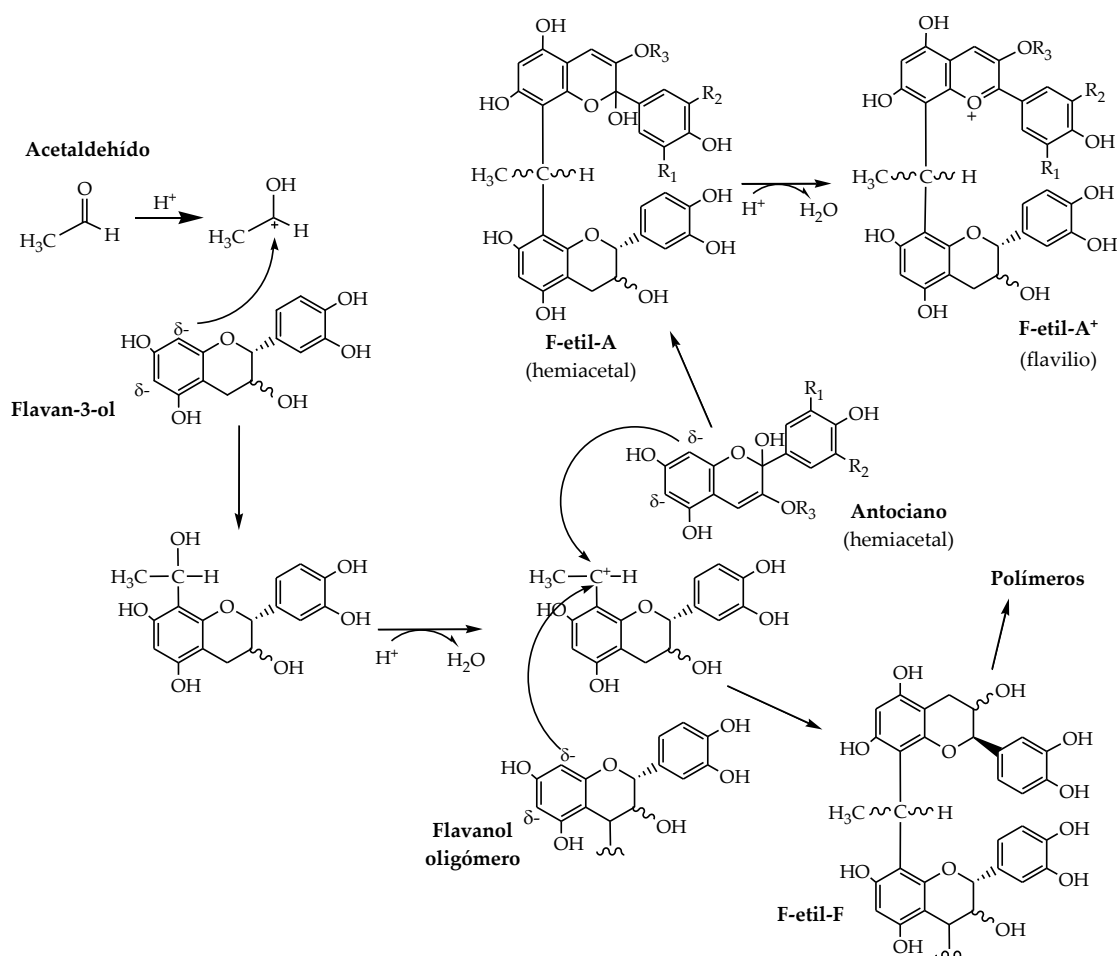


Figura I.13: Mecanismos de formación de condensados mediados por acetaldehído.

En el caso de la reacción entre flavanoles se producen condensados incoloros (Es-Safi *et al.*, 1999a; Fulcrand *et al.*, 1996; Saucier *et al.*, 1997a; Saucier *et al.*, 1997b), mientras que en la reacción con antocianos se forman pigmentos con espectros de absorción con una longitud de onda de absorción máxima en el visible desplazada batocrómicamente con relación a la de los antocianos originales, lo que les confiere un tono más azulado. Esta tonalidad puede ser debida a una mayor tendencia del núcleo del antociano a estabilizarse por desprotonación hacia la formación de la base quinoidal (Timberlake y Bridle, 1976), así como a la existencia de un fenómeno de copigmentación intramolecular entre el flavanol y el antociano (Escribano-Bailón *et al.*, 1996).

Estos nuevos pigmentos resultan más estables al efecto del pH y a la decoloración por SO₂ que los antocianos libres, probablemente como consecuencia de una mayor protección ejercida por el flavanol frente al ataque nucleofílico por parte de estos agentes decolorantes (Escribano-Bailón *et al.*, 2001; Pissarra *et al.*, 2004; Dueñas *et al.*, 2006c). Sin embargo, estos compuestos no son muy estables en soluciones acuosas, produciéndose la ruptura del puente etilo entre el antociano y el flavanol, lo que da lugar a reorganizaciones estructurales de los compuestos (Escribano-Bailón *et al.*, 2001). Además podrían actuar de intermediarios en la formación de pigmentos más estables como los aductos antociano-vinilflavanol (Pissarra *et al.*, 2004; Pissarra *et al.*, 2005).

1.5.3.b. Productos de la condensación mediada por el ácido glioxílico:

El ácido glioxílico (**Figura I.14.a**) está presente en los vinos principalmente como consecuencia de la oxidación del ácido tartárico catalizada por el hierro. En disoluciones de vino sintético, Fulcrand y colaboradores (Fulcrand *et al.*, 1997) identificaron un dímero incoloro resultante de la condensación entre unidades de catequina a través de un puente carboximetilo, derivado del ácido glioxílico (**Figura I.14.b**). El mecanismo de formación para este compuesto propuesto es similar al de condensación mediada por acetaldehído. Este producto, al pH del vino evoluciona a través de un proceso de deshidratación y oxidación (**Figura I.14.c**) para generar un pigmento de tonalidad amarillo-anaranjada (Fulcrand *et al.*, 1997; Es-Safi *et al.*, 1999d). La caracterización estructural de uno de estos pigmentos fue llevada a cabo por Es-Safi

y colaboradores (Es-Safi *et al.*, 1999c), quienes pusieron de manifiesto que se trataba de compuestos con estructura tipo xantilio. Este tipo de estructura también ha sido propuesto en productos derivados de la evolución de los condensados entre antocianos y flavanoles tipo A-T. Varios autores (Timberlake y Bridle, 1976; Bakker *et al.*, 1993; Escribano-Bailón *et al.*, 1996; Santos-Buelga *et al.*, 1999, Dueñas *et al.*, 2006a) han demostrado que en los medios que contienen antocianos y flavanoles con el paso del tiempo aparecen compuestos de coloración amarillenta con estructuras de este tipo.

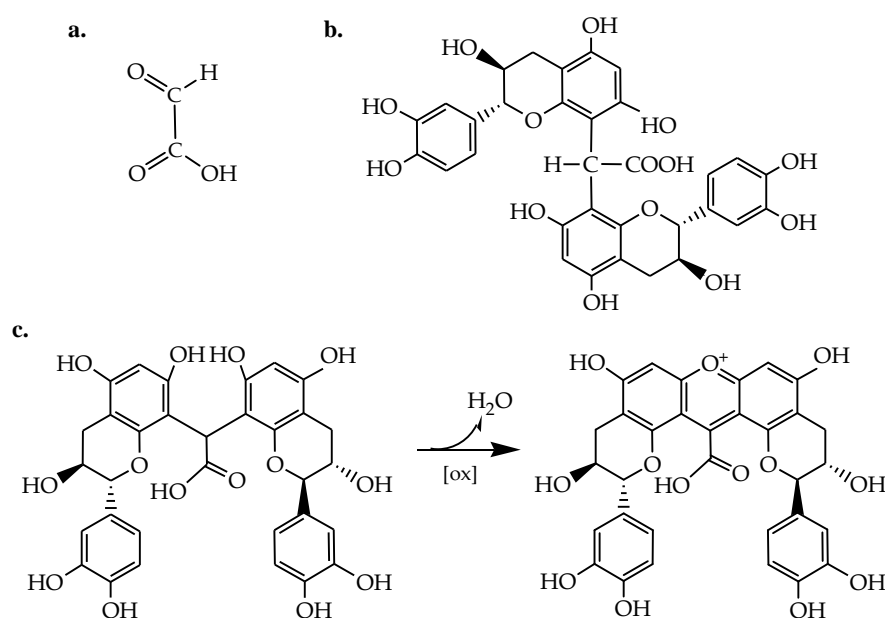


Figura I.14. a. Estructura del ácido glioxílico. b. Estructura del dímero de condensación mediado por ácido glioxílico (Fulcrand *et al.*, 1997). c. Formación de la sal xantilio a partir del dímero de condensación mediado por ácido glioxílico.

1.5.3.c. Productos de la condensación mediada por otros aldehídos:

Otros aldehídos presentes en el vino (principalmente en vinos de Oporto), como el isovaleraldehído, benzaldehído, propionaldehído, isobutiraldehído, formaldehído o 2-metilbutiraldehído, pueden dar lugar a pigmentos de tipo antociano-alkil/aril-flavanol y a dímeros incoloros de tipo flavanol-alkil/aril-flavanol. El espectro visible de los pigmentos formados en estas reacciones también muestra una $\lambda_{\text{máx}}$ desplazada batocrómicamente respecto a los antocianos originales, mostrando tonos azulados (Pissarra *et al.*, 2003). En 2007, Sousa y colaboradores (Sousa *et al.*, 2007) detectaron en

disoluciones modelo un nuevo pigmento resultante de la reacción entre la malvidina 3-O-glucósido y la catequina en presencia de vainillinaldehído, un aldehído procedente de la madera de roble utilizada en el proceso de envejecimiento del vino. El mecanismo de formación propuesto para este compuesto es similar al de los compuestos de condensación mediada por acetaldehído. Este pigmento presenta una longitud de onda de absorción máxima a 549 nm, proporcionando un color violáceo. Además muestra una mayor resistencia a la hidratación y al efecto decolorante del bisulfito en comparación con el antociano de origen (Sousa *et al.*, 2007).

Otros aldehídos procedentes de la madera de roble también pueden participar en reacciones de condensación con flavanoles generando compuestos coloreados, entre los que cabe destacar las *oaklinas*, un grupo de compuestos con una coloración rojo-teja (de Freitas *et al.*, 2004). Estos compuestos se han caracterizado a partir de medios modelo en los que estaba presente la (+)-catequina y aldehídos como el sinapaldehído y el coniferaldehído, procedentes de la madera del roble. Posteriormente se demostró que esta reacción también es posible a partir de estos aldehídos y procianidinas dímeras (Sousa *et al.*, 2012). Su formación (**Figura I.15**) sigue un mecanismo similar a la formación de productos de condensación mediada por acetaldehído. El aldehído en medio ácido forma un carbocatión que es atacado por la catequina a través del C8 (o el C6, en menor medida). El aducto formado vuelve a captar un protón y, tras un proceso de deshidratación, genera un nuevo carbocatión, sobre el que se produce un ataque nucleofílico intramolecular por parte del hidroxilo en posición 7 de la catequina, generando un nuevo anillo piránico en la estructura (Sousa *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2012). En vinos ha sido posible detectar la *oaklina* derivada de la reacción entre la catequina y el coniferaldehído (Sousa *et al.*, 2005), poniendo de manifiesto que su formación es posible en el vino. Además, estos autores han estudiado recientemente las características físico-químicas de las *oaklinas* derivadas del sinapaldehído y el coniferaldehído, observando que el catión flavilio es más estable en estos pigmentos derivados que en el correspondiente desoxiantociano (Sousa *et al.*, 2013).

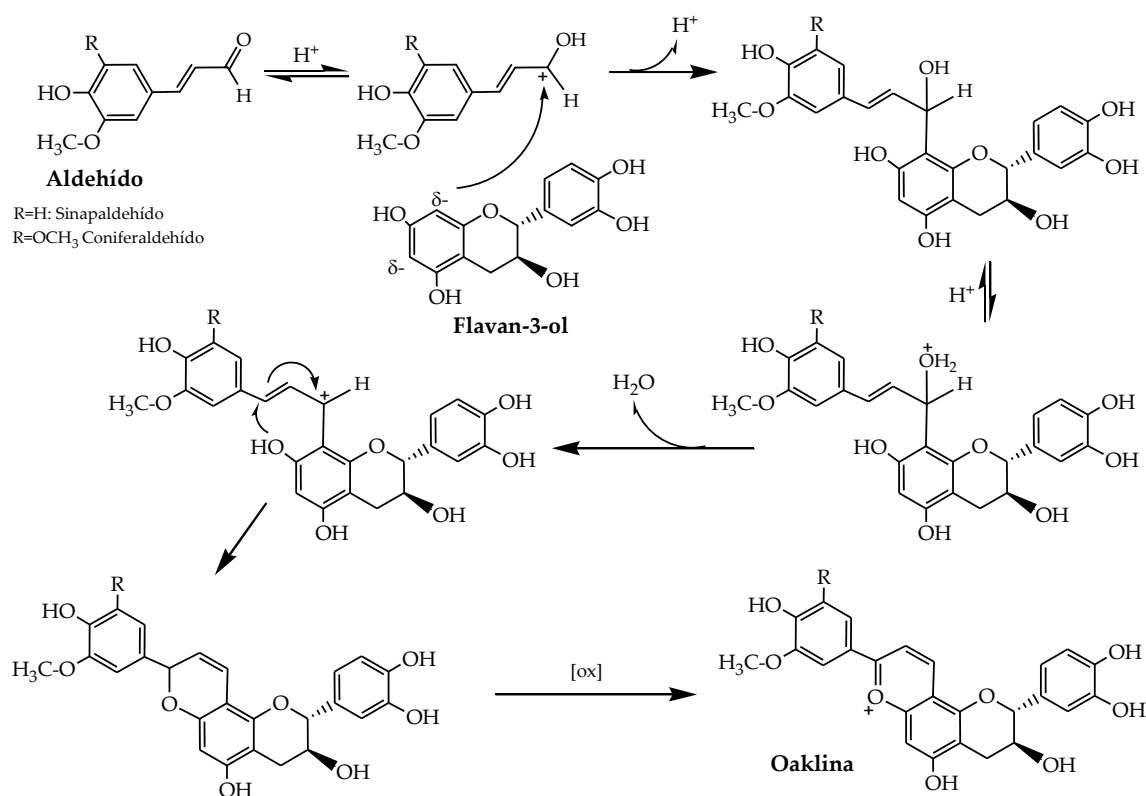


Figura I.15: Mecanismo de formación de las *oaklinas* (adaptado de Sousa *et al.*, 2012).

1.5.4. Piranoantocianos. (de Freitas y Mateus, 2011)

Este tipo de compuestos debe su nombre a la existencia de un nuevo anillo piránico en la estructura del antociano, resultado de la cicloadición de diversos compuestos presentes en el vino sobre el carbono en posición 4 y el grupo hidroxilo en posición 5 del antociano (**Figura I.16**). Los compuestos que reaccionan con los antocianos generando piranoantocianos poseen normalmente un doble enlace polarizable. Entre ellos destacan ciertos metabolitos de las levaduras liberados durante la fermentación, como el ácido pirúvico, el acetaldehído y el ácido acetoacético (Bakker y Timberlake, 1997; Fulcrand *et al.*, 1998; Hayasaka y Asenstorfer, 2002), así como otros constituyentes del vino, como ácidos hidroxicinámicos (y sus vinil-derivados) y algunos derivados de los flavanoles (vinil-flavanoles) (Schwarz *et al.*, 2003b; Sarni-Manchado *et al.*, 1996; Francia-Aricha *et al.*, 1997; Mateus *et al.*, 2002a; Mateus *et al.*; 2002b).

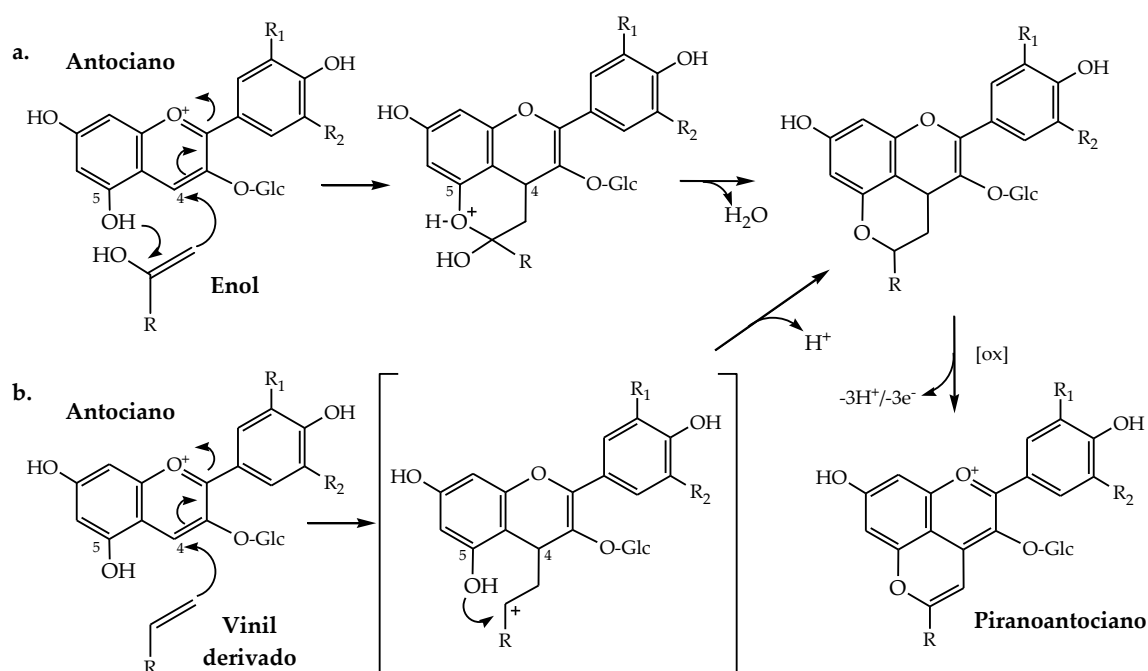


Figura I.16: Mecanismo de formación de los piranoantocianos a partir de la cicloadición de: **a.** La forma enólica de un compuesto cetónico. **b.** Un vinil derivado. R₁ y R₂ determinan el antociano involucrado. R depende del compuesto involucrado en la reacción.

La reacción sigue dos caminos diferentes en función del tipo de compuesto que reaccione con el antociano. En el caso de los ácidos y aldehídos derivados del metabolismo de las levaduras (ácido pirúvico, acetaldehído, etc.), la reacción tiene lugar con la forma enólica de estos compuestos, seguida de un proceso de deshidratación y oxidación (He *et al.*, 2012), como se indica en la **Figura I.16.a**. Por su parte, cuando la reacción tiene lugar con compuestos tipo vinil, como los vinilfenoles o los vinilflavanoles, se produce la cicloadición del doble enlace sobre el antociano, a través de un intermedio carbocatiónico, que, tras perder un protón y sufrir un proceso de oxidación, genera el piranoantociano (Fulcrand *et al.*, 2006) (**Figura I.16.b**).

La principal característica en común de este grupo de pigmentos es su mayor resistencia frente a agentes decolorantes como el agua o el SO₂. Esto es consecuencia de que estos compuestos tienen ocupada la posición 4 del antociano sobre la que normalmente se produce el ataque nucleofílico por parte de estos agentes decolorantes, ataque que conlleva la pérdida del color del antociano.

Los carboxipiranoantocianos, también conocidos como vitisinas de tipo A (Fulcrand *et al.*, 1998) (**Figura I.17a**), son probablemente los piranoantocianos más

abundantes. Se forman a partir de la reacción entre la forma enólica del ácido pirúvico y el antociano (Bakker y Timberlake, 1997; Fulcrand *et al.*, 1998).

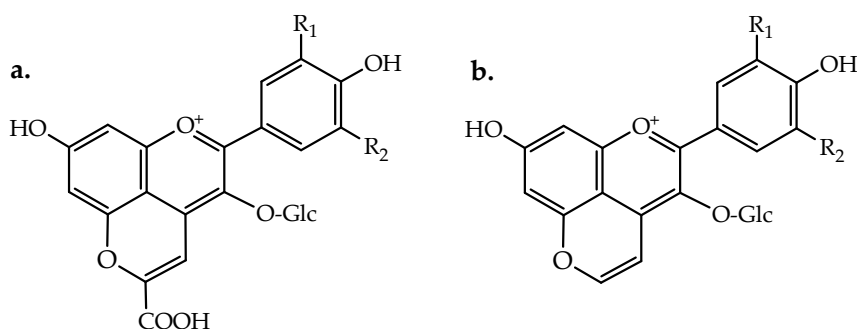


Figura I.17: Estructura general de las vitisinas de tipo A (a.) y vitisinas de tipo B (b.). R₁ y R₂ determinan el tipo de antociano.

La formación comienza probablemente durante la fermentación, momento en el que existe un mayor contenido de pirúvico. Como consecuencia, la vitisina A es uno de los piranoantocianos más importantes en vinos jóvenes. Recientemente además se ha propuesto que en el vino puede tener lugar la formación de oligómeros de catequina-(4-6/8)-vitisina A y de catequina-(4-6/8)-vitisina B (Nave *et al.*, 2010a) de manera similar a la formación de pigmentos de condensación directa tipo F-A⁺. Además se ha visto que la vitisina A puede reaccionar con el agua dando lugar a unos compuestos llamados oxovitisinas, de coloración amarilla en medio ácido ($\lambda_{\text{máx}} = 373$ nm a pH 2) (He *et al.*, 2010).

Otro grupo de piranoantocianos, relacionado estructuralmente con las vitisinas de tipo A, son las vitisinas de tipo B (Bakker *et al.*, 1997) (**Figura I.17.b**). Se diferencian por la carencia del grupo carboxilo en la posición 10 del anillo pirano. La formación de estos compuestos tiene lugar a través de una reacción directa entre el antociano y el acetaldehído y parece ocurrir mayoritariamente durante la fermentación alcohólica (Rentzsch *et al.*, 2007), aunque se ha observado en vinos de Oporto que la formación de la vitisina B también tiene lugar en etapas tempranas del envejecimiento (Mateus y Freitas, 2001). Además Romero y Bakker (Romero y Bakker, 2000) han señalado que la formación simultánea de ambas vitisinas (tipo A y tipo B) puede no estar favorecida como consecuencia de una competición del ácido pirúvico y el acetaldehído en la reacción con el antociano.

Se han identificado otros metabolitos de las levaduras, como el ácido acetoacético o la acetona, capaces de formar piranoantocianos donde el anillo piránico presentaría un grupo metilo (**Figura I.16**, $R = CH_3$), de donde deriva su denominación de metilpiranoantocianos. Estos compuestos han sido detectados en vinos (Hayasaka y Asenstorfer, 2002, Alcalde-Eon *et al.*, 2006), aunque el mecanismo por el que se forman no está claro. En un principio se propuso que estos compuestos se formaban como el resultado de la reacción entre el antociano y la acetona (Hayasaka y Asenstorfer, 2002) pero probablemente su aparición sea consecuencia de la reacción entre antocianos y ácido acetoacético, siguiendo el mecanismo de cicloadición similar al de los carboxipiranoantocianos (He *et al.*, 2006b). Estos compuestos son de color amarillo-anaranjado a pH ácido y presentan una absorción máxima a la longitud de onda de 478 nm.

Otros derivados de antocianos encontrados en el vino de naturaleza piranoantociano proceden de reacciones entre antocianos y vinil compuestos (**Figura I.18**), denominados hidroxifenil-piranoantocianos (piranoantocianos tipo vinilfenol). La primera estructura de este tipo identificada en el vino derivaba de la reacción de la malvidina 3-*O*-glucósido con una molécula de 4-vinilfenol (**Figura I.18.a**, $R = R' = H$) (Cameira-dos-Santos *et al.*, 1996; Fulcrand *et al.*, 1996). La presencia en el vino de la molécula de 4-vinilfenol deriva de la descarboxilación enzimática del ácido *p*-cumárico por parte de las levaduras durante la fermentación (Fulcrand *et al.*, 1996). De igual modo pueden formarse hidroxifenil-piranoantocianos mediante la reacción de los antocianos con otros compuestos de la misma naturaleza que el 4-vinilfenol, a través de un mecanismo similar al anterior. Se generan así piranoantocianos tras la reacción con el vinilcatecol (**Figura I.18.a**, $R = H$, $R' = OH$), el vinilguayacol (**Figura I.18.a**, $R = H$, $R' = OCH_3$), o el vinilsiringol (**Figura I.18.a**, $R = R' = OCH_3$), compuestos formados a partir de la descarboxilación enzimática del ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido sinápico, respectivamente (Hayasaka y Asenstorfer, 2002; Håkansson *et al.*, 2003; Quijada-Morín *et al.*, 2010; Schwarz y Winterhalter, 2003).

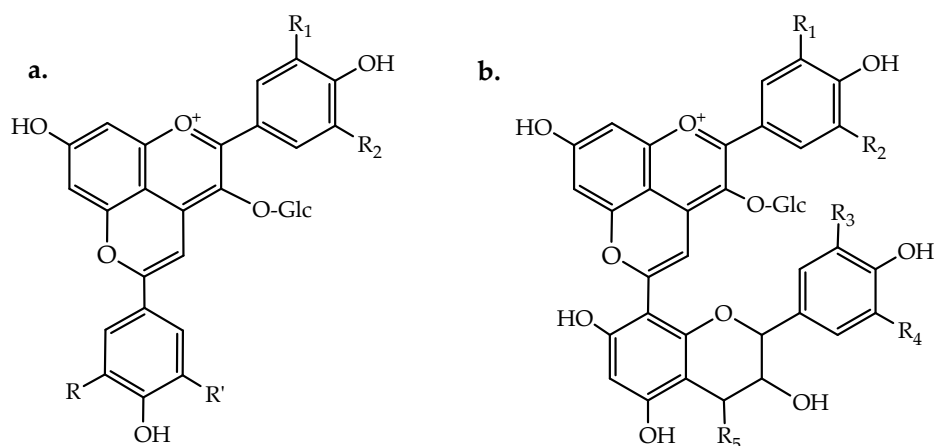


Figura I.18: Estructura general de los piranoantocianos formados por reacción con un vinilfenol (a.) o con un vinil-flavanol (b.).

Se trata en todos los casos de pigmentos de color rojo-anaranjado a pH ácido ($\lambda_{\text{máx}} \approx 500$ nm), con una mayor expresión del color que el antociano correspondiente (Håkansson *et al.*, 2003; Quijada-Morín *et al.*, 2010). Todos estos pigmentos piranoantocianínicos han sido detectados en vinos, destacando entre ellos el derivado de vinilcatecol, el cual además ha podido ser aislado en fracciones obtenidas de vinos tintos elaborados a partir de uva Pinotage (Schwarz *et al.*, 2003a), razón por la cual fue denominado por los autores responsables del aislamiento como *pinotina A*, aunque también ha sido encontrado en vinos elaborados a partir de uvas de otros cultivares (Alcalde-Eon *et al.*, 2006a; Alcalde-Eon *et al.*, 2006b; Rentzsch *et al.*, 2007).

Además, Schwarz y colaboradores (Schwarz *et al.*, 2003b) han demostrado la posibilidad de reacción directa entre los antocianos y los ácidos hidroxicinámicos, con la consecuente formación del piranoantociano correspondiente. Tras el paso de cicloadición se produce un proceso de descarboxilación donde se pierde el resto ácido, que lleva a la aparición del hidroxifenil-piranoantocianos. Según estos autores, la reacción directa con los ácidos hidroxicinámicos sería la principal responsable de la existencia de este tipo de piranoantocianos en el vino, ya que tendría lugar durante el proceso de envejecimiento del vino, mientras que la reacción con los vinilfenoles derivados de la descarboxilación de los ácidos sólo es importante durante el proceso de fermentación, un proceso mucho menos importante en el tiempo.

Otro grupo dentro de la familia de los piranoantocianos son piranoantociano-flavanoles (**Figura I.18.b**), los cuales presentan una molécula de flavanol unida al

anillo piránico del pigmento. La existencia de estos compuestos fue propuesta por primera vez en 1997 por Francia-Aricha y colaboradores (Francia-Aricha *et al.*, 1997), y trabajos posteriores confirmaron su existencia (He *et al.*, 2006a; Monagas *et al.*, 2003; Vivar-Quintana *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la vinilcatequina obtenida por síntesis reacciona fácilmente con los antocianos generando piranoantocianos de este tipo (Cruz *et al.*, 2008), por lo que se ha postulado que estos compuestos resultan de la cicloadición entre vinilflavanoles y antocianos mediante un mecanismo similar al propuesto para los vinilfenoles. Los aductos tipo vinilcatequina son importantes precursores de estos pigmentos pero no se encuentran de forma natural en las uvas, por lo que es necesario un paso previo para su generación en el vino. Se cree que surgen de la evolución de productos de la reacción entre flavanoles y acetaldehído (Es-Safi *et al.*, 1999b), aunque también pueden generarse en la ruptura de polímeros de procianidinas mediante puente etilo, o a partir de productos de la condensación antociano-flavanol mediada por acetaldehído. Además han sido detectadas estructuras más polimerizadas de este tipo de piranoantocianos en los que el flavanol unido al anillo piránico del pigmento es un flavanol oligómero (Asenstorfer *et al.*, 2001). La presencia de más de una unidad de flavanol en la estructura podría tener una influencia importante en el color del pigmento correspondiente (Mateus *et al.*, 2003a). Así, la presencia de un dímero en lugar de un monómero de flavanol en la estructura conlleva un leve desplazamiento batocrómico (9 nm) en la longitud de onda de absorbancia máxima del pigmento, lo que sugiere la existencia de algún tipo de fenómeno de copigmentación intramolecular en la molécula.

Una *segunda generación* de piranoantocianos deriva de la reacción entre los piranoantocianos más simples con otros compuestos de estructuras más complejas. Algunos de ellos se pueden formar a partir de la reacción entre carboxipiranoantocianos (vitisinas de tipo A) y compuestos vinilfenólicos, como los vinilfenoles (**Figura I.19.a**) o los vinilflavanoles (**Figura I.19.b**). Estos compuestos son también conocidos como *portisinas* por haber sido descubiertas en vinos de Oporto (Mateus *et al.* 2003b; Mateus *et al.* 2004; Oliveira, *et al.*, 2007). El mecanismo propuesto para la formación las *portisinas* implica una reacción entre las vitisinas de tipo A y los

vinilflavanoles, produciendo un intermedio de reacción que, tras perder el grupo ácido de la vitisina A original, genera el piranoantociano-vinil-flavanol.

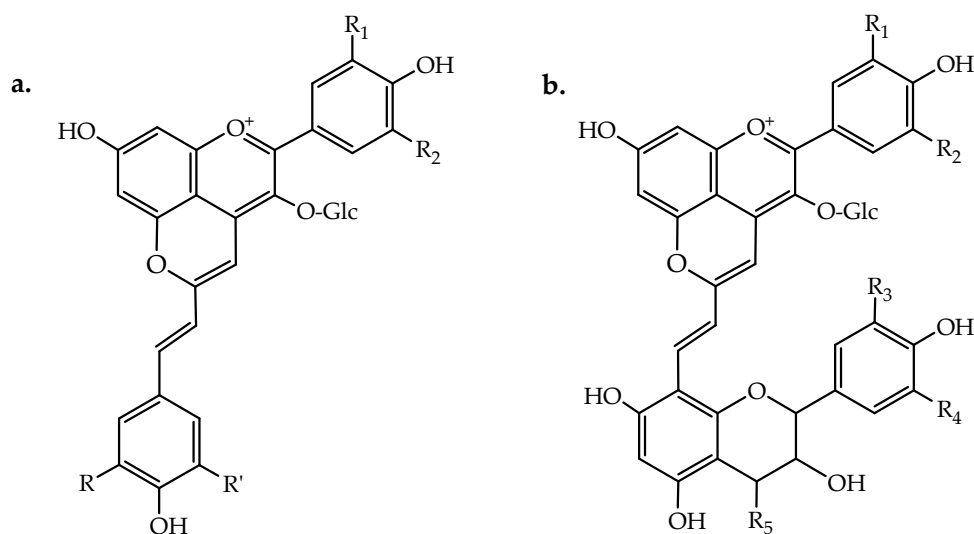


Figura I.19: Estructura general de las portisinas derivadas de la reacción de la vitisina A con un vinilfenol (**a.**, R y R' determinan el vinilfenol) o con un vinilflavanol (**b.**, R₃, R₄ y R₅ determinan el flavanol). R₁ y R₂ determinan el antociano.

Esta reacción ha sido también postulada para la formación de piranoantocianos-vinil-vinilfenoles, los cuales han sido detectados e identificados más recientemente en un vino de Oporto envejecido (Mateus *et al.*, 2006). Este grupo de compuestos presentan, contrariamente al resto de piranoantocianos, un color azulado a pH ácido, y tienen una alta capacidad colorante. El desplazamiento batocrómico sin embargo es mucho más importante en el caso de los vinilpiranoantocianos con un resto vinilflavanol ($\lambda_{\text{máx.}} = 570 \text{ nm}$) que para los presentan un resto vinilfenol ($\lambda_{\text{máx.}} = 538 \text{ nm}$). Recientemente también se han encontrado dímeros de piranoantocianos (Oliveira *et al.*, 2010), con coloraciones azul-turquesa.

En la **Figura I.20** se muestra un esquema-resumen de los diferentes tipos de derivados de antocianos que pueden ser encontrados en los vinos y sus precursores.



Figura I.20: Esquema de la formación de los derivados de antocianos en los vinos.

2. Etapas en la elaboración del vino tinto. (Asselin y Delteil, 2003; Barre *et al.*, 2003; Carbonneau *et al.*, 2003; Razungles *et al.*, 2003; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003; Puech *et al.*, 2003; Zamora, 2003).

La elaboración del vino tinto es un proceso complejo que consta de una serie de etapas sucesivas durante las cuales se produce la transformación de los principales componentes de la uva, generando un medio hidroalcohólico con una complejidad bastante alta en su composición. Las principales etapas de la elaboración del vino tinto se detallan a continuación.

2.1. Maceración y fermentación alcohólica.

A lo largo de estos procesos se produce la extracción de los compuestos procedentes de la uva al mosto a partir del que se generará el vino. La maceración ocurre desde que se llena la cuba con la uva hasta el descube del vino, esto es, antes, durante y después de la fermentación. Durante la maceración pre-fermentativa el medio es acuoso y se encuentra a una temperatura moderada, extrayéndose principalmente los antocianos y los flavanoles de la piel de la uva, así como parte de los polisacáridos. A continuación ocurre la fermentación alcohólica, durante la cual la glucosa procedente de las uvas es transformada por las levaduras presentes en el medio en etanol, convirtiendo el medio en hidroalcohólico. Este medio facilita la extracción de compuestos fenólicos del hollejo y permite la extracción de compuestos fenólicos presentes en las semillas. Además durante este proceso comienzan a darse algunas reacciones entre antocianos y flavanoles. Por último tiene lugar la maceración post-fermentativa, desde que finaliza la fermentación hasta el descube del vino. Durante esta etapa continúa la extracción de taninos, principalmente desde la semilla de la uva. Asimismo, los antocianos siguen transformándose por reacción con los flavanoles y éstos, a su vez, comienzan a sufrir reacciones de polimerización. También se liberan al medio polisacáridos y manoproteínas resultantes de la autólisis de las levaduras. Estos procesos tienen una duración variable según la calidad de la uva empleada y del tipo de vino que se desee elaborar. El tipo de depósito empleado para

llevar a cabo estos procesos puede estar fabricado en acero inoxidable, cemento o madera, dependiendo de las características que quieran aportarse de manera exógena al vino y también de razones económicas. Aunque la composición del vino, y por lo tanto sus propiedades organolépticas, se modifican sustancialmente durante el envejecimiento, la composición que el vino posee al finalizar esta etapa será determinante para el éxito de las siguientes.

2.2. Fermentación maloláctica.

Este proceso es casi imprescindible para la elaboración de la mayoría de los vinos tintos. También se lleva a cabo en ciertos vinos blancos y rosados. Durante esta fermentación se produce la transformación del ácido málico procedente de la uva en ácido láctico. Los agentes de esta transformación son las bacterias lácticas.

Esta fermentación conlleva una reducción de la acidez del vino, puesto que el ácido láctico es menos ácido que el ácido málico a partir del cual se forma. Con esta transformación se consigue también una suavización del vino y se asegura una mayor estabilidad biológica, ya que al desaparecer el ácido málico que sirve como nutriente a las bacterias lácticas, es difícil que éstas proliferen en el medio provocando riesgos biológicos. Además de la generación de ácido láctico, durante la fermentación maloláctica se pueden liberar al medio muchas sustancias que pueden afectar principalmente al aroma y al sabor del vino, tanto positiva, como negativamente.

2.3. Envejecimiento.

El vino es un medio en constante evolución, por lo que el envejecimiento del vino se produce hasta el momento de su consumo. En condiciones idóneas, durante este tiempo el vino consigue una perfecta maduración, afinando sus características organolépticas. No todos los vinos son adecuados para someterlos a un proceso de envejecimiento, ya que deben tener unas características tales que aseguren una suficiente estabilidad durante este proceso. El envejecimiento comprende dos etapas, la crianza del vino en barricas de roble y el envejecimiento en botella. La duración de

la primera etapa está marcada por las características del vino a envejecer y del vino que se desee obtener. La segunda etapa dura hasta el consumo del vino; aunque, en los vinos aptos para envejecer, existe un periodo mínimo de estancia en la botella para asegurar unas características adecuadas del vino a consumir, periodo durante el cual el vino termina su maduración y afinamiento.

2.3.1. Envejecimiento en barrica.

Históricamente se ha utilizado la madera de diferentes árboles para la fabricación de barricas, como el roble, el castaño y el cerezo, e incluso el pino canario, aunque minoritariamente. Sin embargo, el roble es claramente el más utilizado debido a sus propiedades: gran resistencia y durabilidad natural (posee gran resistencia a los ataques de organismos vivos), suavidad, flexibilidad y fisurabilidad (facilidad de ser cortado por hendido) (Puech *et al.*, 2003).

La denominación de madera de roble hace referencia a la madera procedente de alguna de las aproximadamente 150 especies del género *Quercus* que existen en la naturaleza. Sin embargo, sólo tres especies han sido ampliamente utilizadas para la elaboración de las barricas utilizadas para el envejecimiento de los vinos: *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Quercus robur* L. y *Quercus alba* L. Estas especies se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo de Europa, América del norte y América central, así como en el sudeste asiático. Concretamente, la especie *Q. alba* se produce principalmente en América del norte, por lo que esta especie de roble suele conocerse como roble americano, mientras que *Q. robur* y *Q. petraea* provienen normalmente de Francia, el principal productor europeo de barricas de roble. Estas dos especies, aunque no se produzcan en las mismas zonas de Francia, se engloban normalmente bajo el término de roble francés. No obstante, si no se especifica la zona de producción, suele tratarse de *Q. petraea*. Cabe destacar que actualmente existen países emergentes en la fabricación de barrica de roble, principalmente países del este, donde se también se explotan *Q. robur* y *Q. petraea*, o la Península Ibérica, donde se cultivan otras especies de roble como el *Q. pyrenaica*, especialmente abundante en esta zona. Sin embargo su utilización para la fabricación de barricas está aún muy restringida. Se han

realizado estudios de la composición de esta madera (Fernández de Simón *et al.*, 2006) y sobre los efectos que tiene el uso de esta madera en las propiedades organolépticas del vino en comparación con las especies de roble tradicionales, demostrándose que las características que presenta el vino envejecido en barricas fabricadas con madera de la especie *Q. pyrenaica* son muy similares a las que posee el vino envejecido en roble francés (Alañón *et al.*, 2011; Cadahía *et al.*, 2009; Cadahía *et al.*, 2001; Fernández de Simón *et al.*, 2003). Sin embargo, cada tipo de roble imprime en el vino unas características concretas que no se pueden conseguir utilizando otras especies de roble.

Aunque algunos autores han señalado que puede existir más variabilidad entre árboles individuales que entre las diferentes especies (Chatonnet y Dubourdieu, 1998; Masson *et al.*, 1995; Prida y Puech, 2006; Sauvageot y Feuillat, 1999), existen unas diferencias remarcables entre el roble americano y el roble francés tanto en sus características anatómicas como en su composición fenólica (Chatonnet y Dubourdieu, 1998; Fernández de Simón *et al.*, 1999; Glabasnia y Hofmann, 2006; Masson *et al.*, 1995; Prida y Puech, 2006) y volátil (Alañón *et al.*, 2011; Cadahía *et al.*, 2003; Chatonnet y Dubourdieu, 1998; Prida y Puech, 2006). Las características anatómicas de la madera de roble están muy influenciadas por las condiciones edafoclimáticas y el origen geográfico del árbol. Además, la estructura anatómica de la madera determina la porosidad y permeabilidad de la barrica respecto al líquido que contiene, pero también respecto al aire. Se habla de porosidad de acuerdo a dos parámetros: la anchura de los anillos de crecimiento de la madera (es decir, la textura del roble), y la frecuencia de vasos leñosos grandes en la estructura de la madera. Cuanto menor sea la anchura de los anillos de crecimiento, más vasos leñosos de gran tamaño habrá por unidad de superficie y mayor será la porosidad de la madera. Para describir la porosidad se utiliza el término de *grano*, por lo que la madera se puede clasificar como de grano fino, medio o grueso. Normalmente el grano grueso se relaciona con baja porosidad. En este sentido, aunque el tamaño de grano del roble americano es bastante variable, es normalmente mayor que el tamaño de grano del roble de la especie *Q. petraea* y similar al de *Q. robur*. De manera general se puede decir que las barricas de roble francés son más porosas (y como consecuencia presentan mayor riesgo de pérdidas del líquido que contengan) que las barricas fabricadas con roble americano.

Este hecho condiciona la metodología empleada para la fabricación de las barricas, la cual se selecciona con la finalidad de asegurar la estanqueidad de las mismas (Chatonnet y Dubourdieu, 1998; Zamora, 2003). Las duelas con las que se fabrican las barricas son obtenidas a partir de la madera más interna del tronco del árbol, constituida por células muertas que forman el duramen (o madera de corazón). En esta madera han sucedido una serie de transformaciones que conllevan la aparición de tílides, proliferaciones membranosas con origen en las células del parénquima que penetran en los vasos leñosos obstruyéndolos. Si existe gran cantidad de tílides, la madera es menos permeable. Esto ocurre normalmente en el caso del roble americano, lo que hace que la madera sea menos permeable y pueda cortarse en cualquier dirección. Así, a partir del roble americano las duelas se pueden obtener por aserrado de la madera, permitiendo un mayor aprovechamiento del tronco (lo que conlleva un menor coste de fabricación de la barrica). En el caso del roble francés, sin embargo, es necesario obtener las duelas por hendido, de manera que los radios medulares de la madera quedan paralelos a la superficie de contacto con el vino, minimizando el riesgo de fugas. En el aserrado estos radios medulares quedan oblicuos a la superficie de contacto, permitiendo por tanto que el vino pueda penetrar con mayor facilidad en la estructura de la madera en el caso de las barricas obtenidas a partir de roble americano que en aquellas obtenidas de roble francés (Zamora, 2003).

Las duelas, una vez obtenidas, se someten a diferentes procesos previos a su utilización para la fabricación de las barricas. En primer lugar, la madera se somete a un proceso de secado durante el cual pierde la mayor parte del agua que contiene, evitando en gran medida la proliferación de hongos y otros parásitos. Además, se evita que el tamaño de las duelas se modifique posteriormente generando fugas en la barrica. Existen dos procedimientos principales para el secado de la madera. Un secado natural, que se lleva a cabo al aire libre, durante un periodo de entre 2-3 años normalmente; o un secado artificial, llevado a cabo en cámaras de secado con condiciones de temperatura y humedad controladas, durante un tiempo mucho menor. Si bien el coste del secado natural es mucho más elevado, los beneficios que acarrea son mayores, ya que permite un lavado de la madera por parte del agua de la lluvia arrastrando muchos compuestos que podrían pasar al vino confiriéndole

características no deseadas. Además durante el proceso proliferan hongos en la madera que favorecen ciertas transformaciones enzimáticas, modificando las características de algunos compuestos que posteriormente pasan al vino. Por esta razón es habitual llevar a cabo un proceso de secado mixto, con un tiempo de secado natural seguido de un secado artificial.

Tras el proceso de secado las duelas se disponen para la fabricación de la barrica. Para ello es necesario un proceso de domado de las mismas que permita obtener la forma curva característica de las barricas. El domado se consigue con un proceso de calentamiento, conocido como etapa de tostado de formación. Una vez que se ha formado la barrica, ésta se somete a un segundo calentamiento denominado tostado de afinado. Esta segunda etapa determina la composición química de la madera, ya que como consecuencia del contacto con el fuego, muchos de los compuestos que naturalmente se encuentran en la madera se transforman en otros. Con esto se consigue afinar la madera, generando un conjunto de compuestos que aportarán aromas al vino y reduciendo el contenido en elagitaninos por degradación. En función de la temperatura y el tiempo empleados en el tostado, se habla, de manera general, de tres grados diferentes de tostado: tostado ligero, tostado medio y tostado fuerte. Las características de cada tipo de tostado no son universales y cada tonelería posee un protocolo para cada tipo, existiendo modalidades intermedias (por ejemplo, *medium plus*). Por último, hay que tener en cuenta que una vez que la barrica está fabricada su uso es limitado. La extracción de compuestos desde la madera se reduce bruscamente con su utilización, debido al agotamiento de los mismos, de manera que tras dos años de uso la barrica posee solo un 25 % de su capacidad de cesión de taninos elágicos (Zamora et al., 2003).

Como consecuencia de las características de las barricas, durante el envejecimiento del vino en la barrica de roble tienen lugar diversos procesos mediante los cuales el vino gana complejidad y estabilidad. Los principales procesos que se producen durante esta etapa están esquematizados en la **Figura I.21**. Por una parte la estructura de la barrica permite una entrada de oxígeno de manera moderada. Este aporte de oxígeno es vital para las reacciones de polimerización y combinación entre antocianos y flavanoles que conllevan a la estabilización del color y a la suavización de la

astringencia. Además, es habitual realizar trasiegos cada 4-6 meses contribuyendo en gran medida al aporte de oxígeno. Por otra parte, se produce una cierta precipitación de parte de la materia colorante del vino (una clarificación natural), evitando así que esta precipitación ocurra durante la permanencia del vino en botella, apareciendo precipitados en el vino en el momento de su consumo, hecho normalmente rechazado por el consumidor. Además, como se ha indicado antes, el roble aporta gran cantidad de compuestos al vino, tanto nativos de la madera como formados durante el secado y tostado de la misma, que mejoran tanto el aroma como la calidad gustativa del vino. Estos compuestos se pueden clasificar en sustancias volátiles y compuestos fenólicos.

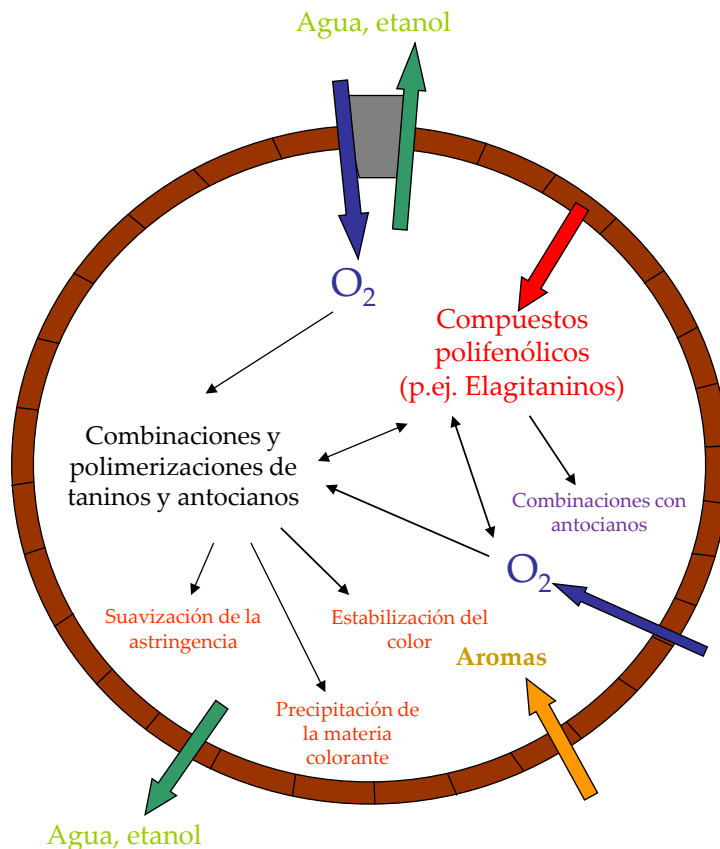


Figura I.21: Principales procesos que se producen durante el envejecimiento del vino en barricas de roble. (Adaptado de Zamora, 2003).

Las sustancias volátiles que son cedidas por la madera, como el metilfurfural, el siringaldehído, el eugenol, etc., aportan aromas característicos al vino que sólo se consiguen mediante este envejecimiento. La composición volátil de la madera depende

del origen geográfico de ésta, pero también está muy influenciada por los procesos que se llevan a cabo durante la fabricación de las barrica, principalmente por el tostado (Alañón *et al.*, 2011; Caldeira *et al.*, 2006).

Los compuestos fenólicos que cede la madera de roble al vino participan principalmente en su sabor, aunque algunos de ellos tienen también una importancia en la evolución del vino y en las transformaciones que sufren los pigmentos que aportan el color al vino. Los principales compuestos fenólicos que se ceden durante el envejecimiento en barrica son ácidos (ácido gálico y ácido elágico), taninos gálicos, cumarinas y taninos elágicos (elagitaninos). Los ácidos, además de aportar una cierta acidez, pueden actuar como protectores frente a la oxidación de los antocianos (Vivas y Glories, 1996). Las cumarinas pueden considerarse como derivados de los ácidos cinámicos que se forman mediante esterificaciones intramoleculares (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1999), pudiendo encontrarse tanto en forma de heterósido como libres. En la madera de roble fresca estos compuestos se encuentran mayoritariamente en forma de heterósidos amargos. Sin embargo, durante el proceso de secado de la madera, como consecuencia del desarrollo de ciertos tipos de hongos, se produce la hidrólisis enzimática de los heterósidos formando los correspondientes aglicones, perdiendo así gran parte del amargor (Zamora, 2003).

Los taninos gálicos, entre los que destaca la pentagalolilglucosa, contribuyen principalmente al amargor y a la astringencia del vino. Además son una de las principales fuentes de ácido gálico en los vinos envejecidos, ya que este ácido se libera en el proceso de hidrólisis de los galotaninos. Sin embargo, debido a su abundancia, los taninos más importantes que puede ceder la madera al vino son los taninos elágicos o elagitaninos. En la madera de roble destaca la presencia de elagitaninos C-glucosídicos, los cuales debido a su alta polaridad son solubilizados con facilidad por el medio acuoso, pasando al vino. Los elagitaninos se encuentran en forma monómera y dímera, siendo los primeros los más importantes en cantidad (Viriot *et al.*, 1994). Estos compuestos pueden contribuir de manera importante a la estructura del vino, aportándole astringencia. Además, las propiedades oxidorreductoras de estos compuestos hacen que su presencia en el vino influya en gran medida en la evolución de su color, tanto por su efecto protector frente a la oxidación de los antocianos, como

por su posible implicación en la combinación antociano-tanino que conlleva una mayor estabilidad de los pigmentos (Vivas y Glories, 1996). El contenido de elagitaninos en la madera depende de varios factores, entre los que destaca el origen geográfico de la madera y el proceso de tostado, como se explicará más adelante. Por ejemplo, un tostado ligero permitiría un mayor contenido en elagitaninos, pero no aportaría los mismos aromas, mientras que un tostado fuerte aporta una gran variedad de aromas, pero una cantidad de elagitaninos mucho menor. Por esta razón, normalmente se suele utilizar un tostado medio que permite un aporte compensado de aromas y de taninos elágicos.

En la actualidad existen además otras posibilidades para el envejecimiento de los vinos que intentan conseguir las mismas características en el mismo, minimizando los costes y los tiempos que requiere el envejecimiento en barrica de roble. Estas alternativas buscan conseguir un efecto similar al que tiene el empleo de la barrica, estabilizando el color del vino, suavizando su astringencia y aportándole complejidad y estructura. Para conseguir estos objetivos se emplean fragmentos de madera de roble conjuntamente con una microoxigenación, llevando a cabo el envejecimiento del vino en depósitos más económicos, como los de acero inoxidable. La microoxigenación consiste en un aporte de oxígeno al vino a través de un microdifusor intentando simular las condiciones que se dan en la barrica de roble y conseguir así las combinaciones y polimerizaciones de antocianos y flavanoles favorecidas por la presencia de oxígeno, que conllevan una estabilización del color y una suavización de la astringencia. El uso de fragmentos de madera de roble en forma de duelas, o más comúnmente, como virutas (*chips*) ha sido autorizado en la Unión Europea, aunque algunas denominaciones de origen no lo permiten. Con ello se consigue aportar al vino los aromas y los taninos elágicos que cede la madera. Sin embargo, como la superficie de contacto de la madera con el vino es mayor en el caso de las virutas que en el caso de la barrica, la dosis y el tiempo de contacto con las virutas es de vital importancia para conseguir los mismos efectos. La combinación del uso de fragmentos de madera de roble, combinado con la microoxigenación, permite elaborar vinos con unas características muy comerciales, semejantes a los vinos envejecidos en barricas, pero con unos costes y tiempos mucho menores. Sin embargo es difícil alcanzar el grado de

calidad y complejidad que se obtiene mediante el envejecimiento en barricas de roble, por lo que esta técnica sigue siendo la más utilizada para la obtención de vinos de calidad.

II. El color del vino tinto

El color es generalmente la primera sensación que percibimos de un vino como consecuencia de la inmediatez y facilidad de obtener esta impresión. Diferentes parámetros pueden evaluarse al observar un vino, como su transparencia y su brillo. Sin embargo, sobre todo el color es el parámetro que más información puede aportar sobre características del vino como su edad, su cuerpo, su estado de conservación e incluso advertir sobre alguno de los posibles defectos que después se percibirán en la degustación. Por estas razones el color de un vino resulta de vital importancia para su aceptación por parte del consumidor.

Como se ha indicado, la composición de pigmentos del vino es la que determina principalmente su color, aunque el pH y la posible interacción (fenómeno de copigmentación) de los compuestos coloreados con otros carentes de color (copigmentos) ejercen una gran influencia sobre el color final del vino. Como consecuencia de la evolución de la composición fenólica del vino, tanto por desaparición y transformación de pigmentos, como por desaparición de copigmentos, el color del vino cambia durante el envejecimiento.



Figura II.1: Evolución del color y el espectro de absorción en el visible del vino con el envejecimiento (Adaptado de Zamora, 2003).

La coloración del vino se muestra acorde con la evolución de su espectro de absorción en el UV-visible (**Figura II.1**). Así, los vinos jóvenes poseen un espectro de

absorción con una componente roja (520 nm) muy importante, una componente azul (620 nm) de relativa importancia y una componente amarilla (420 nm) menos importante relativamente. Este espectro se traduce en colores rojos con tonalidades azuladas, lo que se corresponde con el color de pigmentos propios de la uva, así como con la posible presencia de derivados de la condensación mediada por acetaldehído entre antocianos y flavanoles y con una elevada importancia del fenómeno de copigmentación. Con el envejecimiento se pierde la componente azulada y gana importancia la componente amarilla, lo que conlleva un cambio en el color del vino hacia tonalidades rojo-teja que se corresponden con mayor cantidad de piranoantocianos, menor cantidad de antocianos nativos de la uva y menor importancia del fenómeno de la copigmentación. Si el periodo de envejecimiento es muy largo, incluso la componente roja pierde importancia, como consecuencia de la casi total desaparición de antocianos simples, y la componente amarilla es la más importante, traduciéndose en colores marronáceos.

1. El color de los antocianos: Dependencia del pH. (Pina *et al.*, 2012)

Como se ha indicado, los principales responsables del color del vino son los antocianos y sus pigmentos derivados. El color de estos compuestos y su estabilidad depende de varios factores, entre los que destacan su estructura y el pH del medio. Los antocianos en forma flavilio, al ser deficientes de electrones, presentan una elevada tendencia a sufrir alteraciones en su estructura por la acción de diferentes agentes, entre ellos el agua.

Los antocianos y pigmentos derivados de éstos, en medios acuosos ligeramente ácidos, están involucrados en una serie de reacciones dependientes del pH (pérdida de protón, de hidratación, de tautomerización o de isomerización) que configuran un sistema de equilibrios entre las diferentes formas estructurales del antociano, tanto coloreadas como incoloras. La proporción de las diferentes formas en el medio determina su color. Este conjunto de equilibrios (**Figura II.2**) está bien descrito en el caso de los antocianos (Brouillard y Dubois, 1977; Brouillard y Delaporte, 1977; Brouillard y Lang, 1990; Pina *et al.*, 2012a; Pina *et al.*, 2012b, Mora-Soumille *et al.*, 2013).

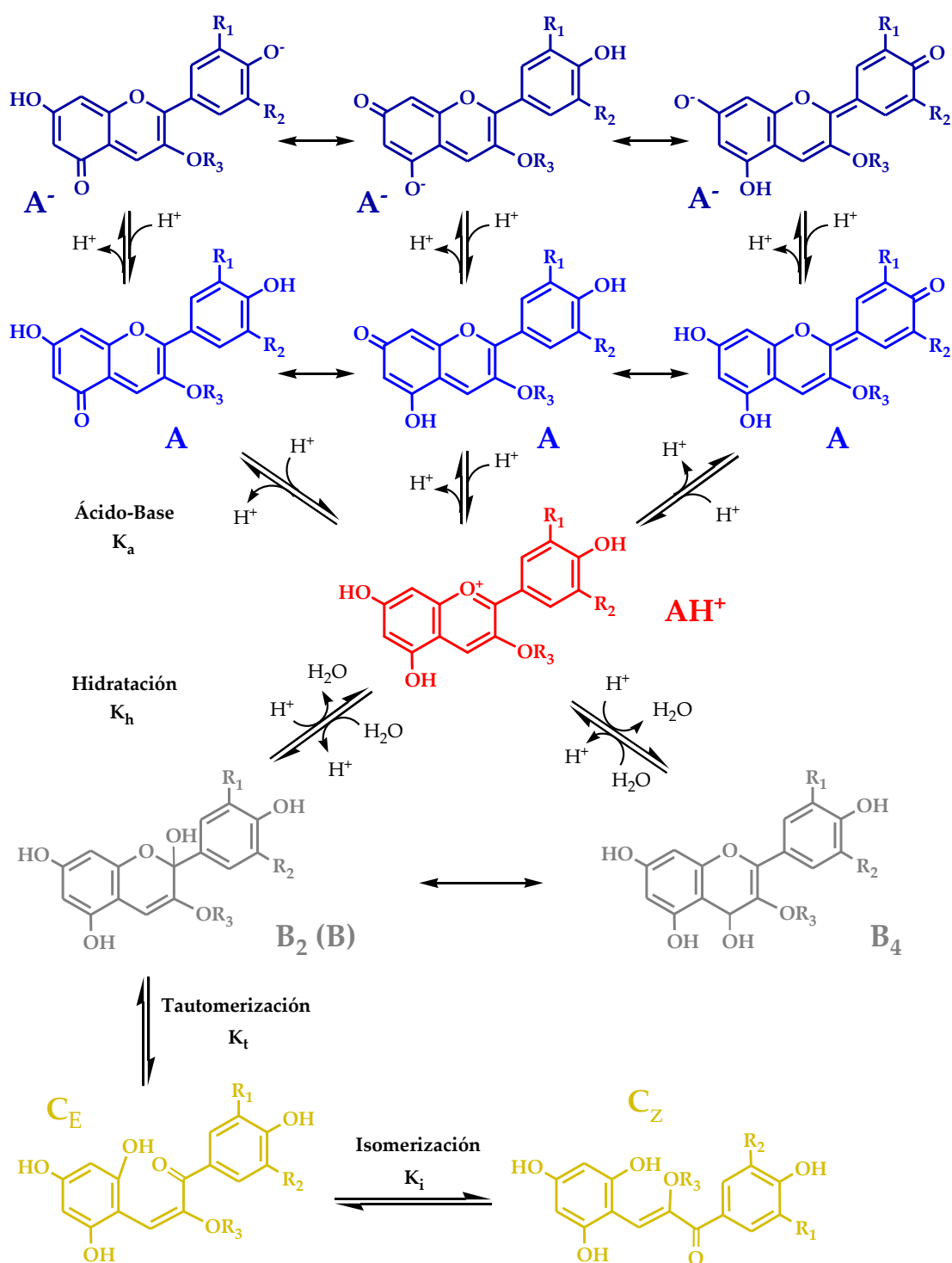


Figura II.2: Sistema de equilibrios dependientes del pH en los que están involucradas las distintas formas estructurales de los antocianos en medios acuosos.

Cada uno de estos procesos queda descrito por un equilibrio (ecuaciones II.1-II.4) cuyo valor de la constante termodinámica indica qué especie es predominante en función del pH del medio.



A pH muy ácido ($\text{pH} < 2$) la forma predominante es la de cation flavilio (AH^+), característica por su color rojizo. Cuando el pH aumenta, el cation flavilio participa en dos equilibrios diferentes. Por un lado, mediante un equilibrio ácido-base, el cation flavilio pierde el protón generándose como producto cinético la base quinoidal (**A**), de coloración azulada. Debido a la existencia de diferentes grupos hidroxilos en la molécula, existen diferentes formas resonantes de esta base quinoidal. Por otro lado, participa en un equilibrio de hidratación. La hidratación puede ocurrir en la posición 2 o en la posición 4 del antociano generando en ambos casos una forma hemiacetal (B_2 , de aquí en adelante, **B**; o B_4 , respectivamente) incolora. El producto **B** es mayoritario y se genera como producto termodinámico, mientras que el producto B_4 es un producto cinético, por lo que, cuando el sistema alcance el equilibrio, formará el correspondiente producto termodinámico, más estable (Gavara *et al.*, 2011). Si el valor de pH continúa aumentando hacia valores de pH básicos, existe la posibilidad de que se generen formas ionizadas (A^-) a través de la desprotonación de los hidroxilos de las formas neutras de la base quinoidal **A**. La forma hemiacetal **B** está involucrada además en un equilibrio de tautomerización que conlleva la apertura del heterociclo del antociano, formándose la (*E*)-chalcona (C_E). Ésta, a su vez, está inmersa en un equilibrio de isomerización con la (*Z*)-chalcona (C_Z).

Antes de que se alcance el equilibrio termodinámico, los diferentes procesos cinéticos llevan a la formación de especies intermedias. Por ejemplo, la reacción de transferencia del protón (ecuación II.2) es mucho más rápida que la hidratación por lo que si en una disolución de un antociano a pH ácido, donde el cation flavilio es estable, se aumenta ligeramente el pH ($\text{pH} > 2$), la base quinoidal **A** se forma inmediatamente. Sin embargo, en el caso de los antocianos, al menos alguna de las otras especies del sistema (**B**, C_E o C_Z) son más estables que **A**, y como consecuencia la base quinoidal tiende a desaparecer para formar el resto de especies. La base quinoidal se formará

como un producto cinético que con el tiempo desaparecerá parcial o totalmente alcanzándose el equilibrio termodinámico. El paso clave del proceso es la formación del hemiacetal **B** a partir de la hidratación del catión flavilio ya que **A** no genera directamente **B** excepto en medios básicos (Brouillard y Dubois, 1977). La (*E*)-chalcona se forma a partir de **B** mediante una reacción de tautomerización, tras la cual puede producirse una reacción de isomerización que transforma la (*E*)-chalcona en la (*Z*)-chalcona. De todas las especies involucradas en el sistema, el hemiacetal **B** es la única incolora, mientras que el catión flavilio AH^+ y la base quinoidal **A** presentan colores rojos y azulados respectivamente.

La distribución relativa de las fracciones molares de cada una de estas especies dentro de la base conjugada **CB** depende principalmente del patrón de sustitución del antociano (Pina, 1998; Pina *et al.*, 2012). En el caso de los antocianos, el hemiacetal incoloro suele ser la forma más importante del sistema, mientras que la formación de la (*Z*)-chalcona a partir de la (*E*)-chalcona es el proceso más lento (Pina *et al.*, 2012). Además, la transformación química del antociano conlleva, en muchos casos, la modificación de las propiedades termodinámicas y cinéticas de su equilibrio. Alguno de los pigmentos derivados de antocianos estudiados en la literatura han mostrado unas propiedades termodinámicas y cinéticas diferentes a las del antociano original (Nave *et al.*, 2010c; Quijada-Morín *et al.*, 2010; Dueñas *et al.*, 2006c; Chassaing *et al.*, 2010.). Estas diferencias dependen principalmente de la naturaleza del pigmento derivado y del tipo de sustituyente unido al antociano. Por ejemplo, en el caso de los piranoantocianos parece que la existencia del nuevo anillo estabiliza la forma flavilio frente a la hidratación (Quijada-Morín *et al.*, 2010). De esta forma, para cada pigmento, al pH del vino existe una distribución relativa de las fracciones molares de cada una de las posibles especies que determinan el color que, a ese valor del pH, expresa ese pigmento. Por esta razón el color del vino depende del valor del pH que presente. La **Figura II.3** muestra el reparto de las fracciones molares de las diferentes especies para la malvidina 3-*O*-glucósido, el antociano mayoritario en muchas variedades de uva, como Tempranillo, la variedad de uva tinta más empleada para la elaboración de vinos en España.

Como se puede observar, al pH del vino (entre 3 y 4) la forma mayoritaria es la forma hemiacetálica, incolora, seguida del catión flavilio, rojo, y de la base quinoidal, azulada. Esta distribución se ve modificada por el efecto de la copigmentación, ya que, como se explicará a continuación, este fenómeno protege a los antocianos en forma flavilio frente a la hidratación, estabilizando esta estructura al pH del vino.

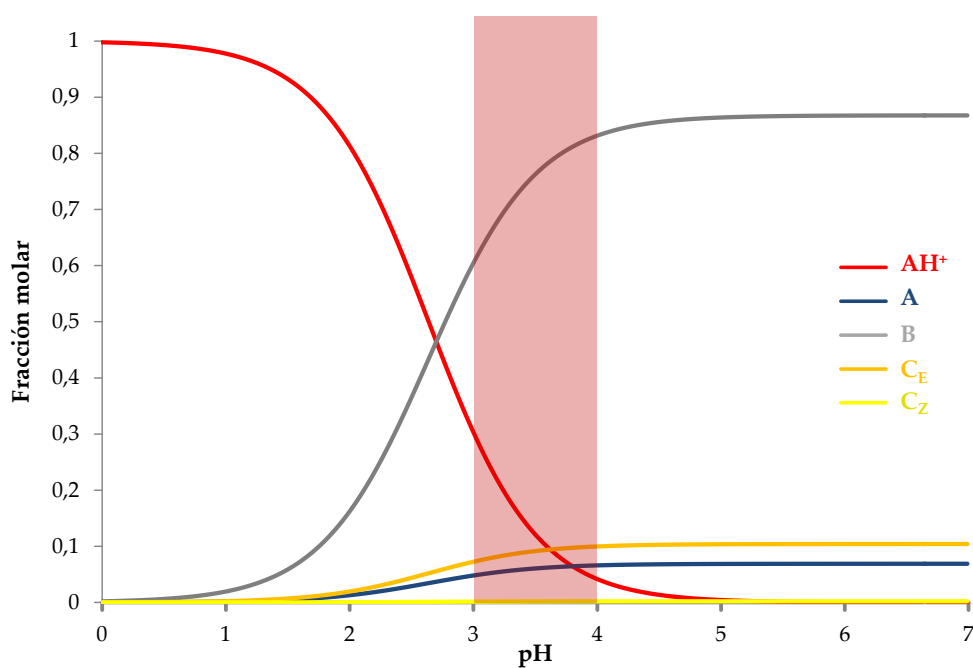


Figura II.3: Distribución de las fracciones molares en función del pH para la malvidina 3-O-glucósido (construido a partir de los datos termodinámicos recogidos por Brouillard, 1982).

2. Fenómeno de copigmentación.

El fenómeno de copigmentación fue observado por primera vez en 1916 por Willstätter y Zollinger (Willstätter y Zollinger, 1916) al comprobar que el color de la malvidina 3-O-glucósido cambiaba hacia tonos azulados con la adición de taninos o de ácido gálico a la disolución. Las primeras observaciones de este fenómeno en vinos fueron llevadas a cabo por Boutaric y colaboradores (Boutaric *et al.*, 1937) mediante el estudio de las desviaciones de la ley de Lambert-Beer existentes al medir la absorbancia del vino tinto antes y después de diluirlo. El fenómeno de copigmentación se debe a asociaciones moleculares hidrofóbicas no covalentes entre los núcleos aromáticos de las formas coloreadas de los antocianos (principalmente el catión flavilio, pero también la base quinoidal) y otras moléculas orgánicas (normalmente no coloreadas o ligeramente coloreadas) (Brouillard, 1982; Brouillard *et al.*, 1989; Boulton, 2001; Escribano-Bailón y Santos-Buelga, 2012). Como copigmento pueden actuar otras moléculas presentes en el medio, normalmente compuestos fenólicos, pero también otros antocianos o incluso partes del antociano. Por esta razón se pueden distinguir tres tipos de mecanismos de copigmentación:

- Copigmentación intermolecular: Son asociaciones que se producen entre dos moléculas diferentes. Estas asociaciones pueden darse entre moléculas de la misma naturaleza, es decir, entre dos antocianos, conociéndose como copigmentación homomolecular o autoasociación, o pueden tener lugar entre un antociano y una molécula de naturaleza diferente (flavonoides no antocianos, ácidos orgánicos, etc.). Se habla entonces de copigmentación heteromolecular.
- Copigmentación intramolecular: El copigmento es una parte de la propia molécula de antociano, como por ejemplo, el resto cumarilo de un antociano cumarilado.

Destaca la copigmentación intermolecular heteronuclear por la variedad y concentración de posibles copigmentos que pueden encontrarse en el vino. El único requisito de los posibles copigmentos es que deben poseer o poder adoptar una configuración plana que permita la asociación con las formas coloreadas de los

antocianos, de manera que protejan al catión flavilio del ataque nucleofílico del agua (Asen *et al.*, 1972). Entre los posibles copigmentos en los vinos se pueden destacar los compuestos de naturaleza flavonoide (Boulton, 2001). De esta forma, flavonoles, flavanoles y ácidos fenólicos han demostrado un efecto importante sobre la estabilización del color de los antocianos mediante el fenómeno de copigmentación (Asen *et al.*, 1972; Baranac *et al.*, 1997a; Baranac *et al.*, 1997b; Boulton, 2001; Darias-Martín *et al.*, 2001; Gómez-Míguez *et al.*, 2006). Entre los compuestos estudiados en la bibliografía, los flavonoles son los que generalmente producen un mayor efecto de copigmentación (Bakowska *et al.*, 2004). Entre los ácidos fenólicos se pueden establecer tres grupos según su capacidad de actuar como copigmentos (Eiro *et al.*, 2002): los ácidos cinámicos (ácidos cafeico, ferúlico o *p*-cumárico) son buenos copigmentos, mientras que los ácidos cinámicos conjugados (ácido rosmarínico o clorogénico) son copigmentos moderados. Por último, los ácidos fenólicos simples (como el ácido gálico) presentan una capacidad como copigmentos menos importante. Los flavanoles monómeros, por su parte, han demostrado ser pobres copigmentos de la malvidina 3-O-glucósido en comparación con los flavonoles (Malien-Aubert *et al.*, 2002; Mirabel *et al.*, 1999). Además, las constantes de asociación pigmento-copigmento determinadas para ciertos flavanoles oligómeros han resultado ser más bajas incluso que para los monómeros, indicando una menor capacidad para actuar como copigmentos (Mirabel *et al.*, 1999). Esto puede deberse principalmente a la existencia de carbonos asimétricos en la estructura de los flavanoles, lo que les confiere conformaciones espaciales no planares. Sin embargo, las altas concentraciones de estos compuestos en el vino con respecto a los flavonoles (Cabanis *et al.*, 2003) hace que su participación en la estabilización del color del vino como copigmentos no pueda despreciarse. Además, el grado de copigmentación varía en función del antociano, habiéndose observado que al aumentar el grado de metoxilación en el antociano el efecto de copigmentación es mayor, por lo que la malvidina muestra un mayor efecto de copigmentación que el resto de antocianos (Mazza y Brouillard, 1990; Eiro *et al.*, 2002).

Como se ha mostrado en la **Figura II.3**, al pH del vino la mayor parte de los antocianos debería encontrarse en la forma hemiacetálica, incolora, resultante de la hidratación del catión flavilio. Sin embargo, el color observado en el vino sólo puede

explicarse con una proporción de catión flavilio mucho mayor a la esperada teóricamente, lo cual es posible por la existencia del fenómeno de copigmentación. Las interacciones hidrofóbicas entre el antociano y el copigmento forman complejos de copigmentación de estructuras verticales tipo *sándwich* antociano-copigmento, con una estequiometría 1:1. Estos complejos se mantienen mediante fuerzas de *Van der Waals* y por uniones por puentes de hidrógeno. En esta estructura se protege al antociano de la hidratación evitando la aparición de la forma incolora hemiacetal. Los restos glucosa de los antocianos se disponen hacia la parte externa de los complejos donde se unen mediante puentes de hidrógeno a moléculas de agua creando una capa de solvatación alrededor de la estructura (Hoshino *et al.*, 1982; Goto y Kondo, 1991). Se crea así un interior de la estructura hidrofóbico al que el agua no tiene acceso, evitando el proceso de hidratación de las formas coloreadas del antociano, lo que permite mayores concentraciones del catión flavilio y la base quinoidal en disolución. Por esta razón, como consecuencia del fenómeno de copigmentación se produce un efecto hiperacrómico (aumento de la absorbancia) y batocrómico (desplazamiento de la longitud de onda de absorbancia máxima hacia valores mayores), cuya magnitud depende de la afinidad del copigmento por la forma flavilio o por la forma quinoidal, respectivamente (Asen *et al.*, 1972). Esto se traduce en que el color de las disoluciones de antocianos aumenta y se desplaza hacia tonalidades más azuladas.

3. Introducción a la medida del color.

El color es una respuesta mental al estímulo que una radiación luminosa visible produce en la retina. Se considera como un concepto psicofísico relacionado al mismo tiempo con la fisiología de la visión, con la energía radiante espectral de una fuente luminosa y con la psicología del observador. Wyszecki y Stiles (Wyszecki y Stiles, 1982) definieron de manera más precisa el color percibido: *"El color es el aspecto de la percepción visual por el cual un observador puede distinguir diferencias entre dos campos de visión del mismo tamaño, forma y estructura, causadas por diferencias en la composición espectral de la energía radiante implicada en la observación"*. Por lo tanto el color no es una propiedad intrínseca del objeto que refleja o transmite la radiación luminosa, sino que depende de la distribución espectral de la radiación incidente en el objeto, de la capacidad del objeto para transformarla y de la fisiología del observador.

De manera general se habla de luz o radiación luminosa cuando se trata de la zona del espectro electromagnético que estimula el sistema visual humano. Esta zona, conocida como zona del visible (**Figura II.4a**), comprende las longitudes de onda entre los 380 y los 780 nm. Cualquier radiación luminosa visible es un conjunto de radiaciones a distintas longitudes de onda con diferente intensidad, de manera que el conjunto es detectado como un color por el observador. Cada fuente de luz posee un espectro de emisión característico en el que todas las radiaciones no poseen la misma energía, es decir, no existen emisores equienergéticos. Cuando la luz emitida incide sobre un objeto, éste es capaz de absorber parte de ella y transmitir la otra parte, de manera que genera un nuevo espectro de emisión.

Por lo tanto, el color del objeto dependerá en primera instancia de la fuente de iluminación empleada. Además, el color que se percibe al observar el objeto deriva de un conjunto de radiaciones transmitidas por éste, es decir, de aquellas radiaciones que el objeto no absorbe. Esto equivale a que el color que se observa resulta de la mezcla aditiva de un conjunto de colores. Tradicionalmente existen tres colores primarios (rojo, verde y azul, **Figura II.4.b**) cuya mezcla en la misma proporción genera el color blanco. La mezcla de dos de esos colores en la misma proporción genera los tres

colores secundarios (amarillo, magenta y cian, **Figura II.4.b**), y mediante mezclas aditivas entre ellos, pueden generarse el resto de colores.

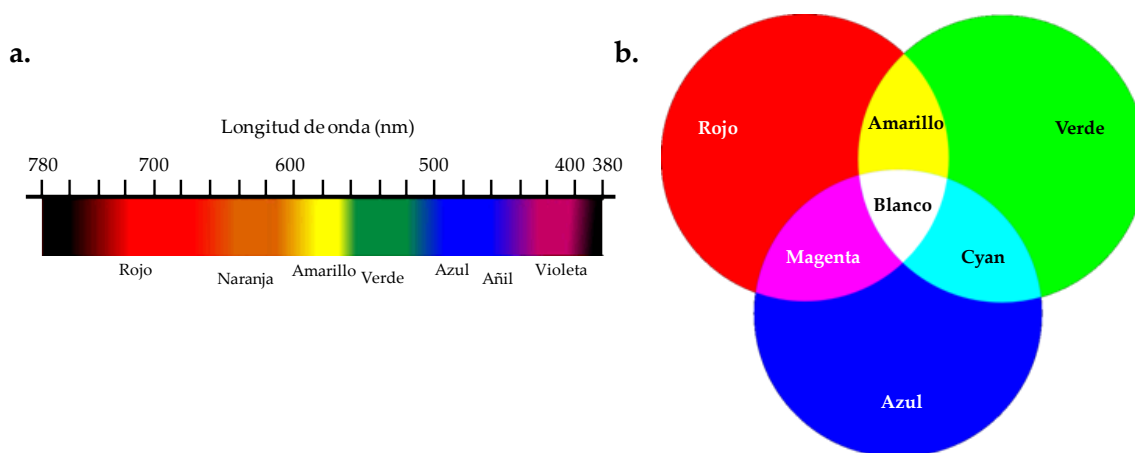


Figura II.4. a. Espectro de la radiación en la región del visible. b. Colores primarios y secundarios en las mezclas aditivas.

La Colorimetría surgió como ciencia para dar solución al problema de la medida del color de una manera objetiva, eliminando la dependencia de las componentes psicológica y fisiológica del observador. Según las teorías de ciencia, regularizadas por la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE, *Commission Internationale de l'Éclairage*), la radiación visible se puede expresar de forma geométrica considerando un espacio de tres dimensiones denominado Espacio Triestímulo. Es este espacio cada estímulo de color (Q) viene expresado por un vector tridimensional donde cada dimensión es proporcional a cada uno de los estímulos primarios: rojo (R), verde (G) y azul (B). La dificultad del cálculo y de la interpretación de los valores triestímulo R, G y B hace que la CIE proponga otro tipo de sistemas colorimétricos para la evaluación del color. En éstos se afirma igualmente que el estímulo cromático está compuesto por tres sensaciones bien diferenciadas (el matiz o tono, el brillo o luminosidad y la saturación o pureza) que otorgan al color su carácter tridimensional:

- Matiz o tono: Es el atributo fundamental para definir el color. Permite distinguir cualquier color respecto al gris con el mismo brillo (denominado estímulo acromático), es decir, el tono permite clasificar los colores en rojizos, amarillentos, etc., por lo que es un atributo cualitativo. Está relacionado con las

diferencias de absorbancia de la energía radiante a diferentes longitudes de onda.

- Brillo o luminosidad: Este atributo permite diferenciar, en términos generales, entre claro u oscuro. Estrictamente se define como el atributo que permite considerar a un color equivalente a alguno de los miembros de la escala de grises entre el blanco y el negro. Es un atributo cuantitativo que deriva de la medida relativa de la luz reflejada frente a la absorbida.
- Saturación o pureza: Este atributo determina para cada tono su grado de diferencia con el gris del mismo brillo, describiendo la reflexión o transmisión a una determinada longitud de onda. Así, tono y pureza sirven para definir la cromaticidad, siendo el tono la medida cualitativa y la saturación la cuantitativa.

Como los objetos poseen un espectro de transmisión constante, para definir su color es necesario fijar un iluminante teórico (una distribución de la energía radiante que índice sobre el objeto) y un observador teórico. Con esto se elimina la variabilidad de la medida del color, estandarizándola. Un iluminante teórico debe ser fijo, tener siempre la misma energía radiante a cada longitud de onda, ser real (que emita luz similar a la luz natural) y debe poder fabricarse. La CIE define los siguientes iluminantes teóricos según la temperatura a la que ha de someterse un cuerpo negro perfecto para generar la radiación:

- Iluminante A: representa la luz de un radiador total a la temperatura de 2856 K.
- Iluminante B: representa la luz solar directa y se relaciona con una temperatura de color aproximada de 4874 K.
- Iluminante C: este iluminante se asimila con la luz diurna media (tradicionalmente, luz de cielo nublado), lo que se relaciona con una temperatura de color de 6774 K. Aunque aún se emplea habitualmente como referencia para la evaluación del color de alimentos, la CIE lo suprimió en 1971, junto con el iluminante B, ya que presentan deficiencias en la región del UV, importante para objetos fluorescentes.
- Iluminante D₅₅: relacionado con una temperatura de color de 5503 K.

- Iluminante D₆₅: se relaciona con una temperatura de color aproximada de 6504 K, representando una fase de la luz de día natural. Es el iluminante más utilizado en la actualidad ya que la CIE lo recomienda en la mayoría de los casos.
- Iluminante D₇₅: junto con el D₅₅ son la alternativa recomendada por la CIE para el D₆₅ en los casos que éste pueda ser problemático. Se relaciona con una temperatura de color de 7504K.

Por otra parte, para el observador estándar, Guiad (Guiad, 1931) definió un observador de 2° y con un campo visual de aproximadamente 2 cm (observador estándar CIE-1931 u observador de 2°) cuyas propiedades definen las "funciones de igualación de color" (series de valores triestímulo espectrales de cada estímulo monocromático en un determinado sistema de estímulos primarios). En 1964 la CIE definió otro observador (observador estándar colorimétrico complementario), el observador de 10° con un campo visual de aproximadamente 9 cm de diámetro.

La CIE ha propuesto diferentes sistemas colorimétricos para la definición de los valores triestímulo y el cálculo de las coordenadas de cromaticidad. En primer lugar, se propuso el sistema CIE 1931-(x,y) que permitía cuantificar el color mediante la representación de los valores triestímulo de los estímulos cromáticos en un diagrama (x-y), pero mostraba falta de uniformidad. Seguidamente se propusieron la Escala Uniforme UCS 1960 y los espacios U*V*W* (1960) y CIELUV (1978), aunque la aparición del espacio de color CIELAB (1976) los relegó a un segundo plano, ya que es sin duda el más usado en la actualidad para la colorimetría.

3.1. Espacio CIELAB.

El espacio de Color CIE 1976 L*a*b* (CIELAB) queda definido cuando se representan en coordenadas rectangulares los valores para las variables claridad (L*) y cromaticidad (a*,b*) (**Figura II.5.a**):

- Claridad (L*): es la magnitud por la que el color se clasifica como más claro o más oscuro. Varía entre 0 y 100, representando esos valores los colores negro y blanco respectivamente.

- Cromaticidad (a^*, b^*): Representa, para cada valor de la claridad, un diagrama bidimensional en el que se puede ubicar cualquier color (**Figura II.5.b**). La componente a^* varía entre el rojo (valores positivos) y el verde (valores negativos) mientras que la componente b^* toma valores desde $+b^*$ (amarillo) hasta $-b^*$ (azul). Los valores de $a = 0$ y $b = 0$ representan el color gris para cada valor de claridad.

A partir de la cromaticidad pueden definirse las coordenadas polares croma (C^*_{ab}) y tono (h_{ab}), con un carácter más psicofísico ya que, junto con el valor de la claridad, permiten una evaluación del color más intuitiva. El croma, calculado como la distancia desde el punto que representa el color hasta el origen de coordenadas del diagrama (a^*, b^*), hace referencia a la pureza del color, esto es, a cómo de diferente es ese color del color gris de la misma claridad. El tono se corresponde con el ángulo comprendido entre el eje ($-a^*, +a^*$) y el segmento que une el punto que representa el color con el origen de coordenadas del diagrama (a^*, b^*). Puede tomar valores entre 0 y 360, pudiéndose definir cuatro cuadrantes: entre 0 y 90 se corresponde con tonos rojos, naranjas y amarillos; entre 90 y 180 con tonos amarillos y verdes; entre 180 y 270 representa tonos verdes y azules y entre 270 y 360 representa tonos azules, morados y rojizos. En el caso del vino, los valores del tono suelen estar ubicados entre el cuarto y el primer cuadrante, por lo que es habitual representar los valores de tono ubicados en el cuarto cuadrante con un valor negativo pequeño en lugar de un valor positivo grande, es decir, es habitual encontrar referido a un valor de tono de 355 como un valor de $h_{ab} = -5$.

Es importante remarcar que, al variar el valor de la claridad, el diagrama (a^*, b^*) cambia, de manera que para valores de claridad muy altos (próximos a 100) o muy bajos (próximos a 0), el color será muy próximo al blanco o al negro respectivamente, y no tendrá sentido hablar del tono. Por esta razón es imprescindible que, para definir un color, a la pareja de valores a^* , b^* o C^*_{ab} , h_{ab} les acompañe siempre el valor de L^* . Además, al considerarse el espacio CIELAB como un espacio uniforme es posible evaluar diferencias de color entre dos colores diferentes a través del cálculo de la distancia euclídea que separa los dos puntos que representan esos colores dentro del

este espacio tridimensional. Por lo tanto se puede evaluar la diferencia de color calculando el valor de ΔE^*_{ab} a través de la siguiente ecuación (ecuación II.7):

$$\Delta E^*_{ab} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{(Ecuación II.7)}$$

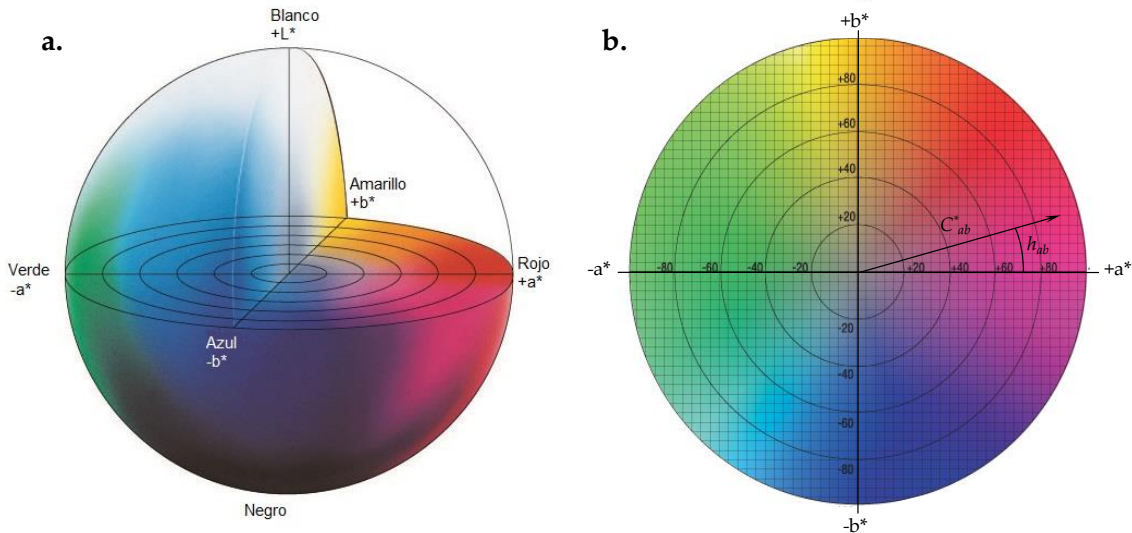


Figura II.5. a. Espacio CIELAB. b. Vista del plano (a^*,b^*) para $L^*=50$ mostrando las coordenadas polares C^*_{ab} y h_{ab} .

3.2. Medida instrumental del color.

El color es probablemente el único atributo sensorial para el que se dispone de métodos analíticos de medida con la suficiente precisión como para poder sustituir una medida sensorial. Estos métodos son repetitivos y objetivos pero en ocasiones el equipo es costoso y puede requerir una interpretación compleja de los resultados, por lo que, a escala industrial, es común que el análisis sensorial sea más importante que el instrumental. En esos casos, lo habitual es hacer una comparación frente a un color o una escala de referencia. Sin embargo, esta evaluación está sujeta a un gran error y una gran variabilidad dependiente del observador, por lo que el uso de métodos instrumentales está extendiéndose en la actualidad. Existen dos tipos de instrumentos para la medida del color: aquellos que proporcionan una medida de los valores triestímulo (colorímetros) y aquellos que miden la magnitud radiométrica o

fotométrica que caracteriza al objeto (espectrofotómetros y espectrorradiómetros), magnitud a partir de la cual se calculan matemáticamente los valores triestímulo.

Los colorímetros miden el color de fuentes de radiación primarias (que emiten luz propia) y secundarias (que reflejan o transmiten la luz externa) obteniendo directamente, de forma óptica y no matemática, los valores triestímulo. Estos instrumentos reproducen la respuesta de un sólo observador patrón y un iluminante estándar preestablecidos, por lo que la medida varía para cada instrumento.

Los espectrofotómetros son los instrumentos más habituales para la medida de radiaciones en el visible. Estos instrumentos tienen la capacidad de manejar un haz de radiación electromagnética separándolo para permitir la identificación, calificación y cuantificación de su energía. Miden la distribución espectral de transmitancia o de reflectancia de un objeto a partir de la cual se puede calcular, de forma matemática, el color bajo distintas condiciones. Se puede obtener por tanto, en función de la disposición del instrumento, el espectro de transmisión (o más comúnmente de absorción) o de reflexión de un objeto o disolución. A partir de este espectro es posible calcular los valores triestímulo utilizando el sistema colorimétrico, el iluminante estándar y el observador estándar que se deseen, de manera que los resultados no dependan del instrumento.

Los espectrorradiómetros son instrumentos equivalentes a los espectrofotómetros con la peculiaridad de que la fuente de iluminación en este caso es externa al instrumento, por lo que la medida dependerá de la fuente de iluminación que se utilice. Su uso está más extendido para medir la transmitancia o reflectancia de una muestra modificando la posición relativa de la fuente de iluminación.

III. Elagitaninos: Origen y propiedades.

1. Estructura y propiedades de los elagitaninos de roble. (Yoshida *et al.*, 2009; Jourdes *et al.*, 2009).

Los elagitaninos son una familia de compuestos muy complejos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, siendo posible encontrarlos en gran variedad de especies vegetales. En un sentido muy amplio, los elagitaninos se pueden definir como ésteres hexahidroxi-difénicos de carbohidratos, destacando los de glucosa. Muchos de ellos pueden derivar de procesos oxidativos partiendo de los galotaninos. La posición de unión del grupo hexahidroxi-difeniloil (HHDP, **Figura III.1a**) con la glucosa normalmente es común para esta familia de compuestos. Así, existe un grupo de elagitaninos donde esta unión se produce con los hidroxilos en posición 2 y 4 y/o los hidroxilos en posición 3 y 6 de la glucosa, y otro donde las uniones se producen con los hidroxilos en posiciones 2 y 3 y/o 4 y 6. Además, existe la posibilidad de un enlace carbono-carbono entre un resto gálico y la glucosa.

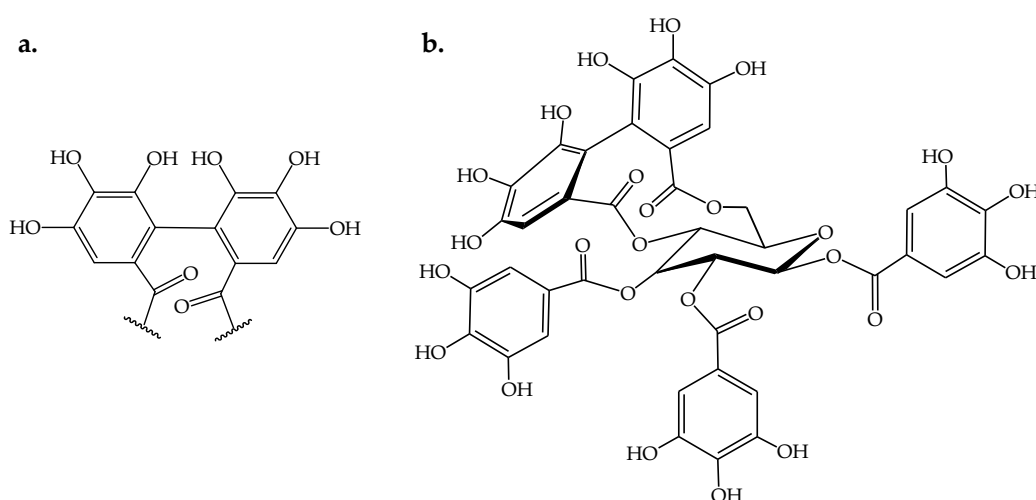


Figura III.1: a. Residuo hexahidroxi-difeniloil (HHDP) común a los elagitaninos. b. Estructura de la tellimagrandina II.

La unidad HHDP existente en estos compuestos deriva del acoplamiento oxidativo carbono-carbono intramolecular de los restos gálicos presentes en los galotaninos.

Cuando se produce la hidrólisis de estos compuestos se libera el resto HHDP que genera el ácido elágico en el medio a través de una reacción de lactonización.

Uno de los elagitaninos de alto peso molecular más sencillo es la HHDP-trigaloilglucopiranososa, conocida como tellimagrandina II (**Figura III.1b**), que se forma a partir de la β -pentagaloilglucosa. Este compuesto posee en su estructura una molécula de glucosa en su forma piranososa donde dos de sus grupos hidroxilos están esterificados por un grupo HHDP, mientras que los otros tres están esterificados por el ácido gálico. Mediante el acoplamiento oxidativo C-C se pueden formar elagitaninos donde todos sus restos gálicos estén unidos entre sí. A partir de estos compuestos algunos autores (Okuda *et al.*, 1987) han propuesto que se puede crear, tras la apertura enzimática de la estructura piranososa, la unión C-C entre uno de los restos gálicos y el azúcar. De esta manera se pueden generar los conocidos como elagitaninos C-glucosídicos. Se pueden diferenciar dos grupos dentro de los C-elagitaninos: aquellos donde el enlace C-C existe entre la glucosa y un resto HHDP unido además vía dos enlaces éster con los carbonos 2 y 3 de la glucosa (**Figura III.2.a.**), y aquellos donde el enlace C-C es entre la glucosa y un resto nonahidroxitrifénico (NHTP) que además está unido vía tres enlaces éster a los carbonos 2, 3 y 5 de la glucosa (**Figura III.2.b.**).

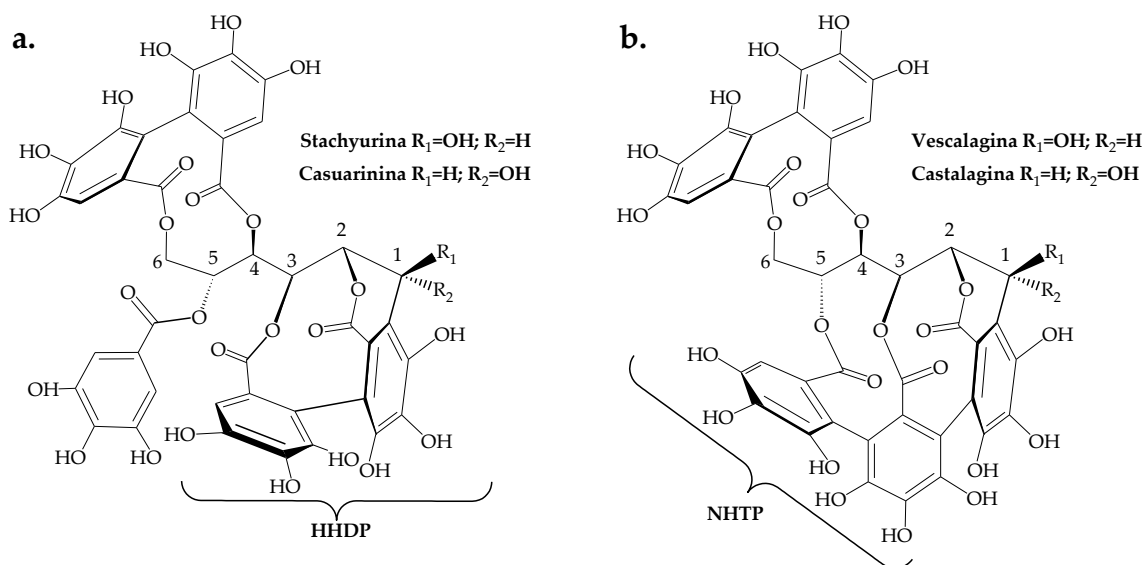


Figura III.2: Estructura de los dos grupos principales de elagitaninos C-glucosídicos (adaptado de Jourdes *et al.*, 2009).

Dentro de los elagitaninos que se engloban en el segundo grupo, los cuales son mayoritarios en la madera de roble como se indicará posteriormente, cabe destacar la castalagina y su epímero en el C1, la vescalagina. Estos compuestos fueron los primeros elagitaninos C-glucosídicos en ser estudiados por Mayer y colaboradores tras su aislamiento a partir de las maderas de castaño y roble (Mayer *et al.*, 1967). Además, pueden actuar como precursores en la formación de varios elagitaninos C-glucosídicos. Se pueden encontrar tanto monómeros glicosilados, donde el hidroxilo sobre el carbono 1 del azúcar ha sido sustituido por un azúcar unido mediante un enlace C-C (grandinina y roburina E, ver **Figura I.6**, apartado **I.1.3.2.**), como dímeros formados por la condensación de los anteriores monómeros entre sí (Roburinas A, B, C y D). También existen productos de condensación de estos compuestos con flavan-3-oles, conocidos como flavano-elagitaninos o (epi)acutisiminas. Estos compuestos se forman por el ataque nucleofílico, bien de un monómero o bien de un flavanol oligómero, al carbocatión generado por pérdida, en medio ácido, del hidroxilo en la posición 1 del azúcar del elagitanino monómero, de manera similar a lo que ocurre en la formación de los pigmentos derivados de la reacción entre la vescalagina y la malvidina. Existe la posibilidad de que el flavanol monómero sea una catequina (acutisimina) o una epicatequina (epiacutisimina). Además, el producto de condensación elagitanino-flavanol puede producirse a través de un enlace con el carbono 8 ((epi)acutisimina A) o con el carbono 6 del flavanol ((epi)acutisimina B). En cualquier caso la regioisomería del carbono 1 de la glucosa del elagitanino es coincidente con la existente en la molécula de la vescalagina.

En general, la presencia de varios grupos hidroxilo en posición *orto* en la periferia de la molécula hace que estos compuestos tengan propiedades particulares. Por un lado, se estudia la actividad biológica de estos compuestos por su posible papel regulador frente a la proliferación de células cancerígenas (Fridrich *et al.*, 2008). Además, estos compuestos y alguno de sus derivados (acutisimina A) han demostrado ser inhibidores de la topoisomerasa II (Quideau *et al.*, 2003; Quideau *et al.*, 2005), una enzima involucrada en la replicación del ADN cuya inhibición es la base de ciertos tratamientos de quimioterapia. Por otro lado, debido a los grupos hidroxilo de la estructura, estos compuestos son muy solubles en agua y, como consecuencia, se

solubilizan con rapidez en el vino cuando éste entra en contacto con la madera. Una vez en el vino, estos compuestos se pueden ver involucrados en numerosos procesos de oxidación. La presencia de los grupos hidroxilo hace que los elagitaninos sean fácilmente oxidables, consumiendo el oxígeno del medio. Esta propiedad es esencial para entender el papel que juegan estos compuestos en el vino, ya que su capacidad de oxidarse absorbiendo el oxígeno del medio evita que otros componentes del vino como los antocianos se oxiden, protegiendo así el color. Además, tras su oxidación, los productos generados a partir de los elagitaninos poseen un poder oxidante mayor, posibilitando que se generen en el medio hidroperóxidos, tanto inorgánicos (H_2O_2) como orgánicos (peróxidos en la molécula del elagitanino) los cuales están involucrados en la formación de acetaldehído a partir del etanol del medio (Vivas y Glories, 1996). La presencia de acetaldehído en el medio posibilitaría la formación de pigmentos derivados, como los derivados de la condensación antociano-flavanol mediante un puente etilo (Timberlake y Bridle, 1976) o las vitisinas de tipo B (Benabdeljalil *et al.*, 2000), con las implicaciones en el color que puede tener la formación de estos pigmentos. De esta forma, los elagitaninos tienen la capacidad de modificar el color del vino tinto mediante diversos mecanismos, tanto de forma indirecta como se acaba de señalar, como de forma directa, a través de los productos derivados de la reacción directa entre el antociano y el elagitanino, por lo que su presencia en el vino puede relacionarse con ciertos cambios en el color (Vivas y Glories, 1996).

Sin embargo no todos los elagitaninos C-glucosídicos poseen la misma reactividad. La castalagina y vescalagina, a pesar de la gran similitud en sus estructuras, presentan una reactividad muy diferente, así como importantes diferencias en su actividad biológica. Estas diferencias son sorprendentes si se tiene en cuenta que la diferencia en sus estructuras es muy pequeña (únicamente la posición esteroespacial de un grupo OH sobre el carbono 1 de la glucosa) con respecto al tamaño de la molécula (con un peso molecular de 934 Da). Varios autores han señalado que las reacciones nucleofílicas en medio ácido en las que están involucrados los elagitaninos (formación de acutisiminas, entre otros) son sólo posibles en el caso de la vescalagina, y no a partir de la castalagina (Yoshida *et al.*, 19991; Viriot *et al.*, 1994; Vivas *et al.*, 2004a), aunque no

se pueda dar una explicación clara para ello. Además, como las reacciones tienen lugar a través de un intermedio de reacción carbocatiónico, derivado de la pérdida del hidroxilo en posición C1 de la vescalagina, se podría pensar que se siguiese un mecanismo de reacción de sustitución nucleofílica unimolecular (S_N1) que conllevaría la obtención de mezclas de diastereoisómeros de los productos. Sin embargo en estas reacciones se mantiene la configuración estérica del C1 de la vescalagina, lo que indica que, una vez formado el carbocatión, sólo es posible el ataque nucleofílico por una cara del compuesto (Quideau *et al.*, 2003; Quideau *et al.*, 2005). Diversos estudios de modelización molecular demostraron que la castalagina es ligeramente más estable que la vescalagina, pero sobre todo pusieron de manifiesto que, en el caso de la vescalagina, el grupo hidroxilo del C1 aparece *exo*-posicionado, mientras que en el caso de la castalagina existe una orientación hacia el centro de la molécula. Consecuentemente, en el caso de la castalagina es posible que este grupo OH participe en interacciones intramoleculares de tipo puente de hidrógeno, estabilizando la molécula (Quideau *et al.*, 2004). Debido a esta interacción intramolecular, la pérdida de este grupo hidroxilo está menos favorecida en el caso de la castalagina con respecto a la vescalagina. Esto puede explicar el hecho de que la castalagina es, sistemáticamente, más abundante que la vescalagina en extractos de plantas. Además, todos los elagitaninos derivados (grandinina, roburinas A-E) poseen la misma configuración en el C1 que la vescalagina. La reactividad de la vescalagina hace que sea posible la formación de derivados en el vino. Además de los pigmentos de condensación vescalagina-antociano, y de las acutisiminas anteriormente mencionados, la vescalagina, previa pérdida del hidroxilo en posición 1, puede reaccionar con los alcoholes, entre ellos el etanol. Así, es posible detectar con facilidad el compuesto 1-O-etilvescalagina en vinos envejecidos en barricas de roble (Jourdes *et al.*, 2011).

Además, algunos autores (Fridrich *et al.*, 2008; Quideau *et al.*, 2005) han demostrado que, como consecuencia de la conformación del C1 de la glucosa, la vescalagina presenta también una actividad biológica más importante que la castalagina.

Por otra parte, existe cierta controversia en la literatura sobre la posible influencia que pueden tener los elagitaninos en otras características organolépticas del vino como

el amargor o la astringencia. Mientras que algunos autores sugieren que la presencia de elagitaninos en el vino podría afectar de manera remarcable a estas características organolépticas, otros señalan que las concentraciones a las que estos compuestos se encuentran normalmente en los vinos hacen que su contribución pueda ser despreciada (Quinn y Singleton, 1985; Somers, 1990; Hervé du Penhoat *et al.*, 1991; Pocock *et al.*, 1994; Puech *et al.*, 1999). Sin embargo, ha quedado demostrado tras los trabajos de Hofmann y colaboradores (Glabasnia y Hofmann, 2006; Hofmann *et al.*, 2006; Stark *et al.*, 2010) que la castalagina y vescalagina, así como algunos de sus derivados, son compuestos relacionados con sensaciones de astringencia con unos umbrales de detección bajos, comprendidos entre 1 y 4 mg/L, por lo que su contribución a la astringencia debe tenerse en cuenta.

2. La madera de roble como fuente de elagitaninos C-glucosídicos. (Okuda *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2009; Jourdes *et al.*, 2009; Zamora, 2003).

La presencia de elagitaninos ha sido ampliamente descrita en el reino vegetal, tanto en la propia planta, como en sus frutos y semillas (Amakura *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2005; Mullen *et al.*, 2003; Seeram *et al.*, 2006). El grupo de elagitaninos que presentan el enlace C-C (los denominados elagitaninos C-glucosídicos) están presentes en plantas y árboles de las familias Casuarinaceae, Stachyuraceae, Myrtaceae, Betulaceae, Fagaceae y Hamamelidaceae entre otras. Dentro de la familia Fagaceae es posible encontrarlos en la madera de los géneros *Castanea* y *Quercus*, tratándose de un grupo de compuestos muy importante, a los que se les atribuye la alta durabilidad de estas maderas (Scalbert *et al.*, 1988). Esta razón, entre otras, hace que la madera de estos géneros destaque por su gran utilidad para innumerables fines. Es de destacar el empleo de madera de ciertas especies de roble para la fabricación de barricas. Como consecuencia, es posible detectar este tipo de compuestos en ciertas bebidas alcohólicas, como el whisky o el vino, cuya elaboración implica, en alguna de sus etapas, la utilización de barricas de roble.

La madera de castaño puede llegar a contener hasta 63 mg de vescalagina y castalagina por gramo de madera seca, lo que representa un 6 % en peso, una cantidad muy elevada para un único grupo de compuestos. Respecto a la madera de roble, se han descrito cantidades de elagitaninos de entre 3 y 57 mg/g de madera seca. La castalagina y vescalagina son los elagitaninos predominantes en este tipo de maderas, pudiendo representar, de manera individual hasta el 60 % del total de elagitaninos (Fernández de Simón *et al.*, 1999). Sin embargo, las cantidades de elagitaninos difieren de manera remarcable en función de la especie de roble de que se trate (Fernández de Simón *et al.*, 1999; Masson *et al.*, 1995; Scalbert *et al.*, 1988). A pesar de la variabilidad intraespecie descrita por diferentes autores, el roble americano (*Q. alba*) presenta menor concentración de elagitaninos (entre 3-8 mg/g de madera seca) que el roble de la especie *Q. petraea* (entre 8-34 mg/g de madera seca) y mucho menor que *Q. robur* (entre 15-57 mg/g de madera seca) (Chatonnet y Dubourdieu, 1998; Fernández de Simón *et al.*, 1999; Feuillat *et al.*, 1997; Glabasia y Hofmann, 2006; Masson *et al.*, 1995; Nonier *et al.*,

2005; Prida y Puech, 2006; Scalbert *et al.*, 1988; Vivas *et al.*, 2004b). Además de un mayor contenido de elagitaninos totales que *Q. petraea*, *Q. robur* presenta mayores cantidades de vescalagina, castalagina (los cuales llegan a representar hasta un 73% del contenido total), roburina C, B y A y grandinina. Sin embargo, *Q. petraea* presenta mayores contenidos de roburina E que *Q. robur* y contenidos similares de roburina D (Chatonnet y Dubourdieu, 1998; Masson *et al.*, 1995; Mosedale *et al.*, 1999).

Independientemente del origen botánico del roble utilizado, los procesos que se llevan a cabo para la fabricación de las barricas tienen un impacto importante sobre los componentes de la madera, tanto sobre los compuestos volátiles responsables de los aromas como sobre los elagitaninos. El secado de la madera y su posterior tostado son los procesos que mayor impacto tienen sobre la composición de la madera (Cadahía *et al.*, 2001; Doussout *et al.*, 2002; Fernández de Simón *et al.*, 2003; Fernández de Simón *et al.*, 2010; Hale *et al.*, 1999; Masson *et al.*, 1995; Matricardi y Waterhouse, 1999). Durante el secado natural de la madera se produce una solubilización y a la vez una mayor degradación de los taninos elágicos, por lo que sus niveles se reducen sensiblemente (Cadahía *et al.*, 2001). Sin embargo, el secado artificial resulta menos efectivo para reducir el exceso de elagitaninos en la madera, lo cual puede conllevar una cesión en exceso al vino.

Los elagitaninos, como consecuencia del tratamiento térmico llevado a cabo durante el tostado de afinamiento de la madera, sufren un proceso de hidrólisis que conlleva un importante descenso en sus niveles. Así, se ha comprobado que un tostado fuerte reduce considerablemente los niveles de castalagina y vescalagina, aumentando la cantidad de ácido elágico, compuesto procedente de su degradación (Matricardi y Waterhouse, 1999; Hale *et al.*, 1999). Además, como se indicó anteriormente, es común utilizar las barricas para envejecer el vino en diferentes cosechas. La capacidad de cesión de elagitaninos por parte de las barricas desciende con el uso de éstas como consecuencia de un agotamiento parcial de los compuestos existentes en las capas más externas de la madera, a las que el vino tiene acceso (Zamora, 2003).

3. Métodos de análisis de elagitaninos de roble.

Como se ha indicado anteriormente, los elagitaninos están presentes en el vino como consecuencia del contacto de éste con la madera de roble. Sin embargo, debido a que son compuestos con una reactividad bastante importante y a que pueden hidrolizarse con facilidad, los niveles que pueden detectarse en el vino suelen ser muy bajos. Por otro lado, el vino posee una composición muy compleja, lo cual dificulta aún más el análisis de los elagitaninos en este medio. Como consecuencia, el análisis de elagitaninos en vinos se ha llevado a cabo, habitualmente, como una determinación de su contenido total utilizando un protocolo que implica un proceso previo de hidrólisis y la cuantificación del ácido elágico libre formado en ese proceso (Peng *et al.*, 1991; Lee y Talcott, 2002; Nonier *et al.*, 2005; Chira y Teissedre, 2013). Cuando es necesario un análisis más detallado de estos compuestos, es necesario un paso previo de purificación/concentración, y el uso de técnicas de detección y cuantificación más avanzadas, como la cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (HPLC-MS).

3.1. Métodos de fraccionamiento para el análisis de elagitaninos.

Previo al análisis de los elagitaninos en vinos suele ser necesario realizar un proceso de fraccionamiento de las muestras que posibilite su aislamiento, facilitando así su detección. En la bibliografía están descritas diversas metodologías cuyo objetivo principal es la separación de los elagitaninos del resto de componentes del vino para posibilitar su detección y cuantificación mediante HPLC-MS. Con este propósito, Saucier y colaboradores (2006) han propuesto un método que consiste en un doble fraccionamiento de la muestra utilizando columnas cromatográficas cuyas fases estacionarias son Amberlita XAD7 HP primero, y Toyopearl TSK HW 40F a continuación. Previamente al fraccionamiento, la muestra de vino (100 mL) se concentra a presión reducida hasta sequedad y se redisuelve en 20 mL de agua. La disolución se carga en la columna de Amberlita, previamente acondicionada con metanol y con una mezcla H₂O:HCOOH (996:4). Se eliminan los azúcares y el ácido

tartárico presentes en la muestra mediante la elución de 250 mL de la misma disolución de H₂O:HCOOH (996:4). La fracción que contiene los elagitaninos se eluye con una mezcla hidrometanólica acidificada (250 mL de H₂O-MeOH:HCOOH (296:700:4)). Esta fracción se lleva a sequedad y el residuo sólido obtenido se redisuelve en 10 mL de agua ultrapura. Esta disolución se somete a un segundo fraccionamiento usando Toyopearl como fase estacionaria, previamente acondicionado con metanol y con H₂O:HCOOH (996:4). Tras cargar la muestra en la columna, se hacen pasar por la columna 50 mL del mismo disolvente acuoso acidificado, y 50 mL de una mezcla hidrometanólica acidificada (H₂O:MeOH:HCOOH (296:700:4)). Para la elución de los elagitaninos aún retenidos en la columna se utiliza una mezcla H₂O:acetona:HCOOH (296:700:4). La fracción rica en elagitaninos que se obtiene se concentra hasta sequedad a presión reducida, redisolviendo el residuo sólido en 400 µL de agua ultrapura, para su posterior análisis mediante HPLC-DAD-ESI-MS, lo que permite a estos autores detectar y cuantificar los principales elagitaninos C-glicosídicos presentes en el vino tinto. En base a la descripción de la metodología, ésta resulta relativamente compleja, requiriendo mucho tiempo así como gran cantidad de muestra para el análisis.

Otra de las metodologías descritas en la bibliografía que tienen como fin el análisis de conjugados del ácido elágico en diversas muestras ha sido desarrollada por Lee y colaboradores (Lee *et al.*, 2005). El método propuesto por estos autores está encaminado a la determinación de elagitaninos en uvas, elagitaninos de naturaleza distinta a los estudiados por Saucier y colaboradores (Saucier *et al.*, 2006). Así, en este trabajo, Lee y colaboradores analizan elagitaninos propios de uvas *Vitis rotundifolia* de la variedad muscadine y no elagitaninos procedentes de la madera del roble. Existen importantes diferencias entre estos dos tipos de elagitaninos, principalmente por el número de restos del ácido gálico que presenta su estructura y por la existencia de enlaces C-C entre los ciclos aromáticos y el azúcar. Como consecuencia sus propiedades de polaridad y reactividad son diferentes. Para separar los elagitaninos del resto de componentes de las uvas, estos autores desarrollaron un método de doble fraccionamiento de las muestras basado en la diferente afinidad de los compuestos polifenólicos presentes en las uvas por las fases estacionarias y eluyentes utilizados. En

primer lugar la muestra se fracciona utilizando cartuchos Sep-pak® C-18 de Waters, y en segundo lugar mediante cartuchos preparados manualmente cuya fase estacionaria es Sephadex LH-20. En concreto, la muestra se carga en el cartucho Sep-pak® C-18 previamente activado y acondicionado. La fracción que no queda retenida en el cartucho se recoge puesto que contiene los taninos más polares, entre ellos los elagitaninos. Para eluir el resto de compuestos se utiliza acetato de etilo eluyendo entre otros, el ácido elágico, y seguidamente metanol, para la elución de los antocianos junto a otros taninos de la uva. A continuación, la primera y tercera fracciones obtenidas se someten, por separado, a un nuevo fraccionamiento utilizando Sephadex LH-20 como fase estacionaria. Para la primera fracción se utiliza un gradiente isocrático empleando metanol como eluyente, mientras que la tercera fracción se fracciona utilizando primero una disolución hidrometanólica al 10 % para la elución de los antocianos y finalmente 100% de metanol para eluir el resto de polifenoles. A partir de la primera fracción se obtiene otra que contiene mayoritariamente los elagitaninos, la cual es analizada mediante HPLC-DAD-ESI-MS pudiendo detectar diversos picos cromatográficos atribuidos a los elagitaninos objeto de su estudio. Sin embargo, no todos los compuestos de estructura elagitanino eluyen en esta fracción. Por lo tanto, no existe en la bibliografía una metodología sencilla que haya sido desarrollada para el análisis de los elagitaninos de roble en muestras de vino y que posibilite de manera rápida y sencilla su detección y cuantificación.

3.2. Análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas. (Flamini y Traldi, 2010).

El análisis de los compuestos polifenólicos de alto peso molecular suele llevarse a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia. Como método de detección existen varias posibilidades, destacando la detección espectrofotométrica y la detección mediante espectrometría de masas, las cuales pueden usarse tanto por separado como conjuntamente. La cromatografía de líquidos de alta eficacia es la técnica de separación más ampliamente utilizada, principalmente por su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la

separación de especies no volátiles o termolábiles y, sobre todo, su gran aplicabilidad a un gran número de sustancias, entre ellas, los polifenoles. Su facilidad de adaptación a un grupo tan amplio de compuestos se debe a la posibilidad de aprovechar diversas características de las moléculas para llevar a cabo su separación, como su polaridad, su tamaño o su mayor afinidad por unos u otros disolventes.

Para el análisis de la mayor parte de los compuestos polifenólicos presentes en las uvas y el vino se suele emplear la cromatografía líquida en fase reversa, esto es, utilizando una fase estacionaria apolar de octadecilsilano (C-18) y una fase móvil polar. Los disolventes utilizados como fases móviles son diversos. Como disolventes acuosos destaca el empleo de disoluciones de ácidos orgánicos como el ácido fórmico, el ácido acético y el ácido trifluoroacético. Como disolventes no acuosos se suelen utilizar acetonitrilo y metanol.

Para la detección se utiliza normalmente la espectrofotometría en el UV-visible. Una posibilidad es la obtención de los espectros UV-visible de los compuestos que se separan, así como registrar la señal que proporcionan a una o a varias longitudes de onda. Existen compuestos polifenólicos capaces de absorber en el visible, como los antocianos, pero otros muchos, carentes de color, tan sólo proporcionan señal en la zona del espectro correspondiente al ultravioleta, como los ácidos benzoicos o los elagitaninos. Sin embargo, la detección mediante espectrofotometría no permite en muchos casos diferenciar entre compuestos puesto que, debido a sus similitudes estructurales, presentan el mismo espectro de absorción. Se requiere entonces otro método de detección que posibilite diferenciar estos compuestos entre sí.

La espectrometría de masas permite obtener información sobre el peso molecular de los compuestos analizados y, a la vez, sobre la estructura de la molécula, gracias al patrón de fragmentación que genera. La detección mediante espectrometría de masas se puede dividir en dos etapas, en la primera se generan los pseudoiones moleculares a partir de los componentes de la muestra, mientras que en la segunda estos iones son analizados, obteniendo el valor de la relación entre su masa y su carga (relación m/z). Para la generación de iones se pueden utilizar diversos mecanismos, siendo la ionización por electrospray la más empleada, basada en la formación de un aerosol a partir de la muestra en presencia de un fuerte campo eléctrico. De esta forma, la

muestra queda cargada y por repulsión electrostática dentro de las pequeñas gotas formadas los iones escapan a la fase gaseosa, formándose así una nube de iones gaseosos.

Para la detección de los iones generados existen diversos analizadores de masas. Los más empleados en el campo de los polifenoles son las trampas lineales de iones (LIT), los analizadores de simple cuadrupolo (Q1) y triple cuadrupolo (Q3) y los analizadores de tiempo de vuelo (TOF). El uso de unos u otros permite realizar diversos tipos de análisis. Los análisis más frecuentemente utilizados son análisis de masas total o *full* masas y análisis MS^n , dentro de los cuales destacan los análisis MS/MS por su versatilidad.

El análisis de masas total acoplado a la cromatografía líquida de alta eficacia permite obtener un espectro de las relaciones m/z de todos los iones generados a cada tiempo. Con este tipo de experimentos se puede obtener información cualitativa sobre la composición de la muestra, así como cuantitativa, a través de la cuantificación del área correspondiente a los picos obtenidos para las relaciones m/z . El análisis MS^n se basa en la fragmentación de uno de los iones generados y posterior análisis de los fragmentos formados. Normalmente este tipo de análisis se suele realizar a un nivel de MS/MS, esto es, obteniendo el patrón de fragmentación de uno de los iones generados durante la ionización de la muestra. Este experimento proporciona por lo tanto información sobre la estructura de la molécula, puesto que los iones detectados son fragmentos de la molécula cargados. Además, el análisis MS/MS, en un analizador triple cuadrupolo permite realizar diversos experimentos:

- **Análisis de iones producto:** En este experimento se selecciona la relación m/z para un ion precursor y se analizan todos los iones fragmento que se obtienen.
- **Análisis de iones precursores:** Con este experimento se pueden identificar todos los iones precursores en cuya ruptura se genere un ion fragmento de una relación m/z determinada.
- **Análisis de pérdidas neutras:** En este experimento se identifican todas las parejas ion precursor/ion fragmento entre cuyas relaciones m/z exista una diferencia concreta como resultado de la pérdida de un fragmento sin carga.

- **Análisis de transiciones:** Este experimento permite identificar todos los iones precursores de una relación m/z determinada en cuya fragmentación se genere un ion fragmento de una relación m/z concreta, es decir, parejas ion precursor/ion fragmento de relaciones m/z previamente seleccionadas. Esta metodología permite una selectividad muy alta y a la vez una gran sensibilidad, puesto que elimina el ruido generado en el detector por todos los iones diferentes a los analizados al no permitir su llegada hasta éste.

En la bibliografía se ha utilizado la cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a la espectrometría de masas para la detección, identificación y cuantificación (como equivalentes de ácido elágico) de los elagitaninos en diversas muestras (Mämmelä *et al.*, 2000; Zywicki *et al.*, 2002). Sin embargo, existen pocos trabajos en los que se lleve a cabo un proceso de fraccionamiento de la muestra previo al análisis mediante HPLC.

En la metodología propuesta por Saucier y colaboradores (2006), el análisis de los elagitaninos se lleva a cabo mediante HPLC. Las fracciones en las que se encuentran los elagitaninos son analizadas mediante HPLC utilizando como fase móvil una disolución A [H₂O-HCOOH (990:10 v/v)] y una disolución B [MeOH-HCOOH (990:10 v/v)] utilizando un gradiente de elución con un flujo de 1 mL/min (0-35 min, 0-25% B; 35-45 min, 25-100% B; 45-50 min, 100% B). Estos autores emplean doble detección: espectrofotométrica a 280 nm y mediante espectrometría de masas en modo negativo mediante ionización por electrospray (ESI-MS).

Con el empleo de esta metodología Saucier y colaboradores (2006) son capaces de detectar los principales elagitaninos C-glucosídicos procedentes del roble, como vescalagina y castalagina. Para la cuantificación de estos compuestos, estos autores emplean rectas de calibrado generadas a partir de la señal obtenida en la detección mediante ESI-MS. Utilizan el ácido clorogénico como patrón interno para corregir la variabilidad de la señal obtenida mediante espectrometría de masas derivada de la variabilidad en la ionización de los analitos. La elección de este compuesto se basa en la ausencia de este analito en las muestras de vino procedentes de uvas *Vitis vinifera*, en su tiempo de retención relativamente corto y en que este compuesto ya había sido utilizado anteriormente como patrón interno para corregir la señal proporcionada por los elagitaninos en el análisis por espectrometría de masas (Salminen *et al.*, 2001). Sin

embargo, la diferencia estructural entre el ácido clorogénico y los elagitaninos hace pensar que pueden existir serias limitaciones en la utilidad de este compuesto como patrón interno para la cuantificación de los elagitaninos mediante espectrometría de masas.

Por su parte, Lee y colaboradores (Lee *et al.*, 2005) emplean también la cromatografía líquida de alta eficacia con doble detección. Sin embargo, su método cromatográfico emplea como fase acuosa una disolución de ácido ortofosfórico a pH 2,4 y como fase orgánica una disolución al 60% (v/v) de metanol en agua, adicificado también a pH 2,4 utilizando el mismo ácido. Se aplica un gradiente lineal a flujo 1 mL/min desde 0% hasta el 60% de B en 30 minutos, desde 60% hasta el 80 % de B en 10 minutos, desde 80 % de B a 100 % de B en 10 minutos y flujo isocrático al 100 % de B durante 10 minutos más, con un tiempo total de análisis de 60 minutos. Estos autores llevan a cabo la detección mediante espectrometría de masas utilizando la ionización por electrospray en modo negativo para un análisis cualitativo de las muestras. La cuantificación de los compuestos se realizó a partir de la señal obtenida en el detector de fotodiodos, cuantificando todos los compuestos en equivalentes de ácido elágico, para el cual se construyó una recta de calibrado.

OBJETIVOS



OBJETIVOS GENERALES

Como consecuencia de su estructura, los taninos hidrolizables o elagitaninos poseen unas propiedades oxidorreductoras que hacen que su presencia en el vino influya en gran medida en la evolución de su color, tanto por su efecto protector frente a la oxidación de los antocianos, como por su posible implicación en la combinación antociano-tanino que confiere una mayor estabilidad a los pigmentos. Estos compuestos proceden de la madera de roble de la que están fabricados los depósitos donde se elabora y/o envejece el vino, aunque su presencia en éste también puede estar relacionada con la utilización de diferentes técnicas enológicas como el empleo de virutas de roble o la adición de taninos enológicos, productos en cuya composición entran a formar parte, principalmente, los taninos hidrolizables y los taninos condensados.

El objetivo general de este trabajo es profundizar en el estudio de la influencia de los taninos hidrolizables (elagitaninos) y condensados (proantocianidinas) en el color del vino tinto y en su evolución. Con este objetivo, se desarrollará una metodología para el análisis de elagitaninos en vinos y se estudiará la importancia del tipo de depósito utilizado (tamaño, origen de la madera, etc.) en el perfil de elagitaninos durante el proceso de maduración y envejecimiento utilizado para la producción de vinos tintos de la variedad Tempranillo. Asimismo, se estudiará la influencia de los distintos taninos en la formación de pigmentos derivados de antocianos y en la estabilización del color. Para ello, tanto en medios modelo como en vinos, se monitorizará la evolución con el paso del tiempo de los pigmentos, mediante HPLC-DAD-MS, y del color, a través de la determinación de parámetros colorimétricos por colorimetría triestímulo. El estudio de la reactividad entre antocianos y elagitaninos servirá también para evaluar la posible influencia de este tipo de taninos sobre el color del vino tinto.

Los objetivos específicos que se pretenden alcanzar son:

Objetivo 1. Desarrollo de una metodología de análisis de taninos hidrolizables procedentes del roble (elagitaninos) en muestras de vino.

Objetivo 2. Efecto sobre el perfil de elagitaninos que tiene la utilización de distintos tipos de depósitos de roble durante la elaboración y el envejecimiento de vinos tintos.

Objetivo 3. Evaluación del efecto que ejerce la adición de taninos condensados e hidrolizables, a través de la adición de tanino enológico comercial, sobre la estabilidad y el color de disoluciones modelo de antocianos y de vinos tintos.

Objetivo 4. Estudio de la reactividad entre elagitaninos y antocianos y de las propiedades colorimétricas de los pigmentos derivados resultantes.

Los objetivos 1 y 2 se desarrollarán en el marco del Bloque I del apartado de Resultados y Discusión. Por su parte, el objetivo 3 se enmarca en el Bloque II y, finalmente, el Bloque III está dedicado a los trabajos desarrollados para la consecución del objetivo 4.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN





BLOQUE I:
ANÁLISIS DE ELAGITANINOS EN VINOS

CAPÍTULO 1:

PUESTA A PUNTO DE UN MÉTODO DE FRACCIONAMIENTO DEL VINO PARA EL ANÁLISIS DE ELAGITANINOS DE ROBLE

Habitualmente, antes de su comercialización, el vino se somete a un proceso de envejecimiento en barricas de madera de roble, consiguiendo con ello mejorar de manera sustancial sus propiedades organolépticas. Durante este proceso se produce la difusión de sustancias desde la madera de roble al vino, modificando su composición y, como consecuencia, produciendo cambios en su olor, color, astringencia y sabor (Glabasnia y Hofmann, 2006; Vivas y Glories, 1996; Puech *et al.*, 1999). Entre los compuestos que la madera de roble puede ceder al vino se encuentran los elagitaninos, una familia de taninos hidrolizables C-glucosídicos relacionados con el ácido elágico. Las estructuras más representativas de los elagitaninos C-glucosídicos son los monómeros castalagina y vescalagina, que junto con grandinina y roburina E representan más del 80 % del total de elagitaninos que pueden encontrarse en el vino (Jourdes *et al.*, 2011; Michel *et al.*, 2011). Estos compuestos poseen un gran número de grupos hidroxilo en su estructura que les permite participar en numerosas reacciones de oxidorreducción (Vivas y Glories, 1996). Entre ellas, estos compuestos pueden participar en ciertas reacciones que conllevan la modificación del color del vino durante el envejecimiento, ayudando a mejorar la estabilidad del mismo (mediante la formación de pigmentos más estables) y protegiéndolo frente a la oxidación (Vivas y Glories, 1996; del Álamo-Sanza *et al.*, 2004; del Álamo-Sanza y Nevares-Domínguez, 2006). Los elagitaninos pueden afectar también a la astringencia del vino (Glabasnia y Hofmann, 2006; Santos-Buelga y Scalbert, 2000) y, además, podrían ejercer cierta actividad biológica con posibles efectos beneficiosos sobre la salud (Fridrich *et al.*, 2008, Quideau *et al.*, 2003; Quideau *et al.*, 2005). Por estas razones, determinar la composición de elagitaninos en el vino resulta de gran interés. La cesión de estos compuestos desde la madera al vino es reducida y depende del tipo de madera empleado y de las condiciones y duración del proceso de envejecimiento (Fernández de Simón *et al.*, 2003). Esto, junto a su alta reactividad y la posibilidad de su hidrólisis generando ácido elágico, hace que sus niveles en el vino sean bajos en comparación con otros

componentes, y como consecuencia, que su detección no sea sencilla ni siquiera mediante técnicas ampliamente utilizadas para el análisis de compuestos fenólicos como la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). Debido a su similitud estructural, la separación cromatográfica de los elagitaninos mediante fase reversa es compleja, al igual que su identificación, ya que presentan el mismo espectro de absorción en el ultravioleta-visible y, al ser isómeros (castalagina y vescalagina; grandinina y roburina E), generan el mismo pseudoion molecular en el análisis mediante espectrometría de masas. Por las mismas razones, no existen patrones comerciales de estos compuestos y su aislamiento y purificación a partir de la madera de roble no es un proceso sencillo. Debido a esto, los trabajos que estudian de manera detallada la composición cuantitativa y/o cualitativa de elagitaninos en vinos son escasos en la bibliografía. La mayor parte de ellos determinan únicamente la concentración total de elagitaninos mediante un procedimiento de hidrólisis y la posterior cuantificación del ácido elágico liberado en el proceso (Peng *et al.*, 1991; Lee y Talcott, 2002; Nonier *et al.*, 2005; Chira y Teissedre, 2013), lo que imposibilita el análisis cualitativo y cuantitativo pormenorizado. Un análisis más detallado de la composición de elagitaninos, tanto en vinos (Saucier *et al.*, 2006; Jourdes *et al.*, 2011) como en otro tipo de alimentos (Lee *et al.*, 2005), requiere de un paso previo de fraccionamiento de la muestra que conlleve el aislamiento total o parcial de esta familia de compuestos del resto de componentes de la misma, permitiendo así su determinación. En las metodologías descritas para el análisis de elagitaninos (Saucier *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2005) se necesita un elevado volumen de muestra (aproximadamente 100 mL de vino), así como un proceso de purificación complejo en el que los elagitaninos están presentes en más de una fracción, lo que puede resultar un problema a la hora de su cuantificación.

1.1. Objetivos.

El principal objetivo de los trabajos englobados en este capítulo es desarrollar una metodología para el análisis de elagitaninos en muestras de vino más eficiente que las que se encuentran descritas en la bibliografía. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Obtención de patrones puros de los cuatro elagitaninos de roble más importantes en el vino (castalagina, vescalagina, grandinina y roburina E) a partir de virutas de madera de roble, mediante su extracción desde la virutas y su posterior purificación mediante cromatografía líquida de alta eficacia a escala semipreparativa.
- Puesta a punto de métodos de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) en fase reversa con detección por espectrometría de masas para el análisis de elagitaninos y de ácido elágico. Se requiere que el método de HPLC desarrollado consiga una buena separación de los elagitaninos que generan en espectrometría de masas pseudoiones moleculares de la misma relación m/z . De esta manera se posibilita la identificación y, en una etapa posterior, la cuantificación de estos compuestos mediante espectrometría de masas.
- Desarrollo y optimización de un método de fraccionamiento que permita el aislamiento de los elagitaninos del resto de constituyentes del vino con la finalidad de posibilitar su detección y cuantificación. Se pretende desarrollar un método sencillo que emplee volúmenes de muestra pequeños y permita obtener todos los elagitaninos de roble en una única fracción.

1.2. Resumen

Los trabajos realizados dieron lugar a la siguiente publicación:

García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Alcalde-Eon, C. Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines. *Analytica Chimica Acta*, **2010**, 660, 171-176.

En este estudio se desarrolló un proceso de fraccionamiento de muestras de vino con el objetivo de aislar los elagitaninos de roble del resto de los componentes del vino. El método consiste en una primera etapa de extracción en fase sólida utilizando un cartucho Sep-Pak® (C-18), seguido de una segunda etapa de fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una minicolumna de Sephadex LH-20 empaquetada manualmente. Este método presenta, como principales ventajas frente a los métodos existentes, la rapidez del análisis, el pequeño volumen de muestra requerido y, principalmente, la obtención de los elagitaninos en una única fracción, separados del resto de compuestos fenólicos del vino que interfieren en su análisis por HPLC-MS, como el ácido gálico.

Además, se pusieron a punto dos métodos de HPLC, uno para el análisis del ácido elágico y otro para el análisis de elagitaninos; así como un método de detección por espectrometría de masas para el análisis de estos compuestos. El método de HPLC desarrollado permite separar entre sí los elagitaninos que presentan el mismo peso molecular, facilitando su identificación mediante espectrometría de masas y posibilitando una futura cuantificación de estos compuestos.

Esta metodología permitió detectar e identificar los principales elagitaninos de roble en una muestra de vino adicionada con patrones de estos compuestos, así como en tres muestras de vino reales correspondientes a diferentes etapas del proceso de vinificación y envejecimiento del vino, y elaborados con uvas de diferentes variedades, demostrando la utilidad de la metodología desarrollada. Así, los trabajos realizados en este capítulo sirven como base para los objetivos de los siguientes capítulos.



Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines

Ignacio García-Estévez, M. Teresa Escribano-Bailón*, Julián C. Rivas-Gonzalo, Cristina Alcalde-Eon

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2009

Received in revised form 5 October 2009

Accepted 10 October 2009

Available online 17 October 2009

Keywords:

Oak ellagitannins

Red wine

High performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry

Fractionation

Characterisation

ABSTRACT

During maturation and ageing in oak barrels wines improve their organoleptic properties. Ellagitannins can be released from wood to the wine and be involved in oxidation reactions and seem to influence the astringency and colour properties of the wine.

Nevertheless, the ellagitannins levels are lower than those of other wine constituents and, consequently, they are not easily detected. This study has developed a two-step fractionation method consisting of a solid phase extraction in C-18 Sep-Pak® cartridges followed by size exclusion chromatography in hand-packed Sephadex LH-20 minicolumn for the detection of oak ellagitannins in different types of wines. An HPLC method has also been developed which allows the separation of compounds with the same m/z ratios, facilitating the ellagitannin identification by means of the mass spectrometric analyses. The main oak ellagitannins (grandinin, vescalagin, roburin E and castalagin) were isolated, detected separately and identified in a spiked wine and in three real ones, proving the usefulness of the fractionation method.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Tel.: +34 923294537; fax: +34 923294515.

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

CAPÍTULO 2:

VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ELAGITANINOS DE ROBLE EN VINOS.

El envejecimiento del vino en barrica de roble se lleva a cabo con el objetivo de mejorar su calidad. La importancia del uso de este tipo de madera, así como los diversos compuestos que pueden cederse desde la madera al vino durante el envejecimiento, ha sido explicada detalladamente en la introducción de la presente memoria de tesis. Entre los compuestos cedidos por la madera se ha destacado a los elagitaninos por el papel que pueden jugar en la modulación y evolución de la astringencia y del color del vino tinto (Chassaing *et al.*, 2010; Glabasnia y Hofmann, 2006; Hofmann *et al.*, 2006; Vivas y Glories, 1996). Desde un punto de vista cuantitativo, castalagina y vescalagina son los elagitaninos más abundantes, junto con la grandinina y roburina E (Cadahía *et al.*, 2001; Jourdes *et al.*, 2009; Scalbert *et al.*, 1990). Sin embargo, la importante reactividad de estos compuestos hace que sus niveles en el vino sean mucho más bajos que los de otros compuestos, lo que conlleva que su detección y cuantificación sea complicada. Como consecuencia, su análisis en vinos requiere de un paso previo de fraccionamiento de la muestra. En el capítulo anterior se ha desarrollado un método de fraccionamiento de las muestras del vino que permite aislar los elagitaninos del resto de compuestos fenólicos presentes en el vino que pueden afectar a su análisis mediante HPLC (García-Estévez *et al.*, 2010). Además el método de HPLC descrito permite separar entre sí los elagitaninos con igual peso molecular, aunque aún existe cierto solapamiento entre los picos cromatográficos correspondientes a los cuatro elagitaninos anteriormente mencionados. Esto imposibilita llevar a cabo una cuantificación precisa a partir de las áreas de los picos obtenidos en el cromatograma y hace necesario el uso de la espectrometría de masas para la cuantificación (García-Estévez *et al.*, 2010). Sin embargo, la cuantificación mediante espectrometría de masas presenta ciertos problemas relacionados con la variabilidad de la señal, consecuencia de la variabilidad en el proceso de ionización de la muestra, incluso en análisis llevados a cabo de manera consecutiva. Es necesario, por tanto, emplear un patrón interno para corregir esta variabilidad. La elección del

patrón interno más adecuado suele ser una tarea compleja, ya que el compuesto seleccionado debe cumplir ciertos requisitos, como no estar presente en las muestras analizadas o poseer una estructura similar a la de los compuestos a cuantificar, entre otros. En estudios existentes en la bibliografía, se ha empleado el ácido clorogénico como patrón interno para la cuantificación de los elagitaninos mediante espectrometría de masas, a pesar de la remarcable diferencia entre su estructura y la de los elagitaninos (Jourdes *et al.*, 2011; Salminen *et al.*, 2001; Saucier *et al.*, 2006). Sin embargo, en el marco de los trabajos desarrollados en esta Tesis doctoral, se han llevado a cabo estudios preliminares utilizando estas metodologías de análisis sin obtener resultados satisfactorios.

2.1. Objetivos.

El principal objetivo de los trabajos llevados a cabo en este capítulo es desarrollar y validar un método de cuantificación mediante espectrometría de masas que permita cuantificar los elagitaninos de roble en muestras de vino, previo fraccionamiento de éstas mediante el método descrito en el capítulo anterior (García-Estévez *et al.*, 2010). Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Optimización de las condiciones de espectrometría de masas para cada elagitanino a cuantificar (castalagina, vescalagina, grandinina y roburina E).
- Selección de un patrón interno que permita corregir la variabilidad de la señal obtenida mediante espectrometría de masas, posibilitando el empleo de esta técnica para la cuantificación de los elagitaninos de roble.
- Desarrollo de un modelo de cuantificación individual para cada uno de los elagitaninos de roble previamente mencionados.
- Validación de los modelos de cuantificación desarrollados.

2.2. Resumen

Los trabajos realizados dieron lugar a la siguiente publicación:

García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Alcalde-Eon, C. Validation of a mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins in wine samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2012**, 60, 1373-1379.

En este estudio se ha desarrollado y validado un método de cuantificación mediante espectrometría de masas para cuantificar los elagitaninos de roble en muestras de vino, previo fraccionamiento empleando el método descrito en el capítulo anterior (García-Estévez *et al.*, 2010). Los ensayos preliminares llevados a cabo utilizando el ácido clorogénico como patrón interno, mostraron que este compuesto no permitía corregir la variabilidad de la señal de la castalagina. Asimismo, con estos estudios se puso por primera vez de manifiesto que la presencia del ácido clorogénico en la disolución inducía la degradación de la castalagina, indicando que este compuesto afecta a la estabilidad de los elagitaninos y, por tanto, no es posible utilizarlo como patrón interno.

El método desarrollado emplea como patrón interno para corregir la variabilidad de la señal de masas la (-)-galocatequina, ya que, entre los compuestos ensayados, fue el único que demostró corregir de manera reproducible dicha variabilidad. Este método permite la cuantificación individual de los principales elagitaninos de roble presentes en el vino, presentando una buena exactitud y precisión y límites de detección y cuantificación suficientemente bajos. Los mejores resultados se obtuvieron mediante el análisis de transiciones (*multiple reaction monitoring analysis*, MRM), ya que los modelos de cuantificación construidos a partir de las señales obtenidas mediante ese tipo de análisis mostraban los valores de exactitud y precisión más altos y menores límites de detección y cuantificación. La utilización de la metodología desarrollada permitió detectar y cuantificar los elagitaninos presentes en diferentes vinos comerciales elaborados en España, probando su utilidad en muestras reales.

Los trabajos englobados en este capítulo, junto con el capítulo anterior, sirven de base analítica para los ensayos realizados en el siguiente capítulo.

Validation of a Mass Spectrometry Method To Quantify Oak Ellagitannins in Wine Samples

Ignacio García-Estévez, M. Teresa Escribano-Bailón,* Julián C. Rivas-Gonzalo, and Cristina Alcalde-Eon

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

ABSTRACT: Detection and individual quantification of oak wood ellagitannins in oak barrel aged red wine samples are difficult mainly due to their low levels and the similarity between their structures. In this work, a quantification method using mass spectrometry has been developed and validated to quantify wine ellagitannins after sample fractionation with a previously reported method. The use of an internal standard is a requirement to correct mass signal variability. (–)-Gallocatechin, among the different tested compounds, was the only one that proved to be a suitable internal standard making possible the accurate and individual quantification of the main oak wood ellagitannins. The developed methodology has been used to detect and quantify these ellagitannins in different Spanish commercial wines, proving its usefulness.

KEYWORDS: oak ellagitannins, red wine, mass spectrometry, quantification, internal standard

Received: September 21, 2011

Revised: January 5, 2012

Accepted: January 23, 2012

Published: January 23, 2012

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

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

Funding

We thank Spanish MICINN and FEDER (Project ref AGL2008-05569-C02-01 and AGL2011-30254-C02-01) and Junta de Castilla y Leon (group GR133) for financial support. We also thank Spanish Ministerio de Educacion for an FPU predoctoral scholarship to I.G.-E.

CAPÍTULO 3:

PERFIL DE ELAGITANINOS DEL VINO TINTO EN FUNCIÓN DEL TIPO DE MADERA DE ROBLE EMPLEADA EN EL PROCESO DE ELABORACIÓN Y ENVEJECIMIENTO.

La madera de roble empleada para el envejecimiento de los vinos tintos presenta diferentes características en función su origen botánico. Consecuentemente, la influencia que esta madera puede ejercer sobre las propiedades organolépticas del vino durante su envejecimiento podrá también variar en función del tipo de roble. Como se explicó en la introducción de esta memoria de tesis, las tres especies de roble más utilizadas en la elaboración de barricas destinadas al envejecimiento del vino son: dos especies de origen europeo, designadas de manera general como roble francés (*Quercus petraea* y *Q. robur*) y una especie de origen estadounidense, designada de manera general como roble americano (*Q. alba*). Existen grandes diferencias tanto en la anatomía de la madera como en la composición fenólica y volátil en función del origen botánico de ésta (Chatonnet y Dubordieu, 1998; Masson *et al.*, 1995; Prida y Puech, 2006; Alañón *et al.*, 2011). En lo que a contenido de elagitaninos se refiere, se ha podido constatar importantes diferencias entre la madera de roble americano y la de roble francés, siendo la concentración de éstos mucho menor en el roble americano (Chatonnet y Dubordieu, 1998; Masson *et al.*, 1995; Prida y Puech, 2006; Scalbert *et al.*, 1988).

Por otro lado, es habitual que las barricas se utilicen en más de una ocasión, es decir, se empleen para el envejecimiento de vinos en diferentes añadas. Como consecuencia del uso repetido de las barricas, su potencial de cesión de elagitanino se ve drásticamente reducido, como resultado de un agotamiento de las capas más externas de la madera a las que tiene acceso el vino (Zamora, 2003).

Apenas existen trabajos en la bibliografía centrados en la determinación de los elagitaninos en vinos elaborados utilizando diferentes tipos de barricas de roble y, además, la mayoría de ellos únicamente analizan la composición de los mismos al final del periodo de envejecimiento (Glabasnia y Hofmann, 2006; Masson *et al.*, 1995). Jourdes y colaboradores (Jourdes *et al.*, 2011) realizaron un estudio de la evolución de los elagitaninos durante el proceso de envejecimiento en función de si el

envejecimiento se llevaba a cabo utilizando barrica de roble francés o depósitos de acero inoxidable junto con la adición de virutas del mismo roble. Sin embargo, no existen en la bibliografía trabajos que comparen la evolución de los elagitaninos en vinos envejecidos en barricas de roble con diferentes características. Debido al papel que estos compuestos pueden jugar durante el envejecimiento en las reacciones de oxidorreducción y en la modulación de ciertas propiedades organolépticas del vino, como el color o la astringencia, resulta interesante conocer las diferencias en el perfil de elagitaninos a lo largo del proceso de elaboración en función del tipo de barrica utilizado. Además, debido al diferente coste de las barricas en función del origen botánico del roble empleado para su fabricación, es también interesante saber si existen diferencias en el perfil de elagitaninos en función de si el roble es de origen francés o de origen americano, así como si la barrica es nueva o seminueva. Por otra parte, como los diferentes elagitaninos presentan distintas actividades biológicas y distinta reactividad (Quideau *et al.*, 2005; Jourdes *et al.*, 2009), es importante estudiar si el contenido individual de los elagitaninos en el vino está influido por el tipo de madera de roble utilizado.

3.1. Objetivos.

El principal objetivo de los trabajos llevados a cabo en este capítulo es estudiar la evolución de los elagitaninos durante el proceso de elaboración y envejecimiento del vino en función de las características de los depósitos y barricas de roble utilizados en estos procesos. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la influencia de llevar a cabo la fermentación alcohólica en tinas de roble francés nuevas o usadas sobre el perfil de elagitaninos del vino.
- Estudiar la influencia de llevar a cabo la fermentación maloláctica en tina o en barrica sobre el perfil de elagitaninos del vino.
- Estudiar la influencia de llevar a cabo el envejecimiento en barricas de roble francés nuevas o seminuevas sobre el perfil de elagitaninos del vino.
- Estudiar la influencia de llevar a cabo el envejecimiento en barricas de roble francés o de roble americano sobre el perfil de elagitaninos del vino.

3.2. Resumen.

Los resultados derivados de los trabajos realizados en el marco de este capítulo están siendo preparados para su publicación:

García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Alcalde-Eon, C. Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile. (*redactado*).

En este estudio se ha puesto de manifiesto la influencia que tiene el tipo de depósito de madera de roble utilizado para la elaboración y envejecimiento del vino en su contenido en elagitaninos. El empleo de depósitos nuevos durante la fermentación alcohólica conlleva mayores niveles de elagitaninos en los vinos. Además, el tipo de depósito utilizado para la fermentación maloláctica condiciona los niveles de elagitaninos que se alcanzan durante el envejecimiento, así como el momento en el que estos niveles son máximos. Los niveles de elagitaninos durante la fermentación maloláctica son mayores cuando ésta tiene lugar en barricas, lo que podría influir en la composición fenólica del vino y su evolución, así como en propiedades organolépticas como el color o la astringencia.

Además, el tipo de madera (francés o americano) y la edad de la barrica (nueva o seminueva) utilizados afectan al contenido y a la evolución individual de los elagitaninos de roble durante el envejecimiento del vino tinto. Los vinos envejecidos utilizando barricas francesas nuevas presentan los mayores contenidos de elagitaninos durante todo el estudio, mientras que aquellos envejecidos en barricas americanas nuevas presentan contenidos mucho menores; pero similares a los que fueron envejecidos utilizando barricas francesas seminuevas. Por otro lado, los vinos que se envejecieron en barricas francesas (tanto nuevas como seminuevas) presentaron una relación vescalagina/castalagina mayor que aquellos envejecidos en barricas americanas nuevas, lo que apunta a un posible uso de esta relación como indicador del origen botánico de la madera de la barrica. La aplicación de herramientas quimiométricas, como el análisis discriminante, a los resultados permitió agrupar las muestras en tres grupos diferentes en función del tipo de barrica empleados para el envejecimiento (barrica francesa nueva, francesa seminueva y americana nueva),

independientemente del proceso de elaboración llevado a cabo. Así, la composición de elagitaninos, mediante la aplicación de técnicas quimiométricas, podría ser un indicador del tipo de bodega empleado para el envejecimiento del vino.

1 **Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile**

2 I. García-Estévez, M.T. Escribano-Bailón*, J.C. Rivas-Gonzalo, C. Alcalde-Eon

3 *Grupo de Investigación en polifenoles (GIP). Unidad de Nutrición y Bromatología. Facultad de*
4 *Farmacia. Universidad de Salamanca. Spain.*

5 *Tel: +34 923294537. Fax:+34 923294515*

6 *corresponding author: M.T. Escribano-Bailón (escriban@usal.es)

7 8 **Abstract**

9 Oak ellagitannins are found in wine as a result of its aging in oak barrels. In this work the
10 influence that the oak wood type (French or American) and age (first-fill or second-fill) of the
11 barrels have on the individual ellagitannin content and also on its evolution during the
12 winemaking and aging has been studied. The results showed that the type of barrel used in aging
13 determines the ellagitannin composition of the wines. Wines aged in new French oak barrels
14 showed contents of ellagitannins (maximum concentrations between 43 and 68 mg L⁻¹) ca. 2-
15 fold higher than wines aged in American and second-fill French ones (maximum concentrations
16 between 24 and 43 mg L⁻¹). Moreover wines aged in French oak barrels showed higher
17 vescalagin/castalagin ratio than wines aged in American oak barrels. Therefore, this ratio might
18 indicate the oak wood type of the barrel used for aging. Discriminant analysis allowed the
19 grouping of the wine samples in three different groups depending on the type of barrel
20 employed in wine aging.

21 **Keywords:** ellagitannins, HPLC-MS/MS-multiple reaction monitoring, red wine, oak barrels,
22 discriminant analysis

23 24 **Highlights**

25 The type of barrel used in aging determines the ellagitannin composition of the wines

26 Wines aged in new French oak barrels had the highest contents of ellagitannins

27 The vescalagin/castalagin ratio might be indicative of the oak type of the barrel used for aging

28 Discriminant analysis differentiated between wines aged in new French and in American oak barrels

29

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile

Publicación:

Oak wood in winemaking: influence on the wine ellagitannin profile



BLOQUE II:

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE TANINOS HIDROLIZABLES Y
CONDENSADOS EN LA COMPOSICIÓN DE PIGMENTOS Y
EL COLOR DEL VINO**

CAPÍTULO 4:

ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE TANINOS HIDROLIZABLES Y CONDENSADOS SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LOS PIGMENTOS Y EL COLOR EN SOLUCIONES MODELO Y VINOS EXPERIMENTALES.

La evolución del color del vino durante el envejecimiento es consecuencia principalmente de la desaparición y transformación de los antocianos en pigmentos derivados. En las reacciones de transformación de los antocianos en pigmentos derivados están involucrados otros compuestos presentes en el vino, como los flavanoles o el acetaldehído. Los elagitaninos de roble también han demostrado ejercer una influencia en la formación de alguno de estos pigmentos derivados, como consecuencia de su participación en las reacciones de oxidorreducción que tienen lugar durante el envejecimiento. La presencia de elagitaninos favorece la transformación del etanol en acetaldehído (Vivas y Glories, 1996) y ciertas reacciones de polimerización (Vivas y Glories, 1996; Timberlake y Bridle, 1976), por lo que estos compuestos pueden afectar indirectamente al color del vino. Como se ha explicado anteriormente, la presencia de elagitaninos en el vino es consecuencia del contacto de éste con la madera de roble durante su elaboración y envejecimiento. La fuente más habitual de estos compuestos son las barricas de roble donde se envejece el vino, aunque los elagitaninos también pueden extraerse de las duelas (*staves*) o virutas (*chips*) de roble utilizadas en ciertos sistemas alternativos de envejecimiento. También es habitual la adición durante el proceso de vinificación de taninos enológicos, una mezcla de proantocianidinas, galotaninos y elagitaninos obtenida a partir de diversas plantas, empleados con la finalidad de mejorar ciertas características del vino, como su color o su estabilidad, así como para compensar defectos en la composición fenólica.

Los efectos de la adición de un tanino enológico dependen de la composición de éste. Existen taninos enológicos indicados para mejorar el color y su estabilidad, mediante la protección de los pigmentos frente a la oxidación, así como otras características organolépticas relacionadas con el sabor. En cuanto al color, existe controversia en los resultados obtenidos por diferentes autores. Existen muchos estudios donde se indica que, como consecuencia de la adición de un tanino enológico, se observa un efecto sobre la intensidad del color (Bautista-Ortín *et al.*, 2007; Liu *et al.*,

2013; Manfroi *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2010). No obstante, otros indican que, a las concentraciones en que se utilizan estos productos, tales efectos son casi despreciables o nulos (Main y Morris, 2007; Parker *et al.*, 2007; Harbertson *et al.*, 2012), y pueden afectar negativamente a otras características organolépticas si se incrementa la dosis empleada (Harbertson *et al.*, 2012).

Por otra parte, el efecto que la adición de este tipo de productos tiene sobre la composición fenólica y/o el color de los vinos depende también de las características de la uva empleada (Bautista-Ortín *et al.*, 2007). Se han realizado estudios de los efectos del empleo de tanino enológicos en la elaboración de vinos a partir de uvas de diversas variedades, como Cabernet Sauvignon, Merlot, Shiraz, Cynthiana o Monastrell (Liu *et al.*, 2013; Main y Morris, 2007; Manfroi *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2010; Parker *et al.*, 2007), pero no existen en la bibliografía trabajos sobre los efectos que puede tener la adición de un tanino enológico en vinos elaborados a partir de uvas de la variedad Tempranillo, la variedad de uva tinta más cultivada en España.

4.1. Objetivos.

El principal objetivo de los trabajos englobados en este capítulo es evaluar el posible efecto que tiene la adición de un tanino enológico compuesto por flavanoles y elagitaninos en la composición de pigmentos y el color del vino. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la evolución de los cinco antocianos mayoritarios de las uvas *Vitis vinifera* L. y del color en disoluciones modelo en presencia de dos taninos enológicos diferentes, en cuya composición destacan los flavanoles y los elagitaninos de roble. Asimismo, se pretende evaluar el efecto ejercido por el medio donde se preparan dichos sistemas modelo: un vino sintético o un medio resultante del metabolismo fermentativo de la glucosa.
- Estudiar el efecto de la adición de uno de los taninos enológicos anteriormente estudiados en la evolución de los pigmentos y en el color de vinos experimentales elaborados a partir de uvas de la variedad Tempranillo utilizando dos cepas de levaduras diferentes.

4.2. Resumen.

Los resultados obtenidos en este capítulo están en fase de publicación:

García-Estévez, I.; Alcalde-Eon, C.; Puente, V.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigment composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines. (*redactado*).

En este trabajo se evaluaron los efectos de la adición de dos taninos enológicos diferentes, compuestos principalmente por flavanoles y elagitaninos, sobre la evolución de los pigmentos y el color tanto en sistemas modelo como en vinos tintos experimentales.

En cuanto a los sistemas modelo, la adición del tanino enológico mostró un efecto diferente en función del medio empleado. Los sistemas modelo preparados en el medio fermentativo presentaron los niveles de antocianos más bajos, como consecuencia de una mayor transformación de estos pigmentos. La adición de tanino enológico a este mismo medio conducía, al final del estudio, a mayores niveles de antocianos que el sistema modelo control, lo que podría explicarse por una mayor protección de estos compuestos frente a la oxidación. Esto podría estar relacionado con la presencia de elagitaninos en el tanino enológico utilizado, ya que esos compuestos participan en reacciones de oxidación-reducción consumiendo el oxígeno del medio. Además la adición del tanino, probablemente también como consecuencia de la presencia de elagitaninos en su composición, parece favorecer la formación de vitisinas de tipo A y tipo B. Además, el color de las muestras a las que se adicionó tanino enológico presentaban, al final del estudio, valores de luminosidad más bajos y valores de croma más altos. Así, la adición del tanino enológico podría favorecer una estabilización del color.

El estudio de la adición de tanino enológico en la elaboración de vinos utilizando dos cepas de levadura diferentes proporcionó resultados similares. Los vinos a los que se adicionó el tanino enológico mostraron una menor desaparición de antocianos con el tiempo, así como una mayor formación de vitisinas de tipo A y tipo B. En los vinos

se observó, además, que la adición del tanino enológico favorecía también la formación de derivados de la condensación entre flavanoles y antocianos, tanto directa como mediada por acetaldehído. Por una parte la adición del tanino enológico conlleva un aumento de los niveles de catequinas y proantocianidinas, necesarias para la síntesis de estos pigmentos derivados. Por otra, los elagitaninos han demostrado favorecer este tipo de reacciones, tanto por generar en el medio especies oxidantes reactivas que faciliten la finalización de la reacción, como por favorecer la formación de acetaldehído en el medio, por lo que su adición al vino a través de la adición del tanino enológico podría explicar esta mayor formación de pigmentos híbridos. Además, los vinos a los que se adicionó el tanino también mostraron valores de luminosidad más bajos y valores de croma más altos, coincidiendo así con los resultados observados en los sistemas modelo.

1 **Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigment**
2 **composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines**

3 García-Estévez, I.^a; Alcalde-Eon, C.^a; Puente, V.^b; Rivas-Gonzalo, J.C.^a; Escribano-
4 Bailón, M.T.^{a,*}

5 ^a Grupo de Investigación en Polifenoles. Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad
6 de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E 37007
7 Salamanca, Spain.

8 ^b Laffort España. Polígono Txirrita Maleo 12. Rentería, Spain. *corresponding author:
9 Tel: +34 923 294537. Fax: +34 923 294515. e-mail address: escriban@usal.es

10

11 **Abstract**

12 Oenological tannins are widely used in the winemaking process either to improve
13 different wine characteristics (color and stability among others) or to compensate for
14 low tannin levels. In this work the influence of the addition of two different oenological
15 tannins, mainly composed of hydrolysable (ellagitannins) and condensed tannins, on the
16 evolution of color and pigment composition of two different types of model systems
17 containing the five main grape anthocyanins has been studied. In addition, the effect of
18 the addition of an oenological tannin on the color and pigment composition of red wines
19 made from *Vitis vinifera* L. cv Tempranillo grapes was also assessed. Results showed
20 that addition of the oenological tannin favored the formation of anthocyanin-derived
21 pigments such as A-type and B-type vitisins and flavanol-anthocyanin condensation
22 products. Moreover, model systems containing the oenological tannins were darker and
23 showed higher values of chroma at the end of the study than control ones, indicating a
24 higher stabilization of color. The higher formation of these derivative pigments was also
25 observed in the red wines containing the oenological tannin. Moreover, these wines also
26 showed lower lightness values and higher chroma values than control wines.

27 **Keywords:** oenological tannin, anthocyanin, anthocyanin-derived pigments, vitisins,
28 Tempranillo red wine, red wine color.

29

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

Publicación:

Influence of the addition of oenological tannins on the color and pigments composition of red wines: an approach in model systems and experimental wines

CAPÍTULO 5:

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE TANINOS HIDROLIZABLES Y TANINOS CONDENSADOS SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA Y EL COLOR DEL VINO TINTO

En los trabajos realizados en el capítulo anterior se ha demostrado que la adición de un tanino enológico cuya composición está basada en flavanoles y elagitaninos podría favorecer la estabilización del color del vino mediante la transformación de los antocianos nativos de la uva en pigmentos derivados más estables. Sin embargo, en la bibliografía existe controversia sobre el efecto que pueden ejercer este tipo de productos sobre la evolución del color cuando son empleados en la elaboración de vinos a escala industrial a las dosis marcadas por el fabricante (Harbertson *et al.*, 2012, Parker *et al.*, 2007). Además, también se ha observado que el efecto que pueden tener los taninos enológicos sobre las características del vino está muy influenciado por las características de la uva empleada para su elaboración, por lo que puede depender tanto de la variedad de la uva como de la añada (Bautista-Ortín *et al.*, 2007).

El interés en el uso de este tipo de productos para la elaboración de vinos comerciales deriva, en muchos casos, de la necesidad de corregir ciertos defectos que presenta la uva de partida, como consecuencia de una maduración inadecuada. Normalmente la cosecha de la uva tiene lugar cuando ésta alcanza la madurez tecnológica, esto es, cuando la concentración de azúcares, el peso y la acidez total de la uva son los adecuados para la elaboración del vino que se desee obtener. Sin embargo, la calidad del vino también depende de su composición fenólica, ya que los compuestos fenólicos son los principales responsables, entre otros, del color, del cuerpo y de la astringencia de los vinos. Por ello, la uva de calidad debe presentar en el momento de cosecha, además de una óptima madurez tecnológica, un perfil de compuestos fenólicos adecuado para evitar defectos organolépticos en el vino. En los últimos años se ha observado, principalmente en años especialmente calurosos, un desfase entre el momento en el que se alcanza la madurez tecnológica y la madurez fenólica (Mira de Orduña *et al.*, 2010) como consecuencia de cambios en las condiciones climáticas. Esto hace que el perfil fenólico de la uva cuando ésta alcanza la madurez tecnológica no sea el adecuado y que, consecuentemente, los vinos que se

elaboren a partir de ella puedan resultar astringentes, amargos o presentar colores pobres o inestables con el tiempo. Por ello, en ocasiones resulta recomendable la adición de productos que puedan ayudar a paliar esta problemática, favoreciendo la extracción de compuestos desde la uva, o aportando otros que puedan ayudar a la estabilización del color. Como se ha indicado en la introducción de la presente memoria de Tesis, los elagitaninos de roble podrían indirectamente participar en la transformación de los antocianos nativos de la uva en pigmentos derivados más estables (Alcalde-Eon *et al.*, 2006b; Vivas y Glories, 1996; Timberlake y Bridle, 1976), por lo que su adición al vino como parte de un tanino enológico podría ser una solución para los problemas relacionados con la estabilidad del color derivados de un defecto en la composición fenólica de la uva. Asimismo, los taninos condensados también pueden estar involucrados en el color del vino, favoreciendo la extracción de pigmentos desde la uva al vino, intensificando el color de los pigmentos presentes mediante el fenómeno de copigmentación (Darias-Martín *et al.*, 2001; González-Manzano *et al.*, 2009), o bien participando directamente en reacciones de formación de pigmentos derivados.

5.1. Objetivos.

El principal objetivo planteado en este capítulo es comprobar si los efectos del empleo de un tanino enológico rico en flavanoles y elagitaninos sobre la composición de pigmentos y el color observados en el capítulo anterior son reproducibles en vinos elaborados a escala industrial en dos años consecutivos. Para ello se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de la adición del tanino enológico sobre la composición de flavanoles y ácidos hidroxicinámicos del vino por su implicación indirecta en el color.
- Estudiar el efecto que tiene la adición del tanino enológico sobre la composición de antocianos y la formación de pigmentos derivados.
- Determinar el efecto que la adición del tanino enológico tiene sobre el color del vino y su evolución.

5.2. Resumen

Los resultados obtenidos han dado lugar a la siguiente publicación

Alcalde-Eon, C.; García-Estévez, I.; Ferreras-Charro, R.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Ferrer-Gallego, R.; Escribano-Bailón, M.T. Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2014**. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.01.004 (*aceptada para su publicación*).

En este trabajo se han estudiado los efectos que tiene sobre la composición fenólica y el color de los vinos, la aplicación de dos técnicas enológicas diferentes: la adición de un tanino enológico en cuya composición destacan los flavanoles y los elagitaninos de roble, y el empleo de uvas sobremaduras.

Con respecto al tanino enológico, la evaluación de sus efectos se llevó a cabo mediante la comparación de la composición fenólica y el color de un vino al que se adicionó el tanino enológico (*vino tanino*) respecto a otro vino, elaborado a partir de las mismas uvas y envejecido siguiendo el mismo procedimiento pero sin dicha adición (*vino control*). Los efectos observados dependen, en parte, de la añada, es decir, las características de la uva influyen en los efectos que la adición del tanino enológico puede tener, como ya habían observado otros autores (Bautista-Ortín *et al.*, 2007). Sin embargo, se pudieron observar tendencias en común en ambos años.

Respecto a los flavanoles se ha observado, como consecuencia de la adición del tanino, un aumento en su contenido con respecto al *vino control*. Este aumento se puede explicar por dos motivos. En primer lugar, al añadir el tanino enológico al vino se están adicionando directamente flavanoles puesto que estos compuestos representan un porcentaje importante en su composición. Por otra parte, este aumento puede relacionarse con la liberación de proantocianidinas dímeras y monómeros de catequinas y galocatequinas debido a hidrólisis parciales de los oligómeros y polímeros de proantocianidinas del vino. Estas reacciones de hidrólisis parecen estar favorecidas por la adición del tanino enológico. Por ejemplo, para el caso de las catequinas monómero y de los dímeros de procianidinas se ha observado que, además de una mayor concentración inicial consecuencia de la adición directa vía el tanino

enológico, una vez finalizada la etapa de maceración, su contenido aumentaba en ciertos momentos del proceso, lo que sólo puede explicarse por una liberación de los mismos como consecuencia de hidrólisis de proantocianidinas con mayor grado de polimerización. El mismo efecto se observó para las galocatequinas y prodelfinidinas, aunque en este caso el aumento de los niveles por la simple adición del tanino es menor, ya que la composición del tanino enológico empleado en este estudio es menos rica en este tipo de compuestos que en procianidinas. En ambos casos se ha observado un efecto claro de la añada. En el segundo año estudiado el *vino control* mostraba un contenido importante de estos compuestos, por lo que el efecto de la adición del tanino enológico es menos remarcable que para el vino del primer año estudiado, donde los niveles de estos compuestos en el *vino control* eran menores. De esta forma, la composición de flavanoles de la uva puede determinar el efecto de la adición del tanino enológico, siendo mayor cuanto menor sea el contenido inicial en flavanoles.

Para el caso de los ácidos hidroxicinámicos se ha observado un claro efecto de la añada en la evolución de los mismos, de manera que el impacto que tiene la adición del tanino enológico también difiere entre los dos años estudiados. El único patrón en común observado entre ambos años se relaciona con un aumento de las formas libres de estos ácidos por su liberación mediante la hidrólisis de los correspondientes ésteres tartáricos durante la fermentación maloláctica. Esta hidrólisis se vio favorecida por el tanino enológico, de manera que en el *vino tanino* se observó un mayor aumento de las formas libres de los ácidos hidroxicinámicos.

En cuanto a los pigmentos, se ha observado que la adición del tanino durante el proceso de maceración y fermentación conlleva un aumento del contenido de antocianos en el vino con respecto al *vino control*, lo que puede indicar que el tanino enológico favorece la extracción de estos compuestos desde el hollejo. Esto coincide con los resultados obtenidos por otros autores que aseguran que la presencia de compuestos fenólicos que puedan interactuar con los antocianos mediante el fenómeno de copigmentación (como los flavanoles y ácidos fenólicos (Boulton, 2001; Malien-Aubert *et al.*, 2002), o los elagitaninos (Chassaing *et al.*, 2010)) puede favorecer la extracción de los antocianos del hollejo de la uva (Boulton, 2001; Darias-Martín *et al.*, 2001; González-Manzano *et al.*, 2009). Durante el proceso de envejecimiento parece que

la presencia del tanino enológico puede tener dos efectos. Por un lado, como se verá más adelante, puede conllevar una mayor transformación de los antocianos en pigmentos derivados. Sin embargo también puede ejercer un efecto protector frente a la oxidación, por lo que, durante el proceso de envejecimiento, no se observan diferencias remarcables en el contenido de antocianos entre el *vino tanino* y el *vino control*.

Con respecto a los pigmentos derivados de antociano se observaron diferencias en función del pigmento estudiado. Para los derivados de la condensación directa entre flavanoles y antocianos, como consecuencia de la adición del tanino se produjo un aumento en formación de este tipo de pigmentos, debido principalmente a una mayor disponibilidad de flavanoles en el medio. En la bibliografía se ha demostrado que la presencia en el medio de otros compuestos como los elagitaninos puede favorecer la formación de este tipo de pigmentos (Alcalde-Eon *et al.*, 2006b; Vivas y Glories, 1996), por lo que la adición del tanino enológico, además de aumentar la disponibilidad de sustratos, puede favorecer la reacción.

Para el carboxipiranoantociano derivado de la malvidina 3-O-glucósido (vitisina A de malvidina 3-O-glucósido) se observó una mayor formación en el *vino tanino* que en el *vino control*. Para la formación de las vitisinas de tipo A es necesaria la presencia en el medio del antociano y del ácido pirúvico, pero también se necesitan oxidantes para completar la reacción. Como consecuencia de la adición del tanino enológico los niveles de elagitaninos se incrementaron, favoreciendo la aparición en el medio de especies oxidantes reactivas que pueden intervenir en la formación de la vitisina A de malvidina, explicando así la mayor formación de este pigmento en el *vino tanino* con respecto al *vino control*.

Para el piranoantociano malvidina 3-O-glucósido-vinilfenol no se observó un efecto de la adición del tanino enológico. Este piranoantociano se puede formar por reacción del antociano con el vinilfenol o con su precursor (ácido *p*-cumárico) directamente, por lo que un mayor contenido de este ácido en el vino puede correlacionarse con una mayor formación de este pigmento. La adición del tanino enológico no conllevó un aumento significativo en los niveles de este ácido, por lo que era esperable que tampoco ejerciese un efecto en la aparición de este pigmento,

indicando además que la mayor presencia de elagitaninos no favorece la síntesis de este derivado. Sin embargo, debido a la gran diferencia en el contenido de este ácido entre los dos años estudiados, se ha podido observar que la formación de este piranoantociano sí está muy influida por la añada.

Con respecto al color, la adición del tanino enológico tuvo una clara influencia sobre la claridad (L^*) de los vinos. Se observaron valores de L^* más elevados en el *vin*o control que en el *vin*o tanino, es decir, los vinos tratados enológicamente resultaron más oscuros. Respecto al croma (C^*_{ab}), la tendencia en la evolución de este parámetro difería ligeramente entre los dos añadas estudiadas. Sin embargo, en ambos casos, en los primeros puntos de muestreo se observaron valores del croma más elevados en los vinos a los que se adicionó el tanino enológico, consecuencia de la mayor cantidad de antocianos que presentaban estos vinos, lo que también explica los valores iniciales más bajos de L^* . Para los valores del tono (h_{ab}) existía también un gran efecto de la añada, mientras que la adición del tanino no presentó un efecto claro.

Se ha llevado a cabo además un análisis de componentes principales (PCA) a partir del conjunto de los resultados obtenidos para evaluar cuáles de las variables estudiadas pueden explicar mejor las diferencias entre los *vin*os control y los *vin*os tanino. Se observó que las variables que mejor diferencian estos dos tipos de vinos entre sí son el contenido de antocianos y el contenido de flavanoles. Esta diferenciación era más clara en los vinos elaborados en el primer añada que en la segunda, como consecuencia del menor contenido en flavanoles del *vin*o control en la primera añada.

En resumen, como consecuencia de la adición del tanino enológico se observaron en los vinos unos contenidos de flavanoles más elevados, principalmente de catequinas y procianidinas dímeras. Asimismo, se favorece la hidrólisis de los ésteres de los ácidos hidroxicinámicos, causando el aumento de los niveles de las formas libres de estos ácidos. Se observó también que la adición del tanino favorece la extracción de antocianos desde el hollejo de la uva, así como la formación tanto de derivados de la condensación directa entre flavanoles y antocianos, como de vitisinas de tipo A, no así de piranoantocianos de vinilfenol. Además, los vinos tratados con el tanino enológico resultaron más oscuros que los vinos control. Por lo tanto, la adición

de este tanino, es decir, un aporte extra de taninos hidrolizables y taninos condensados al vino, puede ser útil para resolver las deficiencias en pigmentos de las uvas, así como para favorecer la síntesis de pigmentos derivados, ayudando a la estabilización química del color.

Manuscript Number: JFCA-D-13-00281R2

Title: Addition of oenological tannin versus overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Article Type: Original Research Article

Keywords: Food analysis, Food composition, Tempranillo red wine, HPLC-DAD-MSn, climate change, oenological tannin, flavanols, phenolic acids, anthocyanins, CIELAB.

Corresponding Author: Prof. Maria Teresa Escribano-Bailon, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Universidad de Salamanca

First Author: Cristina Alcalde-Eon, Ph.D

Order of Authors: Cristina Alcalde-Eon, Ph.D; Ignacio García-Estévez; Rebeca Ferreras-Charro; Julián C Rivas-Gonzalo, Ph.D; Raúl Ferrer-Gallego, Ph.D; Teresa Escribano-Bailón, Ph.D

Abstract: The effects on the phenolic composition (flavanols, phenolic acids and anthocyanins) and on CIELAB colour parameters of two different oenological practices (addition of oenological tannin or use of overripe grapes) aiming at compensating for wine quality deficiencies have been evaluated in red wines made from Tempranillo grapes in two consecutive vintages. Both the addition of oenological tannin and the use of overripe grapes increased, in general, hydroxycinnamic acids and pigment contents. However, the effect of the former was noticeable above all in early stages of winemaking and ageing whereas the effect of the latter was observable in late stages of ageing. Respecting flavanols, the content was generally increased in wines treated with oenological tannin and decreased in wines made from overripe grapes in relation to control wines. Colour differences (ΔE_{ab}) between control and treated wines were in some stages higher than 3, indicating that the colour modifications caused by both treatments can be detectable by the human eye. Results showed that the addition of the oenological tannin to wine will be useful in solving deficiencies in flavanol and pigment contents whereas the use of overripe grapes will be useful above all when a stabilization of the colouring matter is required.

1 **Addition of oenological tannin *versus* overripe grapes. Effect on the phenolic**
2 **composition of red wines.**

3 C. Alcalde-Eon, I. García-Estévez, R. Ferreras-Charro, J.C. Rivas-Gonzalo, R. Ferrer-
4 Gallego, M.T. Escribano-Bailón

5

6 Grupo de Investigación en Polifenoles. Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad
7 de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E 37007
8 Salamanca, Spain. Tel: +34 923 294537. Fax: +34 923 294515

9 e-mail:

10 C. Alcalde-Eon: a51711@usal.es

11 I. García-Estévez: igarest@usal.es

12 R. Ferreras-Charro: rferrerasch@usal.es

13 J.C. Rivas-Gonzalo: jcrivias@usal.es

14 R. Ferrer-Gallego: rauferga@usal.es

15 M.T. Escribano-Bailón: escriban@usal.es

16 Corresponding autor: M.T. Escribano-Bailón

17

18 **Abstract**

19 The effects on the phenolic composition (flavanols, phenolic acids and anthocyanins)
20 and on CIELAB colour parameters of two different oenological practices (addition of
21 oenological tannin or use of overripe grapes) aiming at compensating for wine quality
22 deficiencies have been evaluated in red wines made from Tempranillo grapes in two
23 consecutive vintages. Both the addition of oenological tannin and the use of overripe
24 grapes increased, in general, hydroxycinnamic acids and pigment contents. However,
25 the effect of the former was noticeable above all in early stages of winemaking and
26 ageing whereas the effect of the latter was observable in late stages of ageing.
27 Respecting flavanols, the content was generally increased in wines treated with
28 oenological tannin and decreased in wines made from overripe grapes in relation to
29 control wines. Colour differences (ΔE_{ab}) between control and treated wines were in
30 some stages higher than 3, indicating that the colour modifications caused by both
31 treatments can be detectable by the human eye. Results showed that the addition of the
32 oenological tannin to wine will be useful in solving deficiencies in flavanol and pigment
33 contents whereas the use of overripe grapes will be useful above all when a stabilization
34 of the colouring matter is required.

35

36

37 **Keywords**

38 Food analysis, Food composition, Tempranillo red wine, HPLC-DAD-MSⁿ, climate
39 change, oenological tannin, flavanols, phenolic acids, anthocyanins, CIELAB.

40

41

42 **Highlights**

43 Addition of oenological tannin may solve deficiencies in flavanol and pigment contents

44 The use of overripe grapes might contribute to the stabilization of the colouring matter

45 Synthesis of Vinylphenol-type pyranoanthocyanins is favoured in Overripe wine

46 Synthesis of Vitisin A is favoured in Tannin wine

47 Both oenological treatments lead to darker wines (lower L* values)

48

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.

Publicación:

Adding oenological tannin vs. overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines.



BLOQUE III:

PIGMENTOS HÍBRIDOS ANTOCIANO-ELAGITANINO

CAPÍTULO 6:**HEMISÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y CROMÁTICA DE PIGMENTOS HÍBRIDOS DELFINIDINA 3-O-GLUCÓSIDO-VESCALAGINA.**

El color del vino tinto evoluciona durante el envejecimiento principalmente como consecuencia de la desaparición de los antocianos nativos de la uva y su transformación en nuevos pigmentos, normalmente más estables. Se ha explicado, en la introducción de esta memoria de tesis, las diversas posibilidades de reactividad de los antocianos, generando, entre otros, pigmentos derivados de la condensación con flavanoles o pigmentos resultantes de reacciones de cicloadición (piranoantocianos). Estos pigmentos presentan diferentes propiedades colorimétricas y diferente estabilidad que los antocianos originales, jugando un papel importante en el color del vino.

Entre los diferentes compuestos que pueden reaccionar con los antocianos se encuentran los elagitaninos, presentes en el vino como consecuencia de su envejecimiento en contacto con la madera de roble. Entre los elagitaninos que pueden encontrarse en el vino, sólo la vescalagina ha demostrado reaccionar con los antocianos, habiendo sido posible obtener, por hemisíntesis, pigmentos híbridos formados por una unidad vescalagina y una unidad malvidina o malvidina 3-O-glucósido, unidas por un enlace C-C entre el C1 de la vescalagina y el C8 del antociano (Chassaing *et al.*, 2010). Sin embargo, esta reacción no se observa para el caso de la castalagina (Quideau *et al.*, 2005). Además, estos autores han demostrado la formación de estos pigmentos híbridos en vino sintético, confirmando la posibilidad de que estas reacciones de condensación ocurran en el vino. Las propiedades colorimétricas de estos pigmentos híbridos son muy diferentes a las de los antocianos originales, mostrando tonalidades violáceas, de acuerdo con el desplazamiento batocrómico de aproximadamente 20 nm observado en el máximo de la banda del visible de su espectro de absorción (Chassaing *et al.*, 2010). El comportamiento de estos pigmentos frente a los cambios de pH en disoluciones acuosas también difiere del mostrado por el antociano original, lo que puede tener gran influencia sobre el color de las disoluciones en las que estos pigmentos estén presentes (Chassaing *et al.*, 2010). Parece,

por lo tanto, que además del papel indirecto que juegan los elagitaninos en las reacciones de modulación del color del vino a través de su participación en las reacciones de oxidorreducción (Vivas y Glories, 1996), estos compuestos podrían tener un efecto directo sobre el color del vino gracias a la formación de este tipo de pigmentos híbridos.

Aunque se ha investigado la reactividad de la vescalagina con la malvidina y la malvidina 3-*O*-glucósido, existen otros antocianos como los 3-*O*-glucósidos de delfinidina y petunidina que, en ciertas variedades de uvas, pueden ser cuantitativamente tan relevantes como los derivados de malvidina (García-Beneytez *et al.*, 2002; Revilla *et al.*, 2010). Asimismo, tanto el color (Heredia *et al.*, 1998), como el comportamiento frente al pH (Pina, 1998; Pina *et al.*, 2012) y la reactividad (Ichiyanagi *et al.*, 2004a; Ichiyanagi *et al.*, 2004b) de los antocianos dependen de su estructura, concretamente del patrón de sustitución del anillo B. Por esta razón es posible que existan diferencias entre la malvidina 3-*O*-glucósido y otros antocianos en su reactividad con la vescalagina.

6.1. Objetivos.

El principal objetivo de este capítulo fue estudiar la reactividad entre el antociano delfinidina 3-*O*-glucósido y el elagitanino vescalagina. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Hemisíntesis de pigmentos híbridos delfinidina 3-*O*-glucósido-vescalagina mediante reacción directa.
- Purificación, mediante HPLC a escala semipreparativa, de los diferentes productos de la reacción.
- Estudio, mediante HPLC-MS y RMN, de las estructuras de los principales productos purificados.
- Estudio de las propiedades cromáticas de los pigmentos híbridos delfinidina 3-*O*-glucósido-vescalagina caracterizados estructuralmente.

6.2. Resumen

La siguiente publicación recoge los resultados derivados de los trabajos realizados en este capítulo:

García-Estévez, I.; Jacquet, R.; Alcalde-Eon, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T.; Quideau, S. Hemisynthesis and structural and chromatic characterization of delphinidin 3-*O*-glucoside-vescalagin hybrid pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, 61, 11560-11568.

En este estudio se llevó a cabo la reacción entre la delphinidina 3-*O*-glucósido y la vescalagina obteniendo, entre otros productos, dos pigmentos híbridos resultantes de la condensación directa entre estos dos compuestos. Sus estructuras se determinaron mediante HPLC-MS y RMN. El isómero más abundante se identificó como 1-desoxivescalagina-(1 β →8)-delphinidina 3-*O*-glucósido, mientras que el minoritario se identificó como 1-desoxivescalagina-(1 β →6)-delphinidina 3-*O*-glucósido. En este trabajo se ha identificado por primera vez un compuesto de condensación entre antocianos y elagitaninos a través de la posición 6 del antociano. Estudios previos en los que la reacción se llevó a cabo entre la vescalagina y la malvidina o la malvidina 3-*O*-glucósido, este isómero no fue detectado (Chassaing *et al.*, 2010). Además, se ha demostrado que este isómero podía formarse a través de dos vías diferentes. Por un lado, mediante la reacción directa entre la vescalagina y la delphinidina 3-*O*-glucósido a través de la posición C6 del antociano. Por otro, a través de un equilibrio de regioisomerización a partir del isómero formado a través de la posición C8 del antociano. En este equilibrio, el isómero C8 se puede transformar en el otro isómero a través de un intermedio originado tras la apertura del heterociclo y giro alrededor del enlace C4'a-C4', seguido del cierre de nuevo del heterociclo.

Ambos pigmentos híbridos mostraron propiedades cromáticas muy diferentes a las de la delphinidina 3-*O*-glucósido, con un desplazamiento batocrómico de aproximadamente 20 nm en el máximo de la banda del visible del espectro de absorción con respecto al del pigmento original, lo que se traduce en una coloración violácea. Los pigmentos híbridos mostraron, además, coeficientes de extinción mucho

menores que el del pigmento original. La diferencia de color (ΔE^*_{ab}) entre los dos pigmentos híbridos a pH 1 era mayor que 3 unidades, es decir, podrían ser detectables por el ojo humano. Sin embargo, a pH 3,2 estos pigmentos presentaban colores indistinguibles entre sí.

Hemisynthesis and Structural and Chromatic Characterization of Delphinidin 3-O-Glucoside–Vescalagin Hybrid Pigments

Ignacio García-Estévez,[†] Rémi Jacquet,[§] Cristina Alcalde-Eon,[†] Julián C. Rivas-Gonzalo,[†] M. Teresa Escribano-Bailón,^{*,†} and Stéphane Quideau^{*,§}

[†]Grupo de Investigación en polifenoles (GIP), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, E37007 Salamanca, Spain

[§]Université de Bordeaux (ISM, CNRS-UMR 5255), Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac Cedex, France

ABSTRACT: During red wine maturation in the presence of oak wood, reactions involving anthocyanins and ellagitannins might affect wine organoleptic properties such as color and astringency. In this work, the condensation reaction between myrtillin (delphinidin 3-O-glucoside) and vescalagin has been performed to determine the behavior of this anthocyanin in this kind of reaction and to assess the possible impact of such a reaction in wine color modulation. Two different hybrid pigments have been hemisynthesized and characterized by HPLC-DAD-MS and NMR spectroscopy. These pigments have been identified as 1-deoxyvescalagin-(1 β →8)-myrtillin (major) and 1-deoxyvescalagin-(1 β →6)-myrtillin (minor). The minor pigment could be formed both by the condensation reaction and by a regioisomerization process from the major pigment. Moreover, the chromatic properties of these pigments have been studied and compared to those of myrtillin. The hybrid pigments showed an important bathochromic shift (ca. 20 nm) in the maximum absorbance wavelength and lower molar absorption coefficients.

KEYWORDS: C-glucosidic ellagitannin, oak wood, red wine, myrtillin (delphinidin 3-O-glucoside), vescalagin, anthocyanin reactivity

Received: July 30, 2013

Revised: November 6, 2013

Accepted: November 12, 2013

Published: November 12, 2013

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*(M.T.E.-B.) Phone: +34 923294537. Fax: +34 923294515. E-mail: escriban@usal.es.

*(S.Q.) Phone: +33 540003010. Fax: +33 54000221 5. E-mail: s.quideau@iecb.u-bordeaux.fr.

Funding

We thank the Spanish MICINN and FEDER (Project ref. AGL2008-05569-C02-01 and AGL2011-30254-C02-01), the Consolider-Ingenio 2010 Programme (ref FUNC-FOOD, CSD2007-00063), and the Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux for financial support. We also thank the Spanish Ministerio de Educación for an F.P.U. predoctoral scholarship to I.G.-E.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

CAPÍTULO 7:

PROPIEDADES TERMODINÁMICAS Y CINÉTICAS DE UN NUEVO PIGMENTO HÍBRIDO DELFINIDINA 3-O-GLUCÓSIDO-VESCALAGINA.

Durante el envejecimiento del vino, los antocianos están involucrados en una serie de reacciones que conllevan su desaparición y/o transformación en nuevos pigmentos. Estos pigmentos derivados de antocianos presentan, en algunos casos, una coloración y estabilidad diferente a los pigmentos nativos de la uva, siendo más estables frente a la decoloración por acción de agentes blanqueantes como el SO₂, y frente a los cambios de pH. Los antocianos y pigmentos derivados de éstos, en medios ligeramente ácidos, están involucrados en una serie de equilibrios que se establecen entre las formas estructurales del antociano, tanto coloreadas como incoloras, cuya distribución de fracciones molares, como se explicó en la introducción de esta memoria de tesis, determina la coloración de la disolución. Los parámetros termodinámicos y cinéticos de este sistema de equilibrios dependen principalmente del patrón de sustitución del antociano (Pina, 1998; Pina *et al.*, 2012). Por ello, los pigmentos derivados de antocianos muestran, normalmente, un comportamiento frente al cambio de pH diferente a los antocianos nativos. Estas diferencias dependen del tipo de pigmento derivado y, dentro de cada familia, del sustituyente que exista en la estructura (Dueñas *et al.*, 2006c; Nave *et al.*, 2010c; Quijada-Morín *et al.*, 2010). En particular, los pigmentos híbridos antociano-elagitanino estudiados por Chassaing y colaboradores (Chassaing *et al.*, 2010) han demostrado ser pigmentos más estables que los antocianos originales con respecto a la hidratación. Como consecuencia, la presencia de estos pigmentos en el vino puede tener efecto en el color que éste presente, además de por sus características cromáticas, por su comportamiento frente al pH.

7.1. Objetivos.

El principal objetivo de este capítulo es evaluar los cambios, con respecto a la delfinidina 3-*O*-glucósido, en las propiedades termodinámicas y cinéticas del sistema de equilibrios dependientes del pH del isómero mayoritario del pigmento híbrido *Vg-Mir* obtenido por hemisíntesis a partir de la vescalagina y la delfinidina 3-*O*-glucósido (García-Estévez *et al.*, 2013a). Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

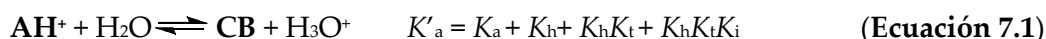
- Determinación de los parámetros termodinámicos y cinéticos de la delfinidina 3-*O*-glucósido.
- Determinación de los parámetros termodinámicos y cinéticos del pigmento híbrido *Vg-Mir* (1-desoxivescalagina-(1 β →8)-delfinidina 3-*O*-glucósido).
- Comparación de los resultados obtenidos con el fin de evaluar si la sustitución del protón del carbono 8 de la delfinidina 3-*O*-glucósido por un resto 1-desoxivescalagina induce cambios en los parámetros termodinámicos y cinéticos del pigmento.

7.2. Cálculo de los parámetros termodinámicos y cinéticos del sistema.

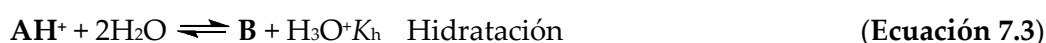
Para determinar los parámetros termodinámicos y cinéticos de los pigmentos antociánicos se llevan a cabo una serie de cálculos matemáticos que, para una mejor comprensión de los resultados obtenidos en este capítulo, debido a su complejidad, se especifican a continuación.

Para simplificar el sistema, se puede considerar el conjunto de equilibrios como un equilibrio simple ácido-base en el que están involucrados el catión flavilio y su base conjugada, **CB**, la cual queda definida como la suma de las concentraciones de las otras especies del sistema: $\mathbf{CB} = [\mathbf{A}] + [\mathbf{B}] + [\mathbf{C}_E] + [\mathbf{C}_Z]$.

Así, en el equilibrio, el sistema se puede definir como un único equilibrio con su correspondiente constante K'_a (ecuación 7.1):



Este equilibrio global puede descomponerse en los correspondientes equilibrios individuales que conforman el sistema de reacciones dependientes del pH en las que están involucradas los antocianos en medios ligeramente ácidos, ecuaciones 7.2-7.5.



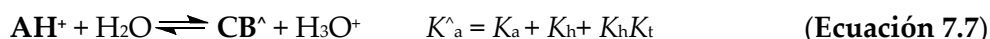
En cualquiera de estos procesos se pueden definir las constantes cinéticas directa k_n e inversa k_{-n} , que se relacionan con la constante termodinámica del equilibrio K_n según la siguiente expresión:

$$K_n = \frac{k_n}{k_{-n}} \quad (\text{Ecuación 7.6})$$

Hay que tener en cuenta que, antes de que se alcance el equilibrio termodinámico, los diferentes procesos cinéticos llevan a la formación de especies intermedias. Por ejemplo, a pH ácido la reacción de transferencia del protón (ecuación 7.2) es mucho

más rápida que la hidratación (ecuación 7.3). Por ello, cuando en una disolución a pH ácido ($\text{pH} < 2$), donde el catión flavilio es estable, se aumenta ligeramente el pH ($\text{pH} > 2$), la base quinoidal **A** se forma inmediatamente. Sin embargo, como para los antocianos al menos alguna de las otras especies del sistema (**B**, **C_E** o **C_Z**) son más estables que la base quinoidal, ésta tiende a desaparecer para formar el resto de especies. Así, la base quinoidal se formará como un producto cinético que con el tiempo desaparecerá parcial o totalmente alcanzándose el equilibrio termodinámico.

A partir de la ecuación 7.1 se puede realizar otra simplificación teniendo en cuenta que, en el caso de los antocianos, la formación de la (Z)-chalcona es un proceso muy lento. Se puede definir entonces un nuevo pseudo-equilibrio en el que están involucradas todas las especies salvo la (Z)-chalcona (ecuación 7.7):



$$[\text{CB}^+] = [\text{A}] + [\text{B}] + [\text{C}_E]$$

Teniendo en cuenta las ecuaciones 7.1–7.5 y 7.7, se pueden proponer una serie de expresiones para determinar la distribución de fracciones molares en función del pH de la disolución en el equilibrio (ecuación 7.8). El mismo cálculo puede realizarse para el pseudo-equilibrio (ecuación 7.7) si se sustituye en la ecuación 7.8 K'_a por K^{\wedge}_a .

$$\chi_{\text{AH}^+} = \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K'_a}; \chi_{\text{A}} = \frac{K_a}{[\text{H}^+] + K'_a}; \chi_{\text{B}} = \frac{K_h}{[\text{H}^+] + K'_a};$$

$$\chi_{\text{C}_E} = \frac{K_h K_t}{[\text{H}^+] + K'_a}; \chi_{\text{C}_Z} = \frac{K_h K_t K_i}{[\text{H}^+] + K'_a} \quad (\text{Ecuación 7.8})$$

Para el estudio de los procesos cinéticos se utilizan experimentos de cambios de pH conocidos como saltos de pH. Existen dos posibles tipos de saltos de pH. Los saltos de pH directos consisten en el cambio del valor de pH de una disolución equilibrada del catión flavilio ($\text{pH} < 1$) a valores de pH superiores (Brouillard y Delaporte, 1977a). Por su parte, en los saltos de pH inversos se parte de una disolución equilibrada del antociano con un pH moderadamente ácido ($4 < \text{pH} < 6$) y se modifica el pH de la disolución hacia valores inferiores (Leydet *et al.*, 2012).

En el caso de los antocianos, cuando se lleva a cabo un salto de pH directo, ocurren tres procesos cinéticos diferentes. El primero de ellos, el más rápido, consiste en la desprotonación del catión flavilio para dar la base quinoidal (ecuación 7.9). Este proceso es tan rápido que sólo puede detectarse utilizando técnicas muy rápidas como los saltos de temperatura (Brouillard y Lang, 1990).

$$k_1 = k_a + k_{-a}[H^+] \quad \text{(Ecuación 7.9)}$$

El segundo proceso es la hidratación (ecuación 7.10), ya que se supone que, a consecuencia de que el pH final del salto es superior a 2, la reacción de tautomerización (apertura del anillo C de la estructura del antociano) es mucho más rápida que la reacción de hidratación del catión flavilio, por lo que el proceso observado corresponde a la formación del hemiacetal.

$$k_2 = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} k_h + \frac{1}{1 + K_t} k_{-h}[H^+] \quad \text{(Ecuación 7.10)}$$

En este punto se alcanza el pseudo-equilibrio en el que están involucradas todas las especies del sistema exceptuando la (Z)-chalcona (ecuación 7.7). Por último, el sistema alcanza el equilibrio a través del último proceso que tiene lugar, que es normalmente el más lento, llevando a la formación de la (Z)-chalcona a partir de la (E)-chalcona, a través de la reacción de isomerización (ecuación 7.11).

$$k_3 = \frac{K_h K_t}{[H^+] + K_a + K_h(1 + K_t)} k_i + k_{-i} \quad \text{(Ecuación 7.11)}$$

En el caso de un salto de pH inverso, de los tres procesos posibles sólo pueden observarse dos, ya que la formación de flavilio a partir de la base quinoidal presente en la disolución es demasiado rápido. En este caso el segundo proceso, como el pH final es suficientemente ácido (pH<2), el proceso de hidratación se convierte en el proceso más rápido y el catión flavilio puede formarse a partir del hemiacetal, siendo despreciable el valor de K_t , como refleja la ecuación 7.12. El último proceso consiste en una formación adicional de catión flavilio a partir de la (E)-chalcona presente en el medio, funcionando el hemiacetal como intermediario del proceso (ecuación 7.13).

$$k_{obs (Hidratación)} = \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} k_h + k_{-h} [H^+] \quad (\text{Ecuación 7.12})$$

$$k_{obs (Taut)} = k_{-t} \quad (\text{Ecuación 7.13})$$

Determinación de las constantes

Para determinar las constantes cinéticas y termodinámicas se parte de una disolución del pigmento preparada en agua ácida a pH=1. Así, todo el pigmento se encuentra en la forma flavilio, la forma más estable. Esta disolución se guarda protegida de la luz a 4 °C. Además se prepara una disolución tampón para modular los cambios de pH. Como tampón se emplea el tampón universal de *Theorell and Stenhagen* (Küster y Thiel, 1982), el cual se prepara disolviendo 2,25 mL de ácido fosfórico (85% p/v), 7 gramos de ácido cítrico monohidratado y 3,54 g de ácido bórico en 343 mL de NaOH 1 M, para finalmente enrasar con agua ultrapura hasta un volumen de 1 L.

Para el cálculo de la constante de acidez aparente (en el pseudo-equilibrio) se estudiaron las variaciones espectrales de disoluciones equilibradas, mientras que, en el caso de las constantes termodinámicas y cinéticas de los equilibrios individuales, se utilizaron experimentos consistentes en saltos de pH tanto directos como inversos. En éstos, se estudian las variaciones con el tiempo del espectro de absorción (o a una longitud de onda concreta), mediante espectroscopia UV-visible convencional o acoplada a un sistema de parada de flujo (*stopped flow*).

Calculo de la constante de acidez aparente K'a

Para determinar la constante de acidez aparente K'_a se preparan una serie de diluciones de la disolución madre del pigmento ajustadas a diferentes valores de pH comprendidos entre 1 y 6. Para ello se toma una alícuota del tampón universal y se ajusta el pH al valor deseado. Se prepara una mezcla ternaria 1:1:1 de la disolución del pigmento madre, NaOH 0,1 M y el tampón universal ajustado al pH deseado, de manera que el hidróxido sódico neutralice la acidez de la disolución del pigmento y el pH final corresponda con el pH del tampón universal. Una vez equilibradas las disoluciones (aproximadamente 2 horas) se mide el pH utilizando un pH-metro para verificar el valor real, y a continuación se realiza la medida espectrofotométrica del

espectro de absorción utilizando una cubeta de 1 cm de paso óptico, tras la cual se mide nuevamente el pH para asegurar su estabilidad.

El estudio de la constante de acidez aparente K'_a , correspondiente al equilibrio definido en la ecuación 7.1, se llevó a cabo mediante el estudio de las variaciones espectrales de las disoluciones anteriores. Se toma el valor de la absorbancia medido en cada disolución en el máximo de absorción del catión flavilio (520 nm para la delfinidina 3-O-glucósido, 539 nm para el pigmento híbrido) y se realiza un ajuste de los valores experimentales a la ecuación 7.14.

$$Abs^{m\acute{a}x} = \frac{[H^+]}{K'_a + [H^+]} A_1 + C_1 \quad (\text{Ecuación 7.14})$$

En esta ecuación $Abs^{m\acute{a}x}$ corresponde al valor de absorbancia a la longitud de onda de absorción máxima, A_1 es una constante correspondiente a la amplitud teórica, esto es, el recorrido del valor de absorbancia desde el inicio hasta el final de cada proceso, y C_1 es una constante correspondiente a la absorbancia mínima teórica. Partiendo de los valores experimentales de absorbancia y de la concentración de protones a cada valor de pH se propone un ajuste teórico según esta ecuación. Se calcula la suma de las diferencias al cuadrado entre los valores de absorbancia experimentales y los valores propuestos por el modelo teórico en cada caso y se buscan los valores de K'_a , A_1 y C_1 que minimicen dicha suma, utilizando la herramienta *Solver* dentro del programa de *Microsoft Office Excel*.

Cálculo de la constante de acidez K_a

La constante de acidez, K_a , se puede determinar utilizando de datos obtenidos a partir de un salto de pH directo. Se parte de una disolución del pigmento ajustada a pH=1 y se modifica el pH a un valor de pH suficientemente alto (entre 5-6). La modificación del pH de la disolución se realiza de forma similar a la preparación de las disoluciones para el cálculo de K'_a . Se mezcla 1 mL de NaOH 0,1 con 1 mL del tampón universal previamente ajustado al valor seleccionado como valor final del salto de pH y, a esta mezcla, se le añade 1 mL de la disolución madre del pigmento, agitando y midiendo justo después de la mezcla. En este salto, inmediatamente tras la mezcla, el catión flavilio AH^+ se transforma en base quinoidal A , y ésta, con el tiempo, desaparece

parcialmente para alcanzar el pseudo-equilibrio, es decir, un equilibrio en el que están involucradas todas las formas del sistema excepto la (Z)-chalcona. Midiendo la variación de la absorbancia a la longitud de onda de absorción máxima para la base quinoidal (entre 550 y 560 nm), se puede monitorizar la desaparición de la base quinoidal del medio. El valor de absorbancia transcurridos 20 minutos del salto de pH (en el pseudo-equilibrio, ecuación 7.7), corresponde a la base quinoidal que no se ha transformado. Este valor resulta ser muy similar al valor de absorbancia al final del proceso (en el equilibrio, transcurridas aproximadamente 2 horas, ecuación 7.1). Esta similitud en el valor de absorbancia indica que la fracción de (Z)-chalcona en el equilibrio es muy pequeña. De esta forma, se puede calcular el valor de la constante de acidez, una vez conocido el valor de la constante de acidez aparente, K'_a , a partir de la ecuación 7.15:

$$\frac{Abs^{final}}{Abs^{inicial}} = \frac{K_a}{K'_a} \quad \text{(Ecuación 7.15)}$$

Los valores de absorbancia final e inicial (Abs^{final} y $Abs^{inicial}$ respectivamente) se calculan de forma teórica a partir de datos obtenidos del ajuste frente al tiempo de los valores de la absorbancia a la longitud de onda de absorción máxima de la base quinoidal ($A^{máx}$) recogidos desde el momento del salto de pH hasta el punto en el que se alcanza el equilibrio, siguiendo la ecuación 7.16:

$$Abs^{máx} = A_0 + A_1 e^{-kt} \quad \text{(Ecuación 7.16)}$$

A_0 corresponde a la absorbancia a tiempo cero, esto es, $Abs^{inicial}$, mientras que la suma $A_1 + A_0$ equivale a la absorbancia a tiempo final, es decir, Abs^{final} . De esta forma, con el ajuste de las absorbancias registradas tras un salto de pH directo se puede estimar el valor de la constante de acidez, K_a .

El valor de la constante de acidez K_a se puede calcular, además, directamente mediante estudios de parada de flujo (*stopped flow*). Para ello se estudió la evolución de la absorbancia de una disolución del pigmento híbrido vescalagina-delfinidina 3-O-glucósido (*Vg-Mir*) durante los 6 primeros milisegundos tras varios saltos de pH desde pH=1 hasta valores finales de pH superiores (1,0; 2,1; 2,9; 3,7 y 4,8). El sistema de

stopped flow consiste en dos jeringas cuyos émbolos son empujados simultáneamente por un sistema hidráulico de manera que la misma cantidad de las disoluciones que contienen llegan a una celda de medida espectrofotométrica, donde se produce la mezcla 1:1. En esta celda se pueden realizar medidas de absorbancia del espectro UV-visible completo cada 1,28 ms a partir de 0,64 ms después del movimiento de los émbolos. El tiempo correspondiente al momento de la mezcla de las disoluciones en la celda de medida es de 3 ms. En los ensayos llevados a cabo, la disolución del pigmento híbrido se colocó en una de las jeringas del sistema de *stopped flow* mientras que en la otra jeringa se colocó una disolución para modular el pH de la mezcla. Esta disolución consistía en una mezcla 1:1 de una disolución de NaOH 0,2 M (necesaria para neutralizar el ácido de la disolución del pigmento híbrido, preparada en HCl 0,1 M), con una disolución de tampón universal ajustado al pH seleccionado como pH final del salto.

Para calcular el valor de la constante de acidez K_a se utiliza la absorbancia medida a $t=5,76$ ms. Se monitoriza la absorbancia a la longitud de onda máxima de absorción del catión flavilio (539 nm en el caso de *Vg-Mir*) para evaluar la desaparición del catión flavilio, y la absorbancia a la longitud de onda de 632 nm para evaluar la aparición de base quinoidal en la disolución. Se realiza un ajuste de los valores de absorbancia para cada longitud de onda frente al pH, según la ecuación 7.17 ($\lambda=539$ nm) y la ecuación 7.18 ($\lambda=632$ nm), derivadas de la expresión de la constante del equilibrio ácido-base entre el catión flavilio y la base quinoidal teniendo en cuenta la fracción molar de cada una de las especies (ecuaciones 7.2 y 7.8):

$$Abs^{539\text{ nm}} = \frac{[H^+]}{K_a + [H^+]} A_1 + C_1 \quad (\text{Ecuación 7. 17})$$

$$Abs^{632\text{ nm}} = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} A_2 + C_2 \quad (\text{Ecuación 7. 18})$$

En estas ecuaciones, Abs^λ corresponde a la absorbancia a la longitud de onda seleccionada, A_1 y A_2 son dos constantes correspondientes a las respectivas amplitudes teóricas, esto es, el recorrido del valor de absorbancia desde el inicio hasta el final de cada proceso, y C_1 y C_2 son las constantes correspondientes a la absorbancia mínima

teórica para cada caso. Partiendo de los valores experimentales de absorbancia y de la concentración de protones a cada valor de pH, se propone un ajuste teórico para estas ecuaciones. Dicho ajuste se realiza de manera conjunta, utilizando el mismo valor de K_a para realizar el ajuste de los valores de absorbancia a ambas longitudes de onda. El valor de la constante de acidez calculado mediante *stopped flow* es muy similar al valor estimado mediante el salto de pH directo (ecuaciones 7.15 y 7.16).

Cálculo de las constantes de hidratación y tautomerización.

A través de los saltos de pH también se pueden estudiar con detalle los procesos de hidratación, tautomerización e isomerización del sistema de equilibrios. En estos casos, al tratarse de procesos más lentos que el proceso ácido-base, además de las constantes termodinámicas, es posible estudiar las constantes cinéticas, tanto directa como inversa, de los diferentes procesos.

Las constantes de tautomerización pueden estudiarse mediante *stopped flow* a través de un salto de pH inverso. Para ello, se monitorizan las variaciones espectrales a la longitud de onda de absorción máxima del catión flavilio de una disolución del pigmento tras un salto de pH desde un pH suficientemente alto hasta un valor de $\text{pH} \leq 1$ (por ejemplo un salto desde pH 4,6 a 0,7). Como se indicó anteriormente, la formación de catión flavilio en la disolución tiene lugar mediante tres procesos diferentes que pueden observarse a partir de los valores de absorbancia medidos. La variación en el valor de la absorbancia sigue una curva bi-exponencial según la siguiente ecuación:

$$Abs^{m\acute{a}x} = A_0 + A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{(Ecuación 7.19)}$$

Ajustando los datos de absorbancia experimentales según la ecuación 7.19 se obtienen los valores de las constantes A_0 , A_1 , A_2 , k_1 , y k_2 que minimizan el error del ajuste. A través de estas constantes es posible estudiar los tres procesos que tienen lugar. El primero corresponde a la transformación de la base quinoidal (**A**), presente en la disolución, en catión flavilio (**AH⁺**), ya que la fracción de catión flavilio a ese pH es despreciable. Este proceso ocurre de manera instantánea tras el salto de pH y por ello la absorbancia inicial (A_0) es proporcional a la fracción de base quinoidal en la

disolución al pH inicial. Como se explicó anteriormente, al ser el pH final suficientemente ácido ($\text{pH} < 2$), el proceso de hidratación es más rápido que la tautomerización y es posible la transformación directa del hemiacetal en catión flavilio. Por ello, el segundo de los procesos se identifica como la formación de catión flavilio a partir del hemiacetal (**B**) presente en la disolución. La constante A_1 corresponde a la amplitud de este proceso, y es proporcional a la cantidad de hemiacetal en la disolución a ese valor de pH. Este valor puede calcularse si se utiliza la ecuación 7.19 suprimiendo el tercer sumando, es decir, únicamente considerando los dos primeros procesos, a partir de la diferencia entre la absorbancia teórica a tiempo infinito y la A_0 . La constante cinética observada para este proceso, k_1 , se ajusta según la ecuación 7.12. Por su parte, el tercer proceso corresponde a la formación de catión flavilio a partir de la (*E*)-chalcona (C_E) existente en el medio, vía la formación del hemiacetal. La amplitud de este proceso A_2 es proporcional a la fracción de C_E existente en el medio al valor de pH inicial y puede calcularse como la diferencia entre la absorbancia teórica a tiempo infinito (calculada a partir de la ecuación 7.19) y la suma $A_0 + A_1$. Como en esta situación la hidratación es un proceso rápido, la constante cinética de este tercer proceso corresponde al proceso inverso de tautomerización, por lo que la constante cinética observada k_2 es igual a la constante cinética inversa del equilibrio de tautomerización k_{-t} (ecuación 7.13). Además, a partir de la relación entre la cantidad de C_E y de **B** en la disolución, esto es, a partir de la relación entre las constantes A_2 y A_1 , puede calcularse la constante termodinámica del proceso de tautomerización (ecuación 7.20).

$$K_t = \frac{[C_E]}{[B]} = \frac{A_2}{A_1} \quad \text{(Ecuación 7.20)}$$

A partir de la constante termodinámica K_t y la constante cinética inversa k_{-t} del proceso de tautomerización, es posible calcular la constante cinética directa k_t mediante la ecuación general del equilibrio (ecuación 7.6).

La constante termodinámica del proceso de hidratación K_h puede estimarse utilizando la aproximación $[CB] \approx [CB^+]$ (ecuación 7.7), lo cual es posible si se considera que la fracción molar de la (*Z*)-chalcona es muy pequeña y, por tanto, puede despreciarse. La fracción molar del hemiacetal en este pseudo-equilibrio equivale a la

relación entre la constante de hidratación y la constante de acidez aparente, según la ecuación 7.21.

$$\frac{K_h}{K'_a} = \frac{[B]}{[CB^{\wedge}]} = \frac{A_1}{A_0 + A_1 + A_2} \quad (\text{Ecuación 7.21})$$

Sin embargo, mediante saltos de pH directos se puede obtener más información sobre el proceso de hidratación. En un salto de pH directo, el equilibrio se alcanza en dos procesos consecutivos, cada uno de ellos siguiendo una cinética de primer orden (ecuación 7.22). Estos dos procesos se pueden observar separados perfectamente en el tiempo, lo que permite analizarlos de forma independiente.

$$Abs^{máx} = A_0 + A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} \quad (\text{Ecuación 7.22})$$

El primer proceso engloba los equilibrios de hidratación y tautomerización, mientras que el segundo se corresponde con la isomerización. El primero corresponde, por tanto, a la desaparición de la base **A** formada inmediatamente tras el salto de pH hasta alcanzar el pseudo-equilibrio en el que están involucradas las especies **B** y **C_E**; mientras que el segundo corresponde a la formación de **C_Z**, alcanzándose el equilibrio global. El primero puede monitorizarse a través de la variación de la absorbancia a la longitud de onda de absorbancia máxima para la base quinoidal (entre 550 y 560 nm), esto es, cuantificando la desaparición de la base quinoidal. Los valores de absorbancia registrados con el tiempo se ajustan según la ecuación 7.22, calculando los valores para las constantes A_0 , A_1 , A_2 , k_1 y k_2 que minimicen las diferencias cuadráticas entre los valores experimentales y los teóricos calculados con dicha expresión. Al tratarse de un salto de pH directo donde el pH final es superior a 2, el proceso de tautomerización es mucho más rápido que el de hidratación y por eso la cinética observada para el primer proceso se corresponde con el proceso de hidratación: A_1 corresponde a la amplitud del primer proceso, con una constante cinética igual a k_1 . A través de una serie de diferentes saltos de pH desde disoluciones del pigmento equilibradas a pH=1 hasta valores de pH superiores a 2, se obtienen diferentes valores para la k_1 en función del pH final del salto. Los valores de k_1 en función del pH se ajustan según la ecuación 7.10, y, utilizando el valor de K_a y K_t previamente calculados, se pueden calcular los valores

de k_h y k_{-h} que minimicen el error cuadrático del ajuste. Por otro lado, es posible calcular una serie de valores de k_1 a partir de diferentes saltos de pH inversos desde una disolución del pigmento equilibrada a pH superior a 4,5 hasta un valor de pH final menor a 2. Estos experimentos se tienen que monitorizar mediante *stopped flow*, de manera análoga a los experimentos realizados para el cálculo de las constantes de tautomerización (ecuación 7.19). En este caso, al ser el pH final menor que dos, la hidratación es el proceso más rápido y el ajuste de los valores de k_1 debe hacerse utilizando la ecuación 7.23:

$$k_2 = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} k_h + k_{-h} [H^+] \quad (\text{Ecuación 7.23})$$

Es posible realizar el ajuste de los valores de k_1 frente al pH de manera conjunta usando las ecuaciones 7.10 y 7.23, buscando los valores de k_h y k_{-h} que minimicen la suma de las diferencias cuadráticas de ambas ecuaciones. A partir de los valores de las constantes cinéticas se puede calcular el valor de la constante termodinámica K_h (ecuación 7.6).

El segundo proceso observado en los saltos de pH directos (correspondiente al tercer sumando de la ecuación 7.22) corresponde al proceso de isomerización. Esto quiere decir que existe un segundo proceso que conlleva la formación de (Z)-chalcona (Cz) a partir de la base quinoidal (A), mediante la isomerización de la (E)-chalcona (CE). El proceso de isomerización es un proceso muy lento, por lo que se puede observar separado perfectamente en el tiempo respecto al primer proceso. Este proceso puede estudiarse, además de a través de la desaparición de la base quinoidal, a partir de la variación de la absorbancia a 335 nm. El valor de la absorbancia a esta longitud de onda, tras sufrir un descenso durante el primer proceso, vuelve a aumentar ligeramente como consecuencia de la transformación de la (E)-chalcona en la (Z)-chalcona, ya que ésta presenta mayor absorbancia a esa longitud de onda. En cualquier caso, la constante cinética k_2 es independiente de la longitud de onda utilizada para el seguimiento del proceso. Si se obtienen varios valores de k_2 a partir de varios experimentos, pueden ajustarse según la ecuación 7.11 para calcular los valores de k_i y k_{-i} que minimicen las diferencias cuadráticas del ajuste de los valores experimentales de

k_2 con dicha expresión. Sin embargo, habitualmente, debido a la poca formación de (Z)-chalcona, es complejo obtener varios datos de k_2 sin un gran error asociado. De esta forma, el valor de K_i se puede estimar utilizando la ecuación 7.1, puesto que se conocen el resto de constantes termodinámicas del proceso. Una vez estimado el valor de la constante termodinámica del proceso de isomerización, puede construirse un sistema de dos ecuaciones (ecuación 7.6 y ecuación 7.11) con dos incógnitas (k_i y k_{-i}) que permite calcular el valor de las constantes cinéticas directa e inversa del equilibrio de isomerización.

Con esto, el sistema de equilibrios dependientes del pH en los que están involucrados los pigmentos de naturaleza antociano en medios acuosos débilmente ácidos ($4 < \text{pH} < 6$) queda caracterizado por completo. Para una visualización del sistema es posible calcular un diagrama de energías en el que se representan todas las especies involucradas en el mismo. Para ello, se puede calcular la energía libre de *Gibbs* para cada especie a partir de la siguiente ecuación, considerando temperatura ambiente (298 K):

$$G = RT \ln K \quad \text{(Ecuación 7.24)}$$

Tomando como referencia el catión flavilio (AH^+) a $\text{pH}=0$, la energía de la forma hemiacetal (**B**) se calcula utilizando para la K el valor de K_h . El valor de esta energía coincide con la que corresponde al catión flavilio al $\text{pH}=\text{p}K_h$, puesto que a ese pH ambas formas están en equilibrio. En el caso de la base quinoidal (**A**), el valor de la energía libre de *Gibbs* se calcula a partir del valor de K_a , el cual es igual, por la misma razón que en el caso anterior, al valor de la energía del catión flavilio a un valor de $\text{pH}=\text{p}K_a$. Los valores de la energía libre de *Gibbs* de la (E)-chalcona y la (Z)-chalcona se calculan utilizando, como valores para K , los productos $K_h \cdot K_t$ y $K_h \cdot K_t \cdot K_i$ respectivamente.

7.3. Resumen.

Los resultados obtenidos en este capítulo han dado lugar a la siguiente publicación:

García-Estévez, I.; Gavara, R.; Alcalde-Eon, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Quideau, S.; Escribano-Bailón, M.T.; Pina, F. Thermodynamic and kinetic properties of a new myrtilin-vescalagin hybrid pigment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, 61, 11569-11578.

En este trabajo se llevó a cabo el estudio de las propiedades termodinámicas y cinéticas del pigmento híbrido 1-desoxivescalagina-(1 β →8)-delfinidina 3-O-glucósido y se compararon con las correspondientes a la delfinidina 3-O-glucósido. Los resultados mostraron que la sustitución del protón del carbono 8 del antociano por un resto 1-desoxivescalagina conlleva modificaciones importantes en el comportamiento del pigmento frente a los cambios de pH en disoluciones acuosas. El pigmento híbrido *Vg-Mir* mostró valores de pK'_a y pK_a menores que el antociano original, lo que indica que el catión flavilio es más ácido en el caso del pigmento híbrido y, por lo tanto, a valores de pH superiores a 2, está más desestabilizado. Además, el derivado antociano-elagitanino estudiado presentó un valor mucho mayor de la constante termodinámica del equilibrio de tautomerización (K_i), y de la constante cinética de apertura del ciclo (k_i) que la delfinidina 3-O-glucósido, lo que indica una desestabilización de la forma hemiacetálica con respecto al pigmento original. Esto indica que, en el pigmento híbrido, la (*E*)-chalcona está casi tan estabilizada como la forma hemiacetálica, mientras que en el caso de la delfinidina 3-O-glucósido el hemiacetal es claramente la forma más estable.

Como consecuencia, a un pH moderadamente ácido (entre 4 y 6), la forma mayoritaria de la delfinidina 3-O-glucósido será el hemiacetal (**B**), y la (*E*)-chalcona (**C_E**) y la base quinoidal (**A**) serán minoritarias, mientras que en el caso del pigmento híbrido **A** y **C_E** representarán porcentajes mucho mayores. Como resultado, las disoluciones del pigmento híbrido a estos valores de pH presentarán más color y una tonalidad muy diferente que las disoluciones del antociano original.

Thermodynamic and Kinetic Properties of a New Myrtillin–Vescalagin Hybrid Pigment

Ignacio García-Estévez,[†] Raquel Gavara,^{*,§} Cristina Alcalde-Eon,[†] Julián C. Rivas-Gonzalo,[†] Stéphane Quideau,[#] M. Teresa Escribano-Bailón,^{*,†} and Fernando Pina[§]

[†]Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, E37007 Salamanca, Spain

[§]REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Monte de Caparica, Portugal

[#]Université de Bordeaux (ISM, CNRS-UMR 5255), Institut Européen de Chimie et Biologie, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac Cedex, France

ABSTRACT: During red wine maturation in contact with oak wood, C-glucosidic ellagitannins can react with anthocyanins, leading to new pigments. In this work the thermodynamic and kinetic constants of the network pH-dependent equilibrium of a new myrtillin (delphinidin 3-O-glucoside)–vescalagin hybrid pigment (1-deoxyvescalagin-(1 β →8)-myrtillin) have been determined by UV–visible absorption and stopped-flow experiments and compared to those determined for myrtillin. The vescalagin substitution at the C-8' center of myrtillin entails important variations in the pigment behavior upon pH changes. The hybrid pigment showed lower pK_a' and pK_a values and a much higher value of K_t. As a consequence, at moderately acidic pH values (4 < pH < 6), the percentage of the hemiketal is much lower and the quinoidal base and the (*E*)-chalcone represent higher percentages relative to those for myrtillin. Therefore, the hybrid pigment can provide in slightly acidic or neutral solutions an exceptionally different color compared to that of myrtillin.

KEYWORDS: anthocyanins, myrtillin (delphinidin 3-O-glucoside), ellagitannin, thermodynamic, kinetic, red wine

Received: July 30, 2013

Revised: October 25, 2013

Accepted: October 29, 2013

Published: October 29, 2013

■ AUTHOR INFORMATION**Corresponding Authors**

*(R.G.) Phone: +351 212948300, ext. 10946. Fax: +351 212948550. E-mail: r.castell@fct.unl.pt.

*(M.T.E.-B.) Phone: +34 923294537. Fax: + 34 923294515. E-mail: escriban@usal.es.

Funding

Thanks are due to the Spanish MICINN and FEDER (Project ref. AGL2008-05569-C02-01 and AGL2011-30254-C02-01), to Consolider-Ingenio 2010 Programme (ref FUNC-FOOD, CSD2007-00063), and to the Spanish Ministerio de Educación for an F.P.U. predoctoral scholarship to I.G.-E. We are also grateful to the "Fundação para a Ciência e a Tecnologia for funding through Projects PTDC/QUI-QUI/117996/2010 and PEst-C/EQB/LA0006/2013 and a postdoctoral grant SFRH/BPD/44639/2008 (R.G.).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

SUMMARY



1. Introduction.

The color of wine is one of the first features perceived by consumers that can influence its acceptance and inform about its age, conditions of storage, etc. Anthocyanins are the pigments responsible for grape color, and they are extracted to must during winemaking, providing it the characteristic reddish-blue color of young red wines that changes to brick-red color during maturation and aging. Red wines are usually aged in oak wood barrels in order to improve their overall quality. During this maturation process different kinds of compounds and among them the ellagitannins, are released from the wood to the wine. Also, a slow and continuous diffusion of oxygen through the oak barrel occurs. Consequently, wine undergoes physical, chemical and physicochemical processes involving oxygen and oak components that cause important organoleptic changes. As a result, during aging and storage of red wine, anthocyanins are progressively transformed into new pigments (Alcalde-Eon *et al.*, 2006b; Fulcrand *et al.*, 2006; Monagas and Bartolomé, 2009; de Freitas and Mateus, 2011; He *et al.*, 2012). These new pigments usually present important differences in their stability and color properties in relation to those of their anthocyanin precursors.

Different kinds of derived pigments such as pyranoanthocyanins and flavanol-anthocyanin condensation products have been detected in wines. The first ones result from the cycloaddition of wine nucleophiles at C-4 and O-5 of the anthocyanin flavylium nucleus (followed by aromatization through autoxidation), which leads to an additional pyrane ring in the pigment structure. Some nucleophilic compounds present in wines, such as the enol forms of pyruvic acid or acetaldehyde and vinylphenols among others, can thus react with anthocyanins to generate this kind of pigments (de Freitas and Mateus, 2011). These pyranoanthocyanins usually show orange hues (λ_{\max} 480 to 510 nm) and higher stability in a wider pH range compared to their anthocyanin precursors. They are also highly stable and resistant to sulfur dioxide bleaching and oxidative degradation (de Freitas and Mateus, 2011; He *et al.*, 2012). However, there are pigments related to these pyranoanthocyanins, the so-called portisins (Mateus *et al.*, 2003b), which show blue hues.

Anthocyanins have also demonstrated to react with flavanols, involving acetaldehyde or not, to generate either acetaldehyde-derived or direct flavanol-

anthocyanin condensation products (Rivas-Gonzalo *et al.*, 1995; Escribano-Bailón, *et al.*, 1996; Francia-Aricha *et al.*, 1997; Es-Safi *et al.*, 1999b; Salas *et al.*, 2004a; Fulcrand *et al.*, 2006). Two different mechanisms have been postulated to explain direct reactions between anthocyanins and flavanols during which the anthocyanin could act either as an electrophile or as a nucleophile to form either anthocyanin-flavanol (A-F) or flavanol-anthocyanin (F-A⁺) adducts (Salas *et al.*, 2004a), respectively. Some of these anthocyanin-tannin adducts (A-F) are colorless (Remy *et al.*, 2000) whereas others (F-A⁺) show red hues similar to their anthocyanin precursor (λ_{\max} 515-526 nm) (Cheynier *et al.*, 2006). In the case of acetaldehyde-mediated flavanol-anthocyanin pigments, the anthocyanin acts as nucleophile (Es-Safi *et al.*, 1999a). The anthocyanin moiety in such polymeric pigment is more protected against water attack. Moreover, these pigments show purple hues (λ_{\max} 528-540 nm) and their color is more stable with regard to bleaching by sulfite dioxide than that of monomeric anthocyanins. However, they are more susceptible to degradation in aqueous solutions than native anthocyanins (Escribano-Bailón *et al.*, 2001).

Moreover, anthocyanins can react with C-glucosidic ellagitannins to generate anthocyanin-ellagitannin hybrid pigments (Quideau *et al.*, 2005). These pigments show purple hues (λ_{\max} 542-545 nm) and they are more stable against hydration than their anthocyanin precursor (Chassaing *et al.*, 2010).

Along with pigment composition, other factors, such as copigmentation or pH determine the final color that wine shows. Copigmentation is a spontaneous and exothermic process that consists of the stacking of an organic molecule, called copigment, on the planar polarizable moieties of the anthocyanin colored form (Escribano-Bailón and Santos-Buelga, 2012). As a consequence, anthocyanins are more protected against water attack and they show higher stability in a wider pH range. Anthocyanins and related compounds, in mildly acidic aqueous solutions such as wine, are involved in a series of pH-dependent chemical reactions leading to both colored and colorless species (Brouillard and Delaporte, 1977; Brouillard and Dubois, 1977, Pina, 1998). Depending on the pH, these species are in equilibrium through proton transfer, hydration, tautomerization and isomerization reactions, although this last one occurs in a lesser extent. The flavylium cation **AH⁺** (red) is the predominant species in

the equilibrium under sufficiently acidic conditions ($\text{pH} < 2$). When the pH is raised, the flavylum cation is involved in two parallel reactions: deprotonation to form the blue-purple quinoidal base **A** and hydration in position 2 of the pyrylium nucleus to give the colorless hemiketal **B**. This species leads by a ring-opening tautomeric process to the yellow (E)-chalcone (C_E), which in turn can be transformed via isomerization into the (Z)-chalcone (C_Z , yellow). The relative distribution of the mole fraction of each of these species in the equilibrium is dependent on the substitution pattern of the flavylum core of the anthocyanin (Pina *et al.*, 1998; Pina *et al.*, 2012). In the case of anthocyanins, the hemiketal **B** is the major component and the quinoidal base **A** and the (E)- and (Z)-chalcones are the minor species (Pina *et al.*, 2012). The thermodynamic and kinetic parameters of some anthocyanin-derived pigments have been studied showing important differences in relation to the native anthocyanins (Dueñas *et al.*, 2006c; Nave *et al.*, 2010; Quijada-Morín *et al.*, 2010). These differences depend on the type of substituent linked to the native anthocyanins. In particular, as explained above, the anthocyanin–ellagitannin hybrid pigment previously studied by Chassaing and co-workers, 1-deoxyvescalagin-(1 β \rightarrow 8)-maldivin 3-O-glucoside, has been shown to be a more stable pigment than maldivin 3-O-glucoside with respect to hydration (Chassaing *et al.*, 2010).

Although the formation of most of the aforementioned anthocyanin-derived pigments is related to the presence in the wine of other compounds such as proanthocyanindins, acetaldehyde or phenolic acids; the oak ellagitannins have also demonstrated to indirectly influence the formation of some of these derivative pigments. The oak ellagitannin structure (**Figure 1**) allows them to participate in oxidation reactions acting as consumers of oxygen, protecting other compounds against oxidation and favoring the transformation of ethanol into acetaldehyde (Vivas and Glories, 1996) also favoring several polymerization reactions (Timberlake and Bridle, 1976; Vivas and Glories, 1996) thus affecting the wine color. Moreover, due to their ability to precipitate salivary proteins, ellagitannins could directly affect the wine astringency (Glabasnia and Hofmann, 2006; Stark *et al.*, 2010).

C-glucosidic ellagitannins are normally present in wine as a consequence of its maturation and aging in contact with oak wood. The traditional source of ellagitannins

is the oak barrels where the wine is kept during the ageing process. Nevertheless, they can also be released from the chips or staves that are nowadays used as an alternative to barrel aging or be supplied by oenological tannins. These latter ones are mainly constituted of a mixture of condensed (proanthocyanidins) and hydrolyzable tannins (gallic and ellagic tannins) from different plant sources widely used in the winemaking process either to improve different wine characteristics (color and stability among others) or to compensate for low tannin levels (Obreque-Slier *et al.*, 2009, Versari *et al.*, 2013).

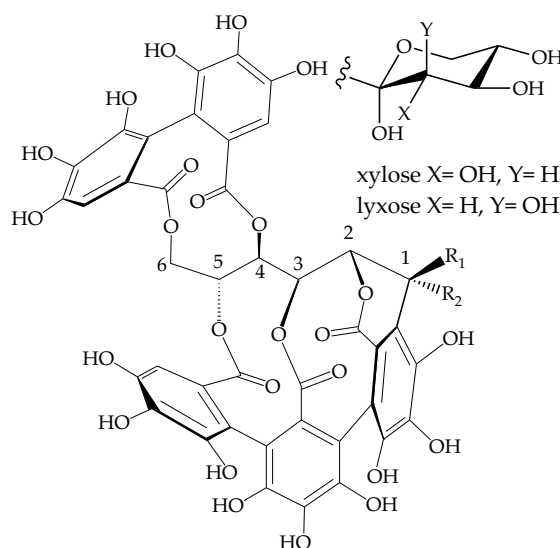


Figure 1. Structure of the main ellagitannins: castalagin ($R_1=H$; $R_2=OH$), vescalagin ($R_1=OH$; $R_2=H$), grandinin ($R_1=lyxose$ ($X=H$, $Y=OH$); $R_2=H$) and roburin E ($R_1=xylose$ ($X=OH$, $Y=H$); $R_2=H$).

In the case of oak barrels, three oak species have been traditionally used in cooperage for its production: two European species (*Quercus petraea* and *Quercus robur*) and one American species (*Quercus alba*). There are important differences between American and European oak species both in wood anatomy and in phenolic (Chatonnet and Dubourdieu, 1998; Masson *et al.*, 1995; Prida and Puech, 2006) and volatile compositions (Alañón *et al.*, 2011; Chatonnet and Dubourdieu, 1998; Prida and Puech, 2006). The anatomy of wood determines the method employed in oak cooperage as well as the porosity and permeability of staves to liquids and air. Furthermore, there are important differences in the ellagitannin content depending on the oak species. American oak wood shows lower concentration of ellagitannins (from

3 to 8 mg/g of dry wood) than *Q. petraea* (from 8 to 34 mg/g of dry wood) and much lower than *Q. robur* oak wood (from 15 to 48 mg/g of dry wood) (Chatonnet and Dubourdiou, 1998; Masson *et al.*, 1995; Prida and Puech, 2006; Scalbert *et al.*, 1988). The level of ellagitannins in oak wood also depends on the age of wood, the geographical origin, the silvicultural treatment of the tree, the sampling position in the tree (Fernández de Simón *et al.*, 1999; Fernández de Simón *et al.*, 2003; Masson *et al.*, 1995) and the type and length of the drying and toasting periods (Cadahía *et al.*, 2001; Masson *et al.*, 1995). In addition, oak barrels are frequently used in more than one vintage due to the high cost of new barrels (Zamora, 2003). Used barrels have lower capability to release ellagitannins to wine than new barrels (Zamora, 2003).

The most representative structures of found-in-wine C-glucosidic ellagitannins are the monomeric forms vescalagin and castalagin, which are the most abundant ellagitannins in oak wood ranging from 39 to 73% of the total ellagitannin content (Scalbert *et al.*, 1988; Fernández de Simón *et al.*, 1999; Nonier *et al.*, 2005; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Lyxose/xylose derivatives (grandinin and roburina E, respectively) and dimeric forms (roburins A, B, C, and D) have also been described (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Hervé du Penhoat *et al.*; 1991, Jourdes *et al.*, 2009; Masson *et al.*, 1995). Although in oak heartwood, the ellagitannins may represent up to 10% of the dry wood weight (Scalbert *et al.*, 1988), their levels in wine are much lower than those of other wine constituents since, due to their high reactivity, these compounds are involved in different chemical reactions. Consequently, they are not easily detected in the chromatograms even recorded at their maximum wavelength. Moreover, their structural similarities make their chromatographic separation difficult in reversed phases as well as their identification by means of the spectral features (identical UV-vis spectra, pseudo-molecular ions with the same m/z ratios). In addition, the standards of oak wood ellagitannins are not commercially available. There are few studies whose objective has been the qualitative and quantitative determination of the ellagitannin composition in wines. Some of them only determine the total concentration of these compounds following a procedure usually employed in the quantification of total ellagitannins in wood (Peng *et al.*, 1991; Nonier *et al.*, 2005; Chira and Teissedre, 2013), which is based on acid hydrolysis of the ellagitannins and subsequent quantification of

the free ellagic acid released. Nevertheless, it seems interesting to investigate the individual content of ellagitannins since it has been proven that castalagin presents lower reactivity towards other wine constituents such as anthocyanins and (epi)catechins than vescalagin (Jourdes *et al.*, 2009; Quideau *et al.*, 2005), as well as different biological properties to those shown by vescalagin (Fridrich *et al.*, 2008; Quideau *et al.*, 2005). When the studies had the objective of the characterization in detail of the ellagitannin profile of the wine samples (Saucier *et al.*, 2006) and, in some cases grapes (Lee *et al.*, 2005); a fractionation step was always required. In the existing methods the high volume of sample required, the complexity of some of the stages and the presence of targeted compounds in more than a single fraction can be considered as the main drawbacks. Moreover, as a consequence of their chromatographic behavior, individual quantification of ellagitannins from the chromatogram recorded at a given wavelength lacks accuracy. For this reason, quantification from HPLC-MSⁿ data, which allows the knowledge of the area of the peak for each *m/z* ratio or for each transition, seems to be more suitable. However, mass data have great variability over the course of several days and, depending on the instrument, even within the same day. Consequently, when quantification is performed from mass data, an internal standard has to be used to correct this variability. A potential internal standard has to fulfill some requirements such as not to be present in the sample and to be structurally related to the compounds that have to be quantified, among others. Despite the structural differences, chlorogenic acid has been employed in previous studies (Salminen *et al.*, 2001; Saucier *et al.*, 2006; Jourdes *et al.*, 2011) as internal standard for quantitative analyses of ellagitannins in different kinds of samples and among them, wine in which this compound is absent. However, studies carried out in our laboratory following the existing quantitative methods (Saucier *et al.*, 2006) did not allow the obtaining of satisfactory results. For this reason, it seems that a new methodology for the determination of the ellagitannin profile in wines needs to be developed in order to solve the lacks shown by those described in literature.

2. Aim.

The ellagitannin structure allows them to participate in oxidation reactions acting as consumers of oxygen, protecting other compounds against oxidation and favoring several reactions between flavanol and anthocyanins. As a consequence, these compounds can affect wine color and its evolution. The most common source of ellagitannins is the wood of the oak barrels where the wine is kept during the ageing process. Nevertheless, they can also be released from the chips or staves that are nowadays used as an alternative to barrel aging or be supplied by the oenological tannins, in whose composition both proanthocyanins and ellagitannins are present.

The general aim of this PhD Thesis was to study the influence of ellagitannins and flavanols on wine color and its evolution. To be precise, the objective was to study the influence of these types of tannins on the formation of anthocyanin-derived pigments as well as on wine color stabilization. For this purpose, the evolution of pigment composition and color was studied in both model systems and wines. The reactivity between anthocyanins and ellagitannins has also been investigated in order to assess the direct influence of this type of tannins on wine color. Moreover, a new methodology for the analysis of ellagitannins in wine was developed and used to study the ellagitannin profile of red wines elaborated from Tempranillo grapes during winemaking and aging.

The specific objectives of this PhD Thesis were:

Objective 1. Development of a new methodology for the analysis of oak ellagitannins in wine samples (Chapters 1 and 2).

Objective 2. The study of the influence of the oak wood type and age of barrels employed for winemaking and aging, on the ellagitannin profile of red wines (Chapter 3).

Objective 3. Assessment of the effect of the addition of ellagitannins and flavanols, through the addition of oenological tannins, on the pigment composition and color of anthocyanin-containing model systems and wines (Chapters 4 and 5).

Objective 4. Investigation of the reactivity between anthocyanins and ellagitannins and study of the colorimetric properties of anthocyanin-ellagitannin hybrid pigments (Chapters 6 and 7).

3. Experimental section.

SECTION I: ANALYSIS OF OAK ELLAGITANNINS IN WINE SAMPLES

Chapter 1: Development of a fractionation method of red wines for the analysis of oak ellagitannins

The aim of this chapter was to develop a new methodology for the detection and identification of oak ellagitannins in wines in order to solve the deficiencies shown by the methodologies described in literature. The results obtained led to the following *peer-reviewed* publication:

García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Alcalde-Eon, C. Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines. *Analytica Chimica Acta*, **2010**, 660, 171-176.

Material and methods

Standards: Oak ellagitannin standards were extracted and isolated from *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. wood. Ellagitannins were extracted from oak wood using a hydromethanolic solution (1:1), and the extract was fractionated by liquid chromatography using Sephadex LH-20 as stationary phase. The fractions containing the main oak ellagitannins (castalagin, vescalagin, roburin E and grandinin) were selected to isolate each ellagitannin from them by means of semi-preparative HPLC (García-Estévez *et al.*, 2010). The different fractions were then analyzed by HPLC-DAD-MS and those with purities higher than 95% of one ellagitannin were gathered and freeze-dried. The identities of the ellagitannins were assigned from the data obtained in the HPLC-DAD-MS and in the ^1H and ^{13}C NMR analyses (Glabasnia and Hofmann, 2006; Fridrich *et al.*, 2008).

Development of the fractionation method: A red wine made from *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes was spiked with the four main oak ellagitannins (*ca.* 25 mg/L) and fractionated in a two-step procedure similar to that described by Lee and co-workers (Lee *et al.*, 2005) for the isolation of ellagic acid conjugates in muscadine grapes, but with important modifications.

HPLC-DAD-MS analysis: Two different HPLC methods were developed for the analysis of the different fractions obtained. *Method 1* was used for the analysis of

ellagitannins whereas *method 2* was employed to the ellagic acid analysis. Both methods used an aqueous solution (2.5%) of acetic acid (solvent A) and 100% HPLC-grade methanol (solvent B) to carry out the samples elution. Mass analyses were performed in an ion-trap instrument equipped with an electrospray ionization interface (ESI-MS). Spectra were recorded in negative ion mode and mass conditions were optimized using a castalagin solution (García-Estévez *et al.*, 2010).

Wine samples: Three real red-wine samples (wines A, B and C) were submitted to the developed fractionation method in order to verify its usefulness. Wine A was made from *V. vinifera* L. cv. Graciano grapes and was analyzed after 2 months of malolacticfermentation in oak barrels. Wine B was made from *V. vinifera* L. cv. Tempranillo grapes and was analyzed after ageing 4 months in oak barrels and eight in the bottle. Wine C was made from *V. vinifera* L. cv. Graciano grapes and was analyzed after an ageing of 14 months in oak barrels and twelve in the bottle.

Results and discussion

The HPLC-DAD-MS analysis of the spiked wine before its fractionation revealed the complexity of the sample. The chromatogram recorded at 250 nm (**Figure 2a**) indicates the co-elution of a large number of compounds making the detection and identification of the ellagitannins difficult. Since the concentration of the ellagitannins in the spiked wine (ca. 25 mg/L of each one) was twice or more times higher than that reported in wines (Glabasnia and Hofmann, 2006; Saucier *et al.*, 2006) it was possible to localize them in the chromatogram by the mass analysis. However, the co-elution of these compounds with others hindered the obtaining of their spectral features. Furthermore, as the ellagitannin levels in real oak-matured red wines are much lower than in the spiked one it can be easily deduced that the fractionation of the sample is a required step in their determination. In our laboratory, several modifications to the procedure proposed by Lee and co-workers (Lee *et al.*, 2005) were carried in order to allow the obtaining of all the oak ellagitannins in the same fraction isolated from other wine phenolic compounds. The final developed method consisted in a two-step fractionation (**Figure 3**). The sample was first fractionated using a Waters C-18 Sep-Pak® (500 mg) cartridge obtaining three fractions (fractions **a**, **b** and **c**, see **Figure 3.1**). Fraction **a** was subsequently submitted to another fractionation in a hand-packed

Sephadex LH-20 minicolumn (10mm×30mm). In this second fractionation, three different eluents were employed obtaining four eluates (fraction 1, 2, 3 and 4, see **Figure 3.2**). All the fractions obtained in both fractionations were analyzed by HPLC-DAD-MS in order to localize the oak ellagitannins, using the HPLC method 1.

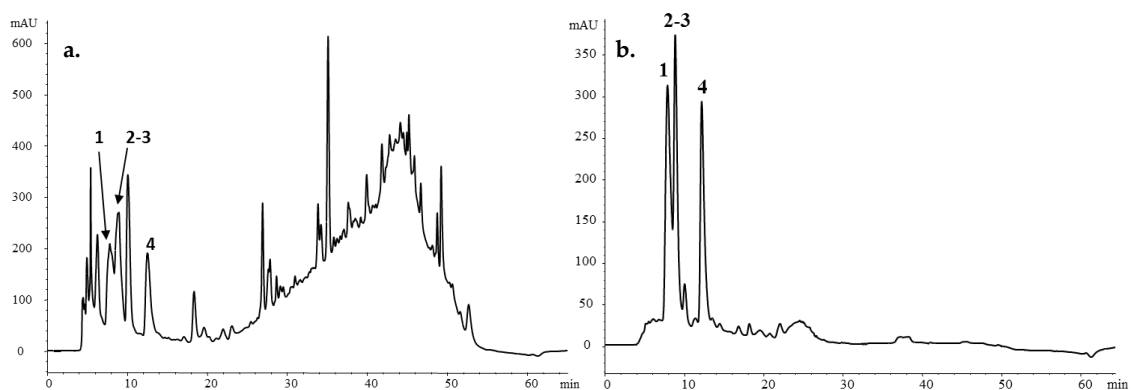
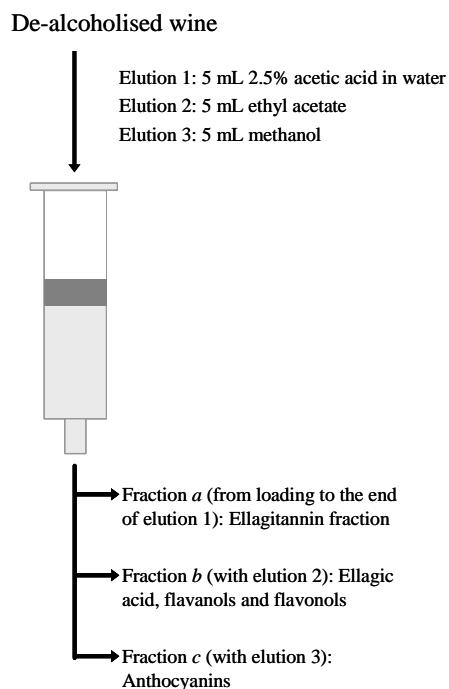


Figure 2. Chromatogram of the spiked wine before its fractionation (**a.**) and of fraction 4 of the spiked wine (**b.**) recorded at 250 nm. (1) Grandinin, (2) vescalagin, (3) roburin E and (4) castalagin.

The HPLC-DAD-MS analysis of the fractions revealed that fraction **a** contained all the oak ellagitannins and other polar substances, such as gallic acid. However, as in the non-fractionated wine the identification of the peaks corresponding to the oak ellagitannins was only achieved from the results of the mass analyses. Thus, another fractionation step was required to improve the separation. None of the oak ellagitannins was detected in fractions **b** and **c**, and ellagic acid was only detected in fraction **b**. After the second fractionation step, the oak ellagitannins were only detected in fraction **4** isolated from the rest of compounds which interfered with their HPLC determination (**Figure 2b**), such as gallic acid, now detected in fraction 3. The removal of these compounds is an important advantage of the fractionation method developed in this work with regard to those reported in literature, along with the low amount of wine sample (3 mL) and the short time required for the analysis.

The recovery of the fractionation method was calculated from the application of this methodology in triplicate to a wine sample before and after the addition of known amounts of pure castalagin (50%, 100% and 150% of the content reported for this ellagitannin in wine (Saucier *et al.*, 2006)). The mean recovery, which takes into account the mean recovery at each concentration and the mean of these recoveries, was 91.5%.

1) SPE in a C-18 Sep-pak® cartridge



2) Size exclusion chromatography of fraction *a* in Sephadex LH-20

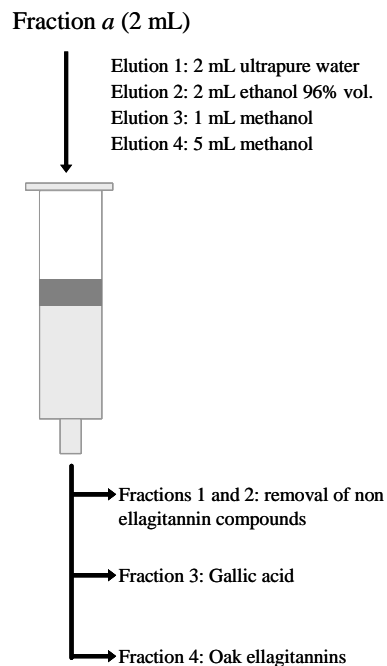


Figure 3. Scheme of the two-step fractionation method developed for the separation of the oak ellagitannins' fraction from red wines.

The developed method was also used to analyze the oak ellagitannins in three real wines. Differences in the ellagitannin levels of these three wines were expected due to the differences in their ages and in the time spent in oak barrels. None of the targeted ellagitannins was detected in the wines when analyzed directly after de-alcoholization and dilution of the sample. However, when these wines were fractionated, it was possible to detect some ellagitannins in fraction 4, proving the usefulness of the fractionation method.

Chapter 2: Validation of a mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins in wine samples

The main objective in this chapter was to develop and validate a mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins in wine samples after sample fractionation with the previously developed method (see Chapter 1). The obtained results led to the following *peer-reviewed* publication:

García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Alcalde-Eon, C. Validation of a mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins in wine samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2012**, 60, 1373-1379.

Material and methods

HPLC-DAD-MS analysis: The HPLC method 1 developed in the previous chapter was employed for the analysis of the samples. Mass spectrometry was carried out in an instrument equipped with an ESI source and a triple-quadrupole/linear ion trap mass analyzer. The mass spectral method consisted of two mass experiments: (i) Full mass analysis (EMS mode) was employed to obtain the signals at the m/z ratios corresponding to the ellagitannins and to the internal standard. Mass conditions were automatically optimized by direct infusion of a solution of castalagin (García-Estévez *et al.*, 2012). (ii) Multiple reaction monitoring analysis (MRM mode) was employed to detect the transitions (each parent-ion/daughter-ion pair) corresponding to the analyzed ellagitannins (castalagin (933/631), vescalagin (933/301), and grandinin and roburin E (1065/249)) and to the internal standard (galocatechin (305/125)). The settings employed in the MRM analysis were tuned for each transition by direct infusion of a solution of the corresponding compound (García-Estévez *et al.*, 2012).

Internal standard selection: Different compounds were tested as internal standards: chlorogenic acid, pentagalloylglucose, 4-hydroxybenzoic acid, 3,5-dihydroxybenzoic acid and galocatechin. Five different solutions of castalagin of different concentrations were prepared daily and analyzed in triplicate in four non-consecutive days, after the addition of the tested internal standard (each internal standard was tested separately). The relationship between the castalagin and the internal standard (IS) signals in both mass modes employed (EMS and MRM modes) was determined by the equation 1. The variability of f values was used to assess the usefulness of each compound as IS.

$$f = \frac{\frac{\text{ellagitannin signal}}{\text{ellagitannin concentration}}}{\frac{\text{IS signal}}{\text{IS concentration}}}$$

Equation 1

Model calibration development: Calibration curves were built from the data resulting from triplicate HPLC-DAD-MS analyses of solutions of each ellagitannin at different concentrations using galocatechin as internal standard. Two calibration curves were built for each ellagitannin from data supplied by mass spectrometry, one using the data obtained in EMS mode and other from those obtained in MRM mode. In both cases, correction was done by calculating the *s* ratio (equation 2) and this ratio was plotted versus the ellagitannin concentration to build the calibration curves.

$$s = \frac{\text{ellagitannin signal}}{\text{IS signal} / \text{IS concentration}}$$

Equation 2

Validation of the HPLC-MS method: The following parameters were determined following the FDA guidance for the validation of analytical methods (FDA, 2009): Curve adjustment, accuracy, intra- and inter-day precision, and detection (LOD) and quantification (LOQ) limits (García-Estévez *et al.*, 2012). Moreover, the compound stability in the processed samples was tested both in presence and absence of the internal standard.

Wine samples: In order to test the usefulness of the developed method for ellagitannin quantification, twelve Spanish commercial wines were analyzed, including red, white and rosé wines, which were made from grapes of different varieties and aged for different periods using oak wood from different geographical origins. Samples were fractionated with the method previously developed (García-Estévez *et al.*, 2010) and the levels of each individual ellagitannin were determined using the quantification method built on MRM mode.

Results and discussion

Mass parameter optimization: The aforementioned transitions were selected on the basis of the fragmentation pattern obtained in the MS² analysis for each compound. The most abundant fragment ion obtained in this analysis was selected as daughter ion. Although castalagin and vescalagin show identical *m/z* ratios and very similar

fragmentation patterns in mass spectrometry, optimization of the mass conditions has allowed the obtaining of a specific fragmentation pattern for each compound where the most abundant fragment ion is different and with also different minor fragment ions. Thus, the main transition for castalagin was 933/631 whereas for vescalagin it was 933/301. This enabled the monitoring of a different transition for each of these two compounds, making the quantification method more selective. This differentiation between isomers was not possible for grandinin and roburin E. However, the previous separation by HPLC allowed the individual quantification of these compounds from the signals obtained for the same transition.

Internal standard selection: The tests conducted were designed to find a stable relationship between the ellagitannin and the internal standard mass signals. Chlorogenic acid has been employed previously as internal standard in the quantitative analysis of oak ellagitannins in wine samples (Saucier *et al.*, 2006; Jourdes *et al.*, 2011) and for this reason it was tested. However, the f ratio calculated using equation 1 showed a high variability both intra- and inter-day and, in some cases, higher than the ellagitannin signal variability. This indicated that the use of this compound did not allow the correction of the variability of the ellagitannin signal, probably due to the difference between its structure and that of the ellagitannins. However, it might also be related to differences in the composition of the mobile phase at the moment of the mass analysis because, with the chromatographic method employed in this study (García-Estévez *et al.*, 2010) chlorogenic acid elutes much later and with higher percentages of methanol than ellagitannins. Furthermore, during these experiments a decrease over time in the levels of castalagin in the solutions that contained chlorogenic acid was observed, whereas the same solutions in the absence of chlorogenic acid were stable, as will be explained later. Thus, chlorogenic acid was not a suitable internal standard for the ellagitannin quantification by mass spectrometry. Pentagalloylglucose (PGG) was also tested as internal standard but the obtained results were similar to those obtained for chlorogenic acid. PGG also eluted much later than ellagitannins, so the variability obtained could be due to a high variability in the ionization process of these compounds. For this reason, different phenolic compounds that, as ellagitannins do, could elute with a predominantly aqueous mobile phase were

tested as internal standards. Among the different compounds tested, only gallicocatechin has provided good results. Although gallicocatechin can be found in wine samples, after sample fractionation (García-Estévez *et al.*, 2010) ellagitannins and wine native gallicocatechin are present in different fractions, making possible the use of this compound as internal standard.

Model calibration development: **Table 1** shows the calibration curves built for grandinin, vescalagin, roburin E, and castalagin in both EMS and MRM modes, as well as the correlation coefficients and the range of concentration for each ellagitannin. Data were fitted to different calibration models, and the best results were obtained for a quadratic model. The quadratic trend is more evident at the lowest concentrations, and because ellagitannins are normally found in wines in low concentrations, this type of adjustment seems to be the most appropriate to build the calibration curves.

Table 1. Calibration curves built for grandinin, vescalagin, roburin E and castalagin in both EMS and MRM modes

Ellagitannin	Concentration range analyzed (mg L ⁻¹)	Mass mode analysis	Model calibration equation	Correlation coefficients
Grandinin	7.5 × 10 ⁻² - 5	EMS	$y = 1.8072x^2 + 0.0291x + 3 \times 10^{-6}$	0.9990
		MRM	$y = 9.8641x^2 + 0.1189x + 6 \times 10^{-6}$	0.9993
Vescalagin	7.5 × 10 ⁻² - 5	EMS	$y = 0.341x^2 + 0.0185x$	0.9990
		MRM	$y = 0.2544x^2 + 0.0032x + 4 \times 10^{-7}$	0.9993
Roburin E	7.5 × 10 ⁻² - 5	EMS	$y = 1.7758x^2 + 0.0638x + 4 \times 10^{-6}$	0.9991
		MRM	$y = 10.323x^2 + 0.2616x + 7 \times 10^{-6}$	0.9993
Castalagin	7.5 × 10 ⁻² - 50	EMS	$y = 0.2941x^2 + 0.2559x$	0.9997
		MRM	$y = 5.6273x^2 + 0.249x$	0.9997

Model validation. Developed methodologies were validated following the FDA guidelines to validate analytical methods (FDA, 2009). The correlation coefficients were >0.999 in all cases, and adjustments were statistically significant ($p < 0.01$). The quantification method showed good accuracy since the recovery rates obtained did not show statistically significant differences with a 100% recovery value. Moreover, the values obtained for the intra- and inter-day precisions were within FDA criteria acceptance (FDA, 2009).. The obtained values of LOD and LOQ were on the order of

the LOD and LOQ values existing in the literature (Jourdes *et al.*, 2011). MRM analysis provided the lowest detection and quantification limits, as a result of the higher sensitivity of this mass methodology. In both cases they were lower than the usual concentration levels of ellagitannins in wine samples (Jourdes *et al.*, 2011; Stark *et al.*, 2010). As indicated above, the compound stability in the processed samples was determined before and after addition of gallocatechin. In both cases the results showed that there were no statistically significant differences between the concentration determined before and after the storage, pointing out the processed sample stability.

Ellagitannin determination in wine samples. To prove the versatility of the developed analysis method, ten red wines, one white wine, and one rosé wine were fractionated with the method previously developed (García-Estévez *et al.*, 2010) and their ellagitannin contents were determined by the calibration model developed in the present work. Regardless of the variety of grape employed in wine elaboration or the geographical origins of the oak employed for wine aging, the individual levels of ellagitannins were successfully determined.

Chapter 3: Influence of the type of oak used in winemaking and aging on the ellagitannin profile of red wines.

The aim of the study carried out in this chapter was to study the influence that the oak wood type (French or American) and age (first-fill or second-fill) of the barrels can exert on the individual ellagitannin content and on its evolution during the winemaking and aging. The obtained results are being drafted for publication.

Material and methods

HPLC-DAD-MS analysis: To determine the ellagitannins concentration, wine samples were first fractionated following the two-step fractionation method previously developed (García-Estévez *et al.*, 2010). The ellagitannin-rich fraction obtained was then analyzed by HPLC-ESI-MS/MS-multiple reaction monitoring using the methodology previously validated (García-Estévez *et al.*, 2012).

Wine samples: Oak ellagitannin content was determined in different wines made from *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes from two different vineyards (vineyard 1 and vineyard 2) during winemaking and aging. Depending on the wine, maceration and alcoholic fermentation steps were carried out either in new (wines *V1a*) or in second-fill (wines *V1b* and *V2*) French oak tanks. Malolactic fermentation took place either in oak tank (wines *V2*) or in different oak barrels (wines *V1a* and *V1b*): new (F) and second-fill (S) barrels made from French oak wood (*Quercus petraea*) and new barrels made from American (A) oak wood (*Q. alba*). Then, all the wines were aged using this three types of oak barrels. After barrel aging, all the wines were bottled. Samples were taken at different moments of winemaking and aging.

Statistical analysis: Canonical discriminant analysis (CDA) was used for data analysis as a multi-group discrimination method. The dataset employed consisted on the ellagitannin levels determined in all the wines during all the study. Moreover, statistical differences for total and individual ellagitannin levels and for the vescalagin/castalagin ratio were determined by one-way analysis of variance.

Results and discussion

Total ellagitannins: No differences on the evolution of the ellagitannin levels were observed depending on the type of oak barrel employed. In all the wines analyzed, total ellagitannin content reached a maximum after approximately 3 months of stay in

oak barrels, and after this moment, total ellagitannin content started to decrease in a similar way. Moreover, a correlation between rackings and this decrease was observed, probably due to an important entrance of oxygen in the medium occurring during rackings which can favor the ellagitannin oxidation.

In relation to the importance of the container where the malolactic fermentation takes place it was observed that it affects not only the maximum concentration but also the levels determined at the end of the study. This could be explained by a higher extraction from oak barrels than from oak tanks as a consequence of the greater surface-to-volume ratio of barrels in relation to tanks. Moreover, the amounts of ellagitannin extracted from the new oak tank were significantly higher than those extracted from second-fill oak tanks. This indicates the lower capability of used oak tanks to release ellagitannins as consequence of a partial depletion of the outermost layers of the wood (Zamora, 2003).

Regarding the type of oak barrel used for wine aging it was observed that wines aged in new French oak (**F**) barrels showed in all cases a much higher concentration (almost 2-fold higher) of ellagitannins than those aged in new American oak (**A**) barrels. This difference can be explained by the fact that French oak has a concentration of ellagitannins between 2 and 4-fold higher than American oak (Chatonnet and Dubourdieu, 1998; Fernández de Simón *et al.*, 1999). However, as a consequence of the process employed in the manufacture of the **A** barrels, wine can penetrate deeper in the wood structure, allowing the extraction of compounds from deeper layers of this kind of wood and partially making up for the lower contents of ellagitannins in American oak.

The higher ellagitannin content found in wines aged in **F** barrel (*ca.* 2-fold higher) in relation to those aged in second-fill (**S**) French oak barrels can be explained by the partial depletion of the outermost layers of the wood as a result of the use of the barrels in successive years. Moreover, it was observed a slower loss of ellagitannins over time in wines aged in **F** barrels in relation to those aged in **A** and **S** barrels, which, in turn, showed very similar evolutions over time. Thus, it seems that new French oak barrels were able to release higher amounts of ellagitannins and probably during a longer period of time than the other types of barrels employed in this study.

Individual ellagitannins: Results showed that castalagin and vescalagin were the most abundant (on average about 50% and 30% of the total ellagitannin content, respectively) and the most stable ellagitannins over time, while grandinin and roburin E showed a lower stability over time. Moreover, these two latter ones represented each one only about 5% of the total ellagitannin content during the stay of the wines in the oak tanks (both new and used) whereas during the stay in the oak barrels, they represented up to 12-14% of total ellagitannin content. This could be explained by the different surface-to-volume ratio and the different type of oak wood between tanks and barrels along with a possible easier extractability and higher stability of castalagin and vescalagin in relation to grandinin and roburin E.

Furthermore, wines aged in French oak barrels (both **F** and **S**) showed during all the study a higher vescalagin/castalagin ratio than those aged in **A** barrels. The mean value of this ratio, calculated for each type of wine from the values obtained at each step of the winemaking and aging, was also significantly higher in wines aged in French oak barrels than in wines aged in **A** barrels except for wine V2. In these wines, the length of the stay in the French oak tank could partially modify this ratio. Therefore, the kind of barrel employed for aging conditions the ellagitannin composition of the wine.

Discriminant analysis: Discriminant analysis was performed as a supervised pattern recognition method to allocate the wine samples to their wine group (wines aged in **F** oak barrels (“**F** barrels” group), wines aged in **A** oak barrels (“**A** barrels” group) and wines aged in **S** oak barrels (“**S** barrels” group)). As can be seen (**Figure 4**) factor 1 allowed the discrimination of wines aged in **F** barrels from the rest of samples. Total content, castalagin percentage and vescalagin/castalagin ratio were the variables that better explain the discrimination along this factor. Therefore, the higher total content in wines aged in **F** barrels allowed the separation of this group from **A** and **S** groups along factor 1. The differentiation between samples of wines aged in **S** barrels from the rest of samples was possible along the factor 2. The most important variables on this factor 2 were vescalagin percentage, vescalagin content and vescalagin/castalagin ratio. Thus, wines aged in **A** barrels were grouped separately from wines aged in **S** barrels along factor 2 mainly as a consequence of the difference in the vescalagin content.

From these results, it seems that the wine ellagitannin composition along with chemometric tools such as discriminant analysis might indicate the oak type of the barrels used for aging. Differences in the ellagitannin composition resulting from the kind of oak barrel employed might influence wine properties, considering the role that oak ellagitannins can play on wine organoleptic properties, such as color (Vivas and Glories, 1996) or astringency (Chira and Tesseidre, 2013; Glabasnia & Hofmann, 2006; Stark *et al.*, 2010) and the different chemical and biological activity of the ellagitannins (Jourdes *et al.*, 2009; Quideau *et al.*, 2005).

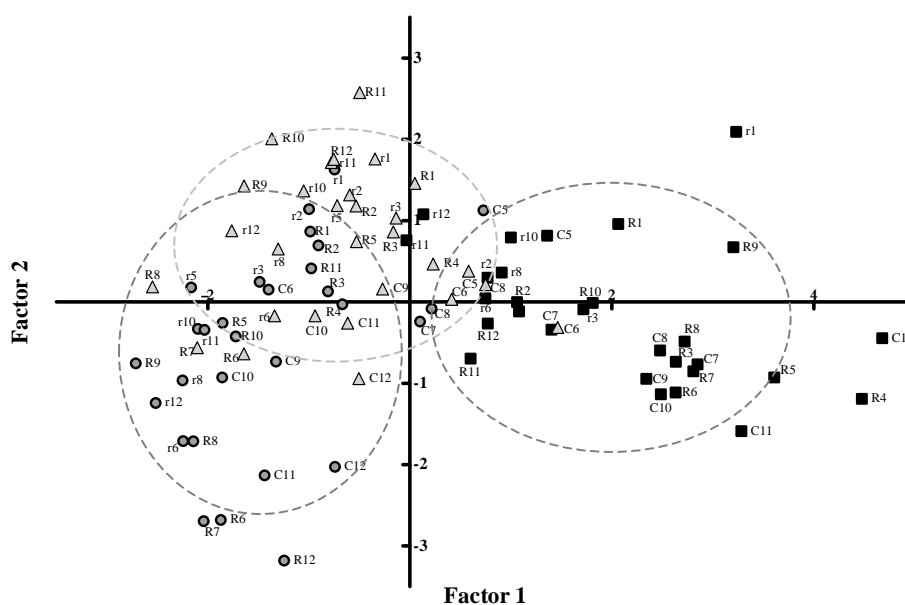


Figure 4. Discriminant analysis plot of data from wines aged in new French (■), second-fill (△) and new American (●) oak barrels. R: Wine V1a; r: Wine V1b; C: Wine V2. The numbers correspond to the sampling points.

SECTION II: EFFECT OF THE ADDITION OF HYDROLYZABLE AND CONDENSED TANNINS ON WINE PIGMENT COMPOSITION AND COLOR

Chapter 4: Influence of the addition of hydrolyzable and condensed tannins on the evolution of pigment composition and color of model systems and red wines.

The main objective of this work was to assess the influence of the addition of two different oenological tannins, mainly composed of hydrolysable (ellagitannins) and condensed tannins, on the evolution of color and pigment composition of two different types of model systems containing the five main grape anthocyanidin 3-*O*-glucosides and of Tempranillo red wines. The obtained results are being drafted for publication.

Material and methods

Chemicals: Anthocyanidins (delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin and malvidin) 3-*O*-glucosides were extracted from the skins of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes following a previously developed methodology (García-Estévez *et al.*, 2013a). Oenological tannin C was mainly constituted by flavanols (58.8%), oak ellagitannins (11.2%) and hydroxybenzoic acids (7.5%). Oenological tannin S was mainly constituted by procyanidins (22.9%), catechins (8.4%), oak ellagitannins (16.9%) and hydroxybenzoic acids (11.1%).

Model systems: The model systems consisted of a mixture 3:1 of the main anthocyanidin 3-*O*-glucosides with the oenological tannin (C or S), prepared in two different solvents: standard wine (*ATC* and *ATS*, added with the tannin C and S respectively) and a fermentative medium resulting from the fermentative metabolism of glucose (*ATCF* and *ATSF*, added with the tannin C and S respectively). Model systems without oenological tannins prepared in both solvents (*A* and *AF* in standard wine and in the fermentative medium respectively) were used as a reference. Two model systems of each type were prepared and monitored. These model systems have been monitored for 98 days by means of HPLC-DAD-MSⁿ analysis and colorimetric measurements were also performed.

Wines: The oenological tannin C has been added at three steps (final concentration of 35 g/hL) during the alcoholic fermentation of two different wines elaborated from *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes (wine *R* and wine *F*), using two different strains

of *Saccaromyces cerevisiae* (yeast R and yeast F respectively). A wine elaborated with the yeast R but without any oenological tannin was used as reference wine (wine C). Each wine was elaborated in triplicate and monitored for 5 months by means of HPLC-DAD-MSⁿ analysis and colorimetric measurements.

Results and discussion

Model systems: The qualitative evolution of the pigments was the same for each type of model systems regardless of the presence or absence of oenological tannin and independently of the type of oenological tannin employed. However, some important differences were observed depending on the solvent employed to prepare the model system. In the case of the model systems prepared with standard wine, the disappearance of the grape anthocyanins was clearly observed whereas no formation of derivative pigments could be observed. However, in the model systems prepared using the fermentative medium as solvent, the disappearance of the grape anthocyanins occurred along with the formation of A-type and B-type vitisins of peonidin 3-O-glucoside and of malvidin 3-O-glucoside. The greater complexity of the fermentation medium in relation to the standard wine makes possible the involvement of anthocyanins in different reactions and, as a consequence, their transformation is more important than in standard wine model systems. Moreover, it is worth pointing out that in both types of model systems, peonidin 3-O-glucoside was the anthocyanin that showed, at the end of the study, the highest percentages in relation to the initial contents. Moreover, the formation of A-type and B-type vitisins derived from this anthocyanin was also observed in the model systems prepared in the fermentative medium. Thus, the disappearance of this anthocyanin could be mainly related to the formation of derivative pigments whereas the disappearance of other anthocyanins such as delphinidin 3-O-glucoside or petunidin 3-O-glucoside could only be attributed to their degradation, since no pigments derived from these anthocyanins could be detected.

In the case of the model systems prepared in the fermentative medium, the lowest loss of anthocyanins were observed for those model systems added with the oenological tannins, and no differences were observed between the two different oenological tannins. The model systems added with the oenological tannins (*ATCF* and

ATSF) also showed the highest levels of vitisins. The higher formation of these derivative pigments in these model systems might be related to the presence of ellagitannins in the oenological tannins. On the one hand, these compounds have been reported to favor the transformation of ethanol into acetaldehyde (Vivas and Glories, 1996), one of the substrates for the formation of B-type vitisins. On the other hand, the ellagitannins present in the oenological tannins can favor the formation of the A-type vitisins acting as oxidants in the last step of the synthesis, which is an essential step to complete it (Asenstorfer *et al.*, 2003).

The addition of the oenological tannins also affected the evolution of the CIELAB color parameters. Respecting lightness the lowest values were observed in the model systems added with the oenological tannins (*ATCF* and *ATSF*). This could be explained by two different reasons. First, these oenological tannins contain, among other compounds, flavanols and hydroxycinnamic acids that can act as copigments of the anthocyanins. As a consequence, the lightness of the samples may be reduced due to the hyperchromic effect induced by copigmentation. Second, the levels of anthocyanins were higher in model systems *ATCF* and *ATSF*, which might be related to a higher protection of the anthocyanins in these model systems as a result of the presence of ellagitannins. Thus, the highest levels of anthocyanins may explain why these model systems were darker than the corresponding model system without oenological tannin. The model systems treated with oenological tannins were also those that showed the lowest decreases in the value of Chroma. As in the case of lightness, the difference on Chroma values for the model systems prepared in the fermentative medium could also be due to the higher levels of anthocyanins in the model systems to which an oenological tannin was added. Thus, the addition of the oenological tannins was correlated to darker model systems and to higher values of chroma at the end of the study, which could indicate a higher stabilization of color.

Wines: The evolution of wine pigment composition has been studied during 8 months at five different points of the winemaking and aging processes. At the end of the alcoholic fermentation wines *R* and *F* showed higher levels of anthocyanidin 3-O-glucosides than wine *C*. Thus, it seems that the addition of flavanols and phenolic acids through the addition of the oenological tannin can favor the extraction of anthocyanins

from grapes by means of copigmentation reactions as previously reported elsewhere (Boulton, 2001; Darias-Martín *et al.*, 2001; González-Manzano *et al.*, 2009). Furthermore, the wines containing the oenological tannin also showed, at the end of the study, a lower loss of anthocyanins than wine C. This could be related to a higher protection of these pigments against oxidation as a consequence of the presence of ellagitannins in these wines (Vivas and Glories, 1996) due to the addition of the oenological tannin. In relation to the anthocyanin-derived pigments, the effect of the addition of the oenological tannin was different depending on the type of derivative pigment. Respecting flavanol-anthocyanin direct condensation products (F-A+ products) wines *F* and *R* showed higher levels than wine C. The addition of the oenological tannin could not only supply substrates but also indirectly favor the formation of this kind of pigments since the presence of ellagitannins might favor the polymerization reactions between flavanol and anthocyanins (Alcalde-Eon *et al.*, 2006b; Vivas and Glories, 1996). As for flavanol-anthocyanin acetaldehyde-mediated condensation products, wines *R* and *F* also showed higher levels than wine C. The presence of ellagitannins, which are related to a higher formation of acetaldehyde (Vivas and Glories, 1996) and the higher levels of flavanols in wines *R* and *F*, as a consequence of the addition of the oenological tannin, could explain the higher formation of this kind of pigments. The formation of A-type and B-type vitisins of malvidin 3-*O*-glucoside was more affected by the yeast strain employed than by the addition of the oenological tannins. However, it seems that the addition of the oenological tannin could favor the formation of these vitisins since wine *R* showed higher levels of these vitisins than wine C (both made using yeast *R*). As previously indicated for the model systems, the higher formation of this anthocyanin derivatives can be attributed to the presence of ellagitannins, which are related to a higher formation of acetaldehyde (Vivas and Glories, 1996) and might take part in the oxidation step required to complete the synthesis of A-type vitisins (Asenstorfer *et al.*, 2003). Finally, the formation of the vinylphenol pyranoanthocyanin of malvidin 3-*O*-glucoside was affected neither by the yeast strain nor by the addition of the oenological tannin. Thus, the presence of ellagitannins seems not to affect to the formation of this kind of pyranoanthocyanin. The effect of the addition of the oenological tannin on red wine color was similar to that observed for the model

systems: the addition of the oenological tannins has led to wines with lower values of lightness and higher values of chroma, which can be related to a stabilization of wine color.

Chapter 5: Effect of the addition of ellagitannins and proanthocyanidins on the red wine phenolic composition and color.

The main objective of this work was to assess the effects of the addition of an oenological tannin mainly constituted by proanthocyanidins and ellagitannins on red wine phenolic composition and color, thus corroborating the effects observed in the previous chapter in model systems and experimental wines. The obtained results led to the following *peer-reviewed* publication:

Alcalde-Eon, C.; García-Estévez, I.; Ferreras-Charro, R.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Ferrer-Gallego, R.; Escribano-Bailón, M.T. Adding oenological tannin *vs.* overripe grapes. Effect on the phenolic composition of red wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2014**. DOI: 10.1016/j.jfca.2014.01.004 (*accepted for publication*).

Material and methods

Samples: Two different wines (Control and Tannin wines) elaborated in two consecutive vintages from *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes were analyzed. An oenological tannin was added twice to one of these wines (Tannin wine) during alcoholic fermentation in a dose of 15 g/hL each time. The oenological tannin employed was one of those tested in the previous chapter (tannin C, mainly constituted by flavanols (58.8%), oak ellagitannins (11.2%) and hydroxybenzoic acids (7.5%)). Control wine was elaborated following the same procedure than Tannin wine but without the addition of the oenological tannin: the maceration and the alcoholic fermentation were carried out in a stainless steel tank. At the end of alcoholic fermentation wines were transferred into new medium-toasted French oak barrels where the malolactic fermentation took place and where the wines were aged. Then wines were bottled and aged in bottle for 6 months. Wine samples were collected at different moments during winemaking and ageing from the alcoholic fermentation to 6 months after bottling. Each sample was analyzed in triplicate.

Analysis of pigment composition: Wine samples were diluted (1/5) with acidified water (pH 1, HCl) before HPLC-DAD-MS analysis using a previously developed method (Alcalde-Eon *et al.*, 2006b). Twenty-three anthocyanins and derivative pigments were determined: 5 anthocyanidin 3-*O*-glucosides, 5 anthocyanidin 3-*O*-acetylglucosides, 8 anthocyanidin 3-*O*-cumaroylglucosides, 3 flavanol-anthocyanin direct condensation products, the A-type vitisin of malvidin 3-*O*-glucoside and the vinylphenol-malvidin 3-*O*-glucoside pyranoanthocyanin.

Analysis of flavanols and phenolic acids: Wine sample was fractionated prior to HPLC-DAD-MS analysis following a previously reported procedure (González-Manzano *et al.*, 2006). The phenolic rich-fraction was then analyzed by HPLC-DAD-MS (García-Marino *et al.*, 2006). Seventeen flavanols were determined: 3 monomers (catechin, epicatechin and galocatechin), 10 procyanidins (6 dimers, 3 trimers and 1 galloylated dimer) and 4 prodelphinidins (2 dimers and 2 trimers). Nine phenolic acids were determined: 8 hydroxycinnamic acids and their tartaric esters and 1 hydroxybenzoic acid (gallic acid).

Colorimetric measurements: Wine pH was standardized to 3.6 with 0.1 N HCl and absorption spectra (190-1100 nm) were recorded. CIELAB color parameters were then calculated and color differences between Control and Tannin wines were determined.

Chemometric techniques: Principal components analysis (PCA) was used for data analysis. The total variables used were 20, corresponding to detailed phenolic composition and 5 CIELAB color parameters.

Results and discussion

Flavanols: The highest levels of catechins and procyanidins were observed in Tannin wines. This can be explained by the composition of the oenological tannin employed (42% of catechins and procyanidins). However, the addition of the oenological tannin might influence the levels of catechins and procyanidins not only by directly supplying catechins and procyanidins to the wine but also affecting the reactions in which these compounds are involved, i.e. partial hydrolysis of oligomeric procyanidins favoring the release of monomers from them. The same effect was observed for gallocatechins and prodelphinidins. However, in this case the direct increase in their levels was less important since the oenological tannin content of these

compounds in the oenological tannin was much lower than that of catechins and procyanidins. Nevertheless, in both cases the effect of the oenological tannin addition was partially influenced by vintage: This influence was more noticeable in wines with the lowest initial content of flavanols (vintage 2009). Thus, the levels of flavanols in grapes might determine the effect of the oenological tannin addition.

Gallic acid: The levels of this compound increased from alcoholic fermentation to barrel ageing in all cases. However, the effect of the addition of the oenological tannin was different between vintages. In 2009, Tannin wine showed the highest content in almost all the steps of winemaking and ageing in the barrel which can be explained, as in the case of flavanols, by the direct supply of this compound and probably by its indirect effect, through the increase of the hydrolysis reactions leading to a release of gallic acid units. In 2010, on the contrary, a general behavior for this compound can not be reported. Thus, the effect of the addition of oenological tannin on the evolution of gallic acid has been shown to be clearly dependent on vintage.

Hydroxycinnamic acids and their tartaric esters: These compounds also showed an important vintage effect. Nevertheless, the same behaviors within the same vintage have been observed for each ester/free acid pair (caftaric/caffeic acid and coutaric/*p*-coumaric acid). An increase of free acids during malolactic was observed as a result of the hydrolysis of the corresponding esters that can be attributed to lactic acid bacteria which can use the tartaric esters as substrates due to their cinnamoyl esterase activity (Hernández *et al.*, 2007). The oenological tannin did not supply hydroxycinnamic acids or their tartaric esters to the wines to which it was added. Nevertheless, it seems that it might favor the release of the hydroxycinnamic acids from their corresponding tartaric esters, since Tannin wines showed a much important increase during malolactic fermentation of free acids than Control wines.

Anthocyanins: Tannin wines showed higher levels of anthocyanins than Control wines. This may indicate that the addition of the oenological tannin favors the extraction of these compounds from grape skins. The addition of the oenological tannin increases the levels of phenolic compounds such as flavanols or phenolic acids which can in turn interact with anthocyanins by means of copigmentation process favoring their extraction from grape skins.

During aging, two effects could be observed. First, the addition of the oenological tannin could favor the formation of anthocyanin-derived pigments. Nevertheless, it can also protect anthocyanins towards oxidation, which might explain why there were no significant differences in anthocyanin levels between Tannin and Control wines.

Anthocyanin-derived pigments: The effect of the addition of the oenological tannin depended on the type of anthocyanin-derived pigment studied. Regarding flavanol-anthocyanin direct condensation products, Tannin wines showed higher levels than Control wines. This can be explained by the higher levels of substrates (i.e. flavanols) for the formation of this kind of pigments as a result of the addition of the oenological tannin. Moreover, it has been reported in literature that the presence of ellagitannins can favor the formation of this kind of pigments (Alcalde-Eon *et al.*, 2006b; Vivas y Glories, 1996). Thus, the addition of the oenological tannin can increase the levels of flavanol-anthocyanin direct condensation products not only by providing substrates for their formation but also by favoring the reaction.

In the case of the A-type vitisin of malvidin 3-O-glucoside, Tannin wines also showed higher levels than Control wines. The ellagitannins supplied by the oenological tannin employed in Tannin wine may be related to a higher formation of this vitisin, since ellagitannins favor the increase of reactive oxidizing species that take part in formation of A-type vitisins.

No differences were found in the levels of the vinylphenol-malvidin 3-O-glucoside pyranoanthocyanin levels between Tannin and Control wines. Thus, it seems that the addition of the oenological tannin, and therefore the addition of ellagitannins, does not affect the formation of this pigment.

Color: The addition of the oenological tannin showed a clear influence on Lightness values. Control wines showed higher values of lightness than Tannin wines. Thus, Tannin wines were darker than Control wines. Regarding the values of Chroma, the behavior differed between the two studied vintages. However, in both vintages in the first sampling points Tannin wines showed higher Chroma values than Control wines, as a result of the higher levels of anthocyanidin 3-O-glucosides in the former ones, which in turn can also explain its lower values of Lightness. In the case of hue, no clear differences were observed between Tannin and Control wines.

Principal Component Analysis was carried out from the dataset obtained in order to assess the most important variables to differentiate between Tannin and Control wines. It was observed that anthocyanin and proanthocyanidin contents were the most useful variables to differentiate between these two kinds of wines.

In summary, the addition of the oenological tannins made the proanthocyanidin levels higher. Furthermore, it also favored the hydrolysis of the tartaric esters of the hydroxycinnamic acids and as a consequence, the levels of free hydroxycinnamic acids increased. The addition of the oenological tannin promoted both the extraction of anthocyanins from grape skins and the formation of anthocyanin-derived pigments such as A-type vitisins or flavanol-anthocyanin direct condensation products. Moreover, the treated wines were darker than Control wines. Thus, the addition of the oenological tannin, i.e. the addition of ellagitannins and flavanols, might be useful to correct grape pigment deficiencies and also to favor the formation of derivative pigments, helping to improve wine color stabilization.

SECTION III: ANTHOCYANIN-ELLAGITANNIN HYBRID PIGMENTS.**Chapter 6: Hemisynthesis, structural and chromatic characterization of delphinidin 3-O-glucoside-vescalagin hybrid pigments**

The main purpose of the study carried out in this chapter was the hemisynthesis of delphinidin 3-O-glucoside-vescalagin hybrid pigments and the study of their chromatic properties in order to assess the role of such anthocyanin-ellagitannins hybrid pigments in the modulation of wine color. The obtained results led to the following *peer-reviewed* publication:

García-Estévez, I.; Jacquet, R.; Alcalde-Eon, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T.; Quideau, S. Hemisynthesis and structural and chromatic characterization of delphinidin 3-O-glucoside-vescalagin hybrid pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, 61, 11560-11568.

Material and methods

Chemicals. Delphinidin 3-O-glucoside (myrtillin) was extracted from the skins of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. The extract was fractionated using Sephadex LH-20. Delphinidin 3-O-glucoside eluted later than the other anthocyanidin 3-O-glucosides. Myrtillin purity (>95%) was determined by HPLC-DAD-MS analysis. (-)-Vescalagin (Vg) was extracted from *Quercus robur* heartwood and purified as described previously (Quideau *et al.*, 2004).

Reaction: The reaction was performed according to the procedure described by Quideau and co-workers for the hemisynthesis of oenin- and malvidin-vescalagin hybrid pigments (Quideau *et al.*, 2005). Products were purified by semipreparative HPLC. The obtained fractions were then analyzed by HPLC-DAD-ESI-MS and those containing each compound of interest were gathered, and re-purified using the same semipreparative HPLC procedure.

Product characterization: The structures of the purified product were investigated by means of ¹H-NMR analyses. Moreover, the absorption spectra of the pigments obtained were recorded at pH 1 (0.1 M HCl aqueous solution) and at pH 3.2 (model wine solution). CIELAB parameters (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , and h_{ab}) and color differences (ΔE^*_{ab}) were also determined.

Results and discussion

Hemisynthesis and structural characterization: Reaction between vescalagin and myrtillin was carried out in an anhydrous tetrahydrofuran solution containing 1.5% (v/v) of trifluoroacetic acid (**Figure 5**).

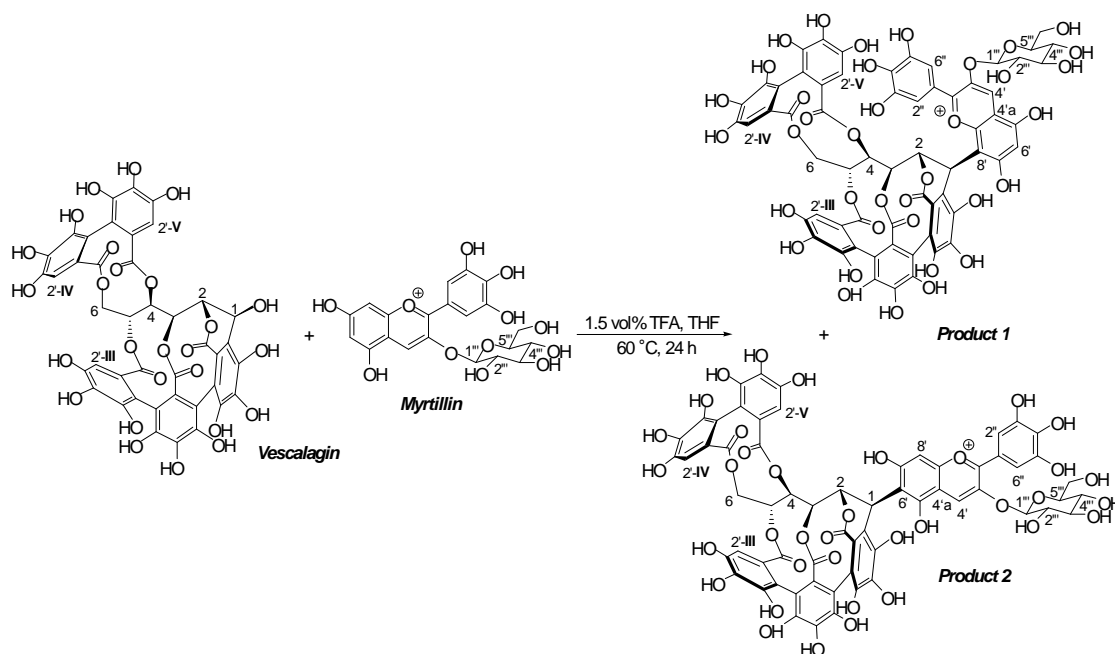


Figure 5. Reaction between vescalagin and myrtillin in an acidic organic solution.

The reaction progress was monitored by HPLC-DAD-MSⁿ to determine the optimum reaction time. After 24 h, the degradation of the starting materials and the formation of secondary products were more important than the formation of direct condensation vescalagin-myrtillin products, and therefore this time was set as final time reaction. Different products were obtained, but among them, only two showed a band of absorption in the visible region of the spectrum. These two pigments (see **Figure 5**) were obtained and isolated by semipreparative HPLC, hence obtaining 13 mg of product 1 (molar yield of 4.3%, purity higher than 95%) and 1.5 mg of product 2 (molar yield of 0.5%, purity higher than 90%).

The UV-visible spectra of these hybrid pigments showed (see **Figure 6**) a maximum around 230 nm (characteristic of the ellagitannins), a shoulder around 280 nm (characteristic of the anthocyanin) and another maximum around 540 nm (characteristic of the flavylum form of some purple anthocyanin derivatives). Mass analyses of both pigments provided in full mass analysis a molecular ion at m/z 1381

with the same fragmentation pattern: a main fragment in MS² analysis at m/z 1219 ($[M^+-162]$), corresponding to the loss of the anthocyanin glucose moiety, and a main fragment in MS³ analysis at m/z 917 ($[M^+-162-302]$), which could correspond to the 1-deoxyvescalagin moiety formed by the loss of the anthocyanin residue.

Both hybrid pigments (products **1** and **2**) resulted from an acid-catalyzed nucleophilic substitution at the C-1 center of vescalagin with retention of configuration. The anthocyanin molecule has two potential nucleophilic positions (6'-C and 8'-C), but according with literature (Es-Safi *et al.*, 1999; Atanasova *et al.*; 2002; Chassaing *et al.*, 2010), anthocyanin 8'-C position is more likely to be involved in the linkage than 6'-C. For this reason, and taking into account the rate at which the compounds were obtained, product **1**, the major one, was identified as 1-deoxyvescalagin-(1 β \rightarrow 8)-myrtillin (8'-C isomer), whereas product **2**, obtained in a much lower proportion, was identified as 1-deoxyvescalagin-(1 β \rightarrow 6)-myrtillin (6'-C isomer) (**Figure 5**). ¹H-NMR signals obtained in the NMR analysis of products **1** and **2**, with the help of the analysis of the HMQC and HMBC correlation data maps of the major product **1**, were used to corroborate the identities of these pigments.

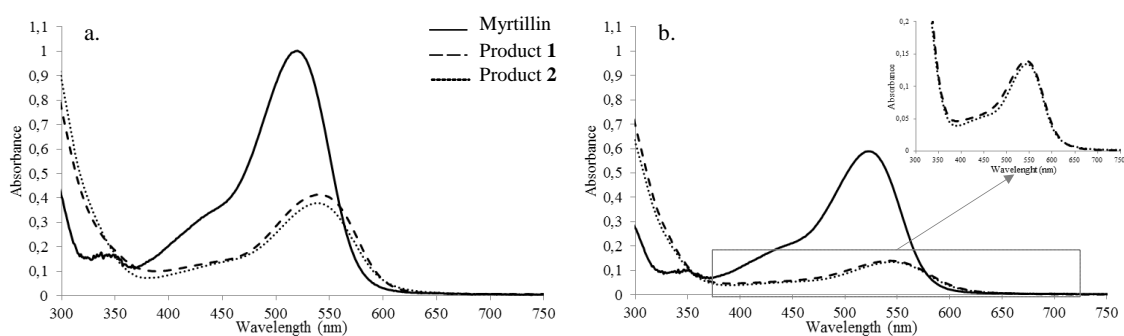


Figure 6. Visible spectra of myrtillin (4.6×10^{-5} M), 8'-C isomer (product 1, 9.2×10^{-5} M), and 6'-C isomer (product 2, 9.2×10^{-5} M) at pH 1 (a) and pH 3.2 (b, wine model solution).

The reaction between vescalagin and myrtillin showed some important differences from that between vescalagin and oenin. In the former one, two isomers of the hybrid pigment could be isolated and more side-products were obtained than in the latter one. Among them, one product derived from vescalagin and myrtillin reaction that did not show color. The mass analysis of this compound showed a signal at m/z 1397 ($[M+H]^+$), with a main ion fragment detected in the MS² analysis at m/z 1235, $[M+H-162]^+$ and a

main ion fragment in the MS³ analysis at m/z 917 ([M+H-162-318]⁺). Unfortunately, the full structural determination of this product was not possible.

Regioisomerization process. Two regioisomers have been obtained from the reaction between vescalagin and myrtillin (8'-C and 6'-C isomers). Chassaing and co-workers have proposed that the 6'-C regioisomer could derive from a regioisomerization process (Chassaing *et al.*, 2010). In this process the 8'-C isomer could be transformed into the 6'-C isomer through a hydration process followed by the ring-opening, the rotation around the C-4'-C-4'a bond, the ring re-closure and, finally, the dehydration. To confirm if the 6'-C isomer could be formed by this mechanism, the evolution of an aqueous solution of the 8'-C isomer adjusted to pH 3 was monitored over time by means of HPLC-DAD-MS, showing the formation of the former one and the partial disappearance of the latter one. Thus, the 6'-C isomer could be formed in two different ways, either by the direct reaction between the anthocyanin and the ellagitannin or by an isomerization of the 8'-C isomer.

Chromatic characterization: The UV-visible spectra of the obtained pigments were measured and compared to the that of myrtillin both in aqueous solutions at pH 1 and in wine model solutions at pH 3.2 (**Figure 6**). An important bathochromic shift was observed in the visible band of the hybrid pigment spectra in relation to that of the native myrtillin, which is in agreement with the violet hue exhibited by these hybrid compounds and comparable to that observed in the acetaldehyde-mediated flavanol-anthocyanin derivative pigments (Es-Safi *et al.*, 1999). The molar absorption coefficients (ϵ) at pH 1 of the hybrid pigments ($\epsilon = 9040 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, and $\epsilon = 8570 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, for 8'-C and 6'-C at $\lambda = 539 \text{ nm}$, respectively) were lower than that of myrtillin ($\epsilon = 21900 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$, $\lambda = 520 \text{ nm}$). Thus, the presence of the vescalagin moiety linked to the anthocyanin A-ring through a C-C linkage affects the molar absorption coefficient of the resulting hybrid pigments. The CIELAB parameters were employed to objectively evaluate the color of the hybrid pigments and also to make comparisons between their color and that of myrtillin. Hybrid pigments showed higher lightness values and much lower hue values than myrtillin, in accordance with their lower molar absorption coefficients and with their bluish hues in relation to myrtillin. The color differences (ΔE^*_{ab}) between the two hybrid pigments were detectable by the human eye

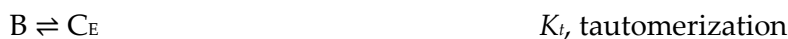
only at pH 1 (because the ΔE^*_{ab} value is ≥ 3), but these pigments had indistinguishable colors at pH 3.2, even when using analytical methods ($\Delta E^*_{ab} \leq 1$). Thus, at wine pH, these hybrid pigments showed no differences in their color.

Chapter 7: Thermodynamic and kinetic properties of a new delphinidin 3-O-glucoside-vescalagin hybrid pigment

The aim of the study performed in this chapter was to evaluate the changes in the aqueous equilibria of delphinidin 3-O-glucoside induced by the vescalagin substitution at the carbon C-8' of the flavanic skeleton. Considering this objective, the thermodynamic and kinetic constants of the network of a new related anthocyanin–ellagitannin hybrid pigment, 1-deoxyvescalagin-(1 β \rightarrow 8)-delphinidin 3-O-glucoside were determined and compared to those of the native anthocyanin. For calculations, the network at equilibrium can be very simplified if the system is considered as a single acid–base equilibrium between the flavylum cation (**AH**⁺) and its conjugate base **CB**, defined by the apparent acidity constant K'_a :



CB is defined as the sum of the concentrations of the other species in the network, $[\text{CB}] = [\text{A}] + [\text{B}] + [\text{C}_E] + [\text{C}_Z]$, where **A** corresponds to the quinoidal base, **B** to the hemiketal, and **C_E** and **C_Z** to the (*E*)-chalcone and the (*Z*)-chalcone, respectively. This global equilibrium is decomposed into its corresponding components:



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

García-Estévez, I.; Gavara, R.; Alcalde-Eon, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Quideau, S.; Escribano-Bailón, M.T.; Pina, F. Thermodynamic and kinetic properties of a new myrtillin–vescalagin hybrid pigment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013**, *61*, 11569-11578.

Material and methods

Chemicals. Delphinidin 3-O-glucoside (myrtillin) was extracted from the skins of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes and 1-deoxyvescalagin-(1 β \rightarrow 8)-delphinidin 3-O-glucoside (8'-C isomer, *Vg-Myr*) hybrid pigment has been previously hemisynthetized and purified as explained in the previous chapter (García-Estévez *et al.*, 2013). NaOH and HCl solutions and a universal buffer of Theorell and Stenhagen (Küster and Thiel, 1982) were employed to adjust the pH of the pigment solutions.

Determination of the thermodynamic and kinetic parameters: The network of chemical reactions was studied at pH values between 1 and 6. The apparent acidity constant (K'_a) was accomplished by measuring, on the UV-visible spectrophotometer, equilibrated solutions composed of one-third of the corresponding pigment stock solution, one-third of a solution of 0.1 M NaOH, and one-third of a universal buffer solution adjusted at different pH values. Kinetic and thermodynamic constants were determined using the so-called direct and reverse pH jump experiments: The spectral variations after a pH jump from equilibrated solutions of the pigment were followed over time by conventional UV-visible spectroscopy or by stopped-flow coupled to a UV-visible detector depending on the rate of the monitored process.

Results and discussion

Thermodynamic and kinetic parameters of myrtillin: In a previous paper (Leydet *et al.*, 2012) the network of chemical reactions of myrtillin was studied. Here, some experiments were reproduced in order to compare them to those performed for *Vg-Myr*. Initially, the spectral variations of myrtillin solutions at different pH values upon equilibration (overnight) were used to calculate the pK'_a . The value obtained ($pK'_a = 2.55$) is in good agreement with the one previously reported (Leydet *et al.*, 2012). From the value of K'_a and using the absorbance variations at 550 nm upon a direct pH jump from an equilibrated solution of myrtillin at pH 1.0 to 5.1 the value of $pK_a = 3.75$ can be calculated. Leydet and co-workers have also carried out reverse pH jump experiments followed by stopped flow to determine the thermodynamic (K_t) and kinetic (k_t , k_{-t}) parameters of tautomerization process (Leydet *et al.*, 2012). The obtained values are shown in **Table 2**, along with those obtained in this work. Moreover, a series of direct pH jumps of myrtillin solutions at pH 1.0 to higher pH values were carried out and the

rate constants of the first step observed were calculated. The representation of these rate constants as a function of pH along with the kinetic constants determined for the fast process observed during the reverse pH jumps experiments allowed the calculation of the kinetic constants of the hydration process ($k_h=0.09\text{ s}^{-1}$ and $k_{-h}=32\text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). From the ratio of these kinetic constants, $K_h = 2.8\times 10^{-3}\text{ M}^{-1}$ was calculated. Considering that the mole fraction of Cz at equilibrium is very low, it was possible to give a rough value for $K_i = 0.2$ using the rest of the thermodynamic data determined (K'_a , K_a , K_h , and K_i). Finally, by using the rate of the slowest kinetic process observed during a direct pH jump, it was also possible to estimate the isomerization rate constants $k_{i=5.1\times 10^{-5}\text{ s}^{-1}}$ and $k_{-i}=2.4\times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$.

Thermodynamic and kinetic parameters of Vg-Myr hybrid pigment: The determination of the values of the thermodynamic parameters (K_a , K'_a , K_h , K_i , and K_i) and kinetic (k_h , k_{-h} , k_i , k_{-i} , k_i and k_{-i}) parameters was performed following the same procedure as for myrtillin's network characterization (see **Table 2**). In addition, in this case K_a ($\text{p}K_a=2.9$) was also directly determined by stopped flow, from the absorption spectra of solutions of Vg-Myr after several direct pH jumps from pH 1 to higher pH values. The obtained value shows that the hybrid pigment has higher acidity than the native myrtillin (**Table 2**).

Table 2. Equilibrium and rate constants

	$\text{p}K'_a$	$\text{p}K_a$	$K_h\text{ (M}^{-1}\text{)}^a$	K_i^b	K_i	
Myr	2.5(5) \pm 0.05	3.7(5) \pm 0.05	2.8×10^{-3}	0.06	0.2 ^c	
Vg-Myr	2.2(5) \pm 0.05	2.9 \pm 0.05	2.4×10^{-3}	0.9	0.3 ^c	
	$k_h\text{ (s}^{-1}\text{)}^a$	$k_{-h}\text{ (M}^{-1}\text{ s}^{-1}\text{)}^a$	$k_i\text{ (s}^{-1}\text{)}^b$	$k_{-i}\text{ (s}^{-1}\text{)}^b$	$k_i\text{ (s}^{-1}\text{)}$	$k_{-i}\text{ (s}^{-1}\text{)}$
Myr	0.09	32	0.02(pH=1.4)	0.30	5.1×10^{-5c}	2.4×10^{-4c}
Vg-Myr	0.065	25	0.76(pH=0.7)	0.84	7.9×10^{-5c}	2.7×10^{-4c}

a. Estimated error 5%; b. Estimated error 20%; c. The value is a rough estimate.

This could be explained by a reduction of the flavylum electronic density due to the vescalagin substitution at carbon C-8' of the flavanic skeleton. The $\text{p}K'_a$ calculated for Vg-Myr is smaller than that determined for myrtillin, an indication that the flavylum cation is slightly destabilized in Vg-Myr. The value of K_i obtained is significantly higher than the one obtained for myrtillin. This fact reveals that the ring opening is more favorable in Vg-Myr compared with myrtillin. It seems that the

anthocyanidin greatly influences the thermodynamic and kinetic properties of the anthocyanin–ellagitannin hybrid pigment, because for *Vg-Myr* pigment, the constants of acidity and tautomerization are very different from those of myrtillin, whereas there are no differences between the values of these constants of oenin–vescalagin hybrid pigment in relation to those of oenin (Chassaing *et al.*, 2010).

Figure 7 shows the energy level diagram of myrtillin (**a**) and *Vg-Myr* (**b**) built from the thermodynamic parameters in order to illustrate the thermodynamic situation of both networks. Inspection of the diagram clearly shows that the quinoidal base (**A**, blue) and the (*E*)-chalcone (**C_E**, yellowish) in *Vg-Myr* are remarkably stabilized in comparison to myrtillin, whereas **B** (colorless) is slightly destabilized. A possible explanation of the stabilization of **A** is the existence of a less polar environment involving the myrtillin moiety of *Vg-Myr*. Moreover, in the case of *Vg-Myr*, (*E*)-chalcone is almost as stabilized as the hemiketal **B**. Because the vescalagin substitution at carbon C-8' of the myrtillin might affect the electronic density of the anthocyanin, (*E*)-chalcone might be stabilized as a consequence of the electron delocalization in its structure.

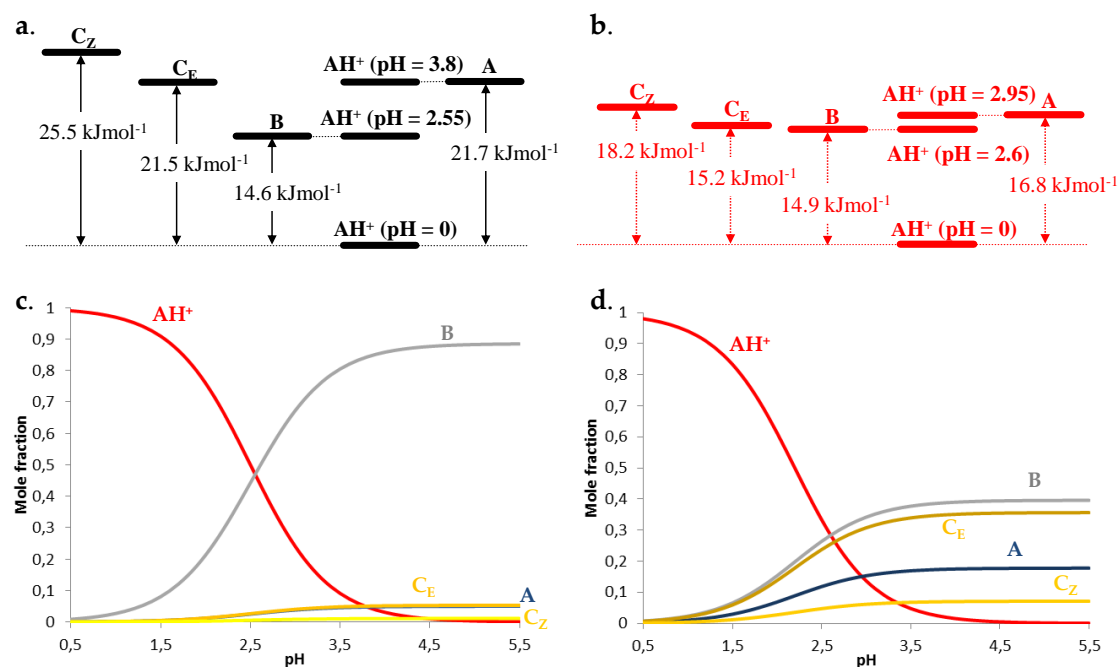


Figure 7. Energy level diagrams of myrtillin (**a.**) and *Vg-Myr* (**b.**). Mole fraction distribution depending on the pH of myrtillin (**c.**) and *Vg-Myr* (**d.**).

The mole fraction distributions depending on the pH of the myrtillin (**Figure 7c**) and the *Vg-Myr* (**Figure 7d**) showed that in the case of *Vg-Myr* the increase of mole fractions of **A**, **C_E**, and **C_Z** at the expense of **B** is significant. Thus, the color of the slightly acidic solutions of these pigments can be affected. At these pH values the solutions of myrtillin become almost colorless since the major species is the hemiketal, whereas the solutions of *Vg-Myr* are colored, because the yellowish chalcones (mainly **C_E**) and the blue quinoidal base represent much higher percentages. It is worth pointing out that the high mole fraction of **C_E** in mildly acidic media may explain why in this media *Vg-Myr* (1-deoxyvescalagin-(1 β \rightarrow 8)-myrtillin) is involved in the regioisomerization process explained in the previous chapter (García-Estévez *et al.*, 2013), also implicating 1-deoxyvescalagin-(1 β \rightarrow 6)-myrtillin.

These results suggest that the vescalagin substitution at the carbon C-8' of the flavanic skeleton of myrtillin induces important changes in the aqueous equilibria of the anthocyanin. However, Nave and co-workers (Nave *et al.*, 2010) have reported that there are no significant modifications regarding the kinetic and thermodynamic behaviors of the oenin and the catechin-oenin pigment, indicating that the network of chemical reactions involving catechin-(4,8)-malvidin-3-glucoside is controlled by its oenin moiety. Moreover, Chassaing and co-workers (Chassaing *et al.*, 2010) have reported only significant differences in the hydration process between the network of oenin and the oenin-vescalagin hybrid pigment. Thus, it seems that the changes observed in the physicochemical properties of the pigment mainly depend on the anthocyanin.

CONCLUSIONES / CONCLUSIONS



Conclusiones:

Las principales conclusiones derivadas de los trabajos recogidos en la presente memoria de Tesis son:

Bloque I:

1. El método de fraccionamiento desarrollado permite el aislamiento de los elagitaninos de roble del resto de componentes del vino, facilitando su detección e identificación mediante HPLC-DAD-MS. Las principales ventajas de este método son el uso de poco volumen de muestra para el análisis, la relativa rapidez del fraccionamiento y el buen porcentaje de recuperación del mismo.

2. La galocatequina se puede emplear de manera satisfactoria como patrón interno en la cuantificación de elagitaninos de roble mediante espectrometría de masas. Este compuesto demuestra ser mejor patrón interno que otros descritos en la bibliografía, como el ácido clorogénico, sin afectar además a la estabilidad de los elagitaninos en la muestra.

3. La combinación del método de fraccionamiento y el método de cuantificación desarrollados en este trabajo, permite la detección y cuantificación de los cuatro principales elagitaninos de roble en diferentes vinos, independientemente de la variedad de uva empleada en su elaboración, del tipo de madera de los depósitos utilizados, y de la duración de permanencia en los mismos.

4. El tipo de madera empleada para la elaboración y envejecimiento del vino determina el perfil de elagitaninos del mismo. El contenido total de elagitaninos podría ser útil en la diferenciación entre vinos envejecidos en barricas de roble francés nuevas y vinos envejecidos en barricas de roble francés seminuevas o en barricas de roble americano nuevas.

5. Los vinos envejecidos en barricas de roble francés (tanto nuevas como seminuevas) muestran una relación vescalagina/castalagina mayor que los vinos envejecidos en barricas de roble americano, por lo que esta relación podría ser un

indicador del tipo de madera de las barricas empleadas para el envejecimiento de los vinos.

Bloque II:

6. La adición de un tanino enológico, en cuya composición destacan los elagitaninos y los flavanoles, a disoluciones modelo con los cinco antocianos mayoritarios de la uva, afecta a la composición de pigmentos y al color. La adición de elagitaninos puede relacionarse con una mayor formación de vitisinas de tipo A y de tipo B, y con mayores niveles de antocianos monoglucósidos al final del estudio. Además, la adición del tanino enológico provoca que al final del estudio las disoluciones presenten valores de luminosidad más bajos y valores de croma más elevados, lo que se traduce en una mayor estabilidad del color.

7. El empleo de un tanino enológico, en cuya composición destacan los elagitaninos y los flavanoles, durante la elaboración de vinos experimentales, tiene como consecuencia una menor desaparición de antocianos originarios de la uva y una mayor formación de vitisinas de tipo A y de tipo B con el tiempo. La adición de flavanoles permite una mayor formación de derivados de la condensación entre flavanoles y antocianos, formación que parece estar además favorecida por la presencia de elagitaninos en el medio. Además, la adición del tanino enológico conlleva que los vinos presenten valores de luminosidad más bajos y valores de croma más altos, en consonancia con los resultados observados en los sistemas modelo.

8. La adición de tanino enológico durante la elaboración de vinos a escala industrial tiene como principales consecuencias una mayor extracción de antocianos desde el hollejo de la uva, junto con mayores niveles de flavanoles en los vinos, principalmente de catequinas y dímeros de procianidinas. La adición del tanino enológico favorece también la formación de derivados de la condensación directa entre flavanoles y antocianos, y de vitisinas de tipo A, pero no afecta a la formación de piranoantocianos de tipo vinilfenol. Por lo tanto, la adición de elagitaninos y flavanoles al vino puede ser útil para tanto resolver las deficiencias en pigmentos de las uvas, así

como para favorecer la síntesis de pigmentos derivados, ayudando a la estabilización química del color.

Bloque III:

10. La reacción entre la vescalagina y la delfinidina 3-*O*-glucósido lleva a la formación de dos pigmentos híbridos antociano-elagitanino: 1-desoxivescalagina-(1 β →8)-delfinidina 3-*O*-glucósido (mayoritario) y 1-desoxivescalagina-(1 β →6)-delfinidina 3-*O*-glucósido (minoritario). Estos pigmentos híbridos muestran un importante desplazamiento batocrómico en su espectro visible (aproximadamente 20 nm) y coeficientes de extinción más bajos que el antociano original.

11. La formación del pigmento híbrido minoritario puede ocurrir a través de dos vías diferentes: mediante el ataque nucleofílico del antociano a través de su posición C6, o a través de un equilibrio de regioisomerización a partir del isómero mayoritario, mediante un intermedio originado tras la apertura del heterociclo y el giro alrededor del enlace C4a-C4, seguido del cierre de nuevo del heterociclo.

12. La sustitución del protón del carbono 8 del antociano por un resto 1-desoxivescalagina conlleva modificaciones importantes en el comportamiento del pigmento frente a los cambios de pH en disoluciones acuosas. Entre ellas, el pigmento híbrido, con respecto al pigmento original, presenta una mayor acidez del catión flavilio y, por lo tanto, menor estabilidad de éste a valores de pH superiores a 2, junto con una desestabilización de la forma hemiacetálica y una mayor estabilidad de la (*E*)-chalcona.

13. Las disoluciones del pigmento híbrido, a un pH moderadamente ácido, presentan mayor proporción de formas coloreadas que las disoluciones del antociano original, como consecuencia de una mayor proporción de las formas (*E*)-chalcona (amarilla) y la base quinoidal (azul) y una menor importancia de la forma hemiacetal (incolora) con respecto al pigmento original, lo que afecta sustancialmente a su color.

Conclusions:

The main conclusions of the studies carried out in this PhD Thesis are:

Section I:

1. The developed fractionation method allows the isolation of oak ellagitannins from other wine compounds making possible their detection and quantification by means of HPLC-DAD-MS. The main advantages of this method are the low amount of wine sample required for the analysis, the short time required and the recovery rate.

2. Galocatechin has proved to be a suitable internal standard for the accurate and individual quantification of the main oak wood ellagitannins by means of mass spectrometry. This compound does not affect the stability of the ellagitannins, in contrast to other internal standards described in literature, such as chlorogenic acid.

3. The fractionation method, along with the quantification method developed allow the detection and quantification of the main oak ellagitannins in wine samples, regardless of the grape variety from which wines were elaborated, the type of wood of the tanks employed in winemaking and aging or the length of aging.

4. The type of oak wood used in winemaking and aging determines the wine ellagitannin composition. Total ellagitannin content of wines may be useful in differentiating the wines aged in new French oak barrels from those aged in second-fill French oak barrels or new American oak barrels.

5. Wines aged in French oak barrels (both new and second-fill) showed higher vescalagin/castalagin ratio than those aged in new American oak barrels. Thus, this ratio may be useful for tracing the oak type of the barrels used for wine aging.

Section II:

6. Adding an oenological tannin mainly composed by ellagitannins and flavanols affects the pigment composition and color of model systems consisting of a solution of the five main grape anthocyanins. The addition of ellagitannins may be related to higher formation of A-type and B-type vitisins and to higher contents of anthocyanins

at the end of the study. Moreover, adding the oenological tannin leads to lower lightness values and higher chroma values of the solutions at the end of the study, involving color stabilization.

7. The addition of the oenological tannin mainly composed by ellagitannins and flavanols during winemaking provokes lower disappearance of grape anthocyanins and higher formation of A-type and B-type vitisins over time. Moreover, adding flavanols allows a higher formation of flavanol-anthocyanin condensation products, which may also be promoted by the presence of ellagitannins in the medium. Adding the oenological tannin to the wine also causes lower lightness values and higher Chroma values, which is in accordance with the results observed in model systems.

8. Adding the oenological tannin during winemaking at industry scale promotes the anthocyanin extraction from grape skins and higher levels of flavanols in wines, mainly catechins and dimeric procyanidins. The addition of the oenological tannin also favors the formation of flavanol-anthocyanin condensation products and of A-type vitisins, but does not affect the formation of vinylphenol-type pyranoanthocyanins. Hence, adding flavanols and ellagitannins may be useful in solving deficiencies in the levels of grape pigments and in promoting the formation of anthocyanin-derived pigments, thus favoring the chemical stabilization of color.

Section III:

10. Two different hybrid pigments result from the reaction between vescalagin and delphinidin 3-O-glucoside: 1-deoxyvescalagin-(1 β →8)-delphinidin 3-O-glucoside (major) y 1-deoxyvescalagin-(1 β →6)-delphinidin 3-O-glucoside (minor). These hybrid pigments show an important bathochromic shift (*ca.* 20 nm) in the maximum absorbance wavelength and lower molar absorption coefficients than the native anthocyanin.

11. The minor pigment could be formed in two different ways, either by a direct nucleophilic substitution reaction during which the anthocyanin attacks from its C6 center or by a regioisomerization process from the major pigment through the

heterocyclic ring-opening, the rotation around the C4a-C4 bond, followed by the ring re-closure.

12. The vescalagin substitution at the anthocyanin carbon C8 induces important changes in the pigment behavior upon pH changes in aqueous solutions. Among them, the hybrid pigment, with regard to the native anthocyanin, shows higher acidity of the flavylium cation and, as a consequence, a lower stabilization at pH higher than 2, along with a lower stability of hemiketal form and a higher stability of (*E*)-chalcone.

13. Hybrid pigment solutions at slightly acidic pH values show higher percentages of colored forms than delphinidin 3-*O*-glucoside solutions as a result of higher percentages of the (*E*)-chalcone (yellowish) and the quinoidal base (blue) and lower percentage of hemiketal form (colorless). As a consequence the color of hybrid pigment solutions are significantly different to those of the native anthocyanin.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



del Álamo-Sanza, M.; Fernández-Escudero, J.A., de Castro-Torío, R. Changes in phenolic compounds and colour parameters of red wine aged with oak chips and in oak barrels. *Food Science and Technology International*, **2004**, 10, 233-241.

del Álamo-Sanza, M.; Nevares-Domínguez, I. Wine aging in bottle from artificial systems (staves and chips) and oak woods anthocyanin composition. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 563, 255-263.

Alañón, M.E.; Pérez-Coello, M.S.; Díaz-Maroto, I.J.; Martín-Álvarez, P.J.; Vila-Lameiro, P.; Díaz-Maroto, M.C. Influence of geographical location, site and silvicultural parameters, on volatile composition of *Quercus pyrenaica* Wild. wood used in wine aging. *Forest Ecology and Management*, **2011**, 262, 124-130.

Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Separation of pyranoanthocyanins from red wine by column chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 513, 305-318.

Alcalde-Eon, C.; Boido, E.; Carrau, F.; Dellacassa, E.; Rivas-Gonzalo, J.C. Pigment profiles in monovarietal wines produced in Uruguay. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2006a**, 57, 449-459.

Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta*, **2006b**, 563, 238-254.

Alcalde-Eon, C. Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Identification of dimeric anthocyanins and new oligomeric pigments in red wines means of HPLC-DAD-ESI/MS. *Journal of Mass Spectrometry*, **2007**, 42, 735-748.

Andersen, Ø.M.; Jordheim, M. The anthocyanins. En: *Flavanoids: Chemistry, biochemistry and applications*. Andersen, Ø.M. and Markham, K.R. (Editores). CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Ratón (Estados Unidos), **2006**, p. 471.

Amakura, Y.; Okada, M.; Tsuji, S.; Tonogai, Y. High-performance liquid chromatographic determination with photodiode array detection of ellagic acid in fresh and processed fruits. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 896, 87-93.

Arnold, R.A.; Noble, A.C.; Singleton, V.L. Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1980**, 28, 675-678.

Asen, S.; Stewart, R.N.; Norris, K.H. Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, **1972**, 11, 1139-1144.

Asenstorfer, R.E.; Hayasaka, Y.; Jones, G.P. Isolation and structures of oligomeric wine pigments by bisulfite-mediated ion-exchange chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 5957-5963.

Asenstorfer, R.E.; Markides, A.J.; Iland, P.G.; Jones, G.P. Formation of vitisin A during red wine fermentation and maturation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2003**, 9, 40-46

Asselin, C.; Delteil, D. Vinificaciones: principales operaciones unitarias comunes. En : *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 2ª Edición; Flanzy, C. (Editor). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España) **2003**; p. 418.

Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Le Guerneve, C.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Letters*, **2002**, 43, 6151-6153.

Bacon, J.R.; Rhodes, M.J.C. Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 838-843.

Bakker, J.; Picinelli, A.; Bridle, P. Model wine solutions: colour and composition changes during ageing. *Vitis*, **1993**, 32, 111-118.

Bakker, J.; Bridle, P.; Honda, T.; Kuwano, H.; Saito, N.; Terahara, N.; Timberlake, C.F. Identification of an anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry*, **1997**, 44, 1375-1382.

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

Bakowska, A.; Kucharska, A.Z.; Oszmiaoński, J. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, **2003**, 81, 349-355.

Baranac, J.M.; Petranovic, N.A.; Dimitric-Markovic, J.M. Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 2. Malvin and the nonglycosidized flavone quercetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997a**, 45, 1694-1697.

Baranac, J.M.; Petranovic, N.A.; Dimitric-Markovic, J.M. Spectrophotometric study of anthocyan copigmentation reactions. 4. Malvin and apigenin-7-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997b**, 45, 1701-1703.

Baranowski, E.S.; Nagel, C.W. Kinetics of malvidin-3-glucoside condensation in wine model systems. *Journal of Food Science*, **1983**, 48, 419-421.

Barre, P.; Blondin, B.; Dequin, S.; Feuillat, M.; Salrayrolles, J.M.; Salmon, J.M. La levadura de fermentación alcohólica. En: *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 2ª Edición; Flanzy, C. (Editor). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España), **2003**; p. 274.

Bautista-Ortín, A.B.; Fernández-Fernández, J.I.; López-Roca, J.M.; Gómez-Plaza, E. The effects of enological practices in anthocyanins, phenolic compounds and wine

colour and their dependence on grape characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2007**, 20, 546-552.

Bayonove, C.; Baumes, R.; Crouzet, J.; Günata, Z. Aromas. En: *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 2ª Edición; Flanzy, C. (Editor). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (España), **2003**, p. 137.

Bishop, P.D.; Nagel, C.W. Characterization of the condensation product of malvidin 3,5-diglucoside and catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1984**, 32, 1022-1026.

Benabdeljalil, C.; Cheynier, V.; Fulcrand, H.; Hakiki, A.; Mosaddak, M.; Moutounet, M. Mise en évidence de nouveaux pigments formés par réaction des anthocyanes avec des métabolites de levure. *Sciences des Aliments*, **2000**, 20, 203-220.

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

Boutaric, A.; Ferre, L.; Roy, M. Reserches spectrophotometriques sur la couleur des vins. *Annales de Falsifications et Fraudes*, **1937**, 30, 196-209.

Bridle, P.; Timberlake, C.F. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. *Food Chemistry*, **1997**, 58, 103-109.

Brouillard, R.; Delaporte, B. Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society*, **1977**, 99, 8461-8468.

Brouillard, R.; Dubois, J.E. Mechanism of the structural transformations of anthocyanins in acidic media. *Journal of the American Chemical Society*, **1977**, 99, 1359-1367.

Brouillard, R. Chemical structure of anthocyanins. En: *Anthocyanins as food colours*. Markakis, O. (Editor). Academic Press. Nueva York (NY, EEUU), **1982**; p.1.

Brouillard, R.; Mazza, G.; Saad, Z.; Albrecht-Gary, A.M.; Cheminat, A. The copigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe fro the structural study of aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society*, **1989**, 111, 2604-2610.

Brouillard, R.; Lang, J. The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. *Canadian Journal of Chemistry*, **1990**, 68, 747-754.

Cabanis, J.C.; Cabanis, M.T.; Cheynier, V. Teissedre, P.L. Talas de composición. En: *Enología: Fundamentos Científicos y Técnicos* 2ª Edición; Flanzy, C. (Editor). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España), **2003**; p. 218.

Cadahía, E.; Varea, S.; Muñoz, L.; Fernández de Simón, B.; García-Vallejo, M.C. Evolution of ellagitannins in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 3677-3684.

Cadahía, E.; Fernández de Simón, B.; Jalocha, J. Volatile compounds in Spanish, French, and American oak woods after natural seasoning and toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, 51, 5923-5932.

Cadahía, E.; Fernández de Simón, B.; Sanz, M.; Poveda, P.; Colio, J. Chemical and chromatic characteristics of Tempranillo, Cabernet Sauvignon and Merlot wines from DO Navarra aged in Spanish and French oak barrels. *Food Chemistry*, **2009**, 115, 639-649.

Caldeira, I.; Clímaco, M.C.; Bruno de Sousa, R.; Belchior, A.P. Volatile composition of oak and chestnut woods used in brandy ageing: Modification induced by heat treatment. *Journal of Food Engineering*, **2006**, 76, 202-211.

Cameira-dos-Santos, P.J.; Brillouet, J.M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Detection and partial characterisation of new anthocyanin-derived pigments in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1996**, 70, 204-208.

Carbonneau, A.; Champagnol, F.; Deloire, A.; Sevilla, F. Vendimia y calidad de la uva. En: *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 2ª Edición; Flanzky, C. (Editor). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España), **2003**; p. 406.

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

Chatonnet, P.; Dubourdieu, D. Comparative study of the characteristics of American white oak (*Quercus alba*) and European oak (*Quercus petraea* and *Q. robur*) for production of barrels used in barrel ageing of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1998**, 49, 79-85.

Chen, L.J.; Hrazdina, G. Structural aspects of anthocyanin-flavonoid complex formation and its role in plant color. *Phytochemistry*, **1981**, 20, 297-303.

Cheynier, V.; Rigaud, J. Separation and characterization of flavonoles in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1986**, 37, 248-252.

Cheynier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Manchado, P. Los compuestos fenólicos. En : *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 2ª Edición; Flanzky, C. (Editor). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España), **2003**, p. 114.

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

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

Cruz, L.; Teixeira, N.; Silva, A.M.S.; Mateus, N.; Rodríguez-Borges, J.; de Freitas, V. The role of vinylcatechin in the formation of pyranomalvidin-3-glucoside-(+)-catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**, 56, 10980-10987.

Dangles, O.; Saito, N.; Brouillard, R. Anthocyanin intramolecular copigment effect. *Phytochemistry*, **1993**, 34, 119-124.

Darias-Martín, J.; Carrillo, M.; Díaz, E.; Boulton, R.B. Enhancement of red wine color by prefermentation addition of copigments. *Food Chemistry*, **2001**, 73, 217-220.

Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A.R.; Paredes-López, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins and betalains-characteristics, biosynthesis, processing and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, **2000**, 40, 173-289.

Doussot, F.; De Jesso, B.; Quideau, S.; Pardon, P. Extractives content in cooperage oak wood during natural seasoning and toasting: influence of tree species, geographic location, and single-tree effects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 5955-5961.

Dueñas, M.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. Formation of anthocyanin-flavanol adducts in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, **2006a**, 563, 15-25.

Dueñas, M.; Cheynier, V.; Fulcrand, H. Structure of a new xanthylum salt derived from an oxidative degradation of malvidin 3-glucoside-epicatechin dimer in wine-like model solutions. En: *Polyphenols communications 2006*. Daayf, F.; El Hadrami, A.; Adam, L.; Balance, G.M. (Editores). Edita Universidad de Manitota, Winneipeg, Manitoba, Canadá, **2006b**, 151-152.

Dueñas, M.; Salas, E.; Cheynier, V.; Dangles, O.; Fulcrand, H. UV-visible spectroscopic investigation of the 8,8-methylmethine catechin-malvidin 3-glucoside pigments in aqueous solution: Structural transformations and molecular complexation with chlorogenic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006c**, 54, 189-196.

Eiro, M.J.; Heinonen, M. Anthocyanin color behavior and stability during storage: effect of intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 7461-7466.

Es-Safi, N.E.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Competition between (+)-catechin and (-)-epicatechin in acetaldehyde-induced polymerization of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999a**, 47, 2088-2095.

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

Es-Safi, N.E.; Le Guernevé, C.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. New polyphenolic compounds with xanthylum skeletons formed through reaction between (+)-catechin and glyoxylic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1999c**, 47, 5211-5217.

Es-Safi, N.E.; Le Guernevé, C.; Labarbe, B.; Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Structure of a new xanthylum salt derivative. *Tetrahedron Letters*, **1999d**, 40, 5869-5872.

Escribano-Bailón, M.T.; Gutiérrez-Fernández, Y.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. Characterization of procyanidins of *Vitis vinífera* variety Tinta del País grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1992**, 40, 1794-1799.

Escribano-Bailón, M.T. Estudio de la composición flavánica de la semilla de uva. Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, España. *Tesis Doctoral*, **1993**.

Escribano-Bailón, M.T.; Guerra, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. Proanthocyanidins in skins from different varieties. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und – Forschung A*, **1995**, 200, 221-224.

Escribano-Bailón, M.T.; Dangles, O.; Brouillard, R. Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochemistry*, **1996**, 41, 1583-1592.

Escribano-Bailón, M.T.; Álvarez-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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 1213-1217.

Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C. Anthocyanin copigmentation - Evaluation, mechanisms and implications for the colour of red wines. *Current Organic Chemistry*, **2012**, 16, 715-723.

FDA - U.S. Food and Drug Administration. Guidance for industry: Guidances for the validation of analytical methods used in residue depletion studies, **2009**; <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM207942.pdf> (ultimo acceso en enero de 2014).

Fernandes, A.; Sousa, A.; Mateus, N.; Cabral, M.; de Freitas, V. Analysis of phenolic compounds in cork from *Quercus suber* L. by HPLC–DAD/ESI–MS. *Food Chemistry*, **2011**, 125, 1398-1405.

Fernández de Simón, B.; Cadahía, E.; Conde, E.; García-Vallejo, M.C. Ellagitannins in woods of Spanish, French and American oaks. *Holzforschung*, **1999**, 53, 147-150.

Fernández de Simón, B.; Hernández, T.; Cadahía, E.; Dueñas, M.; Estrella, I. Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology*, **2003**, 216, 150-156.

Fernández de Simón, B.; Sanz, M.; Cadahía, E.; Poveda, P.; Broto, M. Chemical characterization of oak heartwood from Spanish forest of *Quercus pyrenaica* (Wild.). Ellagitannins, low molecular weight phenolic, and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 8314-8321.

Feuillat, F.; Moio, L.; Guichard, E.; Marinov, M.; Fournier, N.; Puech, J.L. Variation in the concentration of ellagitannins and cis- and trans-beta-methyl-gamma-octalactone extracted from oak wood (*Quercus robur* L., *Quercus petraea* Liebl.) under model wine cask conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1997**, *48*, 509-515.

Flamini, R.; Traldi, P. *Mass Spectrometry in grape and wine chemistry*. Ediciones John Wiley & Sons, Inc. Hoboken (Estados Unidos), **2010**, pp 11, 45 y 76.

Fossen, T.; Rayyan, S.; Andersen, Ø.M. Dimeric anthocyanins from strawberry (*Fragaria ananassa*) consisting of pelargonidin 3-glucoside covalently linked to four flavan-3-ols. *Phytochemistry*, **2004**, *65*, 1421-1428.

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

de Freitas, V.; Sousa, C., Silva, A.M.S.; Santos-Buelga, C., Mateus, N. Synthesis of a new catechin-pyrylium derived pigment. *Tetrahedron Letters*, **2004**, *45*, 9349-9352.

de Freitas, V.; Mateus, N. Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours (review). *Environmental Chemistry Letters*, **2006**, 175-183.

de Freitas, V.; Mateus, N. Formation of pyranoanthocyanins in red wines: a new and diverse class of anthocyanin derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2011**; *401*, 1463-73.

Fridrich, D.; Glabasnia, A.; Fritz, J.; Esselen, M.; Pahlke, G.; Hofmann, T.; Marko, D. Oak ellagitannins suppress the phosphorylation of the epidermal growth factor receptor in human colon carcinoma cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2008**, *56*, 3010-3015.

Fulcrand, H.; Doco, T.; Es-Safi, N.E.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography-ion spray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1996**, *752*, 85-91.

Fulcrand, H.; Cheynier, V.; Oszmianski, J.; Moutounet, M. An oxidized tartaric acid residue as a new bridge potentially competing with acetaldehyde in flavan-3-ol condensation. *Phytochemistry*, **1997**, *46*, 223-227.

Fulcrand, H.; Benabdeljalil, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, **1998**, *47*, 1401-1407.

Fulcrand, H.; Dueñas, M.; Salas, E.; Cheynier, V. Phenolic reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2006**, *57*, 289-297.

García-Beneytez, E.; Revilla, E.; Cabello, F. Anthocyanin pattern of several red grape cultivars and wines made from them. *European Food Research and Technology*, **2002**, *215*, 32-37.

García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Alcalde-Eon, C. Development of a fractionation method for the detection and identification of oak ellagitannins in red wines. *Analytica Chimica Acta*, **2010**, 660, 171-176.

García-Estévez, I.; Escribano-Bailón, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Alcalde-Eon, C. Validation of a mass spectrometry method to quantify oak ellagitannins in wine samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2012**, 60, 1373-1379.

García-Estévez, I.; Jacquet, R.; Alcalde-Eon, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T.; Quideau, S. Hemisynthesis and structural and chromatic characterization of delphinidin 3-O-glucoside-vescalagin hybrid pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013a**, 61, 11560-11568.

García-Estévez, I.; Gavara, R.; Alcalde-Eon, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Quideau, S.; Escribano-Bailón, M.T.; Pina, F. Thermodynamic and kinetic properties of a new myrtilin-vescalagin hybrid pigment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2013b**, 61, 11569-11578.

García-Marino, M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Ibáñez, E.; García-Moreno, C. Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, **2006**, 563, 44-50.

Gavara, R.; Petrov, V.; López, V.; Pina, F. Photochromism of naphthoflavylum. On the role of 4OH hemiketal in flavylum network. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **2011**, 220, 4-10.

Glabasnia, A.; Hofmann, T. Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in Bourbon whiskey and oak-matured red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 3380-3390.

Goldstein J.; Swain, T. Changes in tannins in fruit ripening. *Phytochemistry*, **1963**, 2, 371-383.

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

González-Manzano, S.; Santos-Buelga, C.; Pérez-Alonso, J.J.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Characterization of the mean degree of polymerization of proanthocyanidins in red wines using liquid chromatography mass spectrometry (LC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 4326-4332.

González-Manzano, S.; Pérez-Alonso, J.J.; Salinas-Moreno, Y.; Mateus, N.; Silva, A.M.S.; de Freitas, V.; Santos-Buelga, C. Flavanol-anthocyanin pigments in corn: NMR characterisation and presence in different purple corn varieties. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2008**, 21, 521-526.

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 Chemistry*, **2009**, 114, 649-656.

González-Paramás, A.M.; Lopes da Silva, F.; Martín-López, P.; Macz-Pop, G.; González-Manzano, S.; Alcalde-Eon, C.; Pérez-Alonso, J.J.; Escribano-Bailón, M.T.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C. Flavanol-anthocyanin condensed pigments in plant extracts. *Food Chemistry*, **2006**, 94, 428-436.

Goto, T.; Kondo, T. Structure and molecular stacking of anthocyanins-Flower color variation. *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1991**, 30, 17-33.

Guiad, J. The colorimetric properties of the spectrum. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, **1931**, 230, 149-187.

Håkansson, A.E.; Pardon, K.; Hayasaka, Y.; de Sa, M.; Herderich, M. Structures and colour properties of new red wine pigments. *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 4887-4891.

Hale, M.D.; McCafferty, K.; Larmie, E.; Newton, J.; Swan, J.S. The influence of oak seasoning and toasting parameters on the composition and quality of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 495-502.

Harbertson, J.F.; Parpinello, G.P.; Heymann, H.; Downey, M.O. Impact of exogenous tannin additions on wine chemistry and wine sensory character. *Food Chemistry*, **2012**, 131, 999-1008.

Haslasm, E. In *Vino Veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines*. *Phytochemistry*, **1980**, 19, 2577-2582.

Hayasaka, Y.; Asenstorfer, R.E. Screening for potential pigments derived from anthocyanins in red wine using nanoelectrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 756-761.

Hayasaka, Y.; Kennedy, J.A. Mass spectrometric evidence for the formation of pigmented polymers in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2003**, 9, 210-220.

He, J.; Santos-Buelga, C.; Mateus, N.; de Freitas, V. Isolation and quantification of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments from red wines by combination of column chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, **2006a**, 1134, 215-225.

He, J.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.M.S.; Mateus, N.; de Freitas, V. Isolation and structural characterization of new anthocyanin-derived yellow pigments in aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006b**, 54, 9598-9603.

He, J.; Oliveira, J.; Silva, A.M.S.; Mateus, N.; de Freitas, V. Oxovitisins: A new class of neutral pyranone-anthocyanin derivatives in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58, 8814-8819.

He, F.; Liang, N.N.; Qiu-Hong Pan, L.M.; Wang, J.; Reeves, M.J.; Duan, C.Q. Anthocyanins and Their Variation in Red Wines II. Anthocyanin Derived Pigments and Their Color Evolution. *Molecules*, **2012**, 17, 1483-1519.

Heredia, F.J.; Francia-Aricha, E.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Vicario, I.M.; Santos-Buelga, C. Chromatic characterization of anthocyanins from red grapes - I. pH effect. *Food Chemistry*, **1998**, 63, 491-498.

Heredia, F.J.; Álvarez, C.; González-Miret, M.L.; Ramírez, A. CromaLab, análisis de color. Registro General de la Propiedad Intelectual SE-1052-04: Sevilla, Spain, **2004**.

Hernández, T.; Estrella, I.; Pérez-Gordo, M.; Alegría, E.G.; Tenorio, C.; Ruiz-Larrea, F.; Moreno-Arribas, M.V. Contribution of malolactic fermentation by *Oenococcus Oeni* and *Lactobacillus Plantarum* to the changes in the nonanthocyanin polyphenolic composition of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55, 5260-5266.

Hertog, M.G.L.; Hollman, P.C.H.; Van de Putte, B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids in tea infusions, wines, and fruit juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1993**, 41, 1242-1246.

Hervé du Penhoat, C.L.M.; Michon, V.M.F.; Peng, S.; Viriot, C.; Scalbert, A.; Gage, D. Structural elucidation of new dimeric ellagitannins from *Quercus robur* L. Roburins A-E. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1991**, 1653-1660.

Hofmann, T.; Glabasnia, A.; Schwarz, B.; Wisman, K.N.; Gangwer, K.A.; Hagerman, A.E. Protein binding and astringent taste of a polymeric procyanidin, 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-beta-D-glucopyranose, castalagin, and grandinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 9503-9509.

Hoshino, T.; Matsumoto, U.; Goto, T.; Harada, N. Evidence for the self-association of anthocyanins IV. PMR spectroscopic evidence for the vertical stacking of anthocyanin molecules. *Tetrahedron Letters*, **1982**, 23, 433-436.

Ichiyanagi, T.; Hatano, Y.; Matsuo, S.; Konishi, T. Simultaneous comparison of relative reactivities of twelve major anthocyanins in bilberry towards reactive nitrogen species. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2004a**, 52, 1312-1315.

Ichiyanagi, T.; Hatano, Y.; Matsugo, S.; Konishi, T. Kinetic comparisons of anthocyanin reactivities towards 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (AAPH) radicals, hydrogen peroxide and tertbutylhydroperoxide by capillary zone electrophoresis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **2004b**, 52, 434-438.

Jourdes, M.; Lefeuvre, D.; Quideau, S. C-Glycosidic ellagitannins and their influence on wine chemistry. En: *Chemistry and biology of ellagitannins: an underestimated class of bioactive plant polyphenols*. Quideau, S. (Editor). World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Danvers (Estados Unidos), **2009**, p. 320.

Jourdes, M.; Michel, J.; Saucier, C.; Quideau, S.; Teissedre, P.L. Identification, amounts, and kinetics of extraction of C-glucosidic ellagitannins during wine aging in

oak barrels or in stainless steel tanks with oak chips. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2011**, 401, 1531-1539.

Jurd, L. Anthocyanidins and related compounds-XI: Catechin-flavylium salt condensation reactions. *Tetrahedron*, **1967**, 23, 1057-1064.

Jurd, L.; Somers, T.C. The formation of xanthylum salts from proanthocyanidins. *Phytochemistry*, **1970**, 9, 419-427.

Küster F.W.; Thiel, A. *Tabella per le Analisi Chimiche e Chimico-Fisiche*, 12th ed. Milano Hoepli (Italia), **1982**, p. 157.

Lea, A.G.H.; Bridle, P.; Timberlake, C.F.; Singlenton, V.L. The procyanidins of white grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1979**, 30, 289-300.

Lea, A.G.H. Flavour, colour and stability in fruit products: the effect of polyphenols. En: *Plant polyphenols*. Hemingway, R.W.: Laks, P.E. (Editores). Plenum Press. Nueva York (Estados Unidos), **1992**, p.827.

Lee, C.Y.; Jaworski, A.W. Identification of some phenolics in white grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1990**, 41, 87-89.

Lee, J.H.; Talcott, S.T. Ellagic acid and ellagitannins affect on sedimentation in muscadine juice and wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 3971-3976.

Lee, D.F.; Swinny, E.E.; Jones, G.P. NMR identification of ethyl-linked anthocyanin-flavanol pigments formed in model wine ferments. *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 1671-1674.

Lee, J.H.; Johnson, J.V.; Talcott, S.T. Identification of ellagic acid conjugates and other polyphenolics in muscadine grapes by HPLC-ESI-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 6003-6010.

Leydet, Y.; Gavara, R.; Petrov, V.; Diniz, A. M.; Parola, A.J.; Lima, J.C.; Pina, F. The effect of self-aggregation on the determination of the kinetic and thermodynamic constants of the network of chemical reactions in 3-glucoside anthocyanins. *Phytochemistry*, **2012**, 83, 125-135.

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

Liu, Y.X.; Liang, N.N.; Wang, J.; Pan, Q.H.; Duan, C.Q. Effect of the prefermentative addition of five enological tannins on anthocyanins and color in red wines. *Journal of Food Science*, **2013**, 78, C25-C30.

Main, G.L.; Morris, J.R., Effect of macerating enzymes and postfermentation grape-seed tannin on the color of Cynthiana wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2007**, 58, 365-372.

Malien-Aubert, C.; Dangles, O.; Amiot, M.J. Influence of procyanidins on the color stability of oenin solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 3299-3305.

Mämmelä, P.; Savolainen, H.; Lindroos, L.; Kangas, J.; Vartiainen, T. Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2000**, 891, 75-83.

Manfroi, V.; Rizzon, L.A.; Guerra, C.C.; Fialho, F.B.; Agnol, I.D.; Ferri, V.C.; Rombaldi, C.V., Influence of different doses and distinct times of application of enological tannins on the physicochemical characteristics of the Cabernet Sauvignon wine. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos*, **2010**, 30, 127-135.

Markakis, P. Stability of anthocyanins in foods. En: *Anthocyanins as Food Colors*. Markakis, P. (Editor). Academic Press, inc., Nueva York (Estados Unidos), **1982**, p.163.

Masson, G.; Moutounet, M.; Puech, J.L. Ellagitannin content of oak wood as a function of species and of sampling position in the tree. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1995**, 46, 262-268.

Mateus, N.; de Freitas, V. Evolution and stability of anthocyanin-derived pigments during port wine aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**, 49, 5217-5222.

Mateus, N.; Silva, A.M.S.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C.; de Freitas, V. Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002a**, 50, 2110-2116.

Mateus, N.; de Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V. Structural diversity of anthocyanin-derived pigments in port wines. *Food Chemistry*, **2002b**, 76, 335-342.

Mateus, N.; Carvalho, E.; Carvalho, A.R.F.; Melo, A.; González-Paramás, A.M., Santos-Buelga, C.; Silva, A.M.S.; de Freitas, V. Isolation and structural characterization of new acylated anthocyanin-vinyl-flavanol pigments occurring in aging red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003a**, 51, 277-282.

Mateus, N.; Silva, A.M.S.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V. A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003b**, 51, 1919-1923.

Mateus, N.; Oliveira, J.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.M.S.; de Freitas, V. NMR structure characterization of a new vinylpyranoanthocyanin-catechin pigment (a portisin). *Tetrahedron Letters*, **2004**, 45, 3455-3457.

Mateus, N.; Oliveira, J.; Pissarra, J.; González-Paramás, A.M., Rivas-Gonzalo, J.C.; Santos-Buelga, C.; Silva, A.M.S.; de Freitas, V. A new vinylpyranoanthocyanin pigment occurring in aged red wine. *Food Chemistry*, **2006**, 97, 689-695.

Matricardi, L.; Waterhouse, A.L. Influence of toasting technique on color and ellagitannins of oak wood in barrel making. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 519-526.

Mayer, W.; Gabler, W.; Riester, A.; Korger, H. über die Gerbstoffe aus dem Holz der Edelkastanie und der Eiche, II. Die Isolierung von Castalagin, Vescalagin, Castalin und Vescalin. *Liebigs Annalen der Chemie*, **1967**, 707, 177-181.

Mazza, G.; Brouillard, R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, **1990**, 29, 1097-1102.

McDougall, G.J.; Gordon, S.; Brennan, R.; Stewart, D. Anthocyanin-flavanol condensation products from black currant (*Ribes nigrum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 7878-7885.

Mira de Orduña, R. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, **2010**, 43, 1844-1855.

Mirabel, M.; Saucier, C.; Guerra, C.; Glories, Y. Copigmentation in model wine solutions: occurrence and relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 211-218.

Monagas, M.; Nunez, V.; Bartolome, B.; Gomez-Cordoves, C. Anthocyanin-derived pigments in Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon wines produced in Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2003**, 54, 163-169.

Monagas, M.; Bartolomé, B. Anthocyanins and anthocyanin-derived compounds. En: *Wine chemistry and biochemistry*. Moreno-Arribas, M.V. y Polo M.C. (Editoras). Springer Science, Nueva York (Estados Unidos), **2009**, p.439.

Mora-Soumille, N.; Al Bittar, S.; Rosa, M.; Dangles, O. Analogs of anthocyanins with a 3,4-dihydroxy substitution: synthesis and investigation of their acid-base, hydration, metal binding and hydrogen-donating properties in aqueous solution. *Dyes and Pigments*, **2013**, 96, 7-15.

Mosedale, J.R.; Puech, J.L.; Feuillat, F. The influence on wine flavor of the oak species and natural variation of heartwood components. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 503-512.

Mullen, W.; Yokota, T.; Lean, M.E.J.; Crozier, A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MSⁿ. *Phytochemistry*, **2003**, 64, 617-624.

Nardini, M.; D'Aquino, M.; Tomassi, G.; Gentili, V.; Di Felice, M.; Scaccini, C. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, **1995**, 19, 541-552.

Nave, F.; Teixeira, N.; Mateus, N.; de Freitas, V. Hemisynthesis and structural characterization of flavanol-(4,8)-vitisins by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2010a**, 24, 1964-1970.

Nave, F.; Teixeira, N.; Mateus, N.; de Freitas, V. The fate of flavanol-anthocyanin adducts in wines: Study of their putative reaction patterns in the presence of acetaldehyde. *Food Chemistry*, **2010b**, 121, 1129-1138.

Nave, F.; Petrov, V.; Pina, F.; Teixeira, N.; Mateus, N.; de Freitas, V. Thermodynamic and kinetic properties of a red wine pigment: catechin-(4,8)-malvidin-3-O-glucoside. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2010c**, 114, 13487-13496.

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

Nonier, M.F.; Vivas, N.; Vivas de Gaulejac, N.; Absalon, C.; Vitry, C; Fouquet, E. Global fractionation of oak heartwood extractable polymers (lignins, polysaccharides and ellagitannins) by selective precipitations. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2005**, 85, 343-353.

Obreque-Slier, E.; Pena-Neira, A.; López-Solís, R.; Ramírez-Escudero, C.; Zamora-Marin, F. Phenolic characterization of commercial enological tannins. *European Food Research and Technology*, **2009**, 229, 859-866.

Okuda, T.; Hatano, T.; Kaneda, T.; Yoshizaki, M.; Shingu, T. Liquidambin, an ellagitannin from *Liquidambar formosana*. *Phytochemistry*, **1987**, 26, 2053-2055.

Okuda, T.; Yoshida, T.; Hatano, T.; Ito, H. Ellagitannins renewed the concept of tannins. En: *Chemistry and biology of ellagitannins: an underestimated class of bioactive plant polyphenols*. Quideau, S. (Editor). World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Danvers (Estados Unidos), **2009**, p. 1.

Oliveira, J.; de Freitas, V.; Silva, A.M.S.; Mateus, N. Reaction between hydroxycinnamic acids and anthocyanin-pyruvic acid adducts yielding new portisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, 55, 6349-6356.

Oliveira, J.; Azevedo, J.; Silva, A.M.S.; Teixeira, N.; Cruz, L.; Mateus, N.; de Freitas, V. Pyranoanthocyanin dimers: A new family of turquoise blue anthocyanin-derived pigments found in Port wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58, 5154-5159.

Parker, M.; Smith, P.A.; Birse, M.; Francis, I.L.; Kwiatkowski, M.J.; Lattey, K.A.; Liebich, B.; Herderich, M.J. The effect of pre- and post-ferment additions of grape derived tannin on Shiraz wine sensory properties and phenolic composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2007**, 13, 30-37.

Passos, C. P.; Cardoso, S. M.; Domingues, M. R. M.; Domingues, P.; Silva, C. M.; Coimbra, M. A. Evidence for galloylated type-A procyanidins in grape seeds. *Food Chemistry*, **2007**, 105, 1457-1467.

Pecket, R.; Small, C. Occurrence, location and development of anthocyanoplasts. *Phytochemistry*, **1980**, 19, 2571-2576.

Peng, S.; Scalbert, A.; Monties, B. Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 775-778.

Pereira, G.E.; Gaudillere, J.P.; Pieri, P.; Hilbert, G.; Maucourt, M.; Deborde, C.; Moing, A.; Rolin, D. Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 6765-6775.

Pina, F. Thermodynamics and kinetics of flavylum salts - malvin revisited. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **1998**, 94, 2109-2116. Corrección en *Scheme 1*, ver: Pina, F. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **1998**, 94, 3781.

Pina, F.; Melo, M.J.; Laia, C.A.T.; Parola, A.J.; Lima, J.C. Chemistry and applications of flavylum compounds: a handful of colours. *Chemical Society Reviews*, **2012a**, 41, 869-908.

Pina, F.; Petrov, V.; Laia, C.A.T. Photochromism of flavylum systems. An overview of a versatile multistate system. *Dyes and Pigments*, **2012b**, 92, 877-889.

Pissarra, J.; Mateus, N.; Rivas-Gonzalo, J.; Santos Buelga, C.; de Freitas, V. Reaction between malvidin 3-glucoside and (+)-catechin in model solutions containing different aldehydes. *Journal of Food Science*, **2003**, 68, 476-481.

Pissarra, J.; Lourenço, S.; González-Paramás, A. M.; Mateus, N.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V.. Formation of new anthocyanin-alkyl/aryl-flavanol pigments in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 513, 215-221.

Pissarra, J.; Lourenço, S.; González-Paramás, A. M.; Mateus, N.; Santos Buelga, C.; Silva, A. M. S.; de Freitas, V. Isolation and structural characterization of new anthocyanin-alkyl-catechin pigments. *Food Chemistry*, **2005**, 90, 81-87.

Prida, A.; Puech, J.L. Influence of geographical origin and botanical species on the content of extractives in American, French, and East European oak woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 115-126.

Pocock, K.F.; Sefton, M.A.; Williams, P.J. Taste thresholds of phenolic extracts of French and American oakwood: the influence of oak phenols on wine flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1994**, 45, 429-434.

Puech, J.L.; Feuillat, M.; Mosedale, J.R. The tannins of oak heartwood: structure, properties and their influence on wine flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 469-478.

Puech, J.L.; Feuillat, M.; Boulet, J.C.; Feuillat, F.; Keller, R.; Masson, G.; Moutounet, M.; Naudin, R.; Peyron, D. Crianza de los vinos. En : *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 2ª Edición; Flanzy, C. (Editor). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España), **2003**; p. 608.

Quideau, S.; Jourdes, M.; Saucier, C.; Glories, Y.; Pardon, P.; Baudry, C. DNA Topoisomerase inhibitor acutissimin A and other flavano-ellagitannins in red wine. *Angewandte Chemie International Edition*, **2003**, *42*, 6012-6014.

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

Quideau, S.; Jourdes, M.; Lefeuvre, D.; Montaudon, D.; Saucier, C.; Glories, Y.; Pardon, P.; Pourquier, P. The chemistry of wine polyphenolic C-glycosidic ellagitannins targeting human topoisomerase II. *Chemistry*, **2005**, *11*, 6503-6513.

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

Quinn M.K.; Singleton, V.L. Isolation and identification of ellagitannins from white oak wood and an estimation of their roles in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1985**, *36*, 148-155.

Razungles, A.; Blouin, J.; Boulet, J.C.; Escudier, J.L.; Feuillat, M.; Flanzy, C.; Peyron, D. Vinificación en tinto. En : *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 2ª Edición; Flanzy, C. (Editor). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España), **2003**; p. 462.

Remy, S.; Fulcrand, H.; Labarbe, B.; Cheynier, V.; Moutounet, M. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000**, *80*, 745-751.

Remy-Tanneau, S.; Fulcrand, H.; Labarbe, B.; Cheynier, V.; Moutounet, M. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000**, *80*, 745-751.

Remy-Tanneau, S.; Le Guernevé, C.; Meudec, E.; Cheynier, V. Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**, *51*, 3592-3597.

Rentzsch, M.; Schwarz, M.; Winterhalter, P.; Hermosín-Gutiérrez, I. Formation of hydroxyphenyl-pyranoanthocyanins in Grenache wines: precursor levels and evolution during aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**, *55*, 4883-4888.

Revilla, E.; Carrasco, D.; Benito, A.; Arroyo-García, R. Anthocyanin composition of several wild grape accessions. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2010**, 61, 536-543.

Ribéreau-Gayon, P. *Les composés phénoliques des végétaux*. 1ª Edición. Editorial Dunod. París (Francia), **1968**, p. 254.

Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*. 3ª Edición. John Wiley & Sons, Chichester (Reino Unido), **2003**, p. 404.

Ricardo da Silva, J.M.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Cheminat, A.; Moutounet, M. Procyandin dimers and trimers from grapes seeds. *Phytochemistry*, **1991**, 30, 1259-1264.

Rivas-Gonzalo, J.C.; Bravo-Haro, S.; Santos-Buelga, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-glucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1995**, 43, 1444-1449.

Rodríguez Montealegre, R.; Romero Peces, R.; Chacón Vozmediano, J. L.; Martínez Gascuña, J.; García Romero E. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2006**, 19, 687-693.

Roggero, J.P.; Coen, S.; Archier, P.; Rocheville-Divorne, C. Étude par C.L.H.P. de la réaction glucoside de malvidine-acetaldéhyde-composé phénolique. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **1987**, 21, 163-168.

Romano, P.; Suzzi, G.; Turbanti, L.; Polsinelli, M. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, **1994**, 118, 213-218.

Romero, C.; Bakker, J. Effect of acetaldehyde and several acids on the formation of vitisin A in model wine anthocyanin and colour evolution. *International Journal of Food Science and Technology*, **2000**, 49, 210-215.

de Rosa, T. *Tecnología del vino tinto*. 1ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España), **1987**, p. 247.

Salas, E.; Atanasova, V.; Poncet-Legrand, C.; Meudec, E.; Mazauric, J.P.; Cheynier, V. Demonstration of the occurrence of flavanol-anthocyanin adducts in wine and in model solutions. *Analytica Chimica Acta*, **2004a**, 513, 325-332.

Salas, E.; Guernevé, C. L.; Fulcrand, H.; Poncet-Legrand, C.; Cheynier, V. Structure determination and colour properties of a new directly linked flavanol-anthocyanin dimer. *Tetrahedron Letters*, **2004b**, 45, 8725-8729.

Salminen, J.P.; Ossipov, V.; Haukioja, E.; Pihlaja, K. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens*. *Phytochemistry*, **2001**, 57, 15-22.

Santos-Buelga, C.; Bravo-Haro, S.; Rivas-Gonzalo, J.C. Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in model solutions. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, **1995**, 201, 269-274.

Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E.M.; de Pascual-Teresa, S.; Rivas-Gonzalo, J.C. Contribution to the identification of the pigments responsible for the browning of anthocyanin-flavanol solutions. *European Food Research and Technology*, **1999**, 209, 411-415.

Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds – nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000**, 80, 1094-1117.

Sarni-Manchado, P.; Fulcrand, H.; Souquet, J.M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments, *Journal of Food Science*, **1996**, 61, 938-941.

Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Reactions of polyphenoloxidase generated caftaric acid o-quinone with malvidin 3-O-glucoside. *Phytochemistry*, **1997**, 45, 1365-1369.

Saucier, C.; Bourgeois, G.; Vitry, C.; Roux, D.; Glories, Y. Characterization of (+)-Catechin-acetaldehyde polymers: A model for colloidal state of wine polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997a**, 45, 1045-1049.

Saucier, C.; Guerra, C.; Pianet, I.; Laguerre, M.; Glories, Y. (+)-Catechin-acetaldehyde condensation products in relation to wine-ageing. *Phytochemistry*, **1997b**, 46, 229-234.

Saucier C.; Jourdes M.; Glories Y.; Quideau S. Extraction, detection, and quantification of flavano-ellagitannins and ethylvescalagin in a bodeaux red wine aged in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**, 54, 7349-735.

Sauvageot, F.; Feuillat, F. The influence of oak wood (*Quercus robur* L., *Q. petraea* Liebl.) on the flavor of Burgundy Pinot noir. An examination of variation among individual trees. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**, 50, 447-455.

Scalbert, A.; Monties, B.; Favre, J.M. Polyphenols of *Quercus robur*: Adult tree and *in vitro* grown calli and shoots. *Phytochemistry*, **1988**, 27, 3483-3488.

Scalbert, A.; Duval, L.; Peng, S.; Montiens, B.; du Penhoat, C. Polyphenols of *Quercus robur* L.: II. Preparative isolation by low pressure and high-pressure liquid chromatography of heartwood ellagitannins. *Journal of Chromatography A*, **1990**, 502, 107-119.

Schwarz, M.; Jerz, G.; Winterhalter, P. Isolation and structure of Pinotin A, a new anthocyanin derivative from Pinotage wine. *Vitis*, **2003a**, 42, 105-106.

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

Schwarz, M.; Winterhalter, P. A novel synthetic route to substituted pyranoanthocyanins with unique colour properties. *Tetrahedron Letters*, **2003**, 44, 7583-7587.

Schwarz, M.; Picazo-Bacete, J.J.; Winterhalter, P.; Hermosín-Gutierrez, I. Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 8372-8381.

Seeram, N.P.; Lee, R.; Scheuller, S.; Heber, D. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, **2006**, 97, 1-11.

Somers, T.C. The polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry*, **1971**, 10, 2175-2186.

Somers, T.C. An assessment of the "oak factor" in current winemaking practice. *The Australian Wine Research Institute Technical Review*, **1990**, 67, 3-10.

Sousa, C.; Mateus, N.; Pérez-Alonso, J.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V. Preliminary study of oaklins, a new class of brick-red catechinpyrylium pigments resulting from the reaction between catechin and wood aldehydes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**, 53, 9249-9256.

Sousa, C.; Mateus, N.; Silva, A.M.S.; González-Paramás, A.M.; Santos-Buelga, C.; de Freitas, V. Structural and chromatic characterization of a new malvidin 3-glucoside-vanillyl-catechin pigment. *Food Chemistry*, **2007**, 102, 1344-1351.

Sousa, A.; Fernandes, A.; Mateus, N.; de Freitas, V. Synthesis and structural characterization of oaklin-catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2012**, 60, 1528-1534.

Sousa, A.; Petrov, V.; Araújo, P.; Mateus, N.; Pina, F.; de Freitas, V. Thermodynamics, kinetics, and photochromism of oaklins: a recent family of deoxyanthocyanidins. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2013**, 117, 1901-1910.

Stark, T.; Wollmann, N.; Wenker, K.; Loesch, S.; Glabasnia, A.; Hofmann, T. Matrix-calibrated LC-MS/MS quantitation and sensory evaluation of oak ellagitannins and their transformation products in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**, 58, 6360-6369.

Sun, B.; Neves, A.C.; Fernandes, T.A.; Fernandes, A.L.; Mateus, N.; de Freitas, V.; Leandro, C.; Spranger M.I. Evolution of phenolic composition of red wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**, 59, 6550-6557.

Teissedre, P.L.; Frankel, E.N.; Waterhouse, A.L.; Peleg, H.; German, J.B. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grape and wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1996**, 70, 55-61.

Thompson, R.S.; Jacques, D.; Haslam, E.; Tanner, R.J.N. Plant proanthocyanidins – Part 1- Introduction: the isolation, structure and distribution in nature of plant procyanidins. *Journal of the Chemical Society Perkin Trans 1*, **1972**, 1387-1399.

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

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

Vidal, S.; Cartalade, D.; Souquet, J.M.; Fulcrand, H.; Cheynier, V. Changes in proanthocyanidin chain length in wine-like model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**, 50, 2261-2266.

Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E.J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2003**, 83, 564-573.

Vidal, S.; Hayasaka, Y.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Skouromounis, G. Fractionation of grape anthocyanin classes using multilayer coil countercurrent chromatography with step gradient elution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004a**, 52, 713-719.

Vidal, S.; Meudec, E.; Cheynier, V.; Skouromounis, G.; Hayasaka, Y. Mass spectrometric evidence for the existence of oligomeric anthocyanins in grape skins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004b**, 52, 7144-7151.

de Villiers, A.; Vanhoenacker, G.; Majek, P., Sandra, P. Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1054, 195-204.

Viriot, C.; Scalbert, A.; Hervé, C.L.M.; Moutounet, M. Ellagitannins in woods of sessile oak and sweet chestnut dimerization and hydrolysis during wood ageing. *Phytochemistry*, **1994**, 36, 1253-1260.

Vivar-Quintana, A.M.; Santos-Buelga, C.; Francia-Aricha, E.; Rivas-Gonzalo, J.C. Formation of anthocyanin-derived pigments in experimental red wines. *Food Science and Technology International*, **1999**, 5, 347-352.

Vivar-Quintana, A.M.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Anthocyanin-derived pigments and color of red wines. *Analytica Chimica Acta*, **2002**, 458, 147-155.

Vivas N.; Glories, Y. Role of oak wood ellagitannins in the oxidation process of red wines during aging. *American Journal of Enology and Viticulture*. **1996**, 47, 103-107.

Vivas, N.; Laguerre, M.; Pianet de Boissel, I.; Vivas de Gaulejac, N.; Nonier, M.F. Conformational interpretation of vescalagin and castalagin physicochemical properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004a**, 52, 2073-2078.

Vivas, N.; Nonier, M.F.; Vivas de Gaulejac, N.; Pianet de Boissel, I. Occurrence and partial characterization of polymeric ellagitannins in *Quercus petraea* Liebl. and *Q. robur* L. wood. *C. R. Chimie*, **2004b**, 7, 945-954.

Wang, H.; Race, E.J.; Shrikhande, A.J. Characterization of anthocyanins in grape juices by ion trap liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003a**, 51, 1839-1844.

Wang, H.; Race, E.J.; Shrikhande, A.J. Anthocyanin transformation in Cabernet Sauvignon wine during aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003b**, 51, 7989-7994.

Wildenradt, H.L.; Singleton, V.L. The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1974**, 25, 119-126.

Willstatter, R.; Zollinger, E.H. Anthocyanins, XVI. Anthocyanins of the grape and of the bilberry. II. *Journal of the Chemical Society, Chemical (Abstracts)*, **1916**, 112, 47-48.

Wyszecki, G.; Stiles, W.S. *Color Science: concepts and methods, quantitative data and formulae*. 2ª Edición. John Wiley & Sons, New York (Estados Unidos), **1982**, pp. 117.

Yoshida, T.; Ohbayashi, H.; Ishihara, K.; Ohwashi, W.; Haba, K.; Okano, Y.; Shingu, T.; Okuda, T. Tannins and related polyphenols of melastomataceous plants. I. Hydrolyzable tannins from *Tibouchina semidecandra* COGN. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **1991**, 39, 2233-2240.

Yoshida, T.; Hatano, T.; Ito, H.; Okuda, T. Structural diversity and antimicrobial activities of ellagitannins. En: *Chemistry and biology of ellagitannins: an underestimated class of bioactive plant polyphenols*. Quideau, S. (Editor). World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. Danvers (Estados Unidos), **2009**, p. 55.

Zamora, F. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. 1ª Edición. Ediciones A. Madrid Vicente y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (España), **2003**, pp. 128, 145 y 175.

Zywicki, B.; Reemtsma, T.; Jekel, M. Analysis of commercial vegetable tanning agents by reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry and its application to wastewater. *Journal of Chromatography A*. **2002**, 970, 191-200.



VNiVERSiDAD D SALAMANCA

~ FACULTAD DE FARMACIA ~
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

