El color de los vinos tintos

Véronique Cheynier
Unité Mixte de Recherche Sciences pour l'Oenologie, INRA, 2, place Viala, 34060 Montpellier cedex.

El mayor desafío en la investigación enológica es determinar la relación existente entre la composición fenólica, la calidad del vino y las prácticas de elaboración. De todos los compuestos fenólicos, las antocianinas, pigmentos de la uva tinta, son particularmente importantes para la calidad del vino. Las antocianinas (del griego *anthos*, flor y *kyanos*, azul) son pigmentos vegetales ubicuos responsables de una amplia gama de colores, desde el naranja hasta el violeta. Además, son especies inestables que pueden servir como sustrato de varias enzimas y realizar diferentes tipos de reacciones químicas en el curso de la elaboración del vino. Luego de presentar la estructura de las antocianinas de la uva y la mayoría de los mecanismos que delinean sus propiedades de color, este trabajo hará un repaso de la información actual de los productos, los mecanisms de estas reacciones y sus consecuencias en el color del vino y su estabilidad.

¿Qué son las antocianinas?

Las antocianinas pertenecen a la familia de los flavonoides, están basados en un esqueleto que consiste en dos anillos bencénicos (A y B) y un heterociclo oxigenado (C). Son derivados glicosilados del cromóforo antocianidina aglicona. Generalmente se describen bajo la forma de su catión flavilium, el que es rojo y se reconoce durante la identificación y análisis de las antocianinas (Brouillard and Dangles, 1993).

Las antocianinas de la uva están basadas en cinco estructuras antocianidinas que difieren en el número de hidroxilos (OH) y grupos metilos (OCH_3) en el anillo B, como se muestra en la Figura 1. Se obtiene mayor diversidad por el número y posición de los enlaces de azúcares a la molécula de antocianidina y por la acilación de los azúcares con los ácidos acético, p-cumárico y cafeico.

Las proporciones y cantidades de estas moléculas dependen principalmente de la especie y de la variedad (Roggero et al., 1988, Mazza y Miniati, 1993). Por ejemplo, la especie *vinifera* contiene mayormente 3-glucósidos (Fig. 1, R=Glc, R'= H) y solo trazas de 3,5-diglucósidos (Fig. 1, R= R'=Glc), siendo estos últimos considerados específicos de las especies no *vinifera* (Ribéreau-Gayon, 1959). Además, entre las variedades de vinifera, Pinot noir no contiene antocianidinas aciladas.

A medida que aumenta la sustitución en el anillo B, el color del catión flavilium cambia hacia mayores longitudes de onda (de naranja a violeta). La glicosilación da solo un leve efecto hipsocrómico (de violeta a rojo), pero una mayor solubilidad y estabilidad del pigmento. Asimismo, la acilación de azúcares con ácidos fenólicos incrementa el color y la estabilidad del color, debido a mecanismos de interacción intramoleculares, como será discutido más adelante. Sin embargo, estos cambios no son suficientes para contar con las amplias variaciones del color atribuidas a las antocianinas en las plantas.

¿Por qué el color de las antocianinas es versátil?

Cuando se disuelven en agua, los cationes flavilium (AH^+) son convertidos a diversas formas, a través de la transferencia de protones y de reacciones de hidratación (Brouillard and Delaporte, 1977, Cheminat and Brouillard, 1986). Las proporciones de estas formas secundarias están determinadas principalmente por el pH, los iones flavilium son predominantes solo en medios muy ácidos (pH < 2). A medida de aumenta el pH, estos cationes son desprovistos de protones (Fig. 2, vía 1) y se transforman en bases quinónicas azules (A y A^-), o son hidratados (Fig. 2, vía 2) a compuestos de adición incoloros (B). El hemiacetal (B2), en equilibrio con su isómero abierto (cis-retrocalcona, CE), es en realidad la forma más abundante de la malvidina-

3-glucósido en un rango de pH de 2 a 7 (Brouillard and Delaporte, 1977). En un principio, se pensó que las formas quinónicas coloreadas se hidrataban a hemiacetales incoloros. No obstante, ahora es bien conocido que esta reacción no tiene lugar y que el paso clave que lleva a la pérdida de color es la hidratación del catión flavilium (Brouillard and Dangles, 1993).
Finalmente, debe notarse que el sulfuroso reacciona con los cationes flavilium de la misma forma que el agua para formar aductos incoloros (Fig. 2, vía 3), tal estructura fue recientemente confirmada (Berke et al., 1998).

¿Cómo se estabiliza el color de las antocianinas mediante la copigmentación?
Con los valores de pH del vino, cerca del 80% de las antocianinas se encuentran en forma hidratada incolora excepto si tiene lugar algún tipo de mecanismo estabilizador del color. Tales mecanismos de estabilización son facilitados por el acomplejamiento del cromófero antociánico con otras especies presentes en la solución, las cuales pueden ser una molécula igual de antocianina (autoasociación) o cualquier otra molécula (copigmentación intermolecular).
Los mecanismos involucrados en estos procesos han sido investigados profundamente y están descriptos en detalle en excelentes revisiones (Goto y Kondo, 1991, Brouillard y Dangles, 1993). El incremento en la intensidad y estabilidad del color, resultante de la autoasociación de las antocianinas o de la copigmentación, es debido a un cambio en el equilibrio de hidratación hacia las formas flavilium, que luego es atrapado por los pigmentos, o hacia bases quinónicas en los complejos pigmento-copigmento, como se muestra en la Figura 3. Esto es, por lo tanto, particularmente importante en el rango de pH del vino, donde predominan las formas hidratadas.

¿Qué sucede con las antocianinas durante la elaboración de vinos?
La difusión de constituyentes fenólicos hacia el mosto en fermentación depende de su solubilidad y localización en la baya. Esto, además, es influenciado por varios factores incluyendo la temperatura, el contenido de etanol y dióxido de azufre (SO_2), y la frecuencia de homogeneización del mosto. Las antocianinas que se encuentran localizadas en la piel, y en la pulpa de las variedades tintoreras, son extraídas rápidamente. Su concentración alcanza un máximo después de unos días y luego decrece lentamente a medida que continua la extracción de taninos.
La desaparición de las antocianinas, observada durante la maceración, continúa a lo largo del añejamiento. Sin embargo, el grado de decoloración es en general bajo, ya que una vez extraídas las antocianinas son convertidas en otros pigmentos (Somers, 1971). Estos pigmentos son más resistentes a la decoloración por SO_2 y son descriptos como pigmentos poliméricos.
En el curso de la elaboración de vinos tienen lugar dos grupos principales de reacciones, los procesos enzimáticos y las reacciones químicas que involucran antocianinas y/o flavanoles. Aunque los dos tipos de reacciones ocurren simultáneamente, la primera prevalece en las etapas tempranas de la elaboración, mientras que la segunda comienza a predominar en las últimas etapas, cuando la actividad enzimática decrece.
Las reacciones enzimáticas, en su mayoría catalizadas por polifenoloxidasas, peroxidasas, glicosidasas y esterasas, comienzan cuando se daña la estructura de la célula. Las antocianinas son sustratos pobres para las polifenoloxidasas de las plantas pero reaccionan fácilmente con las o-qinonas generadas por la oxidación enzimática de otros fenoles. La reacción completa produce una importante decoloración (Cheynier et al., 1995). Sin embargo, en vinos tintos está limitada ya que las levaduras compiten con las polifenoloxidasas por el consumo del oxígeno disponible.
Las antocianinas también pueden ser oxidadas directamente por peroxidasas y laccasas con la consecuente decoloración. La degradación de las antocianinas por glicosidasas, que generalmente se añaden durante la elaboración para hidrolizar las

pectinas y, de esta manera, incrementar la extracción de compuestos fenólicos o liberar compuestos volátiles de sus precursores glicosídicos, produce agliconas inestables y así también resulta la decoloración. Esto puede ser acrecentado por la presencia de acil esterasas.

Las reacciones químicas comienzan a prevalecer a medida que la actividad enzimática disminuye. Estas reacciones son descriptas como adiciones antocianinas-taninos, las que pueden ser directas o involucrar acetaldehído. Estas están basadas en procesos de adición nucleofílica en donde las antocianinas y los taninos pueden actuar como agentes electrofílicos, moléculas que presentan una deficiencia de electrones y tienden a atraer moléculas con exceso de electrones, llamadas nucleofílicas, y como nucleofílicos (Fig. 4). Las antocianinas pueden reaccionar como electrofílicos, a través de la carga positiva de la forma flavilium (AH^+). Los flavonoides neutros, como los taninos, muestran un exceso de electrones en las posiciones C-8 y C-6 y, de esta manera, pueden comportarse como nucleofílicos. Esto también se aplica a las formas hidratadas de las antocianinas. Además, la ruptura de los enlaces C-C de las unidades constitutivas de los taninos ocurre espontáneamente en el vino y genera carbocationes (T^+) intermediarios que son electrofílicos.
Consecuentemente, las adiciones directas de antocianinas-taninos provienen de dos mecanismos diferentes (Fig. 5). El primero (Fig. 5, 1) involucra la separación de los taninos seguido de la adición de la antocianina hidratada (AOH) con el resultante T^+. El aducto incoloro T-AOH luego se deshidrata formando la especia $T\text{-}A^+$ roja. En el segundo mecanismo (Fig.5, 2), el tanino se adhiere directamente al catión de la antocianina para formar un intermediario incoloro A-T que puede ser oxidado al aducto rojo A^+-T o convertido a otra especie incolora (no mostrada en el esquema).
Ambas estructuras, A^+-T y $T\text{-}A^+$, son más complejas que las antocianinas pero la última, que surge de la división de los taninos, es un oligómero más que un polímero.
Las reacciones que involucran acetaldehído resultan en productos enlazados a etilos, incluyendo taninos (T-etil-T), aductos de taninos-antocianinas (T-etil-A) y oligómeros de antocianinas (A-etil-A). La formación de estos compuestos involucra la adición nucleofílica de antocianinas hidratadas o de unidades de taninos con el carbocatión resultante de la protonización del acetaldehído. El tamaño molecular de estos productos es ampliamente variable ya que depende del número de pasos sucesivos en la reacción inducida por el acetaldehído y del tamaño de los reactivos polifenólicos, quienes también varían desde monómeros hasta taninos con más de 25 unidades.
Por último, otro mecanismo, que conduce a nuevos pigmentos basado en la estructura piranoantocianina (a veces referida como vitisina), ha sido recientemente demostrado (Fulcrand et al., 1996, Cheynier et al., 1997, Fulcrand et al., 1998). Estos pigmentos incluyen compuestos de bajo peso molecular y resultan de la reacción de los metabolitos producidos por las levaduras, acetaldehído, ácido pirúvico o vinilfenol, con las antocianinas de la uva. Asimismo, incluyen especies de alto peso molecular en las cuales la unidad de piranoantocianina está unida a la molécula de tanino (Francia-Aricha et al., 1997). En la Fig. 6 se describen ejemplos de pigmentos que surgen de reacciones de antocianinas con acetaldehído.

¿Cuáles son las propiedades de color de los distintos tipos de antocianinas formados en el vino?
La conversión de las antocianinas a los diferentes pigmentos mencionados arriba incrementan la gama de colores disponibles (desde el naranja al violeta). Además, la sustitución del anillo C de las antocianinas impide la decoloración cuando se agrega agua o SO_2.
De esta manera, las piranoantocianinas son pigmentos naranjas que resisten la hidratación y la adición de SO_2.

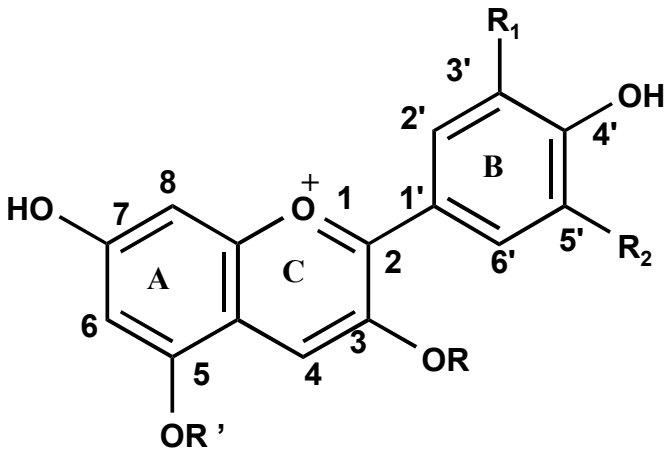
Los compuestos T-A^+ y A^+-T son del mismo color que las mismas antocianinas. Pero el A^+-T es resistente al blanqueo por SO_2 debido a la sustitución del anillo C de la antocianina, mientras que T-A^+ teóricamente debería ser susceptible al SO_2 y a la hidratación. Si estos compuestos son estabilizados por mecanismos de asociación, como los descriptos para los pigmentos con puentes etilo, todavía debe ser determinado. Todavía resta determinar si estos compuestos son establilizados por mecanismos de asociación, como descriptos por los pigmentos con puentes etilos.
Las antocianinas (por ejemplo: T-etil-A y A-etil-A) son pigmentos púrpuras y mucho más resistentes a la decoloración, por deshidratación y SO_2, que las antocianinas genuinas de la uva. Como el anillo C de la antocianina no es sustituido en los derivados etilados, esta resistencia es debida probablemente a su envolvimiento durante la asociación molecular. De esta manera, fue recientemente demostrado que la única forma significativa de una antocianina etilada en el vino es la A^+-etil-AOH, en donde una unidad de antocianina es incolora y la otra es roja (Atanosova et al., 2002). Esto significa que la conversión de los pigmentos de la uva (70-80% AOH, 20-25% AH^+ en los valores de pH del vino) a derivados con puentes etilos (50% AOH, 50% AH^+) no solo resulta en un leve cambio de rojo a púrpura, sino también incrementa la intensidad del color.
Sin embargo, es importante resaltar que los pigmentos resistentes al blanqueo por SO_2 no son necesariamente poliméricos y que algunos pigmentos poliméricos no son resistentes.

¿Qué determina la proporción de varios tipos de nuevos pigmentos?
La importancia relativa de los derivados etilados y aductos directos depende principalmente de la presencia de acetaldehído en el vino. El acetaldehído es un metabolito de las levaduras y se presenta en pequeñas cantidades. También se origina a partir de la oxidación del etanol, por lo tanto su nivel aumenta con la exposición al aire. La conversión de las antocianinas de la uva a pigmentos con puentes de etilo púrpuras es entonces incrementada por la microoxigenación (Atanasova et al., 2002). Luego de largos periodos de añejamiento, la posterior conversión de estos pigmentos a piranoantocianinas conduce a tintas pardas. Es más, la oxidación es requerida para la conversión de las especies incoloras A-T a pigmentos A^+-T.
Al competir las antocianinas y taninos como nucleofílicos en la mayoría de las reacciones, la proporción de estos dos compuestos determina la relativa proporción de derivados basados en taninos, antocianinas o ambos. Esta relación depende de la variedad y madurez de la uva, pero también puede estar profundamente alterada por cambios en las condiciones de maceración, ya que las antocianinas se difunden más rápido que los taninos. Se requiere mayor información sobre los porcentajes de las diferentes reacciones y las propiedades de los numerosos productos para poder determinar el tipo de vino a obtener.
El pH del vino es otro parámetro importante. De hecho, la separación catalizada por ácidos es el paso clave en la formación de T-A^+ y tanino-piranoantocianinas y, por su puesto, está más favorecida a bajos pH. La protonación del acetaldehído, que también es acrecentada por la elevada acidez, aparece como un factor limitante en la formación de derivados con puente etilo. Finalmente, ya que la hidratación de las antocianinas depende del pH, valores elevados de pH incrementan el potencial competitivo de las antocianinas frente a los taninos en reacciones de adición nucleofílicas. Sin embargo, en los rangos de pH del vino, la formación de especies T-A^+ y T-etil-A^+ nunca está limitada por la disponibilidad de la forma hidratada.

¿Existen reacciones o pigmentos buenos y malos?
Las reacciones de las antocianinas originan tanto productos incoloros como pigmentados de una amplia gama de colores. La mayoría de ellos muestran un

aumento en la estabilidad a la hidratación y al SO_2 con respecto a sus precursores antociánicos. Esta propiedad no está relacionada al peso molecular ni restringida a especies de elevado peso molecular.

La conversión de antocianinas a aductos tanino-antocianina disminuye la astringencia. Esto clásicamente ha sido atribuido al aumento del peso molecular de los taninos, ya que se creía que los taninos de alto peso molecular eran insolubles y, por lo tanto, no astringentes. No obstante, estudios recientes han señalado que la solubilidad de los taninos no disminuye con el peso molecular y que la astringencia de hecho aumenta con la longitud de la cadena del tanino. También ha sido demostrado que las reacciones de los taninos en el vino resultan en un aumento del peso molecular de las especies (a través de reacciones inducidas por el acetaldehído y formación de aductos A-T) y en una disminución del peso molecular de otras especies (a través de la separación catalizada por ácidos) como se ilustra en la Figura 5. El último mecanismo es favorecido por la presencia de altas concentraciones de antocianinas, quienes atrapan los productos de separación catalizados por ácidos, como $T\text{-}A^+$ y tanino-piranoantocianinas. Consecuentemente, la disminución de la astringencia observada durante el añejamiento pareciera involucrar estos procesos, más que las reacciones de polimerización. Sin embargo, el sabor de las antocianinas derivadas y el efecto sobre la astringencia de los taninos, al incorporar unidades de antocianinas a la estructura tánica, todavía están siendo investigados.



Antocianidinas (R=R'=H)	R_1	R_2
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH_3	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH_3	OH
Malvidina	OCH_3	OCH_3

Figura 1. Antocianinas de la uva mostrados como cationes flavilium

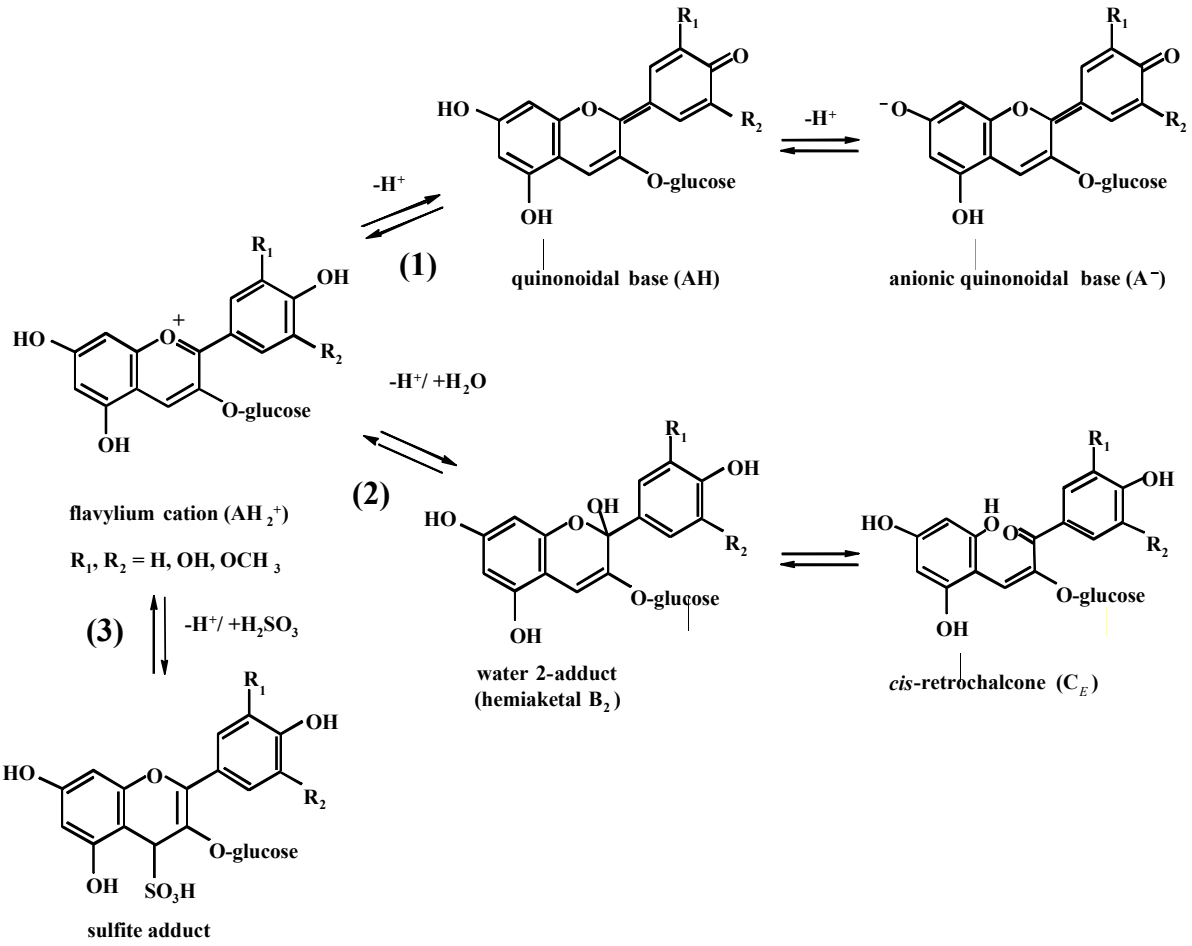


Figura 2. Reacciones principales de las antocianinas en medio acuoso (solo se representa una forma de cada base quinónica, entre los tres isómeros posibles)

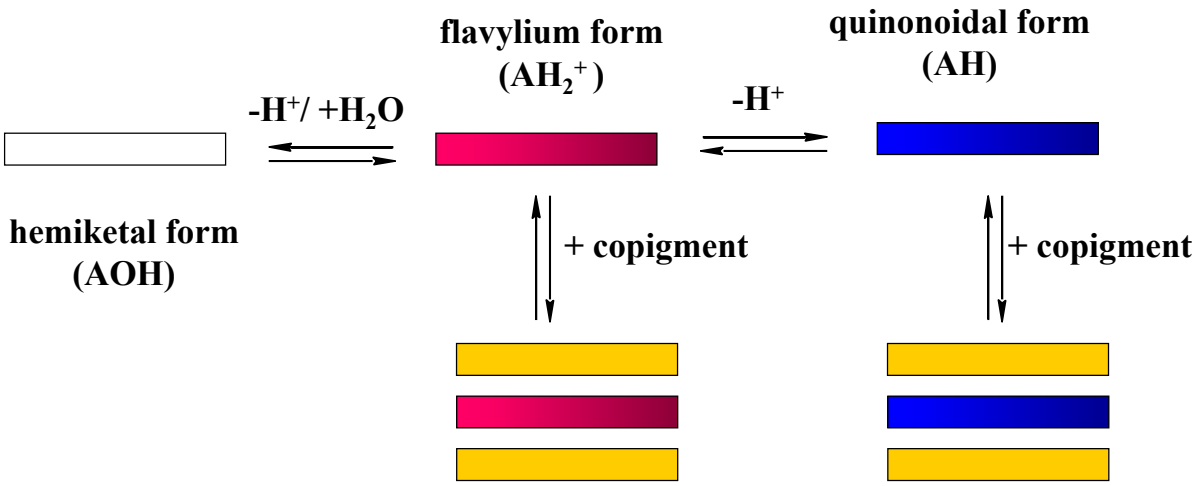


Figura 3. Principio del proceso de pigmentación

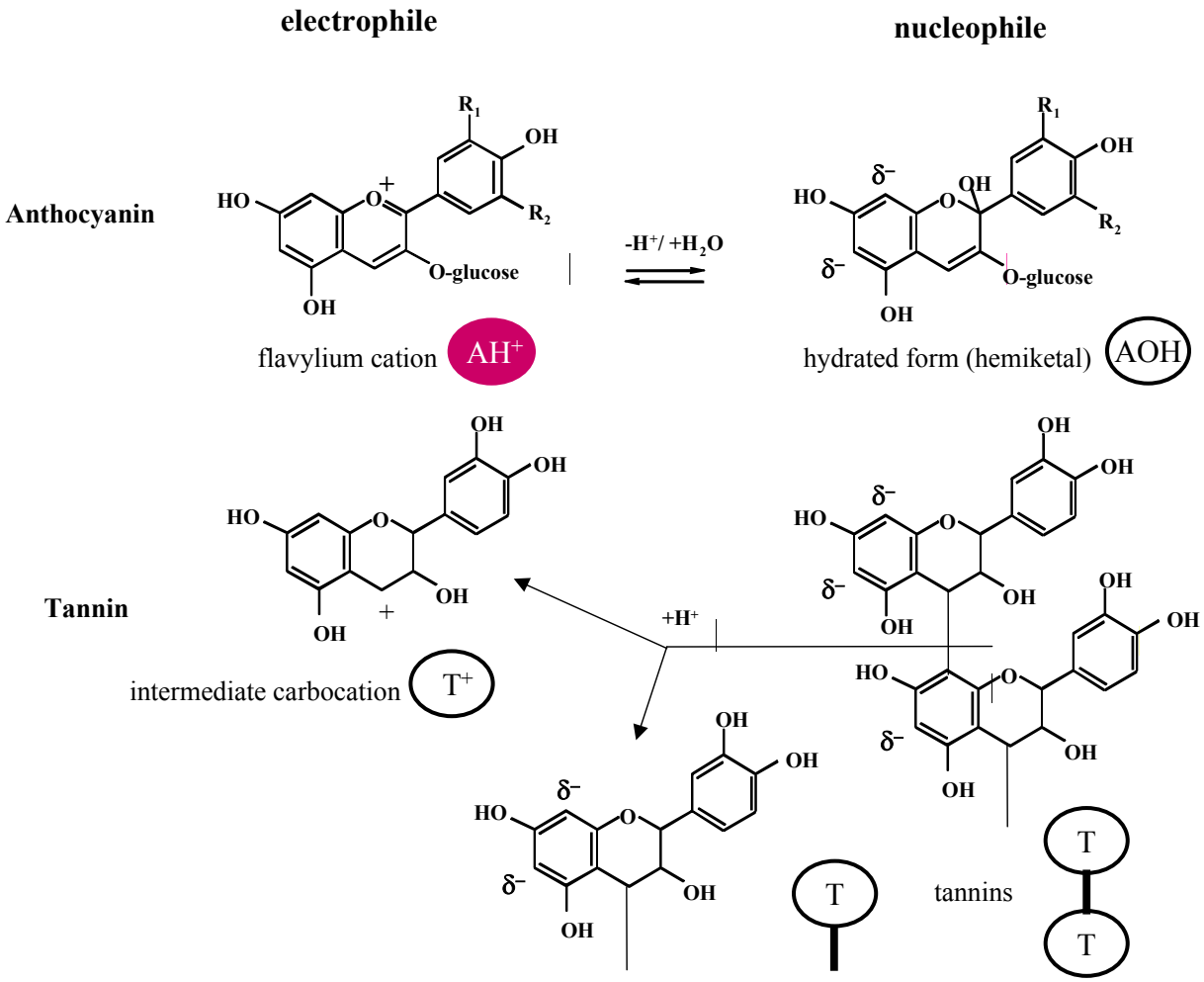


Figura 4. Propiedades nucleofílicas y electrofílicas de las antocianinas y taninos (δ^- indica el exceso de electrones en los sitios nucleofílicos)

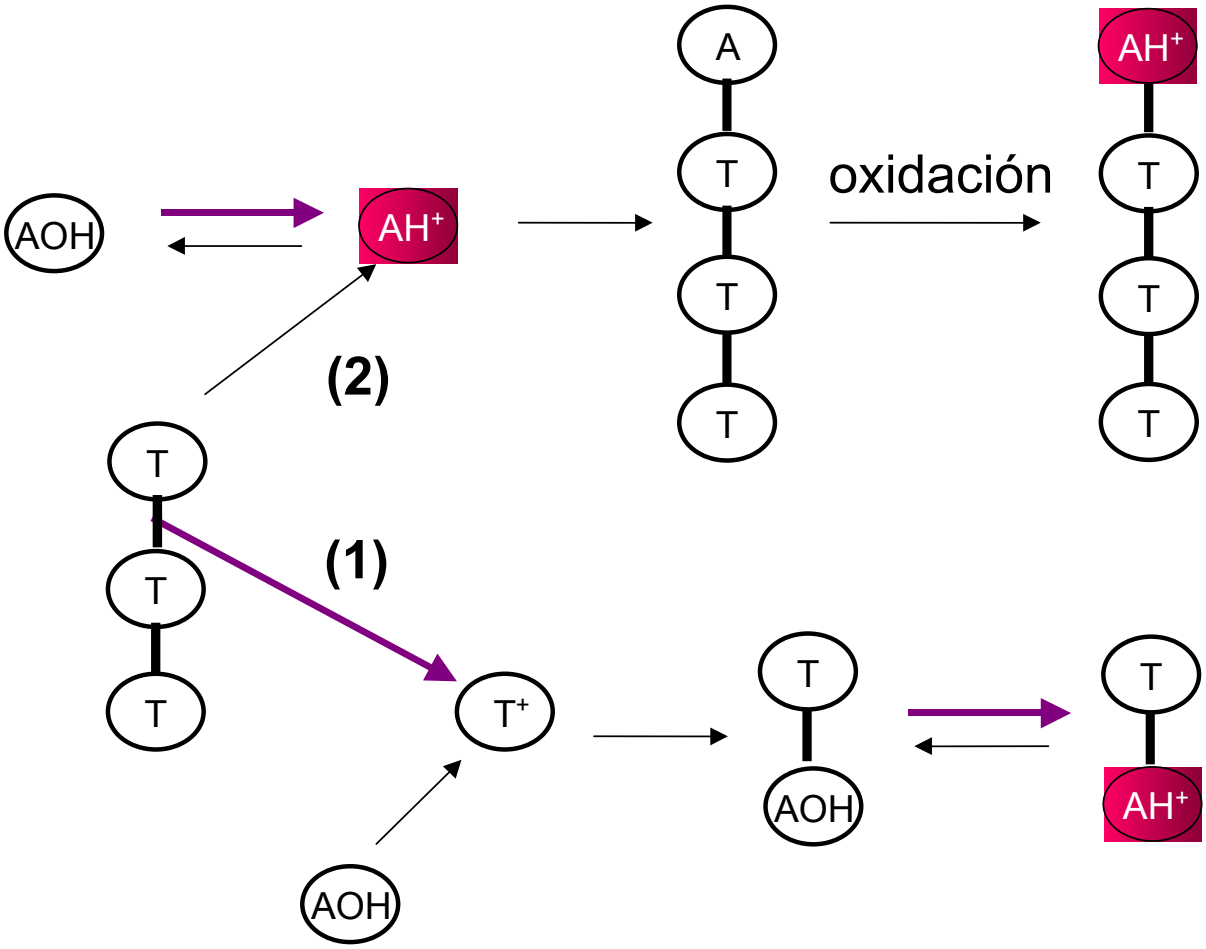
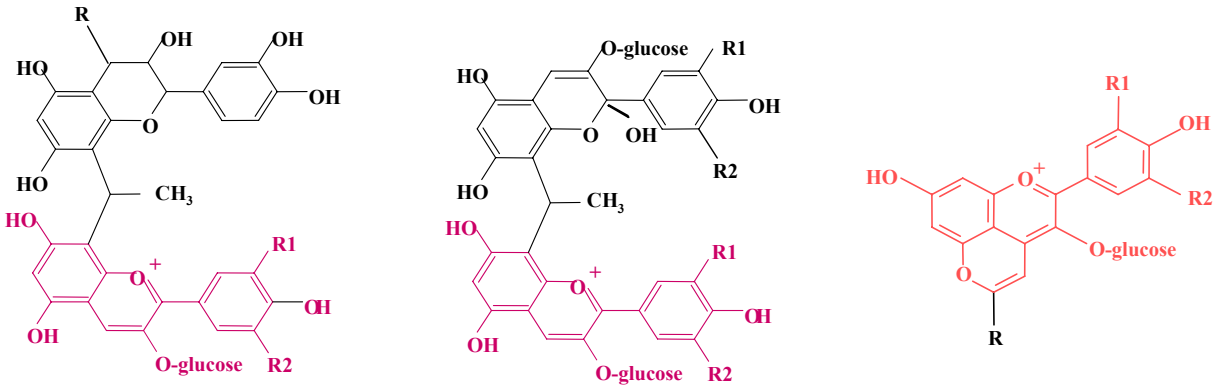


Figura 5. Mecanismo de reacción de taninos y antocianinas



T-ethyl-A (R= H, tannin)

A-ethyl-A

pyranoanthocyanin (R=H, tannin,…)

Figura 6. Estructura de los pigmentos formados por la reacción de acetaldehído con antocianinas.

Bibliografía

Atanasova., H. Fulcrand. Cheynier, and M. Moutounet, 2002, Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine making: *Analytica Chimica Acta*. **458**: 15-27.

Atanosova., H. Fulcrand, C. Le Guernevé, O. Dangles, and V. Cheynier, 2002, First evidence of acetaldehyde-induced anthocyanin polymerisation: *Polyphenol Communications 2002*: 417-418.

Berke, B., C. Chèze, J. Vercauteren, and G. Deffieux, 1998, Bisulfite addition to anthocyanins : revisited structures of colourless adducts: *Tetrahedron Letters*. **39**: 5771-5774.

Brouillard, R., and O. Dangles, 1993, Flavonoids and flower colour, *in* J. B. Harborne, ed., The flavonoids. Advances in research since 1986: London, Chapman and Hall: 565-588.

Brouillard, R., and B. Delaporte, 1977, Chemistry of Anthocyanin Pigments. 2. Kinetic and Thermodynamic Study of Proton Transfer, Hydration, and Tautomeric Reactions of Malvidin 3-Glucoside. *J. Amer. Chem. Soc*. **99**: 8461-8468.

Cheminat, A., and R. Brouillard, 1986, NMR investigation of 3-O(β-D-Glucosyl)malvidin structural transformations in aqueous solutions: *Tetrahedron letters*. **27**: 4457-4460.

Cheynier., H. Fulcrand, S. Guyot, J. Oszmianski, and M. Moutounet, 1995, Reactions of enzymically generated quinones in relation to browning in grape musts and wines, *in* C. Y. Lee, and J. R. Whitaker, eds., Enzymatic browning and its prevention in foods. *A. C. S. Symp. Series.* **600**: 130-143.

Cheynier., H. Fulcrand: Sarni, and M. Moutounet, 1997, Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de la vinification.: *Analusis*. **25**: M14-M21.

Francia-Aricha, E. M., M. T. Guerra, J. C. Rivas-Gonzalo, and C. Santos-Buelga, 1997, New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 2262-2266.

Fulcrand, H., C. Benabdeljalil, J. Rigaud. Cheynier, and M. Moutounet, 1998, A new class of wine pigments yielded by reactions between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*. **47**: 1401-1407.

Fulcrand, H., P. J. Cameira dos Santos, P. Sarni-Manchado, V. Cheynier, and J. Favre- Bonvin, 1996, Structure of new anthocyanin-derived wine pigments.: J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1. 7: 735-739.

Goto, T., and T. Kondo, 1991, Structure and molecular stacking of anthocyanins. Flower color variation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. **30**: 17-33.

Mazza, G., and E. Miniati, 1993, grapes, *in* G. Mazza, and E. Miniati, eds., Anthocyanins in fruits, vegetables and grains: Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, CRC Press.

Ribéreau-Gayon:, 1959, Recherches sur les anthocyanes des végétaux, Application au genre Vitis, Faculté des Sciences de Bordeaux, Bordeaux.

Roggero, J. P., J. L. Larice, C. Rocheville Divorne: Archier, and S. Coen, 1988, Composition anthocyanique des cépages. I : Essai de classification par analyse en composantes principales et par analyse factorielle discriminante: *Revue Française d'Oenologie*. **112**: 41-48.

Somers, T. C., 1971, The polymeric nature of wine pigments: *Phytochemistry*. **10**: 2175-2186.