

## Influence de SO<sub>2</sub> et de l'acide ascorbique sur l'activité antiradicalaire des tanins, mesurée sur l'anion superoxyde. Application aux vins rouges

par

N. VIVAS<sup>1)</sup>, N. SAINT-CRICQ DE GAULEJAC<sup>1)</sup> et Y. GLORIES<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> Tonnellerie Demptos, détaché à la Faculté d'œnologie, Université Victor Segalen Bordeaux II, Talence, France

<sup>2)</sup> Faculté d'œnologie, Université Victor Segalen Bordeaux II, Talence, France

**R é s u m é :** Pour des concentrations habituellement utilisées en œnologie, le SO<sub>2</sub> ne présente pas d'activité antiradicalaire à l'égard de l'anion superoxyde. L'acide ascorbique est un antiradicalaire dont les performances sont fonction de sa concentration. Les différents tanins testés présentent tous de très importantes activités antiradicalaires. Dans les vins rouges, ce sont donc pour l'essentiel les procyanidines qui captent les radicaux libres superoxydes.

### Influence of SO<sub>2</sub> and ascorbic acid on the scavenger effect of tannins, measured on superoxide anion. Application to red wines

**S u m m a r y :** At usual œnological concentrations SO<sub>2</sub> does not have a scavenger effect on superoxide anion. Ascorbic acid is an antiradical the effect of which varies with concentration. Different tannins, e.g. castalagin, pentagalloylglucose, procyanidins B2 and B4, (+)-catechin and gallic acid, are shown to have significant antiradical effects. In red wines in particular procyanidins have a scavenger effect on free superoxide radicals.

**K e y w o r d s :** SO<sub>2</sub>, ascorbic acid, scavenger effect, superoxide radical, procyanidins, gallotannins, ellagitannins, red wine.

#### Introduction

Les tanins se trouvent dans de nombreux produits alimentaires; en particulier dans les boissons tel que le vin. Ils sont habituellement classés en deux groupes (HASLAM 1981): Les tanins condensés ou proanthocyanidines constitués d'unité flavanol, libérant par hydrolyse acide une anthocyanidine (BATE-SMITH 1954) et les tanins hydrolysables qui libèrent dans les mêmes conditions soit de l'acide gallique (gallotannins) soit de l'acide ellagique (ellagitannins) (FRANIAU et MUSSCHE 1972; PENG *et al.* 1991; VIVAS *et al.* 1996 a). Dans les vins, les proanthocyanidines proviennent des parties solides du raisins; pour l'essentiel ce sont les procyanidines des pépins et des pellicules (PRIEUR *et al.* 1994; SOUQUET *et al.* 1996) et les prodelphinidines des pellicules (SOUQUET *et al.* 1996). Les gallotannins et les ellagitannins peuvent provenir des traitements par les tanins œnologiques (VIVAS *et al.* 1993 a et b) et les ellagitannins sont plus particulièrement cédés aux vins lors de l'élevage en barriques (MOUTOUNET *et al.* 1989; VIVAS *et al.* 1996 b).

Tout au long des opérations de travail et de traitement des vins rouges, l'oxygène passe en solution dans des proportions plus ou moins importantes (VIVAS et GLORIES 1996 a) d'où l'intérêt des travaux sur les réactions d'oxydo-réduction (ROSSI et SINGLETON 1966; PAMPURO et HALE 1988; SANDERS *et al.* 1988; VIVAS *et al.* 1993 c). Dans le vin l'oxygène génère une succession de radicaux libres oxygénés, parmi

lesquels le radical superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup> est le premier suivi du radical hydroxyle HO<sup>•</sup>, conduisant à terme à des hydroperoxydes variés d'après un schéma aujourd'hui classique. Les composés phénoliques, dont les tanins, ont la propriété de capter ces radicaux libres (UCHIDA *et al.* 1988; ARIGA et HAMANO 1990), interrompant ainsi la réaction d'oxydation; c'est ce que l'on nomme des activités antiradicalaires. Depuis quelques années les phénomènes d'oxydations radicalaires constituent dans différents domaines des axes de recherches importants. Les composés phénoliques sont particulièrement étudiés pour leur intérêt pharmaceutique et médical; ils ont la propriété de neutraliser les radicaux libres oxygénés à l'origine de l'altération des tissus. Ces radicaux favorisent le développement des cancers, de l'artériosclérose et du vieillissement des tissus (UCHIDA *et al.* 1987; MASQUELIER 1988). En œnologie, par contre, les phénomènes oxydatifs sont étudiés depuis bien plus longtemps (PASTEUR 1866; RIBÉREAU-GAYON 1933). Mais la complexité des réactions et de la composition des vins rend difficile l'avancement des connaissances.

Pour se prémunir des effets négatifs de l'oxydation, on a coutume d'employer des antioxydants. Généralement le SO<sub>2</sub> et l'acide ascorbique constituent les deux principales sources d'antioxydants des vins (RIBÉREAU-GAYON *et al.* 1976). Cependant le rôle antioxydant de SO<sub>2</sub> a été remis en cause (RIBÉREAU-GAYON 1933; SOMERS et WESCOMBE 1982; VIVAS *et al.* 1993 c). En effet, VIVAS et GLORIES (1996 b),

ont observé que dans les conditions du vin, le  $\text{SO}_2$  ne modifiait ni la vitesse de consommation de l'oxygène dissous ni l'état d'oxydoréduction du milieu. Afin de compléter ces premiers résultats nous voulions vérifier que le  $\text{SO}_2$  n'agissait pas plus en aval dans les réactions oxydatives, au niveau des radicaux libres. Pour comprendre les mécanismes mis en oeuvre une étude générale est conduite sur divers tanins en comparant les résultats obtenus avec ceux enregistrés pour l'acide ascorbique, antioxydant dont les effets ont été reconnus (VIVAS *et al.* 1993 c).

### Materiel et méthodes

**Composés phénoliques modèles:** La (+)-catéchine et l'acide gallique sont fournis par Fluka<sup>TM</sup>, le  $\beta$ -1,2,3,4,6-pentagalloyl D-glucose a été purifié à partir d'extrait de galle à l'éther diéthylique (acide tannique, Prolabo<sup>TM</sup>) dans les conditions décrites par SCALBERT et HASLAM (1987), la castalagine a été purifiée du bois de coeur *Quercus robur* d'après VIVAS *et al.* (1995) et les procyanidines dimères B2 et B4 ont été hémisynthétisées et purifiées par chromatographie basse pression (FREITAS 1995). La structure des produits et leur pureté ont été confirmées par  $^1\text{H}$  RMN (DPX 400 Bruker) et comparées avec les spectres de références.

**Origine des vins rouges:** Les vins rouges ont tous été analysés l'année de leur production ( $n=60$ ), ils proviennent de Bordeaux (Médoc, Cabernet Sauvignon; Saint Emilion, Merlot noir, Entre-deux-mers, Merlot noir et Cabernet Sauvignon), de Madiran (Tannat), de Bourgogne (Pinot noir), de la Loire (Cabernet franc), de la Rioja (Tempranillo), de la Grèce (Xynomavro), de la Californie (Pinot noir, Merlot noir, Cabernet Sauvignon, Syrah), d'Australie (Syrah, Cabernet Sauvignon) et d'Afrique du Sud (Pinot noir, Merlot noir).

**Dosage des composés phénoliques des vins:** Les composés phénoliques totaux sont estimés par l'absorption à D.O. 280 nm d'une dilution de vin au 1/100; les procyanidines sont dosés par la méthode d'hydrolyse en milieu chlorhydrique et les anthocyanes totales par décoloration au  $\text{NaHSO}_3$ . Les détails opératoires de ces diverses techniques analytiques sont décrites par RIBÉREAU-GAYON *et al.* (1976).

**Estimation de l'effet antiradicalaire des composés phénoliques et des vins rouges sur l'anion superoxyde:** Nous avons retenu le radical superoxyde car il est à l'origine de toutes les autres formes activées de l'oxygène, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyl. La démarche suivie est la suivante: Nous générons par un système enzymatique spécifique des radicaux superoxydes (système hypoxanthine-xanthine oxydase). Les radicaux formés réduisent en milieu tamponné (pH 7,4) le nitrobleu de tétrazolium en bleu de formazan ayant un maximum d'absorption à 560 nm. Si on rajoute un piègeur de radicaux libres tel que des composés phénoliques, la formation de bleu de formazan sera limitée. L'absorbance à 560 nm est alors d'autant plus faible que les composés phénoliques ajoutés

sont des piègeurs efficaces de radicaux superoxydes. Cette méthode a déjà été employée avec succès (VERETTE 1984; LAPARRA 1989; RICARDO DA SILVA *et al.* 1991). Pour la réaliser il faut préparer quatre solutions de bases:

- T: Tampon tris HCl 0,05 M pH=7,4 (Trizma pre-set pH cristal, Sigma<sup>TM</sup>);
- N: Nitrobleu de tétrazolium  $10^{-3}$  M (NBT grade III, Sigma<sup>TM</sup>) préparé dans T;
- H: Hypoxanthine  $0,5 \cdot 10^{-2}$  M (Sigma<sup>TM</sup>) préparé dans T;
- X.O.: Xanthine oxydase  $1,67 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  (Sigma<sup>TM</sup>) préparé dans T.

Tableau 1

Détail opératoire de l'estimation du pouvoir antiradicalaire des composés phénoliques et des vins rouges à l'égard de l'anion superoxyde

Experimental conditions for estimating the superoxide scavenger effect of phenolic compounds and red wines

Cuve <sup>1)</sup>	Tampon tris HCl ( $\mu\text{l}$ )	Nitrobleu de tétrazolium ( $\mu\text{l}$ )	Hypoxanthine ( $\mu\text{l}$ )	Xanthine oxydase ( $\mu\text{l}$ )	Echantillon ( $\mu\text{l}$ )
0	2400	100	500	0	0
1	2300	100	500	100	0
2	2200	100	500	100	100

<sup>1)</sup> cuve de mesure de 10 mm de parcours optique

Les mesures sont réalisées au spectrophotomètre DU 65 (Beckman<sup>TM</sup>) et répétées trois fois. Le détail opératoire est décrit dans le Tab. 1. Sur chaque cuve (0, 1, 2) on enregistre la D.O. 560 nm pendant 5 min puis on calcule la pente. La cuve 0 donne la pente 0 (P0), la cuve 1 donne la valeur maximale de formation de radicaux superoxydes, soit le 100 % (P1) et la cuve 2 permet d'évaluer l'effet inhibiteur d'un produit (P2). Le pourcentage d'activité résiduelle (ARs%) est donné par la relation:  $[(P1-P0)-P2/(P1-P0)] \times 100$ .

**Analyses statistiques:** Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel STATGRAPHIC<sup>TM</sup> version 4.0 sur système Apple<sup>TM</sup>.

### Résultats

**Activité antiradicalaire de  $\text{SO}_2$  et de l'acide ascorbique:** Plusieurs solutions aqueuses de concentrations croissantes en  $\text{SO}_2$  et acide ascorbique ont été préparées. Puis, la formation d'anions superoxydes a été suivie à 560 nm; traduisant la réduction du nitrobleu de tétrazolium (jaune) en bleu de formazan par les radicaux libres générés par le système hypoxanthine/xanthine oxydase. Les résultats sont rassemblés sur la Fig. 1. Dans nos conditions, le  $\text{SO}_2$  ne présente pas d'effet antiradicalaire pour des concentrations variant de  $0,46$  à  $1,87 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ; alors que l'acide ascorbique présente un effet antiradicalaire sensible dès  $0,125 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  et un maximum à partir de  $0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ . Pour obtenir un effet antiradicalaire il faut des

doses de SO<sub>2</sub> très supérieures aux teneurs habituellement utilisées en œnologie (ARs= 62 % pour une teneur en SO<sub>2</sub> de 3,75 g · l<sup>-1</sup>). Si les expériences sont renouvelées avec des solutions d'antioxydant préparées dans des milieux de compositions proches du vin, les résultats restent identiques (Tab. 2). Il semble donc que les propriétés antiradicalaires des produits ne dépendent pas de la présence d'éthanol ou de métaux de transition.

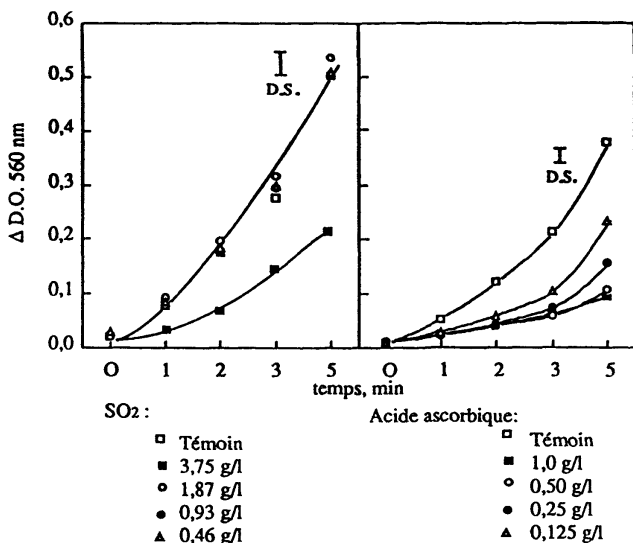


Fig. 1: Influence de la concentration en SO<sub>2</sub> (gauche) et en acide ascorbique (droit) sur la production d'anions superoxydes, estimée par spectrophotométrie à 560 nm (D.S. déviation standard).

Influence of SO<sub>2</sub> (left) and ascorbic acid (right) concentrations on the formation of superoxide anions, measured by spectrophotometry (560 nm), (D.S. standard deviation).

Tableau 2

Influence de la composition du milieu sur l'activité antiradicalaire de SO<sub>2</sub> et de l'acide ascorbique (les résultats représentent le pourcentage d'anions superoxydes résiduels, ARs %)

Influence of the composition of the medium on the scavenger activity of SO<sub>2</sub> and ascorbic acid (results represent the % of residual superoxide anions)

	Milieu aqueux	Milieu hydroalcoolique à 10 % vol.	Milieu modèle <sup>1)</sup>	Milieu modèle avec catalyseurs <sup>2)</sup>
SO <sub>2</sub> <sup>3)</sup>	97±3	100	98±2	100
Acide ascorbique <sup>3)</sup>	58±4	59±6	58±7	60±4

<sup>1)</sup> 12 % Vol. EtOH; 5 g/l d'acide tartrique; NaOH qsp pH 3,5; eau qsp 1000 ml

<sup>2)</sup> Milieu modèle + 1 mg/l Cu et 5 mg/l Fe

<sup>3)</sup> 150 mg/l

Activité antiradicalaire de l'acide gallique de la (+)-catéchine et de différents tanins: Sur la Fig. 2 nous avons reporté les valeurs de ARs pour une concentration de

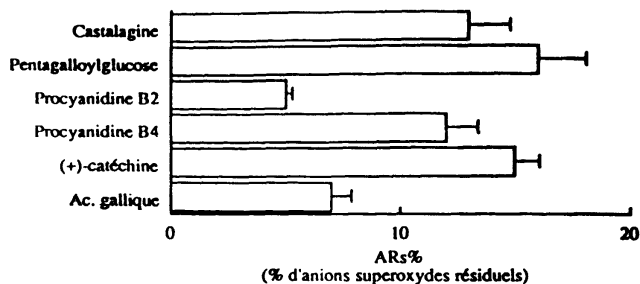


Fig. 2: Activité antiradicalaire (ARs) de quelques composés phénoliques (les ARs% sont donnés pour une concentration en composés de 1 g·l<sup>-1</sup>).

Scavenger activity of different phenolic compounds (ARs% values were obtained at a concentration of the components of 1 g·l<sup>-1</sup>).

1 g · l<sup>-1</sup> choisie parcequ'elle correspond pour les molécules étudiées à leur maximum d'activité. Les différents composés phénoliques testés sont des capteurs très performants des radicaux superoxydes. La procyanidine dimère B2 semble plus efficace que les autres composés étudiés. Les tanins hydrolysables étudiés ont des activités comparables. Pour des teneurs beaucoup plus faibles, 100 mg · l<sup>-1</sup> par exemple, les ARs sont inférieurs à 50 %. Ceci montre que même pour des doses relativement faibles les activités antiradicalaires des composés phénoliques et des tanins sélectionnés restent appréciables ce qui permet de suggérer leur rôle prépondérant dans les vins, à l'égard de cette propriété.

Influence de SO<sub>2</sub> et de l'acide ascorbique sur l'activité antiradicalaire des tanins (Tab. 3): Dans nos conditions, SO<sub>2</sub> pour une faible dose sans effet antiradicalaire (0,375 g · l<sup>-1</sup>) ou une forte dose avec un faible effet antiradicalaire (3,75 g · l<sup>-1</sup>), provoque en fonction de la nature des tanins des comportements différents. SO<sub>2</sub> quelle que soit sa concentration inhibe l'activité antiradicalaire des procyanidines; les valeurs de ARs augmentent en moyenne de 15 et 6 %, respectivement pour la procyanidine B4 et B2. Cette dernière semble moins affectée par l'inhibition exercée par SO<sub>2</sub>. Pour le pentagalloylglucose et la castalagine, l'inhibition ne s'exerce que pour une teneur en SO<sub>2</sub> de 3,75 g · l<sup>-1</sup>. Pour une concentration 10 fois plus faible ces deux tanins hydrolysables conservent leur activité antiradicalaire. L'acide ascorbique à la dose moyenne de 0,25 g · l<sup>-1</sup> agit en synergie avec les procyanidines B2 et B4 en permettant une diminution de 50 % de l'activité antiradicalaire des solutions de procyanidines. En revanche, pour la même dose d'acide ascorbique, l'activité antiradicalaire des tanins hydrolysable est peu modifiée; on peut cependant noter une légère augmentation des valeurs de ARs.

Influence de SO<sub>2</sub> et de l'acide ascorbique sur l'activité antiradicalaire des vins rouges: Les vins rouges ont une activité antiradicalaire (ARs) fonction de leur teneur en composés phénoliques estimée par l'absorbance à 280 nm (Fig. 3). Les valeurs de ARs varie de 52 % pour les vins légers à

**Tableau 3**  
**Incidence de SO<sub>2</sub> et de l'acide ascorbique sur l'activité antiradicalaire (ARs) des tanins**  
**Influence of SO<sub>2</sub> and ascorbic acid on the scavenger activity (ARs) of tannins**

	Concentration (g.l <sup>-1</sup> )	ARs (%)		Concentration (g.l <sup>-1</sup> )	ARs (%)
SO <sub>2</sub>	3,75	62±5	Acide ascorbique	0,25	18±2
	0,375	92±7			
Procyanidine B4	0,05	48±3	Procyanidine B4	0,05	46±3
	Avec SO <sub>2</sub>	3,75			
Procyanidine B2	0,05	42±3	Procyanidine B2	0,05	42±4
	Avec SO <sub>2</sub>	3,75			
Pentagalloylglucose	0,6	15±2	Pentagalloylglucose	0,6	13±1
	Avec SO <sub>2</sub>	3,75			
Castalagine	0,6	18±2	Castalagine	0,6	13±1
	Avec SO <sub>2</sub>	3,75			
	0,375	19±2	Avec ac. ascorbique	0,25	26±2
			Avec ac. ascorbique	0,25	24±3
			Avec ac. ascorbique	0,25	16±2
			Avec ac. ascorbique	0,25	19±2

Tableau 4

Activité antiradicalaire (ARs) de quelques vins rouges jeunes exempts d'antioxydants exogènes. (Vins analysés après la fin de la fermentation malolactique)

Scavenger activity (ARs) of young red wines without any exogenous antioxidant. (Wines analysed after malolactic fermentation)

Echantillons	ARs %		
	Témoin	Acide ascorbique <sup>1)</sup>	SO <sub>2</sub> <sup>2)</sup>
1	27±2	30±2	31±3
2	38±3	39±5	38±3
3	46±5	48±5	47±4
4	34±3	36±3	35±3

<sup>1)</sup> Echantillon + 500 mg/l d'acide ascorbique

<sup>2)</sup> Echantillon + 150 mg/l de SO<sub>2</sub>

### Discussion

Le SO<sub>2</sub> ne possède pas d'activité antiradicalaire sur l'anion superoxyde, pour des concentrations couramment utilisées en œnologie. A 3,75 g · l<sup>-1</sup>, dose très élevée, il ne permet d'éliminer que le tiers des radicaux superoxydes formés. Dans la pratique, son effet sur les radicaux libres de ce type est donc peu probable. Lorsque SO<sub>2</sub> est ajouté en grande quantité (3,75 g · l<sup>-1</sup>) à des solutions aqueuses de tanins la quantité d'anions superoxydes résiduels augmente par rapport au milieu témoin n'en contenant pas. Il semble alors que SO<sub>2</sub> puisse avoir un effet prooxydant à forte dose; ce qui n'avait encore jamais été signalé à notre connaissance. Ajouté aux différents vins rouges des concentrations de SO<sub>2</sub> croissantes de 0 à 1 g · l<sup>-1</sup> ne modifie pas significativement leur pouvoir antiradicalaire.

L'acide ascorbique présente, même à faible dose, une activité antiradicalaire appréciable, qui augmente en

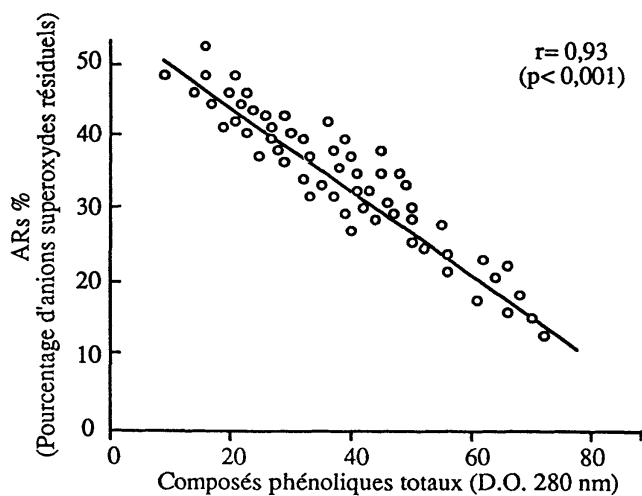


Fig. 3: Relation entre les composés phénoliques totaux et l'activité antiradicalaire des vins rouges (n=60).

Relation between total phenolic compounds and the scavenger effect of red wines (n=60).

13 % pour les plus riches. Pour de telles activités antiradicalaires des doses raisonnables d'antioxydants ne modifient pas sensiblement la quantité d'anions superoxyde résiduels (Tab. 4). Il s'avère, que même des quantités croissantes d'antioxydants ne suffisent pas à augmenter l'activité antiradicalaire des vins. Les résultats obtenus pour SO<sub>2</sub> et l'acide ascorbique sont comparables. Il est cependant intéressant de noter qu'à faible dose (50 mg · l<sup>-1</sup>) l'acide ascorbique permet une diminution significative, de 10 %, de la quantité d'anions superoxydes résiduels par rapport à un vin témoin mais aussi par rapport à des teneurs supérieures à 150 mg · l<sup>-1</sup>. Ces résultats suggèrent que les vins rouges possèdent suffisamment de composés antiradicalaires pour se protéger des réactions d'autoxydations.

fonction de sa concentration. Ajouté aux solutions de différents tanins, il se comporte de façon prévisible, pour une dose moyenne de  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ , en améliorant le pouvoir antiradicalaire du mélange. Dans les différentes expériences réalisées, il semble que chaque composé phénolique possède une concentration maximale au delà de laquelle, la valeur *Ars* reste stable. Lorsque cette concentration limite est atteinte le rajout d'un antioxydant efficace comme l'acide ascorbique ne provoque plus de diminution de cet indice, qui peut dans certains cas augmenter, traduisant alors une diminution du pouvoir antiradicalaire du mélange. Ces observations doivent être rapprochées de la notion de dualité entre effet prooxydant et antioxydant de cette molécule (MAHONEY et GRAF 1986; KANNER et SHAPIRA 1989). Dans un vin rouge nous avons observé qu'à faible dose ( $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) l'acide ascorbique peut être antioxydant, alors que pour des doses plus fortes ( $> 500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ) il présente toujours un effet prooxydant mesurable. En cela nous confirmons les travaux des auteurs précédemment cités.

Les tanins étudiés appartenant aux groupes des tanins condensés et des tanins hydrolysables s'avèrent être des antiradicaux libres très performants; leur efficacité permet de limiter à 50 % la production d'anions superoxydes pour des concentrations comprises entre 50 et  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (résultats non présentés). Parmi les procyanidines dimères, nous avons mesuré la capacité antiradicalaire de la B2 et la B4 qui se sont révélées très différentes. La procyanidine B2 possède dans nos conditions une activité antiradicalaire supérieure à la procyanidine B4. Elles sont constituées par une liaison interflavanique de type C4-C8, mais la nature des flavanols change: B2 est une épicatechine-(4 $\beta$ ->8)-épicatechine et B4 une catéchine-(4 $\alpha$ ->8)-épicatechine. Ces différences entraînent des changements conformationnels à l'origine de modifications des propriétés physicochimiques (FREITAS *et al.* 1996). Une étude ultérieure sur l'influence des conformations des procyanidines sur leur pouvoir antiradicalaire peut être utile pour interpréter les différences de ARs. Dans les vins rouges, les procyanidines dimères peuvent atteindre des doses de 300 à  $700 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  et les flavanols (catéchine et épicatechine) de 50 à  $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (FREITAS 1995). Dans ces conditions et sans prendre en compte les formes polymérisées des procyanidines, les anthocyanes, les flavonols et les acides phénols, les vins possèdent suffisamment d'antioxydants naturels. Enfin l'élevage en barrique ou l'apport de tanins œnologiques, constituent une source appréciable de tanins hydrolysables, substances à pouvoir antiradicalaire élevé. Les deux tanins hydrolysables étudiés captent 75 % des radicaux superoxydes produits pour des doses de 100 à  $250 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  (résultats non présentés) et 90 % pour des doses de  $500 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Cependant, au cours du processus oxydatif, de nombreux types de radicaux libres sont formés, or notre étude ne s'est attachée qu'à un seul d'entre-eux l'anion superoxyde. Des travaux en cours, ce propose d'analyser l'effet antiradicalaire de nombreuses molécules à l'égard des radicaux libres totaux, en utilisant une méthode originale.

## Références

- ARIGA, T.; HAMANO, M.; 1990: Radical scavenging action and its mode in procyanidins B1 and B3 from Azuki beans to peroxy radicals. *Agric. Biol. Chem.* **54**, 2499-2504.
- BATE-SMITH, E.C.; 1954: Leucoanthocyanidins. I. Detection and identification of anthocyanidin formed from leucoanthocyanidins in plant tissues. *Biochem. J.* **58**, 122-125.
- FRANAU, R.; MUSSCHE, R.; 1972: Quantitative determination of gallic acid in tannic acid by thin layer chromatography. *J. Inst. Brew.* **78**, 450-456.
- FREITAS DE, V. A.; 1995: Recherches sur les tanins condensés: Application à l'étude des structures et propriétés des procyanidines du raisin et du vin. Thèse Université de Bordeaux II.
- FREITAS, V.; GLORIES, Y.; LAGUERRE, M.; VERCAUTEREN, J.; 1996: Analyse conformationnelle et propriétés physicochimiques des procyanidines dimères. In: VERCAUTEREN, J.; CHÉZE, C.; DUMON, M. C.; WEBER, J. F. (Eds.). *Polyphenols Communications 96. Groupe polyphénols, Bordeaux*, 75-76.
- HASLAM, E.; 1981: Vegetable tannins. In: CONN, E. E. (Ed.): *The Biochemistry of Plants*. Academic Press, New York.
- KANNER, J.; SHAPIRA, N.; 1989: Oxygen- and metal-ion-dependent nonenzymatic browning of grape juice. *ACS Symposium series 405. Quality Factors of Fruits and Vegetables*, 55-64.
- LAPARRA, J.; 1990: Les procyanidines du vin. Action inhibitrice sur les radicaux libres oxygénés. In: RIBÉREAU-GAYON, P.; LONVAUD-FUNEL, A. (Eds.): *Actualité Œnologique 89*. Dunod, Paris 392-397.
- MAHONEY, J. R.; GRAF, E.; 1986: Role of  $\alpha$ -tocopherol-ascorbic acid, citric acid and EDTA as oxidants in model systems. *J. Food Sci.* **51**, 1293-1296.
- MASQUELIER, J.; 1988: Effets physiologiques du vin. Sa part dans l'alcoolisme. *Bull. OIV* **61** (689-690), 554-578.
- MOUTOUNET, M.; RABIER, P.; PUECH, J. L.; VERETTE, E.; BARILLERE, J. M.; 1989: Analysis by HPLC of extractable substances in oak wood. Application to a Chardonnay wine. *Sci. Aliments* **9**, 35-51.
- PAMPURO, P.; HALE, J. M.; 1988: Misura di ossigeno disciolto nelle bevande. *Ind. delle Bevande* **17**, 150-153.
- PASTEUR, L.; 1866: Etudes sur le vin. Ses maladies et les causes qui les provoquent - Procédés nouveaux pour le conserver et pour le vieillir. 1. édition. Librairie Savy, F., Paris.
- PENG, S.; SCALBERT, A.; MONTIES, B.; 1991: Insoluble ellagitannins in *Castanea sativa* and *Quercus petraea* woods. *Phytochemistry* **30**, 374-378.
- PRIEUR, C.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M.; 1994: Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **36**, 781-784.
- RIBÉREAU-GAYON, J.; 1933: Contribution à l'étude des oxydations et des réductions dans les vins. Application à l'étude du vieillissement et des casses. Delmas (ed.), Bordeaux.
- ; PEYNAUD, E.; RIBÉREAU-GAYON, P.; SUDRAUD, P.; 1976: *Traité d'Œnologie*. Tome I, III. Dunod, Paris.
- RICARDO DA SILVA, J. M.; DARMON, N.; FERNANDEZ, Y.; MITTAVILA, S.; 1991: Oxygen free radical scavenger capacity in aqueous models of different procyanidins from grape seeds. *J. Agricult. Food Chem.* **39**, 1549-1552.
- ROSSI, A. J.; SINGLETON, V. L.; 1966: Contributions of grape phenols to oxygen adsorption and browning of wines. *Amer. J. Enol. Viticult.* **17**, 231-239.
- SANDLERS, G. D.; ROBERTS, J.; CORNELLE, J.; 1988: Determination of oxygen solubility in liquid foods using a dissolved oxygen electrode. *J. Food Sci.* **53**, 1493-1496.
- SCALBERT, A.; HASLAM, E.; 1987: Polyphenols and chemical defence of the leaves of *Q. robur*. *Phytochemistry* **26**, 3191-3195.
- SOMERS, T.C.; WESCOMBE, L.G.; 1982: Red wine quality: The critical role of SO<sub>2</sub> during vinification and conservation. *Australian Grapegrower Winemaker* (220), 1-8.
- SOUQUET, J. M.; CHEYNIER, V.; BROSSAUD, F.; MOUTOUNET, M.; 1996: Polymeric proanthocyanidins from grapes skins. *Phytochemistry* **43**, 509-512.
- UCHIDA, D.; EDAMATSU, R.; HIRAMATSU, M.; MORI, A.; NONAKA, A.; NISHIOKA, I.; NIWA, M.; OZAKI, M.; 1987: Condensed tannins scavenge active oxygen free radicals. *Med. Sci. Res.* **15**, 831-832.
- VERETTE, E.; 1984: Fractionnement des composés polyphénoliques de la myrtille, *Vaccinium myrtillus*. Etude de leur activité antiradicalaire,

- détermination des anthocyanes monomères. Thèse Université de Montpellier I.
- VIVAS, N.; BOURGEOIS, G.; VITRY, C.; GLORIES, Y.; FREITAS, V.; 1996 b: Determination of the composition of commercial tannin extracts by liquid secondary ions mass spectrometry (LSIMS). *J. Sci. Food Agricult.* **72**, 309-317.
- -; CHAUVET, S.; GLORIES, Y.; SUDRAUD, P.; 1993 a: Caractérisation et définition des préparations commerciales de tanins oenologiques. *Ind. Agricult. Aliment.* **110**, 705-713.
- -; - -; SUDRAUD, P.; GLORIES, Y.; 1993 b: Techniques de contrôle et d'évaluation de la qualité des tanins oenologiques, *Ann. Fals. Exp. Chim.* **919**, 215-222.
- -; GLORIES, Y.; 1996 a: Modélisation et estimation du bilan des apports d'oxygène au cours de l'élevage des vins rouges. I. Les apports technologiques et liés au mode d'élevage. *Progr. Agric. Vitic.* **113**, 222-227.
- -; - -; 1996 b: Effet antioxydant de l'anhydride sulfureux dans les vins rouges. *Riv. Viticolt. Enol.* **49** (3) 51-56.
- -; - -; BOURGEOIS, G.; VITRY, C.; 1996 a: Les ellagitanins de bois de coeur de différentes espèces de chênes (*Quercus* sp.) et de châtaignier (*Castanea sativa* Mill.). Dosage dans les vins rouges élevés en barriques. *J. Sci. Tech. Tonnellerie* **2**, 24-49.
- -; LAGUERRE, M.; GLORIES, Y.; BOURGEOIS, G.; VITRY, C.; 1995: Structure simulation of two ellagitannins from *Quercus robur* L. *Phytochemistry* **39**, 1193-1199.
- -; ZAMORA, F.; GLORIES, Y.; 1993 c: Incidence de certains facteurs sur la consommation de l'oxygène et sur le potentiel d'oxydoréduction dans les vins. *J. Intern. Sci. Vigne Vin* **27**, 23-34.

Received January 13, 1997