

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE POLIFENOLES
ENOLÓGICOS CON LA FRACCIÓN PROTEICA DE LA
SALIVA TOTAL HUMANA***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica Ambiental y Memoria para optar al Título de Bioquímico, por:

Francisca Paz Noya Leal

Director de Tesis: Dr. Remigio López Solís

Co- Director de Tesis: Dr. Álvaro Peña Neira

Profesor Patrocinante: Dr. Dante Miranda Wilson

Santiago - CHILE

Enero 2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

Francisca Paz Noya Leal

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental; y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día _____.

Director de Tesis:

Dr. Remigio López Solís

Co-Director de Tesis:

Dr. Álvaro Peña Neira

Profesor Patrocinante:

Dr. Dante Miranda Wilson

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Marcelo Kogan Bocian

Dra. Inés Urquiaga Reus

Dr. Hernán Speisky Cosoy

Esta Tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT-Chile nº 1110832 y dio origen a las siguientes comunicaciones:

Presentaciones en congresos científicos

- Noya, F., Obreque-Slér, E., Peña-Neira, A., López-Solís, R. Cuantificación de interacciones de saliva humana con componentes de matriz vínica mediante ensayos de difusión y precipitación de la fracción proteica salival. XV Congreso Ciencia Joven-ICBM, Septiembre del 2012
- Noya, F., Obreque-Slér, E., Peña-Neira, A., López-Solís, R. Organización supramolecular de la saliva interactúa con polifenoles enológicos. LV Reunión Anual Sociedad de Biología de Chile, Noviembre del 2012

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Glosario de Abreviaturas y Conceptos.....	iii
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Tablas.....	v
Resumen.....	vi
Summary.....	vii
<hr/>	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Astringencia.....	1
1.2. Vino tinto: bebida astringente rica en polifenoles.....	4
1.3. Saliva humana: primera interface con los polifenoles del vino.....	11
1.4. Interacción de polifenoles del vino con proteínas de la saliva.....	15
1.5. Medición de la astringencia.....	19
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	22
2.1. Hipótesis.....	22
2.2. Objetivo General.....	22
2.3. Objetivos Específicos.....	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
3.1. Materiales.....	23
3.1.1. Reactivos.....	23
3.1.1.1. Vinos.....	23
3.1.1.2. Polifenoles.....	23
3.1.1.3. Saliva humana.....	23
3.1.2. Soluciones.....	26
3.1.3. Equipos.....	26
3.2. Métodos.....	27
3.2.1. Ensayo de Difusión.....	27
3.2.2. Ensayo de Precipitación.....	28
3.2.3. Morfometría de imagen digital.....	30
3.2.4. Protocolo de colección de saliva total humana.....	30
3.2.5. Alteración de saliva total humana.....	30
3.2.6. Cuantificación de proteínas: Método de Bradford.....	31
3.2.7. Microdesecados.....	31

4. RESULTADOS.....	33
4.1. Implementación de un protocolo para el análisis cuantitativo de interacciones polifenoles-proteínas basado en un ensayo de difusión de proteínas sobre membrana de celulosa.....	33
4.1.1. Difusión de suspensiones proteicas, polifenoles enológicos y vinos sobre membranas de celulosa.....	33
4.1.2. Interacción proteína-polifenoles: empleo de membranas de celulosa	45
4.2. Evaluación de la interacción entre la fracción proteica de la saliva humana y polifenoles de interés enológico empleando un ensayo de difusión de proteínas sobre membrana de celulosa.....	58
4.2.1. Interacción saliva-polifenoles: evaluación en membranas de celulosa	58
4.2.2. Estudio complementario de microdesecados de saliva.....	65
4.3. Evaluación de la interacción entre la fracción proteica de la saliva humana y vinos de distinta composición polifenólica empleando un ensayo de difusión sobre membrana de celulosa.....	67
4.3.1. Interacción entre saliva y vinos con distinto contenido polifenólico: evaluación en membranas de celulosa.....	67
5. DISCUSIÓN.....	73
5.1. Modo de difusión de suspensiones proteicas en membrana de celulosa.....	73
5.2. Método de evaluación de interacciones polifenoles -proteínas sobre membranas de celulosa.....	74
5.3. Interacción de vino con proteína modelo.....	77
5.4. Interacción de matrices vínicas con saliva humana <i>in vitro</i>	80
6. CONCLUSIONES.....	83
7. BIBLIOGRAFÍA.....	84
8. MATERIAL COMPLEMENTARIO.....	88

GLOSARIO DE ABREVIATURAS Y CONCEPTOS

<i>Background</i>	Fondo de la membrana de celulosa. Corresponde al área no cargada con proteínas, que presenta leve tinción residual.
BSA	Sigla que proviene del inglés <i>Bovine Serum Albumine</i> , para referirse a la proteína comercial Albúmina de suero bovina empleada como estándar de proteínas.
CB	Coomassie Blue R-250. Tinción para proteínas al 0,25% p/v.
Densitometría	Grafica la intensidad de tinción (<i>Grey Value</i>) versus la posición en centímetros respecto a un origen.
Difusibilidad	Características de la difusión de una solución proteica en membrana de celulosa.
Fracción proteica	Es el contenido de naturaleza proteica (y glicoproteica) de la saliva humana que se tiñe con el colorante Coomassie Blue.
Frente de difusión	Corresponde al borde del <i>spot</i> , generalmente marcado con grafito.
Polifenoles enológicos	Se refiere a los polifenoles presentes en el vino tinto que confieren importantes características organolépticas y, por lo tanto, son de especial interés en Enología y Vitivinicultura
Precipitabilidad	Capacidad de una solución proteica para precipitar en presencia de un agente precipitante.
PRPs	Proteínas ricas en prolina, de la sigla en inglés <i>Proline-rich proteins</i> .
<i>spot</i>	Zona circular o mancha correspondiente a la difusión de una alícuota en la membrana de celulosa.
STH	Saliva total humana. Saliva colectada desde la boca y sometida a una centrifugación leve para excluir células descamadas y material sólido residual.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Clasificación de los compuestos fenólicos.....	6
Figura 2.	Estructura de un ácido benzoico y de un tanino hidrolizable constituido de él.....	7
Figura 3.	Estructura de subunidades de taninos condensados (monómeros flavan-3-ol)....	7
Figura 4.	Dímeros y trímeros de procianidinas comúnmente encontrados en las bayas de uva.....	8
Figura 5.	Estructura química de dos antocianidinas características del vino tinto.....	8
Figura 6.	Glándulas secretoras de componentes salivales.....	12
Figura 7.	Precipitación proteína-polifenol en tres etapas.....	16
Figura 8.	Protocolo de ensayos de difusión y de precipitación en membrana de celulosa...	29
Figura 9.	Difusión de diluciones de BSA en agua sobre membrana de celulosa.....	34
Figura 10.	Densitograma de difusión de diluciones de BSA sobre membrana de celulosa.....	34
Figura 11.	Efecto de la dilución sobre el área de difusión de BSA en membrana de celulosa	36
Figura 12.	Densitograma del spot de saliva total humana en difusión sobre membrana de celulosa.....	38
Figura 13.	Difusión de diluciones de saliva total humana sobre membrana de celulosa.....	38
Figura 14.	Densitograma de difusión de saliva total humana sobre membrana de celulosa..	39
Figura 15.	Efecto de la dilución en agua sobre el área de difusión de STH en membrana de celulosa.....	39
Figura 16.	Difusión de diluciones de saliva alterada en agua sobre membrana de celulosa...	42
Figura 17.	Caracterización de la difusión de vinos sobre membrana de celulosa.....	44
Figura 18.	Caracterización de la difusión de polifenoles sobre membrana de celulosa.....	44
Figura 19.	Ensayos de difusión y de precipitación de BSA en presencia de ácido tánico.....	46
Figura 20.	Ensayo de difusión y de precipitación de BSA en presencia de vino tinto: rango explorativo.....	48
Figura 21.	Alteración de la difusión de BSA por efecto de vino tinto.....	50
Figura 22.	Ensayo de difusión y precipitación de BSA por efecto del vino tinto.....	51
Figura 23.	Controles del efecto del vino tinto sobre la difusión y precipitación de BSA.....	52
Figura 24.	Identificación del punto de equivalencia BSA-vino tinto mediante superposición de imágenes.....	54
Figura 25.	Disminución del área relativa de difusión de BSA en presencia de vino.....	54
Figura 26.	Efecto antidifusor sobre BSA de acuerdo a la concentración de vinos.....	55
Figura 27.	Efecto antidifusor sobre BSA en función del Logaritmo de la concentración de vinos.....	55
Figura 28.	Alteración de la difusión de la fracción proteica salival por efecto del vino.....	59
Figura 29.	Ensayo de difusión y precipitación de saliva por efecto de vino blanco.....	60
Figura 30.	Ensayo de difusión y precipitación de saliva por efecto de vino tinto.....	61
Figura 31.	Identificación del punto de equivalencia entre saliva y vino tinto mediante la superposición de imágenes.....	61
Figura 32.	Disminución del área relativa de difusión de la fracción proteica salival en	

	presencia de vino.....	63
Figura 33.	Efecto antidifusor sobre la saliva en función del Logaritmo de la concentración de vinos.....	63
Figura 34.	Efecto antidifusor producido por vinos sobre una proteína modelo y la saliva humana.....	64
Figura 35.	Microdesecados de saliva humana en presencia de vinos blanco y tinto.....	66
Figura 36.	Alteración de la fracción proteica salival por efecto de vinos gota y prensa.....	68
Figura 37.	Identificación del punto de equivalencia entre saliva y vinos gota y prensa mediante superposición de imágenes.....	69
Figura 38.	Disminución del área relativa de difusión de la fracción proteica salival en presencia de vinos gota y prensa.....	71
Figura 39.	Efecto antidifusor sobre la saliva en función del Logaritmo de la concentración de vinos.....	71
Figura 40.	Efecto antidifusor de vinos de distinta composición polifenólica sobre la saliva...	72
Figura 41.	Interpretación de la interacción de proteína-vino tinto.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales propiedades organolépticas de los compuestos fenólicos en el vino tinto.....	6
Tabla 2.	Principales funciones de la saliva y componentes involucrados.....	12
Tabla 3.	Listados de proveedores y reactivos.....	24
Tabla 4.	Vinos empleados para el desarrollo de la Tesis.....	24
Tabla 5.	Composición general de los vinos comerciales empleados.....	25
Tabla 6.	Composición general de los vinos específicos empleados.....	25
Tabla 7.	Presencia de precipitado observable en diluciones de BSA en ácido tánico.....	46
Tabla 8.	Diluciones de BSA en vino tinto y registro de precipitados observados.....	51
Tabla 9.	Diluciones de saliva en vino tinto y registro de precipitados observados.....	58
Tabla 10.	Parámetros descriptivos de la interacción entre suspensiones proteicas y vinos de acuerdo a evaluación en membranas de celulosa.....	64
Tabla 11.	Diluciones de saliva y registro de precipitados en ensayo con vinos específicos...	68
Tabla 12.	Parámetros descriptivos de la interacción entre saliva y vinos de distinta composición polifenólica de acuerdo a evaluación en membranas de celulosa....	72

RESUMEN

La astringencia es una importante característica de calidad del vino tinto. Al degustarlo, produce aspereza, rugosidad y sequedad en la cavidad bucal, sensaciones que se han atribuido a la presencia de compuestos fenólicos (taninos) en el vino tinto. Se ha señalado que estos compuestos interactúan con las proteínas de la saliva en la boca formando complejos, los cuales precipitan generando la pérdida de la capacidad lubricante de la saliva y la sensación que denominamos astringencia. Para estimar la astringencia que produce un vino se emplea un panel de degustación, de manera que implica siempre cierta subjetividad.

Por otro lado, se ha señalado que la interacción y la precipitación de los complejos tanino-proteínas salivales se produce por la presencia de proteínas ricas en prolina (PRPs), abundantes en la saliva humana. La investigación de las interacciones tanino-saliva se aborda frecuentemente con taninos y proteínas específicas, soluciones proteicas ideales y/o muestra biológica procesada (mediante dilución, centrifugación o filtración). Tales interacciones son evaluadas en nuestro laboratorio empleando, en cambio, “saliva total humana”. Esta se utiliza en el estudio de la fracción proteica salival en ensayos de difusión sobre membranas de celulosa y mediante ensayos de precipitación. Hasta ahora, las evaluaciones asociadas a este fenómeno son prácticamente inexistentes, por lo cual se planteó como objetivo de esta Tesis: **“Evaluar cuantitativamente interacciones entre la fracción proteica de la saliva total humana y polifenoles del vino”**. Para ello, se ha propuesto como hipótesis que: **“La medición sistemática de alteraciones tanto en la capacidad de difundir sobre matrices de celulosa como en la solubilidad de la fracción proteica salival, producidas por los polifenoles del vino, permite la cuantificación de la formación de complejos entre polifenoles del vino y la proteína salival.”** Se implementó un método de estudio cuantitativo de interacciones polifenoles-proteínas de la saliva total humana, se estableció un modelo de análisis donde la interacción es dependiente de la composición polifenólica en el vino y se especificaron parámetros para cotejar aspectos de la progresión de la interacción vino-fracción proteica de saliva total humana.

SUMMARY

Assessment of the interaction of oenological polyphenols with the protein fraction of whole human saliva.

Astringency is an important feature of red wine quality. On tasting, astringency produces roughness, puckering and dryness of the mouth, feelings that have been attributed to the presence of phenolic compounds (such as tannins) in red wine. These compounds interact with proteins in the saliva forming complexes in the mouth, which precipitate generating the loss of lubricant properties of saliva which is followed by the sensation of astringency. To estimate levels of wine astringency a taste panel is employed, a traditional procedure that always involves some subjectivity.

Moreover, it's been indicated that interaction and precipitation of tannin – salivary protein complexes it's produced by the presence of proline-rich proteins (PRPs), typically abundant in human saliva. Previous investigations studying interactions between saliva and tannins used specific proteins, model proteins or ideal solutions and/or processed biological samples (by dilution, centrifugation or filtration). However, none study employed not disrupted human saliva. In our laboratory, interactions with tannins were evaluated using whole human saliva. With this biological sample, the study of salivary protein fraction in assays of diffusion on cellulose membrane and employing precipitation assays was performed. Until now, evaluations associated with this phenomenon were virtually nonexistent. Thus the objective of this thesis is **"To assess quantitatively interactions between protein fraction of whole human saliva and wine polyphenols"**. The working hypothesis is that: **"The systematic measurement of disruptions both diffusion capability over cellulose membranes and solubility of salivary protein fraction, produced by wine polyphenols, allow quantitation of complex formation between wine polyphenols and the salivary protein"**. A method for the quantitative study of polyphenol - protein of whole human saliva interactions was set up and established an analytical model where these interactions are dependent on the polyphenolic composition of wine, and defined specific parameters for the analysis of the interaction between wine and the salivary protein fraction of whole human saliva.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Astringencia

La astringencia tiene un rol significativo en la experiencia sensorial provocada por un grupo diverso de alimentos y bebidas, entre los que se incluyen vino, té, leche de soya, café, frutas, nueces y legumbres (Bajec y Pickering, 2008). Comprende “el conjunto de sensaciones debido a la constricción, raspado o fruncimiento del epitelio como resultado de la exposición de sustancias tales como alúminas o taninos (*American Society for Testing and Materials*, 2004). No existe consenso en la literatura sobre el detalle de este conjunto de sensaciones (Bajec y Pickering, 2008). La mayoría de los autores consideran las sensaciones de sequedad, aspereza y fruncimiento (o constricción) para definir la astringencia (Gawel, 1998; Jöbstl *et al.*, 2004) incluyendo, en algunos casos, amargor y sabor agrio (Lee y Lawless, 1991). Particularmente, no está bien estipulado si la sensación de sequedad podría ser en realidad una reacción concomitante a la astringencia, entre varios otros aspectos en discusión, incluyendo aspectos semánticos para describir las sensaciones bucales (Bajec y Pickering, 2008 y referencias que ellos incluyen).

Un compuesto astringente es el que une y precipita proteínas, definición muy relacionada a la raíz latina de la palabra: *adstringere*, referida a “unir, apretar” (Joslyn y Goldstein, 1964). Según esto, hay 4 grupos de verdaderos astringentes, es decir, capaces de reaccionar con proteínas y de ser astringentes desde el punto de vista perceptual. Estos son: sales de cationes metálicos multivalentes (especialmente sales de aluminio), agentes deshidratantes (etanol y acetona), ácidos orgánicos e inorgánicos, y polifenoles o compuestos fenólicos (Joslyn y Goldstein, 1964).

La percepción de la astringencia ha sido vinculada a un tipo de recepción distinta de los receptores del gusto (células neuroepiteliales receptoras del gusto, TRCs por su sigla en inglés) que también se encuentra albergada en la cavidad bucal: los mecanoreceptores (MRs) (Bajec y Pickering, 2008 y referencias que ellos incluyen). De forma distinta a los

receptores del gusto, los mecanorreceptores son neuronas. Estos se clasifican de acuerdo al tamaño y al carácter del campo receptivo (pequeño y puntual o grande y difuso), además de clasificarse según sean rápida o lentamente adaptables (Jacobs *et al.*, 2002). Los receptores de adaptación rápida responden durante la fase dinámica del estímulo, mientras que los de adaptación lenta responden a la aplicación de fuerza estática y dinámica (Jacobs *et al.*, 2002). La distribución de los distintos tipos de mecanorreceptores en la cavidad oral varía según la localización. Se sugiere, por ejemplo, que las regiones de las mucosas que se encuentran deformadas durante el funcionamiento normal (labios, por ejemplo) contienen gran proporción de aferentes de adaptación lenta, mientras que regiones involucradas principalmente en comportamiento de exploración y manipulación (lengua) presentan gran número de fibras de adaptación rápida (Trulsson y Essick, 1997). De todos los nervios que inervan la cavidad oral y que se proyectan a las papilas gustativas proveyendo somatosensorialidad, es decir, el nervio trigémino, el nervio facial y el nervio glossofaríngeo (nervios craneales V, VII y IX), específicamente los nervios infraorbital, lingual, cuerda del tímpano y glossofaríngeo contienen fibras aferentes mecanoreceptoras (Trulsson y Essick, 1997).

Desde que se sugirió que la astringencia es una sensación y no un sabor, se ha aceptado su naturaleza táctil como un paradigma (Bajec y Pickering, 2008). La teoría actual acerca de la astringencia señala que después de que un compuesto astringente despoja (une y precipita) la cavidad bucal de proteínas de mucosa y epitelio que confieren lubricación, la fricción incrementada entre las superficies de la cavidad bucal estimula mecanorreceptores (Lyman y Green, 1990). Sin embargo, hay investigadores que reparan en que la astringencia sería un sabor, en vista de que taninos específicos (ácido tánico y/o catequina) son capaces de interactuar con receptores celulares, es decir, del tipo de receptores del gusto (referencias incluidas en Bajec y Pickering, 2008). Finalmente, no se ha podido descartar la teoría táctil tampoco, por lo que hoy se entiende que, para algunos compuestos astringentes, la sensación de astringencia puede ser resultado de mecanismos táctiles y del gusto en conjunto (Bajec y Pickering, 2008).

Entre los compuestos que generan astringencia, los polifenoles de origen vegetal son la fuente primaria de astringencia en alimentos y bebidas reportados como astringentes (Bajec y Pickering, 2008). Alimentos de consumo masivo con alto contenido de polifenoles son el vino, el té y algunas legumbres (porotos, sorgo). Particularmente, el vino es una fuente valiosa de compuestos fenólicos (Bennick, 2002), donde estos contribuyen importantemente al color, su evolución, al sabor y a la sensación del vino (Kennedy, 2008). Si bien en el vino blanco también tienen relevancia, específicamente con respecto a la calidad visual (ácidos hidroxicinámicos) (Kennedy, 2008), en el vino tinto los compuestos fenólicos son responsables de características organolépticas definitorias de su calidad (Zamora, 2003). Entre ellas, la astringencia es una característica fundamental de la sensación en boca (Gawel *et al.*, 2001). Los taninos que producen la sensación de astringencia conforman, adicionalmente, la “estructura” o el “cuerpo” del vino tinto (McRae y Kennedy, 2011). La sensación en boca y la textura son muy determinantes en las preferencias y la aceptación del consumidor hacia los alimentos y bebidas (Gawel, 1998). La importancia de esta para el mercado del vino ha llevado a enriquecer la investigación sobre las causas de la astringencia y sobre cómo los taninos impactan en la calidad de la sensación (McRae y Kennedy, 2011). Un objetivo de los vitivinicultores es balancear los compuestos fenólicos en un vino tinto, junto a otros componentes (Kennedy, 2008), para que la astringencia contribuya al carácter y la calidad del vino tinto (Gawel, 1998). Cuando se encuentra en exceso, la astringencia resta valor a otros componentes, mientras que con demasiado poca, los vinos pueden saber planos, insípidos y poco interesantes (Gawel, 1998). El progreso continuo de investigación en uva y vino en diversos aspectos depende del desarrollo continuo de la química de análisis, conducente a perfeccionar el manejo de compuestos fenólicos en la uva y el vino (Kennedy, 2008).

1.2. Vino tinto: bebida astringente rica en polifenoles

El vino contiene abundantes sustancias fenólicas. Los compuestos fenólicos, grosso modo, constituyen uno de los grupos de sustancias más comunes en plantas. Son considerados metabolitos secundarios y no tienen funciones metabólicas específicas dentro de las células (Bennick *et al.*, 2002). Sin embargo, varios de estos compuestos fenólicos son esenciales para las plantas, otorgando mecanismos de defensa antimicrobiana, volviendo el alimento desagradable para los depredadores (Bennick *et al.*, 2002), además de que proveen pigmentación a flores, frutas y semillas, y atraen a polinizadores y dispersadores de semillas, promueven la fertilización de plantas y la germinación del polen, actúan como moléculas de señalización en interacciones con microbios (Petti 2009 *et al.*, 2009) y, por su estructura, tienen propiedades antioxidantes, neutralizando el efecto de los radicales libres (Bennick *et al.*, 2002). Esta actividad puede proteger a las plantas de la luz ultravioleta, insectos, bacterias, hongos y virus.

Químicamente, los compuestos fenólicos son sustancias que contienen al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos, además de otros sustituyentes (Bennick *et al.*, 2002). Se pueden clasificar según su complejidad estructural en varios grupos (Castillo, 2007). El grupo más sencillo corresponde a los ácidos fenólicos y cetonas polifenólicas; luego se encuentran los fenilpropanoides (cumarinas, cromonas, benzofuranos y lignanos), xantonas, estilbenos y quinonas; y los flavonoides (antocianos, flavonoides menores como flavanonas y dihidroflavonoles, flavonas y flavonoles, isoflavonoides y taninos condensados), los cuales constituirían cerca de la mitad de los compuestos fenólicos presentes en las plantas, (Castillo, 2007).

Los constituyentes fenólicos revisten una gran importancia en enología debido al papel que juegan directa o indirectamente sobre la calidad de los vinos, además del interés nutricional y farmacológico que comporten (Cheynier *et al.*, en Flanzy, 2000). Los compuestos y sus niveles en el vino son distintos según la especie de la uva y también según el tipo de vino, blanco o tinto. Los vinos blancos se fabrican presionando brevemente la uva para extraer el jugo, mientras que los tintos se fermentan del jugo

incluyendo las partes sólidas de la uva (hollejo y semillas) (Waterhouse, 2002). Debido a que hollejos y semillas contienen la mayor cantidad de polifenoles, el vino tinto es un extracto de la baya entera, en cambio el vino blanco es un producto del jugo (Waterhouse, 2002).

Del gran número de sustancias sumamente heterogéneas que corresponde al grupo de los compuestos fenólicos, se han encontrado diversas estructuras en el vino. Estas, pueden clasificarse como se señala en la **Figura 1**. La uva contiene esencialmente compuestos no flavonoides en la pulpa y flavonoides en los hollejos, semillas y raspones (Cheynier *et al.*, en Flanzy, 2000), además de agua, azúcares, elementos minerales, ácidos orgánicos y sustancias odorantes (Obreque, 2010). Debemos considerar también que algunos compuestos fenólicos resultan de modificaciones estructurales a los de la baya durante la vinificación (McRae y Kennedy, 2011). Adicionalmente, la maduración de los vinos en barrica de roble (etapa de añejado) confiere nuevos compuestos al vino procedentes de la madera, enriqueciéndolo no solo en aromas, sino también en compuestos no volátiles (Zamora, 2003). El conjunto de compuestos fenólicos aportan al vino distintas propiedades organolépticas y su capacidad para la crianza (ver **Tabla 1**). Los polifenoles de la uva son parcialmente extraídos durante la fermentación alcohólica del vino tinto. Pero, luego de un año de maduración, cerca del 50% de los antocianos son degradados y lo mismo, pero menos acentuado, ocurre con los taninos condensados o, también, denominados procianidinas. Después de dos años de añejado en la botella, cerca del 80% de los antocianos libres y del 40% de las procianidinas son degradadas, en comparación con el vino recién embotellado, mientras que la cantidad total de polifenoles permanece prácticamente invariable. Gran diversidad de nuevos polifenoles son formados durante el añejado, complejizando la composición de polifenoles del vino. En otras palabras, durante la maduración la contribución de antocianos libres al color rojo del vino es gradualmente reducida y reemplazada por complejos pigmentados, y el color del vino tinto cambia progresivamente de rojo brillante a rojo-marrón (Sun *et al.*, 2006).

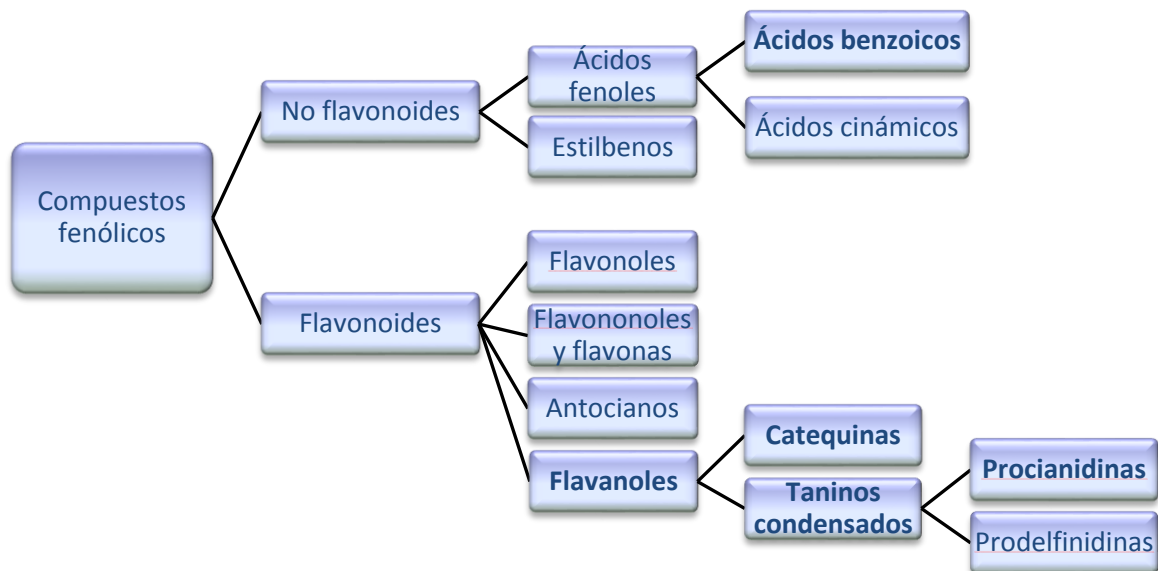


Figura 1. Clasificación de los compuestos fenólicos. Los compuestos fenólicos se pueden clasificar químicamente como flavonoides o no flavonoides, y en subgrupos dentro de estos. En el diagrama se muestran los compuestos fenólicos mayoritariamente presentes en el vino tinto, los cuales provienen de la uva. Adicionalmente, durante el añejado la barrica entrega taninos hidrolizables (no incluidos), entre otros compuestos. Aquellos compuestos fenólicos que se encuentran remarcados en el diagrama tienen importante rol en la sensación de astringencia, en conjunto con los taninos hidrolizables, adicionalmente mencionados. (Tomado de Zamora, 2003)

Tabla 1. Principales propiedades organolépticas de los compuestos fenólicos en el vino tinto. (Adaptado de Zamora, 2003)

Compuesto fenólico	Principales propiedades
Ácidos fenólicos	Poca influencia directa
Flavonoles	Color amarillo
Antocianos	Color rojo
Taninos condensados	Sabor amargo, astringencia, cuerpo, estructura, capacidad para la crianza
Taninos hidrolizables	Acidez, amargor y astringencia

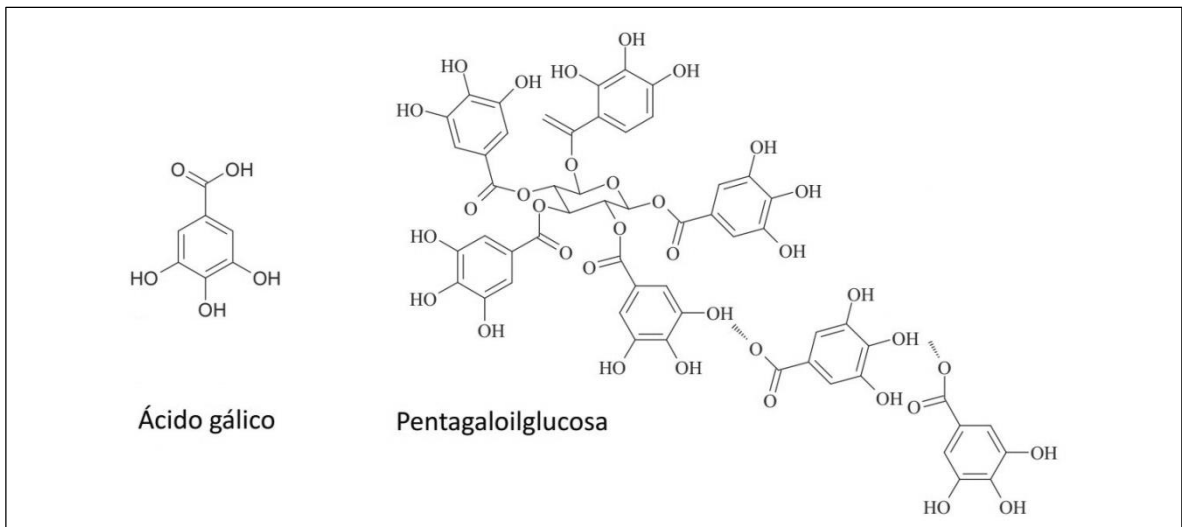


Figura 2. Estructura de un ácido benzoico y de un tanino hidrolizable constituido de él. El ácido gálico es la subunidad que conforma los galotaninos, como por ejemplo el pentagaloilglucosa mostrado en la figura.

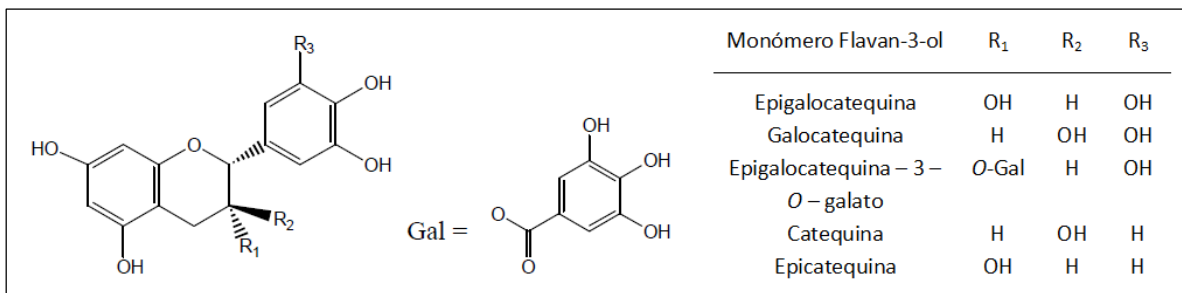


Figura 3. Estructura de subunidades de taninos condensados (monómeros flavan-3-ol). (Tomado de McRae y Kennedy, 2011)

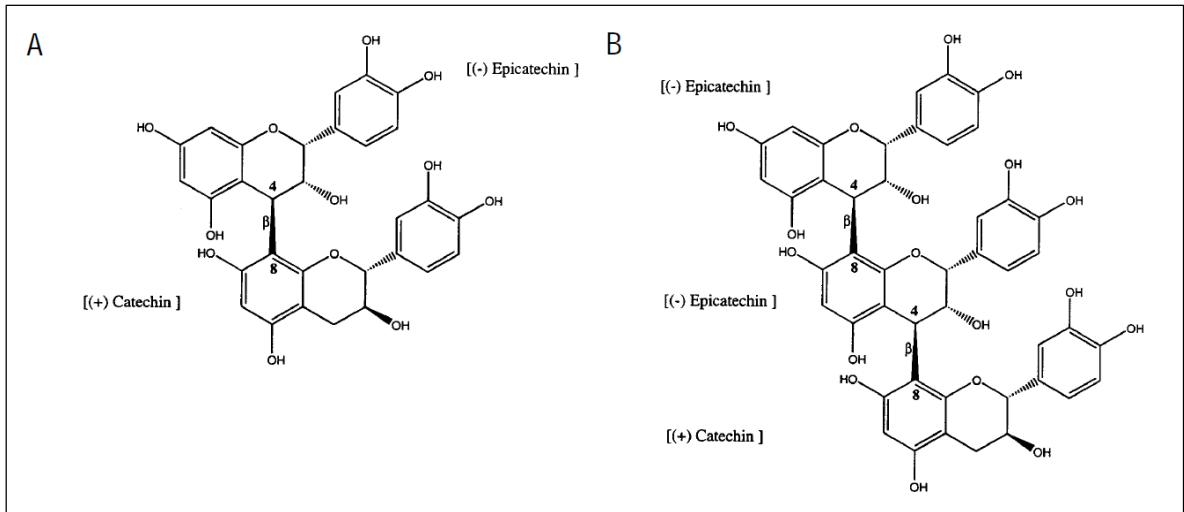


Figura 4. Dímeros y trímeros de procianidinas comúnmente encontrados en las bayas de uva. A) Dímero B1: epicatequina ($4\beta \rightarrow 8$) – catequina. B) Trímero: epicatequina ($4\beta \rightarrow 8$) – epicatequina ($4\beta \rightarrow 8$) – catequina. (Tomado de Gawel, 1998)

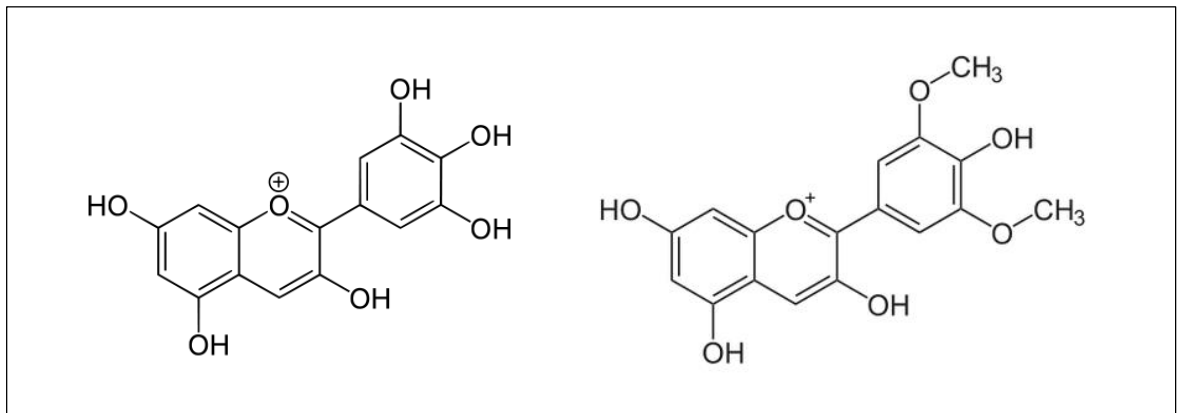


Figura 5. Estructura química de dos antocianidinas características del vino tinto. Los antocianos se componen de un anillo fenólico y un benzopirilio (catión flavilio) y se diferencian por sus niveles de hidroxilación, metilación, esterificaciones y glicosilaciones. Un antociano glicosidado corresponde a una antocianina, mientras que la forma aglicona se denomina antocianidina. Se muestra, al lado izquierdo, la estructura de la delphinidina y, al lado derecho, la malvidina. Ambas moléculas son características del género *Vitis*. Tan sólo las forma agliconas (como en la figura) presentan características cromóforas y por tanto son las responsables del color del vino tinto (Cheynier *et al.*, en Flanzky, 2000; Zamora, 2003).

Los taninos condensados tienen la capacidad de unirse a las proteínas. De hecho, el nombre genérico de tanino proviene precisamente de esta propiedad relacionada con el curtido de pieles (del francés *tannage*). Es aceptado que al beber un vino tinto, ponemos en contacto los taninos con las proteínas de la saliva, lo que dará lugar a la precipitación de estas y a la sensación de astringencia. Adicionalmente a los taninos condensados, debemos considerar un grupo de taninos distintos provenientes de la barrica de roble, aportados durante el añejado del vino: los taninos hidrolizables. Estos participan de la misma manera en la sensación de astringencia (Zamora, 2003).

De los ácidos benzoicos, el ácido gálico y el ácido elágico (dímero del ácido gálico) conforman los polifenoles denominados taninos hidrolizables. Específicamente, “taninos gálicos” si se constituyen de ácido gálico o “taninos elágicos” si se constituyen de su dímero, el ácido elágico (Zamora, 2003). Los taninos hidrolizables se componen de polialcoholes, como la glucosa, unidos a ácidos gálicos o elágicos mediante uniones ésteres (**Figura 2**). Estos compuestos son fácilmente hidrolizables en soluciones alcalinas, resultando polialcoholes y ácido gálico, o ácido elágico en el caso de elagitaninos (Bennick *et al.*, 2002). Los taninos condensados (flavanoles) están formados por monómeros de catequinas (moléculas flavan-3-ol) o epicatequinas unidos por enlaces C-C (ver **Figuras 3 y 4**). Solo pueden ser despolimerizados en ácidos fuertes y con temperatura, originando pigmentos antocianidínicos y otros productos. De esta interacción proviene su denominación como procianidinas. El grado de polimerización varía de pocas a más de 50 moléculas de catequina. Los taninos condensados pequeños son solubles en agua o en solventes orgánicos, mientras que los grandes polímeros son insolubles (Bennick *et al.*, 2002). Existen niveles considerables de taninos en el vino tinto, en orden de unos 750 mg/L (Bennick *et al.*, 2002).

Además de taninos como tales, se ha demostrado que monómeros, dímeros y trímeros flavan-3-ol y ácidos benzoicos también provocan la sensación de astringencia (Lesschave *et al.*, 2005; Obreque-Slier *et al.*, 2010b). Así, la formación de agregados solubles entre taninos hidrolizables que también producen la sensación de astringencia *in vivo* sugiere

que no es necesaria la precipitación para inducir la experiencia sensorial (McRae et al., 2011).

De la calidad de los taninos en el vino dependen la máxima intensidad de la sensación de astringencia en la boca, su duración total y el tiempo que toma alcanzar el máximo de la intensidad, así como también, la sequedad y la rugosidad percibida (McRae et al., 2011).

La astringencia del vino es influenciada por otros factores, además de estructura y cantidad del tanino en el vino. Estos son, la presencia de macromoléculas tales como polisacáridos y residuos de azúcares, la concentración de moléculas pequeñas como antocianidinas (**Figura 5**) y monómeros de catequinas, la acidez y la concentración de etanol (McRae *et al.*, 2011). Por otro lado, la proporción de taninos provenientes de hollejos y de semillas depende de factores adicionales, como la madurez de la uva, tiempo de maceración, condiciones de la viña y el grado de prensado de la baya (Kennedy, 2008).

Lo que los consumidores degustan en el vino es la culminación de prácticas de manejo desde la viña a la copa. Debido a que los compuestos fenólicos son tan importantes en la calidad general del vino tinto, son objeto de investigación intensa alrededor del mundo (Kennedy, 2008). Así, la investigación enológica permite comprender mejor acerca de las prácticas empíricas, para fomentarlas, modificarlas o intentar suprimirlas (según el caso) con el objetivo de determinar, en función de la materia prima y del producto acabado buscado, una línea tecnológica adaptada (Cheynier *et al.*, en Flanzy, 2000).

1.3. Saliva humana: primera interfase con los polifenoles del vino

La saliva humana es un fluido que se encuentra presente en la boca como producto de secreción exocrina. Es de alta complejidad, líquida, incolora, sin olor, sin sabor, de viscosidad variable (Obreque, 2010) y constituye la primera superficie de encuentro con el alimento. Las propiedades bioquímicas y fisicoquímicas de la saliva permiten que tenga roles multifuncionales en habla, lubricación, digestión de alimentos y mantención de la salud bucal general (ver **Tabla 2**) (Schipper *et al.*, 2007), además de proporcionar el medio en que se disuelve y se suspende el material de la comida que estimula los receptores del gusto (Rossetti *et al.*, 2008).

La saliva en la boca es el producto de la mezcla de secreciones de tres tipos de glándulas salivales principales: parótidas, submandibulares y sublinguales (**Figura 6**); además del aporte de glándulas salivales menores palatinas, ubicadas en zonas particulares en la submucosa de la boca (Proctor *et al.*, 2007), y glándulas más pequeñas situadas en la lengua, mejillas y labios (Silvers y Som, 1998). Controlando e influenciando todas las glándulas secretoras antes mencionadas están los nervios autónomos parasimpáticos y simpáticos, los cuales trabajan coordinadamente para producir la secreción de la saliva (Proctor *et al.*, 2007). El tipo de secreción que producen las glándulas salivales difiere entre ellas. Las glándulas parótidas secretan un fluido acuoso, mientras que glándulas sublinguales y submandibular secretan una saliva enriquecida en mucus, que es viscosa y relativamente elástica (Schipper *et al.*, 2007). El 60% de la secreción en reposo (no estimulada) proviene de la glándula submandibular, cuya saliva es rica en mucinas, denominada incluso como saliva mucinosa (Walsh, 2008). Los fluidos salivales glandulares convergen en la cavidad oral, se mezclan con la ayuda de los movimientos de la lengua e interactúan entre sí organizando la película salival (Schipper *et al.*, 2007). La mezcla de secreciones total conforma un volumen promedio de 1 mL de saliva en la cavidad bucal en reposo y, se ha estimado también, que el flujo salival varía, específicamente entre 500-1500 mL/día en adultos (Walsh, 2008). Además de la variación intrínseca a la actividad bucal, hay diversos factores afectando el volumen de saliva, tales como edad, género,

características genéticas, condición de salud bucal, estado físico, ritmo cardíaco, actividad diferencial de glándulas salivales, tipo y duración de estímulo, dieta alimenticia, consumo de fármacos y estado psicológico (Schipper *et al.*, 2007).

Tabla 2. Principales funciones de la saliva y componentes involucrados. (Adaptado de Kaufman *et al.* 2000)

Funciones	Componente salival involucrado
<p>1. <i>Función protectora</i></p> <p>Lubricación</p> <p>Antimicrobiana</p> <p>Integridad de la mucosa</p> <p>Lavado/limpieza</p> <p>Efecto tamponante</p> <p>Remineralización</p>	<p>Mucinas, glicoproteínas ricas en prolina, agua</p> <p>Proteínas salivales: lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasa, mucinas, cistatinas, histatinas, IgA secretora; glicoproteínas ricas en prolina</p> <p>Mucinas, electrolitos, agua</p> <p>Agua</p> <p>Bicarbonato, fosfatos, proteínas</p> <p>Calcio, fosfato, proteínas ricas en prolina aniónicas</p>
<p>2. <i>Funciones en habla y alimentación</i></p> <p>Preparación de alimento</p> <p>Digestión</p> <p>Gusto</p> <p>Habla</p>	<p>Agua, mucinas</p> <p>Amilasa, lipasa, ribonucleasa, proteasas, agua, mucinas</p> <p>Agua, gustinas</p> <p>Agua, mucinas</p>

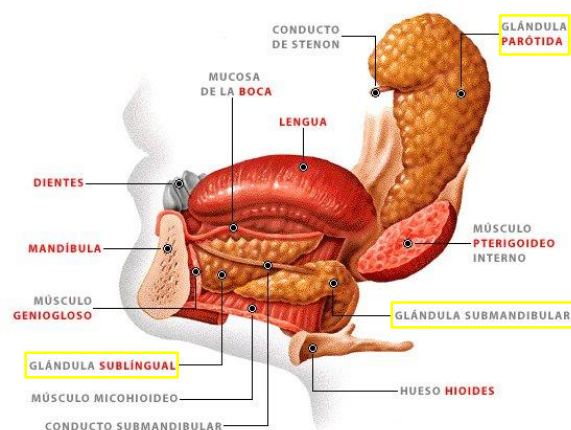


Figura 6. Glándulas secretoras de componentes salivales. Ubicación de glándulas parótidas, sublinguales y submandibulares.

La composición de la saliva consiste fundamentalmente en agua (~99,5%), proteínas (~0,3%) y compuestos traza e inorgánicos (~0,2%) (van Vliet *et al.*, 2009). Particularmente, las proteínas salivales son una mezcla compleja de macromoléculas producidas por las diversas glándulas secretoras, tejidos y células que se constituyen principalmente de glicoproteínas (van Vliet *et al.*, 2009).

La **saliva total humana (STH)**, es decir, una muestra del fluido completo presente en la boca, incluye también constituyentes de origen no salival de la cavidad bucal. Entre ellos: derivados de secreciones nasales y bronquiales, eventualmente suero y células sanguíneas provenientes de heridas, tanto como bacterias y productos bacterianos, virus y hongos, células epiteliales descamadas y restos de alimentos (Kaufman *et al.*, 2000). La STH es fácilmente colectada de manera no invasiva (Esser *et al.*, 2008) con y sin estimulación previa (Kaufman *et al.*, 2000). Alternativamente, muestras de saliva pueden ser colectadas desde los conductos específicos de las glándulas salivales obteniéndose, correspondientemente, saliva parotídea, saliva submandibular y saliva sublingual (Kaufman *et al.*, 2000).

De las **proteínas de la saliva** (no estimulada), el 70% son proteínas ricas en prolina (PRPs), las que a su vez son de tres tipos: ácidas (30%), glicosiladas (23%) y alcalinas (17%) (Charlton *et al.*, 2002). Las proteínas ácidas y las glicosiladas han sido vinculadas al control de los niveles de calcio y a la lubricación del bolo alimenticio, respectivamente, pero para las proteínas PRP básicas la función más importante que se ha propuesto es la de unir polifenoles (Hagerman *et al.*, 1981). En general, la glicoproteína PRP básica ha sido reportada unida a células bucales, bacterias y taninos de la dieta. De esta manera, se propone para PRPs salivales un rol como primera línea de defensa contra efectos perjudiciales de polifenoles de la dieta (Sarni-Manchado *et al.*, 2008). Se ha visto que los polifenoles pueden tener una variedad de efectos perjudiciales en animales, incluyendo secuestro de hierro e inhibición de la actividad de enzimas digestivas, y que las proteínas ricas en prolina de la saliva pueden unirse a los polifenoles precipitándolos, previniendo

efectivamente del daño producido por su biodisponibilidad en el tracto gastrointestinal (Charlton *et al.*, 2002).

Funciones como citoprotección, lubricación, protección contra la deshidratación y mantención de la viscoelasticidad recaen en las mucinas (y complejos de estas con IgA y Albúmina). Las mucinas de la saliva son glicoproteínas con numerosos residuos de oligosacáridos cortos en cada molécula (Walsh *et al.*, 2008), siendo las proteínas que otorgan el clásico carácter visco-elástico a todas las secreciones de las mucosas (Schenkels *et al.*, 1995). Las funciones y propiedades bioquímicas de las mucinas son principalmente determinadas por los residuos terminales (fundamentalmente, ácido siálico) y, en general, varios residuos de cisteínas están involucrados en la formación de complejos macromoleculares. Asimismo, dependen importantemente del alto contenido de oligosacáridos (constitución de glicoproteínas) y su habilidad en la formación de capas tipo gel para la protección de las superficies epiteliales (Schenkels *et al.*, 1995).

1.4. Interacción de polifenoles del vino con proteínas de la saliva

Hoy es un paradigma que la interacción de taninos con las proteínas de la saliva es el origen de la sensación de astringencia, característica de estas moléculas (Cheynier *et al.*, en Flanzy, 2000). Tres mecanismos pueden estar implicados en la formación de complejos: interacciones hidrofóbicas, uniones mediante puentes de hidrógeno e interacciones iónicas. Sin embargo, al parecer las asociaciones resultan principalmente de interacciones hidrofóbicas, estabilizadas eventualmente por puentes de hidrógeno, siendo muy menor la contribución de las uniones iónicas (Cheynier *et al.*, en Flanzy, 2000). De acuerdo a Hagerman y Butler (1981), las interacciones entre proteínas en general y procianidinas dependen principalmente de la vinculación del hidrógeno. Los modelos moleculares propuestos muestran la presencia de numerosos enlaces de hidrógeno consideran que ocurren entre las funciones carbonilo de algunos residuos de prolina en las proteínas y los grupos OH de los cuatro anillos de las procianidinas (Simon *et al.*, 2003). Según Jöbstl y colaboradores (2004), los polifenoles son ligandos multidentados capaces de unirse a través de grupos fenólicos diferentes, en forma simultánea y en más de un punto con una proteína. Estos autores postulan que la precipitación proteína-polifenol ocurre en tres etapas (**Figura 7**):

En la primera etapa, las proteínas están libres con una conformación nativa funcional. La unión simultánea de los polifenoles multidentados en varios sitios de la proteína lleva al enrollamiento de la proteína alrededor de los polifenoles, llevando la disposición espacial de la proteína a una más compacta y esférica. Uniones puntuales de polifenoles a la proteína aumentan la afinidad y la unión global. En la segunda etapa, a medida que la concentración de polifenoles aumenta, los polifenoles complejados en la superficie de la proteína se unen a otras proteínas produciendo la dimerización u oligomerización, que lleva a la insolubilización. En la tercera y última etapa, a mayor unión de polifenol, los dímeros u oligómeros se agrupan y las partículas resultantes precipitan.

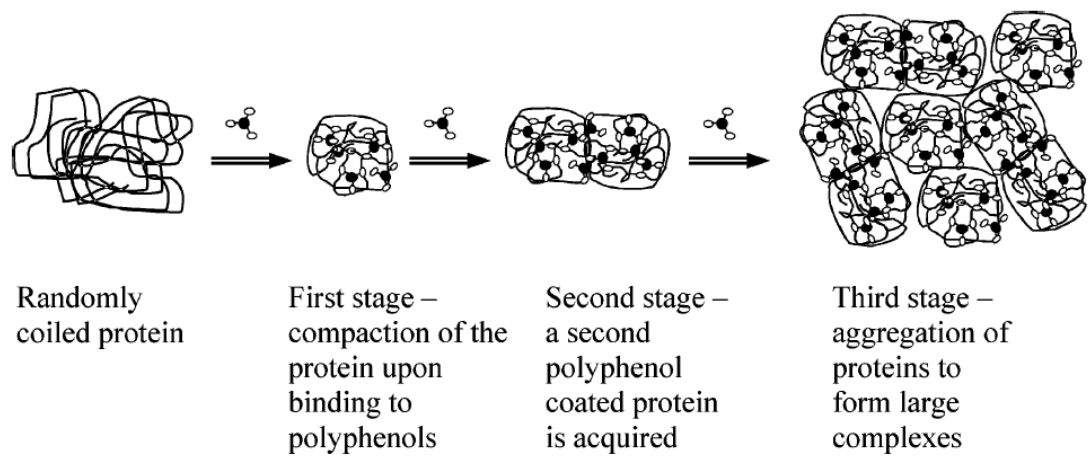


Figura 7. Precipitación proteína-polifenol en tres etapas. Modelo de Jöbstl y colaboradores (2004).

Se ha investigado la interacción entre saliva o proteínas de la saliva y polifenoles mediante diferentes técnicas y enfoques: cromatografía (Kallithraka *et al.*, 1998), turbiedad (Horne *et al.*, 2002), dispersión de la luz y microscopía electrónica (Charlton *et al.*, 2002), resonancia magnética nuclear (RMN) (Baxter *et al.*, 1997), ensayos de difusión y precipitación en membranas de celulosa (Obreque-Slier *et al.*, 2010a-b), precipitación y análisis de HPLC (Obreque-Slier *et al.*, 2011), reología interfacial (Rossetti *et al.*, 2008) y RMN, dicroísmo circular y espectrometría de masas para modelamiento molecular (Simon *et al.*, 2003), entre otros. Todos estos métodos coinciden en la observación de complejos estables que, en su mayoría, forman precipitados, aunque la correlación de estos con la percepción de astringencia no ha sido clarificada.

En general, se ha descrito que los compuestos fenólicos responsables de la astringencia del vino son polímeros flavan-3-ol (taninos condensados) (Gawel, 1998). Además, el ácido tánico, un tanino gálico altamente galoilado, tiene alta afinidad por las proteínas salivales. La epigallocatequina muestra alta afinidad con fracciones ricas en prolina en comparación con la mayoría de las demás proteínas (Bacon y Rhodes, 1998).

Se han sugerido dos factores relevantes en la afinidad de taninos por proteínas salivales que influirían sobre la percepción de astringencia: el tamaño del tanino o grado de polimerización y el nivel del galoilación, presencia de ácidos gálicos y derivados en la estructura del tanino (Obreque-Slier *et al.*, 2010). Mayor tamaño y complejidad del polifenol implica una interacción más fuerte con fragmentos de proteínas en la saliva, específicamente, con proteínas ricas en prolina. En contraste, un bajo grado de galoilación se corresponde con una baja afinidad por las proteínas salivales. De la misma manera, la naturaleza química del compuesto fenólico (hidrolizable, condensado, galoizado), tanto como el peso molecular, estructura tridimensional, susceptibilidad a autoasociarse y solubilidad en agua, y también las condiciones del medio (pH, concentración de alcohol, entre otras) pueden producir diferencias en la formación de complejos taninos-proteínas. Estas diferencias podrían explicar, a su vez, diferencias gustativas importantes notadas por los enólogos sobre el comportamiento de los taninos en el vino tinto, tales como las

características de sequedad, fruncimiento, amargor, astringencia o aspereza (Lee y Lawless, 1991). Concretamente, se ha ensayado la influencia del pH (Kallithraka *et al.*, 1997), del alcohol (Obreque-Slier *et al.*, 2010c) y de polisacáridos como pectinas (Mateus *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006) sobre la interacción tanino-proteína, encontrándose un efecto exacerbante de la interacción y de la percepción de astringencia con los dos primeros e inhibidor de la interacción con el tercero. Se ha postulado que los carbohidratos, específicamente, se unen a los taninos formando estructuras estables sin capacidad de asociarse a las proteínas (Mateus *et al.*, 2004).

Actualmente, se propone que la unión de taninos a PRPs salivales es el paso inicial en el desarrollo de la sensación de astringencia. Sin embargo, los polifenoles también se unen estrechamente a histatinas, α -amilasa, lactoferrina y mucinas, de la misma manera en que se unen también a las proteínas no salivales gelatina, albúmina de suero bovino y caseína (Obreque-Slier *et al.*, 2011). Estudios de interacción con proteínas purificadas han mostrado que la unión podría depender de la naturaleza de la proteína, específicamente del nivel de glicosilación (Sarni-Manchado *et al.*, 2008).

En contraste con las PRPs, las 12 histatinas conocidas aisladas desde la saliva humana no contienen prolinas, excepto un único residuo en las histatinas 1 y 2. Se componen prominentemente de aminoácido histidina, en un 25% (Bennick *et al.*, 2002 y sus referencias). A pesar de ello, las histatinas son potentes precipitantes tanto de taninos condensados como de ácido tánico. A pH neutro, precipitan más del doble de la cantidad de ácido tánico que precipita la gelatina, la cual ha sido considerada como un fuerte aglutinante del ácido. Resultados similares fueron observados con taninos condensados (Bennick *et al.*, 2002). De esta manera, las histatinas podrían tener un rol importante en la inactivación de polifenoles a través del tracto gastrointestinal (Petti *et al.*, 2009).

1.5. Medición de la astringencia

La herramienta clásica y mayormente empleada en enología y vitivinicultura es el análisis de la astringencia mediante una evaluación sensorial. Este tipo de evaluación consiste en la estimación de la astringencia empleando individuos panelistas degustadores que pueden ser entrenados o no entrenados, los cuales valoran atributos percibidos en una pauta descriptiva no estructurada. La percepción en general por parte de un individuo es subjetiva. Depende de lo que pueda interpretar el individuo como astringencia y de aspectos más concretos como su flujo salival, entre otros. La astringencia como fenómeno es compleja, la posibilidad de medirla es muy distinta a la de otras características en los vinos, como por ejemplo el color, que sí es cuantificable de manera directa.

Dadas estas limitaciones, la medición de la astringencia ha sido instrumentalmente relacionada con la evaluación de alteraciones que experimentan suspensiones proteicas en presencia de taninos. En estos estudios se han empleado compuestos fenólicos puntuales (como ácido tánico, procianidinas puras y extractos fenólicos de semillas y hollejos). También se han empleado algunas proteínas puntuales (entre ellas, caseína, gelatina y albúmina), péptido sintéticos (poli-L-prolina) y fracciones aisladas de la saliva (Obreque, 2010). Entre los ensayos que proponen estimar la astringencia empleando mediciones analíticas, se encuentra muy integrado a la práctica vitivinícola la determinación del índice de gelatina (Glories, 1984). Consiste en precipitar los “taninos astringentes” presentes en el vino tinto utilizando la gelatina como “proteína precipitadora”. A través de la determinación de procianidinas en el vino tinto antes y después de la precipitación se obtiene el índice de gelatina (tanino precipitado expresado como porcentaje del tanino total en la solución). El valor obtenido se relaciona con la intensidad de astringencia que produce el vino tinto. El método se basa en una larga etapa de precipitación (tres días), haciendo el ensayo tedioso (Harbertson y Spayd, 2006). Además, no considera la variedad de compuestos fenólicos presentes en el vino tinto (sólo procianidinas) u otros compuestos que pueden interferir en el ensayo (Llaudy *et al.*, 2004) o en el fenómeno del que se quiere dar cuenta. Otro aspecto deficiente es el empleo de

gelatina, una mezcla heterogénea de proteínas cuya composición cambia en los distintos productos comerciales, lo que conlleva una fuente importante de imprecisión y variabilidad.

Otro método propuesto como un correlato analítico de la astringencia, consiste en un ensayo de precipitación de proteína ovoalbúmina (proteína purificada de huevo de gallina) (Llaudy *et al.*, 2004). Consiste en medir la Absorbancia de compuestos fenólicos totales a 280 nm antes y después de la precipitación y centrifugación de mezclas entre vino y soluciones de concentraciones crecientes de ovoalbúmina. Aun cuando el empleo de ovoalbúmina representa una gran ventaja metodológica, dado que como proteína pura unifica el criterio en la precipitación, la medición de la absorbancia a 280 nm dificulta la claridad respecto a qué compuestos son los que se están determinando espectrofotométricamente, debido a que las proteínas también absorben a esa longitud de onda. Adicionalmente, el ácido tánico empleado en la estandarización es un galotanino con número de ramificaciones altamente variable según el producto comercial, tal como ocurriría con la gelatina.

Para ambos métodos analíticos señalados las posibilidades de asociarlos a la astringencia son limitadas en vista de sus propias limitaciones técnicas. Por lo tanto, hasta hoy persiste la necesidad de disponer de un método analítico confiable y expedito que pudiera ser de utilidad en la actividad vinícola, en la cual se requiere evaluar al menos indirectamente la potencialidad astringente de un producto. Aún más, sería deseable que este método analítico incluya entre sus reactantes un material biológico más cercano al fenómeno fisiológico de la percepción de la astringencia, como es la saliva, antes que a la sola evaluación de las propiedades de interacción de los componentes enológicos con cualquier proteína modelo.

Hasta ahora, las investigaciones se han orientado principalmente al estudio de la interacción de taninos con proteínas salivales específicas. Estudios de esta naturaleza con saliva total, el primer vínculo del material astringente con el sujeto que percibe la astringencia, son prácticamente inexistentes. Particularmente, los trabajos que abordan

la investigación con “saliva total” muestran en realidad el empleo sistemático de prácticas de laboratorio que la modifican (dilución, centrifugación y/o filtración de la saliva) a fin de facilitar el manejo de este fluido visco-elástico.

En nuestra propuesta, para el estudio de las interacciones entre el componente polifenólico del vino potencialmente responsable de provocar la sensación de astringencia, hemos contemplado el empleo de saliva humana total. Para ello hemos propuesto investigar el comportamiento de la fracción proteica de la saliva total frente a la presencia de matrices vínicas con diferente contenido de polifenoles. El estudio será de carácter cuantitativo y evaluará la capacidad de difusión sobre matrices de celulosa y la solubilidad de la fracción proteica salival.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

La medición sistemática de alteraciones tanto en la capacidad de difundir sobre matrices de celulosa como en la solubilidad de la fracción proteica salival, producidas por los polifenoles del vino, permite la cuantificación de la formación de complejos entre polifenoles del vino y la proteína salival.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo general

Evaluar cuantitativamente interacciones entre polifenoles de interés enológico y la fracción proteica de la saliva total humana.

2.2.2. Objetivos específicos

OE1. Implementar la evaluación cuantitativa de la interacción entre polifenoles del vino y una proteína modelo empleando ensayos de difusión y de precipitación de proteínas en membrana de celulosa.

OE2. Implementar la evaluación cuantitativa de la interacción entre polifenoles del vino y la fracción proteica de la saliva humana empleando ensayos de difusión y de precipitación en membrana de celulosa.

OE3. Evaluar la interacción entre la fracción proteica de la saliva humana y vinos de distinta composición polifenólica empleando ensayos de difusión y de precipitación sobre membrana de celulosa.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos

Los reactivos químicos y sus proveedores se detallan en la **Tabla 3**. A continuación, se describen los reactivos enológicos y proteicos empleados, según el objetivo de esta tesis.

3.1.1.1. **Vinos**

Para el desarrollo de esta Tesis, se dispuso de vinos de contenido fenólico diferente. Estos son: un vino sin polifenoles (vino blanco) y un vino rico en polifenoles (vino tinto); y dos vinos con idéntico origen, pero con marcada diferencia en nivel de taninos. La **Tabla 4** muestra los antecedentes de los vinos y las **Tablas 5 y 6** muestran su composición general.

3.1.1.2. **Polifenoles**

- Ácido tánico 1 mg/ml (tanino hidrolizable: galotanino)
- (+)-catequina 4 mg/ml (monómero de tanino condensado)
- Ácido gálico 1 mg/ml (ácido benzoico; conforma galotaninos mediante galoilación)

3.1.1.3. **Saliva humana**

Todas las muestras de saliva fueron obtenidas de un mismo donante voluntario sano entre 9 y 11 am. Para cada experimento se empleó una muestra fresca (ver Protocolo de colección de saliva más adelante), siempre mantenida en hielo y en tubos tapados, y se realizó la cuantificación de proteínas presentes en la muestra salival mediante el método de Bradford (ver más adelante). Adicionalmente, en todos los ensayos con saliva se empleó, en forma paralela, la proteína estándar Albúmina de suero bovina (BSA) de concentración 1 mg/ml (Absorbancia a 280 nm = 0,7).

Tabla 3. Listado de proveedores y reactivos

PROVEEDOR	REACTIVO
Mundo Lab (RM, Chile)	Alcohol etílico de melaza desnaturalizado, 96°
Químicos Giorc (RM, Chile)	Ácido acético
Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, USA)	β -mercaptoetanol (+)catechin hydrate C1251-10G Ácido Tánico n° T-0125 Bovine Serum Albumin (BSA) Coomassie Brilliant Blue R
Whatman Ltda (Maidstone, UK)	Membrana de celulosa Whatman #1
Winkler (RM, Chile)	Reactivo de Bradford, lote 0972C231

Tabla 4. Vinos empleados para el desarrollo de la Tesis. Se emplearon dos vinos comerciales distintos: un vino tinto y un vino blanco; y dos vinos de variedad tinta de características especiales: vino gota y vino prensa. Estos últimos provienen de la misma uva. Sin embargo, la vinificación del vino prensa involucraría mayor extracción de antocianos y taninos.

Denominación durante Tesis	Tipo de vino	Descripción
Vino tinto	comercial	Misiones de Rengo, Carmenere, año 2011, Viña Misiones de Rengo, Valle de Rapel (Lat -34,41; Long -70,87)
Vino blanco	comercial	Misiones de Rengo, Sauvignon Blanc, año 2011, Viña Misiones de Rengo, Valle de Casablanca
Vino gota	gota	Vino sin crianza en madera, obtenido del mosto al finalizar la fermentación alcohólica. Viñedos Villaseñor, Itahue, Valle de Lontué (Lat -35,13; Long -71,37)
Vino prensa	prensa	Vino sin crianza en madera, obtenido de la misma materia prima que el vino gota y, además, del prensado de las partes sólidas (hollejo y semilla). Viñedos Villaseñor, Itahue, Valle de Lontué (Lat -35,13; Long -71,37)

Tabla 5. Composición general de los vinos comerciales empleados. Se analizaron los vinos comerciales (vinos tinto y blanco) mediante procedimientos convencionales (ver en Material Complementario) considerando dos determinaciones independientes, en el Laboratorio de los Viñedos Villaseñor, Itahue, VII Región del Maule. La **Tabla 4** muestra los antecedentes de estos vinos. Vino tinto y vino blanco difieren importantemente en el contenido de polifenoles (fenoles totales, taninos totales y antocianos totales).

VINOS COMERCIALES	Vino tinto			Vino blanco		
Repetición	1	2	Promedio \pm sd	1	2	Promedio \pm sd
pH	3,57	3,6	3,585 \pm 0,021	3,15	3,16	3,16 \pm 0,01
Acidez total (g/L de ácido tartárico)	3,9	3,9	3,9 \pm 0,00	4,4	4,5	4,45 \pm 0,071
Acidez volátil (g/L de ácido acético)	0,4	0,4	0,4 \pm 0,00	0,5	0,5	0,5 \pm 0,00
Azúcares reductores (g/L de glucosa)	5,2	5,3	5,25 \pm 0,071	2,8	2,9	2,85 \pm 0,071
Fenoles totales (mg/L de ácido gálico)	1535	1499,6	1517,3 \pm 25,032	155,6	167,6	161,6 \pm 8,485
Taninos totales (mg/L de epicatequina)	2700	2500	2600 \pm 141,4	50	60	55 \pm 7,1
Antocianos totales (mg/L de malvidina)	454,7	446,4	450,6 \pm 5,869	-	-	-

Tabla 6. Composición general de los vinos específicos empleados Se analizaron los vinos especiales (vinos gota y prensa) mediante procedimientos convencionales (ver en Material Complementario) considerando dos determinaciones independientes, en el Laboratorio de los Viñedos Villaseñor, Itahue, VII Región del Maule. De acuerdo al interés de esta investigación, el vino prensa muestra, efectivamente, mayor contenido de taninos y antocianos que el vino gota.

VINOS ESPECIALES	Vino gota			Vino prensa		
Repetición	1	2	Promedio \pm sd	1	2	Promedio \pm sd
pH	3,8	3,7	3,75 \pm 0,071	3,92	3,87	3,895 \pm 0,035
Acidez total (g/L de ácido tartárico)	4,8	4,9	4,85 \pm 0,071	4,4	4,3	4,35 \pm 0,071
Acidez volátil (g/L de ácido acético)	0,38	0,39	0,385 \pm 0,007	0,37	0,35	0,36 \pm 0,014
Azúcares reductores (g/L de glucosa)	2	2,1	2,05 \pm 0,071	1,9	2,1	2,0 \pm 0,141
Intensidad Colorante (U.A.)	19,63	19,42	19,525 \pm 0,148	19,38	18,99	19,185 \pm 0,276
Alcohol Probable (% v/v)	14	13,9	13,95 \pm 0,071	13,8	13,7	13,75 \pm 0,071
Sulfuroso libre (mg/L de SO ₂)	30	28	29 \pm 1,414	42	40	41 \pm 1,414
Sulfuroso total (mg/L de SO ₂)	48	52	50 \pm 2,828	92	88	90 \pm 2,828
Fenoles totales (mg/L de ácido gálico)	3066	3012	3039 \pm 38,184	2849	2768	2808,5 \pm 57,276
Taninos totales (mg/L de epicatequina)	273	265	269 \pm 5,657	504	513	508,5 \pm 6,364
Antocianos totales (mg/L de malvidina)	879	860	869,5 \pm 13,44	1073	1062	1067,5 \pm 7,778

3.1.2. Soluciones

Soluciones para ensayos en membrana de celulosa

- Ácido tricloroacético (TCA) 5%
- Etanol 80%
- Coomassie Blue R-250 0,25%, en 50% isopropanol y 10% ácido acético
- Ácido acético 7%

3.1.3. Equipos

- Espectrofotómetro Shimadzu® UV-1700 PharmaSpec
- Centrífugas Sorvall® MC-12V y RC-5B
- Microscopio Zeiss® AX10 Lab.A1
 - Objetivos: 2,5x/0,06, 5x/0,12 A-plan, 10x/0,25 A-plan y 40x/0,65 Ph2 A-plan
- Cámara fotográfica Canon® EOS Rebel T3
- Registro digital de celulosas: scanner Epson® Perfection Photo 4490
- Softwares:
 - Image-J versión 1.44p
 - GraphPad Prism 5.01
 - EOS Utility (captura remota en microscopio)

3.2. Métodos

3.2.1. Ensayo de difusión

Preparación de soluciones: Se prepararon mezclas en tubos Eppendorfs (1,5 mL) entre las soluciones proteicas (saliva o BSA) y los reactivos enológicos (polifenoles o vinos) según correspondiera al experimento. 100 µl de solución proteica se mezclaron con volúmenes crecientes de reactivo enológico desde 2 a 1000 µl, obteniéndose diluciones en razón 1:0,02 hasta 1:10. Las diluciones específicas para cada ensayo se detallan más adelante. Paralelamente, se prepararon diluciones “control” en agua destilada. Una vez agregados los reactivos, cada tubo se agitó brevemente en vórtex y se dejó reposar aproximadamente 5 min a temperatura ambiente. Una alícuota de cada tubo fue cargada sobre una membrana de celulosa (esquema completo en **Figura 8A**).

Preparación de membranas de celulosas: Las membranas de celulosa de un tamaño adecuado se sujetaron a un soporte en posición horizontal, elevadas del mesón (aproximadamente 10 cm) y tensándolas, como se señala en la **Figura 8B**.

Carga de soluciones en membrana de celulosa: Se tomaron alícuotas de 15 µl de cada tubo con las mezclas y fueron depositadas lentamente, de manera puntual sobre la membrana, sin ejercer presión sobre esta. Una vez depositado el total de la alícuota en la membrana de celulosa, se permitió su plena difusión radial y se marcó con lápiz grafito el borde del círculo húmedo resultante de la difusión (frente de la difusión) (ver **Figura 8C**).

Tinción de membranas de celulosa: Las membranas de celulosa cargadas con las soluciones mezclas se procesaron para tinción de proteínas según la secuencia a continuación. Fijación en TCA 5% por 5 min, etanol 80% por 3 min y tinción en Coomassie Blue R-250 por 10 min, siempre con agitación mecánica suave. La destinción se realizó mediante 4 lavados en ácido acético 7%, consistentes en uno de 7 min en abundante volumen (descartable) y tres de 10 min con pequeños volúmenes (reutilizables). Finalmente, se realizaron 3 lavados cortos con agua potable para retirar el remanente de

ácido acético y se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel absorbente. El material proteico se aprecia teñido de color azul.

La marca realizada en el límite de la difusión concede un punto de referencia y el borde de áreas teñidas azul, otro. A partir de ambas marcas se definen los parámetros *área de difusión de la solución total* y *área de difusión de la fracción proteica*, correspondientemente. Una disminución en el área de difusión de la fracción proteica asociada a la presencia de polifenoles enológicos se empleó como indicativo de interacción entre componentes de la fracción proteica y los polifenoles correspondientes.

3.2.2. Ensayo de precipitación

Los tubos Eppendorf con las mezclas utilizadas en el ensayo de difusión se centrifugaron a 2000 rpm x 2 min (280 G). A partir de cada sobrenadante se cargaron 15 µl sobre una membrana de celulosa, y esta fue procesada para la detección de proteínas como se indicó anteriormente. En este ensayo, una disminución de la tinción es indicativa de precipitación. Esta observación fue complementada mediante la inspección visual de precipitado en los tubos (ver esquema de ensayo en **Figura 8A**).

En el ensayo de precipitación, se definió como un parámetro de la interacción entre proteínas y polifenoles enológicos el **punto de equivalencia** de la precipitación (Obrequé *et al.*, 2010). Se refiere a la dilución a la que las partes interactúan completamente mediante la formación de complejos insolubles, observándose que al cargar el sobrenadante no existe fracción proteica teñida en la membrana de celulosa. El punto de equivalencia consiste en la dilución a la que el polifenol (o el extracto tánico o el vino) logra precipitar la totalidad de la fracción proteica contenida en la suspensión proteica (saliva o BSA).

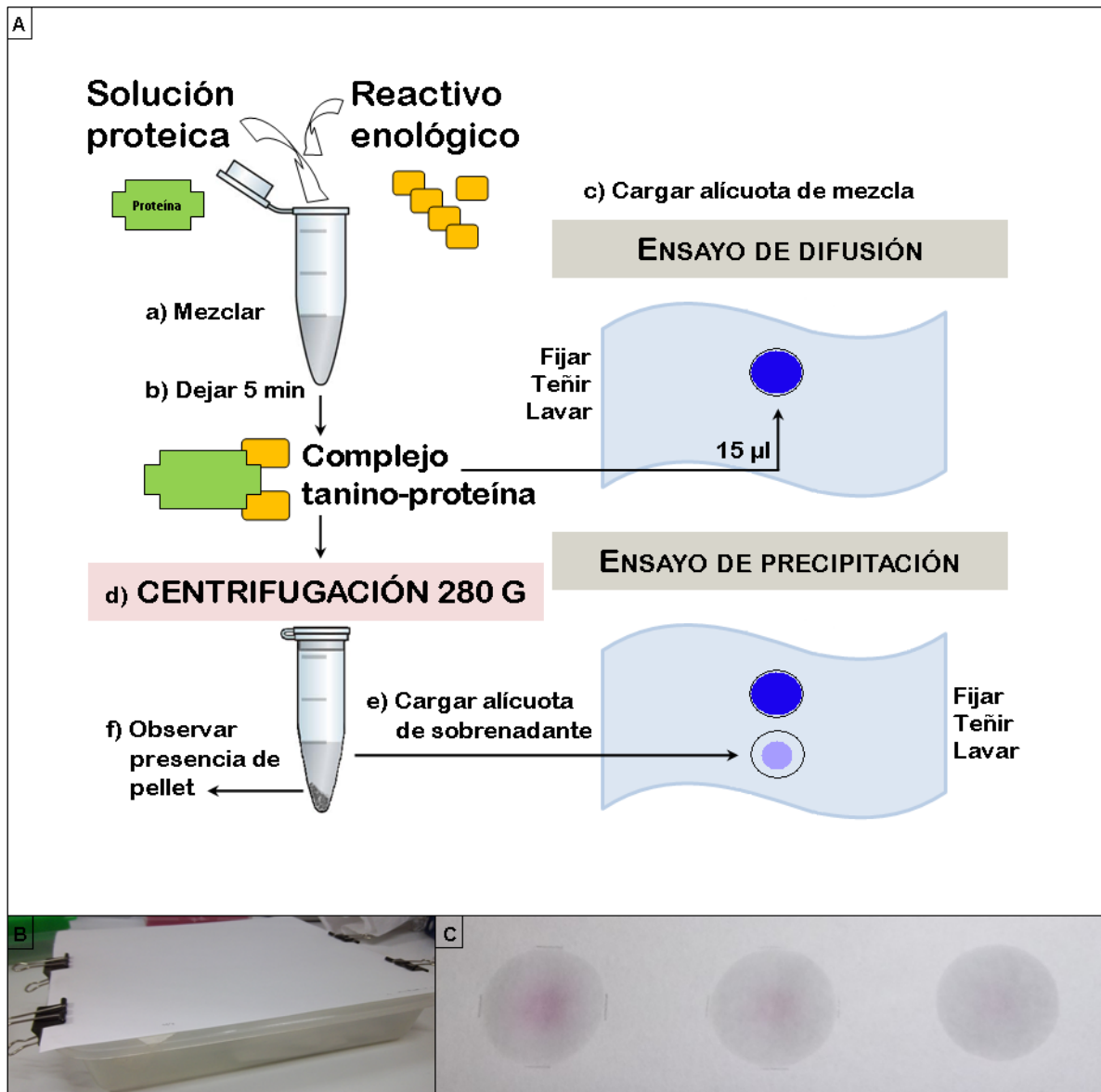


Figura 8. Protocolo de ensayos de difusión y de precipitación en membrana de celulosa. (A) Protocolo de Ensayo de difusión en a-b-c y de Ensayo de precipitación en d-e-f. **(B)** La superficie de celulosa disponible para cargar alícuotas debe estar sostenida en posición horizontal, tensa y sin contacto con el soporte. **(C)** Alícuotas cargadas en la membrana de celulosa. Se observan *spots* húmedos y la marca de grafito señalando el límite de la difusión.

3.2.3. Morfometría de imagen digital

Las membranas de celulosa teñidas, o sin tinción se escanearon para su análisis. Las imágenes digitalizadas fueron sometidas a análisis morfométricos mediante el software Image-J (para procesamiento de imagen y análisis).

Las membranas de celulosa se escanearon ajustando las imágenes a tamaño real, color 24 bits, resolución de 300 ppp y destamado general. Sólo para las membranas de celulosa sin teñir se aplicaron ajustes de contraste y brillo. La evaluación de las imágenes digitales en Image-J consistió, principalmente, en el estudio de la distribución de la intensidad de la tinción, realización de densitometrías y medición de las áreas de los *spots*. En cada ocasión, se realizó una calibración previa correspondiente a 117,5 píxeles = 1 cm. Todo análisis morfométrico fue realizado sobre la “imagen invertida”, de acuerdo a una función específica del software, procedimiento que permite mayor contraste y una mejor apreciación de las áreas de interés.

3.2.4. Protocolo de colección de saliva total humana

Se realizan 3 enjuagues bucales con agua potable. Se recolecta saliva en la cavidad bucal durante 1-2 minutos y se vacía en un frasco pequeño de vidrio. En ese período se almacena regularmente alrededor de 1 mL de saliva. Una vez recolectado el total de la muestra (habitualmente 10 mL), la saliva se centrifuga a 2000 rpm por 2 minutos (280 G). El sedimento formado (células exfoliadas, bacterias y material sólido) se descarta. El sobrenadante constituye la muestra de saliva total humana (STH). Se debe mantener tapada y todo momento en hielo.

3.2.5. Alteración de saliva total humana

Muestras frescas de saliva total humana fueron sometidas a dos tratamientos alternativos independientes. Uno consistió en la filtración de la saliva a través de filtros de 1 μm de tamaño de poro (*MS Glass fiber syringe filter*). El otro procedimiento consistió en la reducción química de la saliva empleando β -mercaptoetanol, adicionado a la saliva en

proporción 1:20, seguida por una centrifugación a 280 G por 2 min. Con ambos tratamientos se obtiene una saliva cualitativamente distinta de la saliva total humana, a la que denominaremos “saliva alterada”.

3.2.6. Cuantificación de proteínas: método de Bradford

La concentración de proteínas en las muestras de saliva se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). Para ello, se mezclan 50 µl de una solución problema (muestra o una dilución de ella) y de blanco (agua) con 1000 µl de reactivo de Bradford 1X. Luego de 5 min, se lee la Absorbancia a 595 nm en espectrofotómetro, ajustado previamente a 0,00 con el blanco.

Se construyó una curva de calibración con BSA 1 mg/ml para determinar el rango óptimo de linealidad del sistema (**Figura 1**, en Material Complementario). Para ello, se usaron diluciones de BSA de 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400 y 500 µg/ml. De las absorbancias obtenidas, se buscó el rango que tuviera mejor regresión lineal. Se obtuvo un coeficiente $r^2 = 0,9967$ en el rango de absorbancias $0,05 > \text{Absorbancia} < 0,5$.

Para las determinaciones, se preparó un stock de estándar de proteína BSA de concentración 170 µg/ml, la que se empleó como patrón en cada determinación de las muestras salivales. A pesar de que la concentración de proteínas en la saliva varía, se estableció preliminarmente que una dilución 1:6 de STH en agua destilada tiene una absorbancia dentro del rango óptimo de detección. Así, la cuantificación de proteínas de la saliva se realizó en forma sistemática midiendo, en triplicado, STH 1:6 y BSA 170 µg/ml. Según la absorbancia arrojada para el BSA 170 µg/ml se determinó la concentración de proteínas en STH. La **Tabla 1**, en Material Complementario, es un ejemplo de estas mediciones.

3.2.7. Microdeseccados

Microdeseccados es la denominación del estudio de alícuotas de fluidos biológicos complejos secadas sobre portaobjeto a temperatura ambiente y sin tinción, empleando

microscopía óptica de campo oscuro. En estas condiciones, habitualmente se observan estructuras cristaloides altamente reproducibles y propias del fluido en observación.

Para la preparación de un microdesechado, se depositó sobre portaobjeto 1 μ l de cada "solución mezcla" (soluciones proteicas más reactivos enológicos) y de cada "solución control" (reactivos puros o su dilución en agua destilada), en triplicado. Estas muestras, se dejaron secar a temperatura ambiente y se observaron en microscopio óptico con objetivos de aumento 2,5X y 5X, para observación del microdesechado completo, y aumentos 10X y 40X para observación de detalles, empleando campo oscuro. En este tipo de microscopía, las estructuras cristalinas o cristaloides reflejan la luz. En el caso de la saliva se puede apreciar la ordenación del entramado salival y sus modificaciones en presencia de reactivos enológicos.

4. RESULTADOS

4.1. Implementación de un protocolo para el análisis cuantitativo de interacciones polifenoles-proteínas basado en un ensayo de difusión de proteínas sobre membrana de celulosa

4.1.1. Difusión de suspensiones proteicas, polifenoles enológicos y vinos sobre membranas de celulosa

Difusión de una proteína modelo en membrana de celulosa

Alícuotas de diluciones crecientes de BSA 1 mg/ml en agua destilada (**Tabla 6**) fueron cargadas ordenadamente en una membrana de celulosa. La membrana de celulosa fue procesada para la detección de proteínas con colorante Coomassie Blue (CB) y digitalizada (ver **Figura 9**). Dicho ensayo se realizó en triplicado y en cada ocasión se incluyó también un spot de agua destilada como control del solvente y un spot de control interno de la celulosa. Este “control interno” fue integrado para eliminar las variaciones que se dan entre distintas membranas de celulosa, no atribuibles a las condiciones experimentales. A grueso modo, factores como la humedad y la temperatura ambiental pueden perturbar la difusión y la intensidad de tinción por efecto sobre los reactivos proteicos o por efecto sobre la membrana de celulosa. Adoptando un control interno, los resultados se pueden independizar de estas variaciones. Se escogió emplear el estándar BSA 1 mg/ml como control interno de cada ensayo en membrana de celulosa y normalizar los resultados con este patrón. En este ensayo de difusión de una proteína modelo, en la **Figura 9**, el spot de BSA 1 mg/ml es redundante ya que aparece primero como el control de difusión de la solución proteica y aparece último como el control interno. Cargarlo constituye una práctica sistemática de los protocolos en membrana de celulosa.

Se observa en la **Figura 9**, que el spot de agua como control del solvente también es un control negativo de proteínas. Su intensidad de tinción es prácticamente igual a la del *background* de la membrana de celulosa (tinción residual o inespecífica).

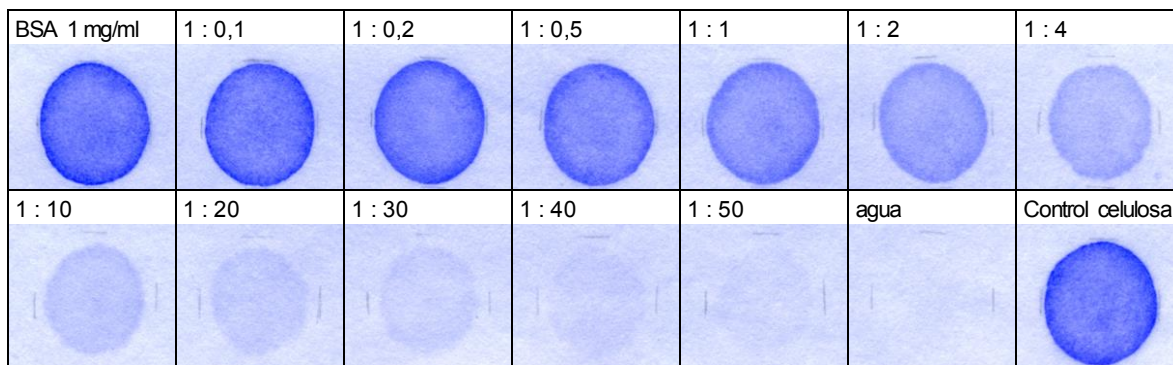


Figura 9. Difusión de diluciones de BSA en agua sobre membrana de celulosa. Una serie de diluciones crecientes de BSA en agua destilada fue cargada en membrana de celulosa y procesada para detección de proteínas (tinción CB). A medida que aumenta la dilución, la intensidad de la tinción va disminuyendo. Por otra parte, el tamaño de la superficie teñida también disminuye. Con las diluciones mayores, se observa que la marca de grafito (solución total) se separa de la fracción proteica (teñida azul), indicando que el agua difunde más que la proteína teñida. A diluciones altas, como 1:40, nos acercamos al límite de detección del método, debido a que la tinción pasa a ser muy similar a la del *background* de la membrana de celulosa.

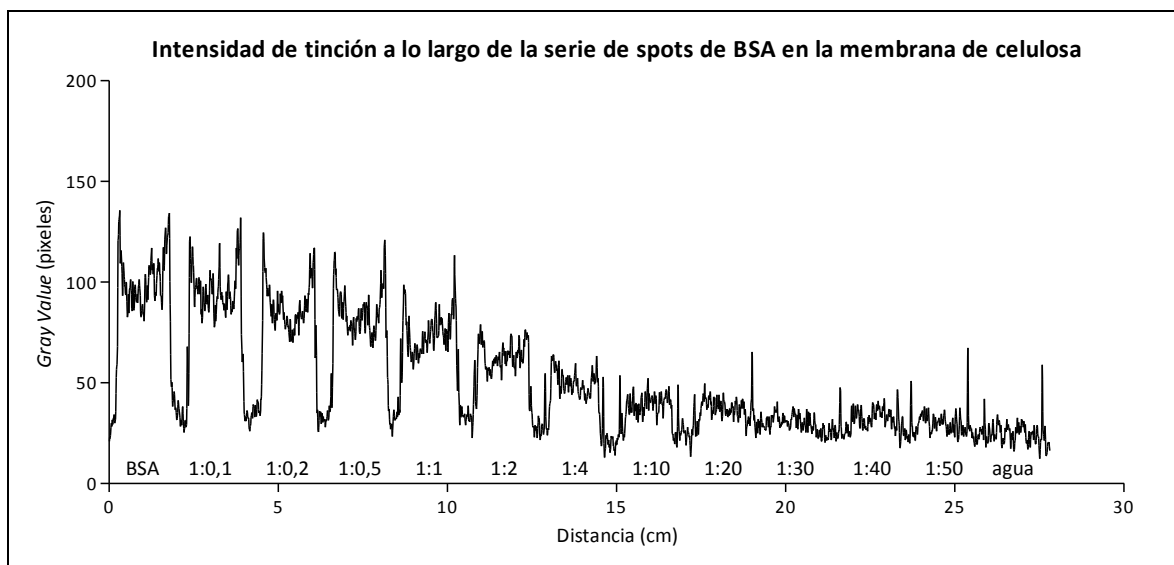


Figura 10. Densitograma de difusión de diluciones de BSA sobre membrana de celulosa. La intensidad de tinción (*Gray Value*) va disminuyendo a medida que se recorren los spots (**Figura 9**) de izquierda a derecha, es decir con el aumento de la dilución. Esto es coherente con la disminución de la cantidad de proteína en cada alícuota. Los *peaks* agudos corresponden a la marca de grafito que identifica el frente de difusión de la solución.

De acuerdo a la tinción, la distribución de la fracción proteica en cada spot es en gran parte homogénea (excepto un ligero reforzamiento en el frente de difusión), no hay agregaciones, no existe retención por parte de la celulosa o interferencia de la difusión. A este modo de difusión de la proteína BSA se le ha denominado **difusión monofásica**. Ésta es una característica persistente de la proteína modelo. El densitograma de la **Figura 10** muestra que la difusión es monofásica a dilución infinita, considerando que la curva que describe la intensidad de tinción (*Gray Value*) en el recorrido de la membrana de celulosa tiene forma de planicie al pasar por cada uno de los spots. En el densitograma también podemos apreciar una disminución de la intensidad de la tinción en los spots a medida que aumenta la dilución.

Se realizó análisis morfométrico a cada spot presente en las membranas de celulosa. De la medición de las áreas teñidas y de las áreas delimitadas por la marca de grafito se determinaron el área relativa (normalizada por el control interno) de difusión de la solución total y el área relativa de difusión de la fracción proteica. El comportamiento de las áreas de difusión a medida que aumenta la dilución se muestra en el gráfico de la **Figura 11**. Esta indica que el área relativa de difusión de la solución total es en gran parte constante y al incrementarse la dilución la difusión de la solución total aumenta. El aumento del área de difusión de la solución total es significativo en la dilución 1:10, equivalente a 0,091 mg/ml de BSA (ver en **Tabla 2** de Material Complementario) y en las diluciones mayores que esta ($p < 0,001$, *one way-ANOVA*). El área de difusión de la fracción proteica corresponde al área con tinción CB positiva. La **Figura 11** muestra que el área relativa de difusión de la fracción proteica disminuye con una dilución 1:4 (equivalente a 0,200 mg/ml de BSA) y con las diluciones por sobre ésta, de manera significativa con $p < 0,001$ de acuerdo a *one way-ANOVA*. La presencia de menor contenido proteico en este rango, a su vez, facilitaría la retención por parte de la membrana de celulosa, observándose la disminución del área de difusión de la fracción proteica sólo por efecto de estas diluciones.

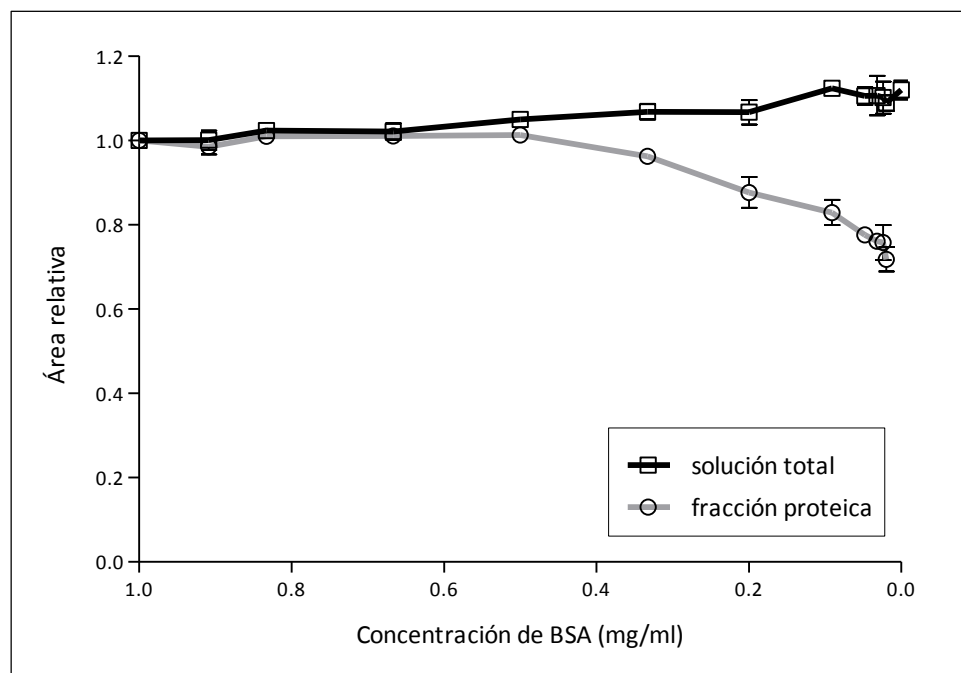


Figura 11. Efecto de la dilución sobre el área de difusión de BSA en membrana de celulosa. El gráfico muestra el área relativa (área normalizada por control interno de celulosa) \pm SD versus la concentración de la proteína modelo, con dos criterios: según el área de la solución total (marcada por grafito) y según el área determinada por la fracción proteica (teñida azul). El área de difusión de la solución total aumenta a medida que la dilución es mayor, mientras que el área de difusión de la fracción proteica va disminuyendo a medida que el agua tiene mayor presencia en la alícuota.

Difusión de saliva total humana en membrana de celulosa

Se prepararon diluciones crecientes de saliva total humana (STH) en agua destilada (**Tabla 3** en Material Complementario) y se realizó un ensayo de difusión en membrana de celulosa. Cuando estudiamos el spot correspondiente a la alícuota de muestra salival total vemos que tiene un comportamiento característico de difusión sobre membrana de celulosa (**Figura 12**). La saliva total humana difunde de manera radial en la membrana de celulosa dejando en evidencia dos fases. Una fase se encuentra mayormente retenida en el centro y tiene una tinción muy marcada, mientras que la otra fase alcanza mayor radio de difusión, presenta menor tinción y difunde con el frente de la difusión. La primera, constituye la **Fase no difusible** y, la última, la **Fase difusible** del contenido proteico en la saliva total humana. Consecuentemente, decimos que la saliva humana tiene **modo de difusión bifásica** sobre membrana de celulosa. Esta distribución en la membrana de celulosa es distinta a la que presentan las fracciones proteicas de otros fluidos similares (glicoproteicos), como la lágrima humana o la saliva murina, de difusión monofásica.

La **Figura 13** muestra los spots en la membrana de celulosa teñida ordenados según la dilución realizada. Cuando la dilución de la saliva es de 1:1, la fracción proteica se separa del frente de difusión y este comportamiento se acentúa con el aumento de las diluciones. Un análisis densitométrico complementario (**Figura 14**), permitió establecer que el carácter bifásico de la saliva no es detectable en las diluciones superiores a 1:4, y que, además, la dilución 1:10 presenta una intensidad de tinción baja. Paralelamente, el spot de esta dilución en la membrana de celulosa (**Figura 13**) carece de un frente de difusión definido, lo cual dificulta la identificación de la zona teñida comprometiéndose el análisis morfológico de la saliva desde esta dilución.

A partir de cada spot sobre la membrana de celulosa se realizó el análisis morfométrico y se determinó el área relativa (normalizada por el control interno) de difusión de la solución total y el área relativa de difusión de la fracción proteica de la saliva total humana. El comportamiento de las áreas de difusión a medida que aumenta la dilución se muestra en el gráfico de la **Figura 15**.

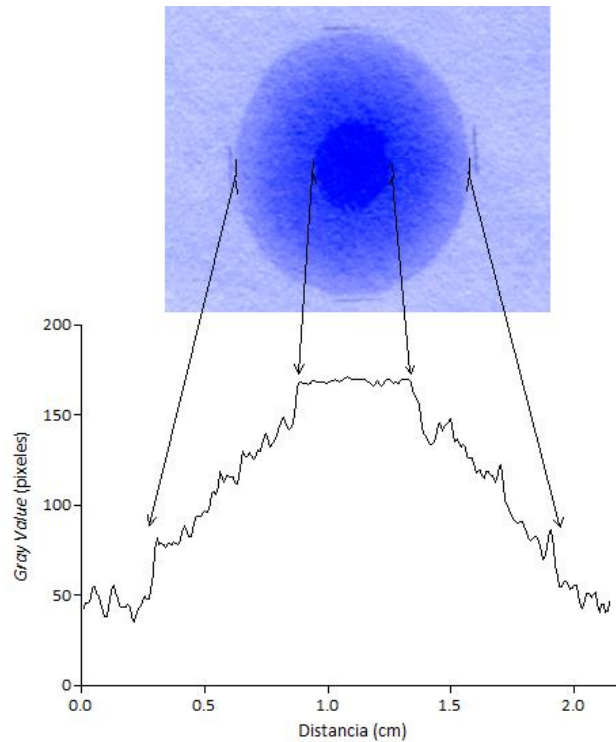


Figura 12. Densitograma del spot de saliva total humana en difusión sobre membrana de celulosa. La curva muestra la intensidad de tinción (*Gray Value*) en el recorrido del spot de STH de izquierda a derecha. La saliva total presenta un modo de difusión bifásico en membrana de celulosa. La Fase no difusible se encuentra retenida en el centro y posee mayor tinción, y la Fase difusible migra más que la fase no difusible y presenta menor intensidad de tinción según la proximidad al borde del spot (frente de la difusión). El peak correspondiente a una alícuota de saliva sin diluir está conformado, básicamente, por una meseta central (fase no difusible) montado sobre una base de tinción progresivamente creciente desde el borde hasta el punto de contacto con la fase no difusible. Este punto de contacto queda definido por el incremento abrupto de la tinción del material no difusible.

Saliva total	1 : 0,1	1 : 0,5	1 : 1	1 : 2
1 : 4	1 : 10	1 : 20	agua	Control celulosa

Figura 13. Difusión de diluciones de saliva total humana en agua sobre membrana de celulosa. La dilución de la saliva no afecta su modo de difusión bifásico. Sin embargo, la intensidad de la tinción CB positiva de cada fase va disminuyendo conforme aumenta la dilución. En este ensayo, las fases difusible y no difusible son indistinguibles en una dilución 1:10 y sobre esta. (Control celulosa: BSA 1 mg/ml).

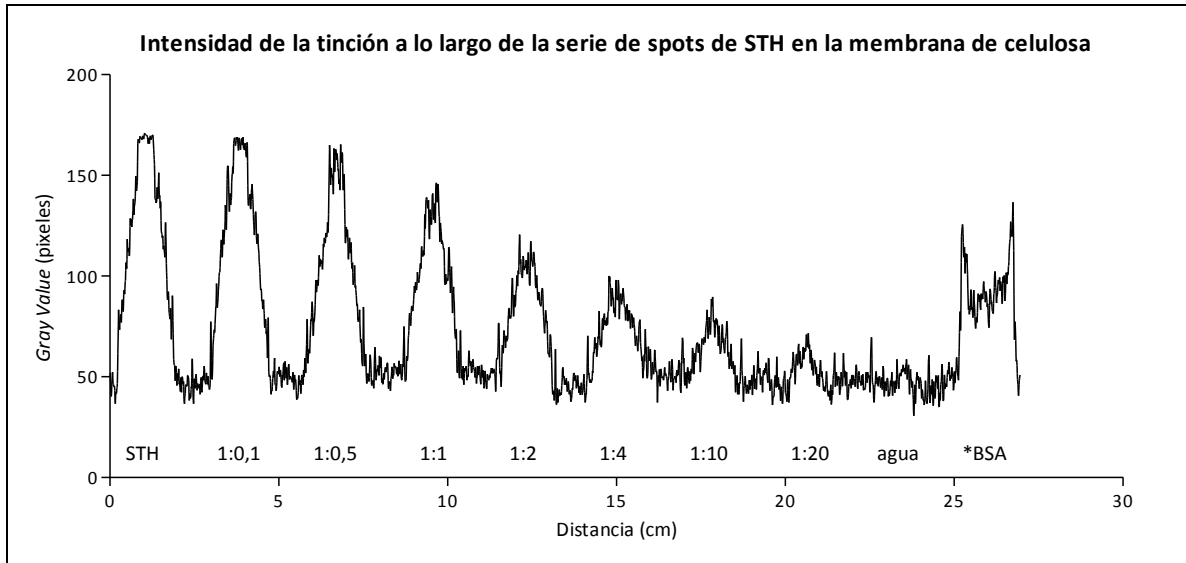


Figura 14. Densitograma de difusión de saliva total humana sobre membrana de celulosa. Se observan los peaks de *Gray Value* de cada spot correspondiente a la membrana de celulosa que se muestra en la **Figura 13**. La distribución bifásica de la saliva humana se pierde con las diluciones mayores. (*BSA 1 mg/ml, control interno de celulosa)

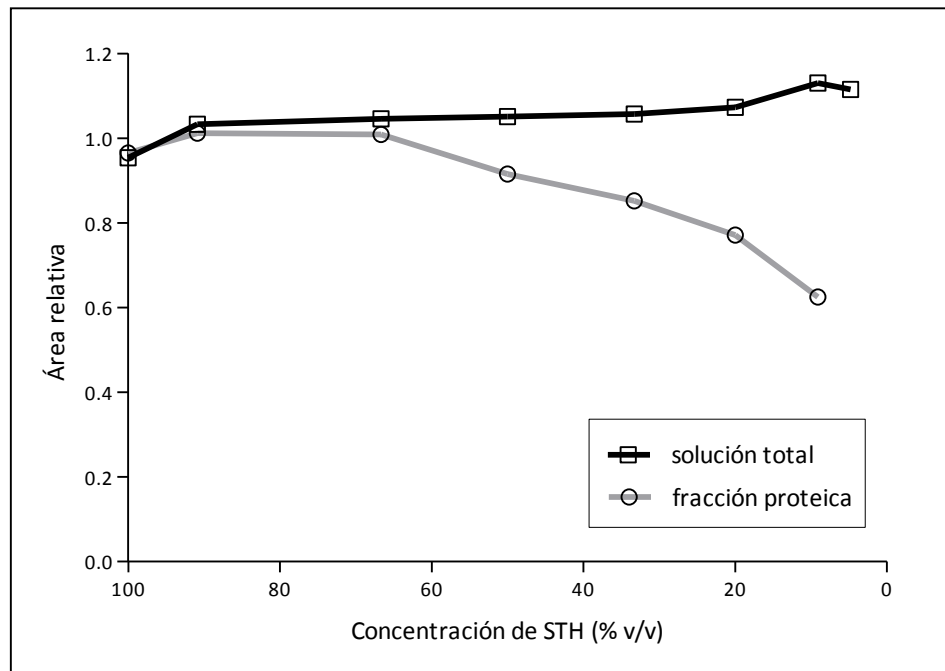


Figura 15. Efecto de la dilución en agua sobre el área de difusión de STH en membrana de celulosa. El gráfico muestra el área relativa (normalizada por control interno de celulosa) versus la concentración de la saliva en la mezcla, de acuerdo al área de la solución total (marcada por grafito) y de acuerdo al área de la fracción proteica (teñida azul). El área de difusión de la solución total aumenta a medida que la dilución es mayor, mientras que el área de difusión de la fracción proteica va disminuyendo a medida que el agua tiene mayor presencia en la alícuota. Con 4,8% v/v de STH en la mezcla, no se distingue fracción proteica (punto no graficado).

El área de difusión de la solución total corresponde a la zona definida mediante marcas de grafito en las membranas de celulosa. La **Figura 15** muestra que el área relativa de difusión de la solución total aumenta tempranamente con la mínima dilución, luego se mantiene constante y, al disminuir la concentración a 9,1% v/v de saliva (dilución 1:10, ver **Tabla 3** en Material Complementario) el área de difusión de la solución total aumenta.

El área de difusión de la fracción proteica corresponde al área con tinción CB positiva en las membranas de celulosa. La **Figura 15** muestra que el área relativa de difusión de la fracción proteica también aumenta con la primera dilución, pero luego tiende a disminuir con cada dilución desde 1:1, es decir, cuando la concentración de saliva en la mezcla es de 50% v/v. Dicha disminución precede a la caída de la curva observada para la proteína modelo BSA (en dilución 1:4), mostrada anteriormente (**Figura 11**). En este caso, también la presencia de menor contenido proteico facilitaría la retención por parte de la membrana de celulosa, observándose la disminución del área de difusión de la fracción proteica sólo por efecto de realizar estas diluciones. Sin embargo, para la muestra salival la retención es más potente que para la proteína BSA, manifestándose antes (con una menor dilución) y produciendo mayor disminución del área relativa de la fracción proteica.

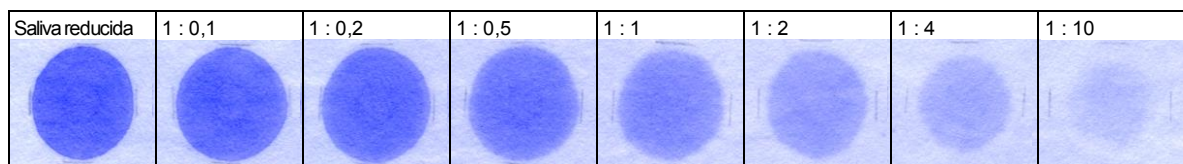
De acuerdo a esto, la evaluación de la difusión de saliva total humana sobre membrana de celulosa posee rango óptimo. Por un lado, este corresponde al rango en que se puede identificar su modo de difusión bifásico (diluciones hasta 1:4), un atributo representativo de este fluido. Por otro lado, hemos visto que la membrana de celulosa no es inerte, por lo que esta variable (afinidad) a diluciones de saliva sobre 1:1 incorpora un efecto sobre la difusión de consideración particular. Y, por último, los resultados indican que en ensayo de difusión sobre membrana de celulosa la saliva es más susceptible a la dilución que la proteína BSA, quedando inhabilitada su evaluación mediante este ensayo con una menor dilución (límite de detección 1:10 versus 1:40 para BSA) y esto no guarda relación con la cantidad de proteína presente en las alícuotas (**Tablas 2 y 3** en Material Complementario). Dichas diferencias en cuanto a modo de difusión, afinidad y límite de detección entre saliva y BSA, también, condicionan la comparación entre ambas suspensiones proteicas.

Difusión de “saliva alterada” en membrana de celulosa

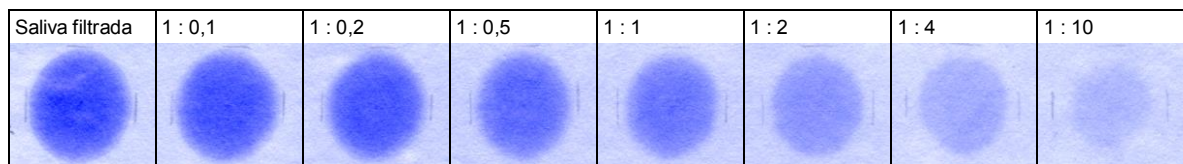
Se estudió el modo de difusión de preparaciones de saliva reducida (con β -mercaptoetanol) y de saliva filtrada (1 μm de ancho de poro), cargando en membrana de celulosa alícuotas de diluciones crecientes en agua de ambos tipos de saliva alterada (**Figura 16**). La saliva reducida y la saliva filtrada, conjuntamente, presentaron modo de difusión monofásico. Con ambos tratamientos, reducción y filtración, desaparece la fase no difusible de los spots de difusión sobre membrana de celulosa. En cuanto a la reducción, el tratamiento con β -mercaptoetanol interrumpe los enlaces disulfuro presentes entre las mucinas de la saliva. Mediante estas uniones las mucinas sostienen la red macromolecular que le da el carácter viscoelástico a la saliva total humana. La “saliva reducida” es por tanto una saliva carente de esa fracción macromolecular articulada, físicamente más líquida (observación operacional) y no presenta fase no difusible al difundir en membrana de celulosa. El contenido que formaba parte de la fase no difusible ahora migra, presumiblemente, con el frente de la difusión, debido a que se remarcó considerablemente revelando un aumento de su contenido proteico. El material proteico de la fase no difusible desarmada pasó a formar parte de la fase difusible (**Figura 16a**) (aumenta el área de difusión y la intensidad de tinción, mediciones no mostradas). A su vez, con la filtración se retiró la fracción macromolecular que compone la fase no difusible. La ausencia de esta fracción macromolecular no afectó la difusión de la fase difusible (**Figura 16b**).

El estudio de la difusión de saliva alterada sobre membrana de celulosa aporta antecedentes para la comprensión de la interacción entre la saliva y las membranas de celulosa. Cuando se refuerza la fase difusible por el desarme de la fase no difusible se evidencia que la separación de la fracción proteica de la saliva en dos fases responde a una diferencia en su nivel de organización y, además, la separación ocurriría por una diferencia de tamaño, en vista del efecto de la filtración. Vinculando esto con el antecedente anteriormente expuesto acerca de la retención de la fracción proteica por parte de la membrana de celulosa, se infiere que la difusión de la saliva depende, al

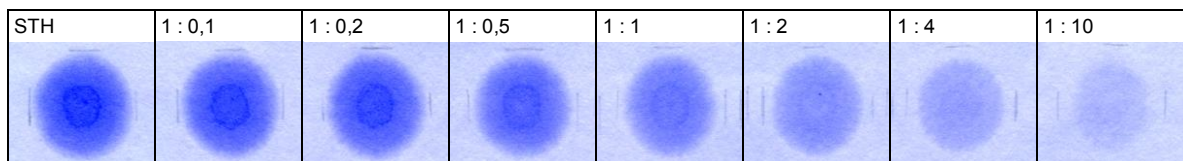
menos, de dos aspectos: tamaño y afinidad. Estos antecedentes refuerzan la noción de la saliva como una suspensión proteica altamente organizada. El material no difusible es un material grande, en la medida en que ante una filtración bastante gruesa ($1\ \mu\text{m}$) esta fase es eliminada. En suma, vemos que la saliva fisiológica es altamente estructurada, cuando menos, vía enlaces disulfuro. La desorganización evidencia que existe un atributo observable en la membrana de celulosa que tiene que ver con la organización de la saliva.



a) Saliva reducida



b) Saliva filtrada



c) Saliva total, control

Figura 16. Difusión de diluciones saliva alterada en agua sobre membrana de celulosa. Efecto de la dilución en agua sobre saliva a) reducida, b) filtrada y c) total. La saliva alterada química o físicamente tiene modo de difusión monofásico, a diferencia de la difusión de la saliva total que es de carácter bifásico. Las diluciones progresivamente crecientes de izquierda a derecha se señalan en proporciones saliva:agua (detalle en **Tabla 4**, Material Complementario).

Difusibilidad de vinos en membrana de celulosa

Los vinos tintos tienen un intenso color rojo. Valiéndonos de esto, se observaron sus propiedades de difusión sobre membranas de celulosa sin teñir. Para ello, se realizó un estudio de alícuotas de 15 μ l de cada vino, sin diluir y se observó el patrón de difusión en membranas de celulosa sin tinción (ver **Figura 17**).

Las alícuotas de los distintos vinos tintos en las membranas de celulosa pre-tinción, mostraron una distribución heterogénea de su(s) colorante(s) (antocianos). El vino blanco ensayado no mostró coloración (**Figura 17**). Frecuentemente, una parte importante de las antocianinas* se encuentran unidas covalentemente y/o no covalentemente con los taninos del vino. De esta manera, la coloración heterogénea de las manchas derivadas de las alícuotas de vino sobre las membranas de celulosa sería indicativa de la presencia de antocianos y taninos del vino.

Luego de depositar las alícuotas de los distintos vinos en las membranas de celulosa, se realizó la segunda parte del estudio sometiéndolas a tinción para proteínas. Los spots correspondientes a vinos tinto inicialmente violáceos y heterogéneos adquirieron una coloración azul, especialmente en los sectores más centrales (menos difusibles) (“Tinción CB” en **Figura 17**). El vino blanco no presentó tinción. La reactividad observada entre el Commassie Blue y los vinos en la membrana de celulosa es relativamente baja y, además, difusa en comparación con una suspensión proteica.

Difusibilidad de polifenoles en celulosa

Se estudió la coloración que pudiesen aportar algunos polifenoles de interés enológico. De los polifenoles empleados para esta investigación, unos son extractos comerciales (ácido tánico), mientras que otros corresponden a moléculas estándares “puras” (catequina y ácido gálico). Alícuotas (15 μ l) de las soluciones de polifenoles fueron depositadas en membrana de celulosa. Dichas membranas fueron estudiadas previamente a la tinción y una vez que fueron procesadas para la identificación de proteína (**Figura 18**). En el primer

* Antocianina corresponde a la forma glicosilada del antociano.

caso (celulosa pre-tinción), la única solución que presentó algún grado de coloración propia fue catequina 4 mg/ml, con un leve color amarillo en la zona central del spot. Así, existiría cierto nivel de retención de la catequina por parte de la membrana de celulosa. En el caso siguiente (post-tinción), no se encontró tinción significativa sobre las zonas de las alícuotas de ninguno de los polifenoles ensayados, a excepción de una muy ligera coloración en el centro del depósito de la solución de ácido tánico.

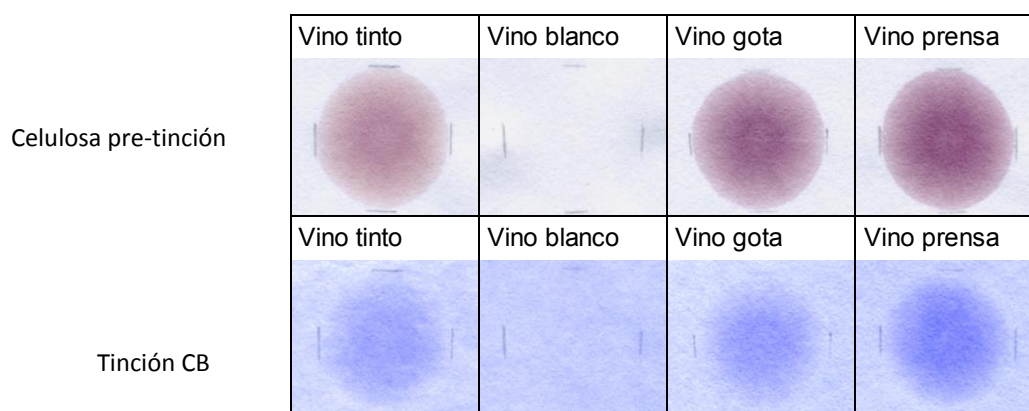


Figura 17. Caracterización de la difusión de vinos sobre membrana de celulosa. En el panel superior se muestran los spots de los vinos empleados para esta investigación, depositados (15 μ l) sobre una membrana de celulosa. Al teñir las membranas de celulosa (panel inferior) se observa coloración azul para todos los vinos tintos (vinos “tinto”, “gota” y “prensa”). El vino blanco no presenta coloración.

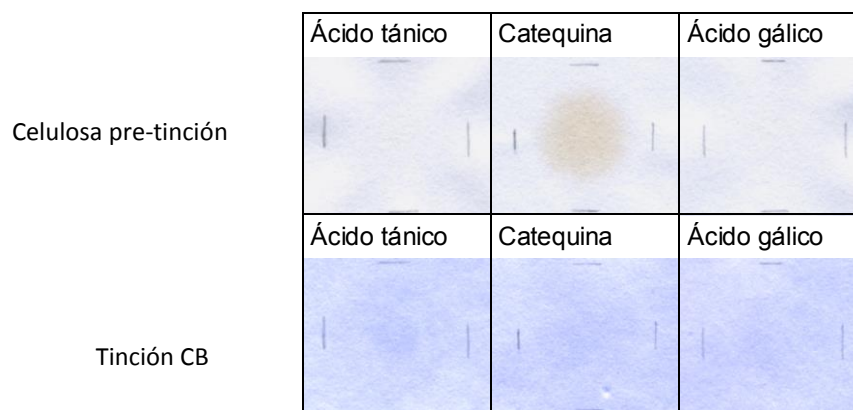


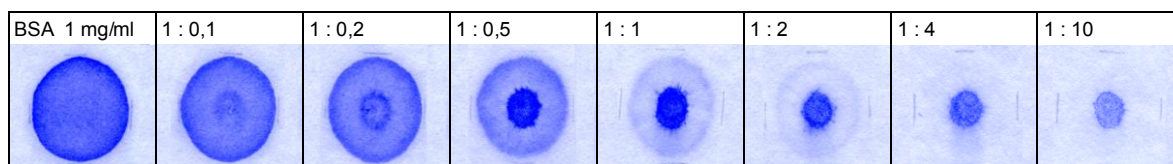
Figura 18. Caracterización de la difusión de polifenoles sobre membrana de celulosa. Se depositaron alícuotas (15 μ l) de las soluciones de polifenoles empleadas para la investigación, soluciones ácido tánico 1 mg/ml, catequina 4 mg/ml y ácido gálico 1 mg/ml. En el panel superior se muestra la membrana de celulosa previa a la tinción y en el panel inferior se muestra la membrana sometida a tinción con Coomassie Blue. No se apreció reactividad importante con el colorante.

4.1.2. Interacción proteína-polifenoles: empleo de membranas de celulosa

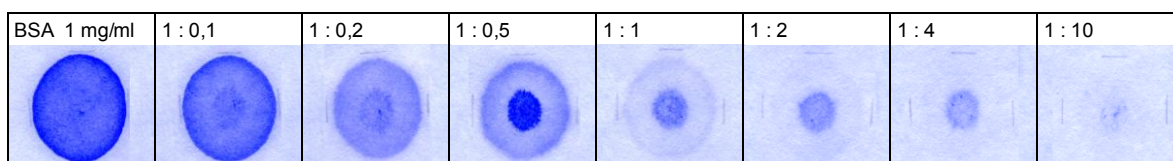
Efecto del ácido tánico sobre la difusión y la precipitación de BSA

Conociendo que los taninos interactúan fuertemente con las proteínas, se estudió el efecto de una solución de ácido tánico 1 mg/ml sobre la proteína modelo BSA empleando como criterios su modo de difusión sobre membranas de celulosa y la precipitabilidad observada en presencia del polifenol, a través del ensayo de precipitación en membrana de celulosa y la detección visual de sedimentos (complejos precipitados). En primer lugar, para el ensayo de difusión, alícuotas de diluciones crecientes de BSA en ácido tánico 1 mg/ml se depositaron en membrana de celulosa (**Figura 19a**) y, a continuación, para el ensayo de precipitación se centrifugaron las mezclas (280 G) y se estudió la distribución de la proteína en la membrana de celulosa (tinción CB), comparada con la difusión inicial (**Figura 19b**). A diluciones pequeñas el ácido tánico modifica marcadamente el modo de difusión monofásico del BSA. A diluciones mayores, se produce restricción de la difusión, la que fue interpretada como indicador de la interacción fisicoquímica entre el ácido tánico y la proteína. Tras la centrifugación de las mezclas a 280 G (**Figura 19b**) estas interacciones conducentes a la formación de complejos taninos-proteínas fueron confirmadas por la aparición de sedimentos (complejos taninos-proteínas insolubles) (ver **Tabla 7**). Además, el ensayo de precipitación (**Figura 19b**) muestra que en la dilución 1:10 ya no es posible identificar proteína, el ácido tánico presente produjo su precipitación total.

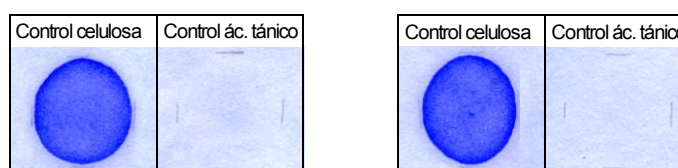
Por lo tanto, el ácido tánico altera la difusión mediante un “efecto antidifusor” y produce la precipitación de BSA, en vista de que el área de distribución de la fracción proteica disminuye conforme aumenta la concentración de polifenol en la mezcla y de que un punto entre las diluciones 1:4 y 1:10 correspondería al punto de equivalencia de la precipitación entre ácido tánico y BSA.



a) Ensayo de difusión: BSA + ácido tánico



b) Ensayo de precipitación: sobrenadantes de BSA + ácido tánico



c) Controles: Ensayo de difusión post-centrifugación

Figura 19. Ensayos de difusión y de precipitación de BSA en presencia de ácido tánico. (a) Se depositaron alícuotas de 15 μ l de diluciones crecientes de BSA en ácido tánico 1 mg/ml sobre membrana de celulosa y esta se procesó para detección de proteínas con Coomassie Blue (diluciones y concentración de proteína BSA son equivalentes a las empleadas en otros ensayos, se pueden revisar en **Tabla 2** de Material Complementario). La interacción BSA-ácido tánico altera el modo de difusión de la proteína sobre la membrana de celulosa y a medida que aumenta el ácido tánico en las mezclas, interfiere con la difusión restringiéndola. (b) Tras una centrifugación (280 G, 2 min) el spot 1:10 de sobrenadante cargado en la celulosa no exhibió proteína, indicando que en esta dilución el ácido tánico presente es capaz de precipitar su totalidad. (c) Los controles cargados fueron solución de BSA 1 mg/ml como control interno de la celulosa y solución de ácido tánico 1 mg/ml como control del agente diluyente empleado. Ambos, difunden de manera idéntica pre y post-centrifugación, es decir, no se ven afectados por el ensayo de precipitación. Particularmente, el ácido tánico no interactúa con el colorante.

Tabla 7. Presencia de precipitado observable en diluciones de BSA en ácido tánico. Diluciones crecientes de BSA en ácido tánico fueron sometidas a centrifugación leve (Ensayo de precipitación, **Figura 19**) y se registró la presencia de precipitados en los tubos de reacción en esta tabla. La apreciación de sedimentos es consistente con las interacciones observadas en los ensayos sobre membrana de celulosa (**Figura 19**). (x = ausencia; \checkmark = presencia; \checkmark = presencia escasa)

Dilución	BSA	1:0,1	1:0,2	1:0,5	1:1	1:2	1:4	1:10
Observación de precipitado	x	x	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark	\checkmark

Efecto de un vino tinto comercial sobre la difusión y la precipitación de BSA

Se evaluó la reactividad entre BSA y vino tinto en ensayos de difusión y precipitación sobre membrana de celulosa. Para explorar el rango en que ocurrirían las interacciones se prepararon las mismas diluciones de experimentos anteriores (**Tabla 2**, Material Complementario) ahora con vino tinto como solución aditiva. La matriz vínica está compuesta por varios componentes que potencialmente podrían interactuar con BSA o alterar las interacciones ya establecidas. Un control apropiado en este caso sería otra matriz vínica, carente de o escasa en taninos, como un vino blanco.

En el ensayo de difusión en presencia de vino blanco (“control enológico”) se observó una leve disminución de la difusión de BSA detectable desde las más bajas concentraciones de vino presentes (**Figura 20a**). En todas las concentraciones ensayadas la difusión de la proteína persistió siendo monofásica. Por otra parte, en el ensayo de difusión las características de los spots de mezclas vino blanco-BSA fueron idénticas a los spots de sobrenadantes correspondientes cargados en el ensayo de precipitación (**Figura 20b**). En otras palabras, el vino blanco no fue capaz de provocar la precipitación de BSA bajo ninguna condición estudiada. En contraste, el vino tinto afectó drásticamente el modo de difusión de BSA desde la más baja concentración empleada. Este efecto antidifusor fue en gran medida consistente con la disminución de la tinción (relación 1:0,1; **Figura 20c**) o desaparición (relaciones 1:0,2 y 1:0,5; **Figura 20d**) de proteína desde los sobrenadantes correspondientes. Es decir, componentes del vino tinto interactúan con BSA produciendo un efecto antidifusor y, a concentraciones mayores, la precipitan totalmente. Cabe destacar que se observó precipitado en los tubos de reacción en todas las diluciones con vino tinto estudiadas.

Se realizó un nuevo experimento incluyendo un rango más amplio de las concentraciones bajas de vino, donde se vio que ocurre el efecto antidifusor, y de las concentraciones cercanas al posible punto de equivalencia de la precipitación entre vino tinto y BSA. Como controles, se prepararon las diluciones en vino blanco y en agua (ver detalle en **Tabla 8**).

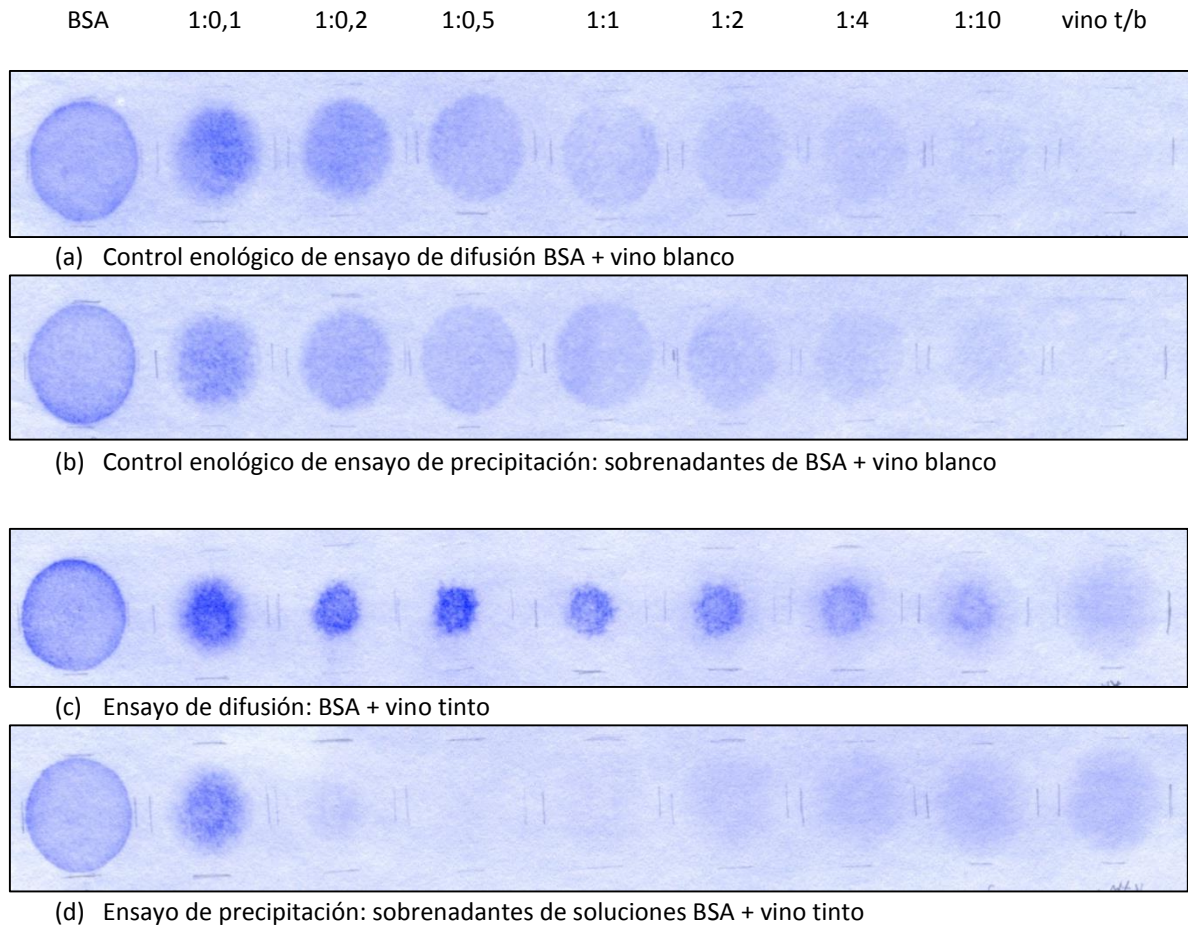


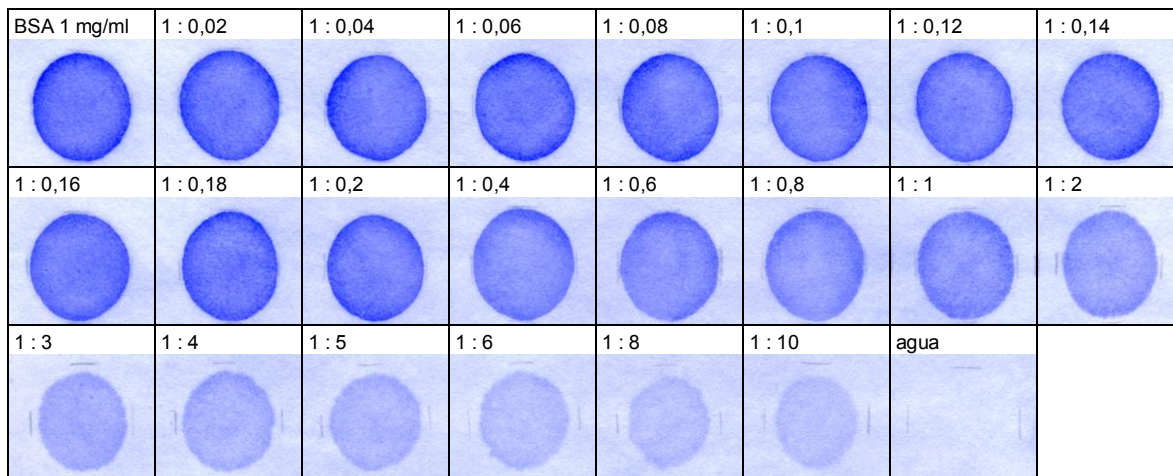
Figura 20. Ensayo de difusión y de precipitación de BSA en presencia de vino tinto: rango explorativo. La solución estándar de BSA fue mezclada en las relaciones de volumen que se indican arriba, con vino blanco (paneles a y b) y con vino tinto (paneles c y d). Se depositaron sobre membrana de celulosa y se estudió la distribución de proteína sobre membrana de celulosa (tinción CB). (a) El vino blanco disminuye ligeramente la difusión de BSA, inicialmente. Sin embargo, no altera el modo de difusión monofásico de la proteína. (c) El vino tinto altera drásticamente la difusión de BSA restringiéndola. Al someter las mezclas a centrifugación, (c) vino blanco no produce la disminución de la tinción CB, indicando que el vino blanco no ejerce un efecto precipitante sobre BSA. Mientras que, (d) el vino tinto logra precipitar totalmente el BSA.

En la **Figura 21** se presenta una de las tres repeticiones del ensayo de difusión de mezclas entre BSA y vino tinto, mostrando los spots de la membrana de celulosa control (dilución en agua), de la membrana de celulosa del control enológico (dilución en vino blanco) y de la membrana de celulosa correspondiente a las diluciones de BSA en vino tinto. Cualitativamente, el modo de difusión de BSA en solución no es alterado por las diluciones en agua (**Figura 21a**).

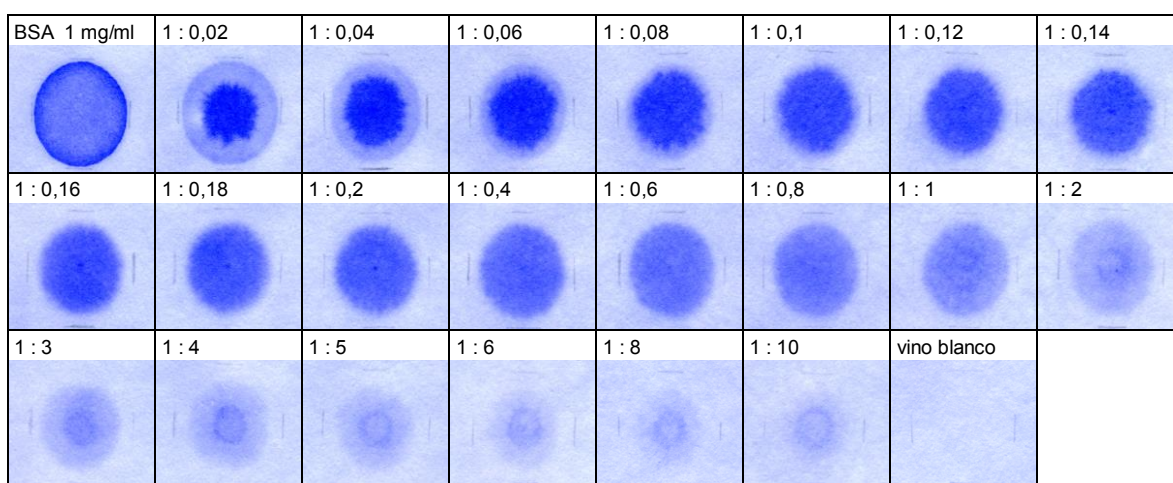
Distintamente, el modo de difusión de BSA en presencia de concentraciones mínimas de vino blanco (razones 1:0,02 a 1:0,08) experimentó perturbaciones notorias que luego se revirtieron a concentraciones ligeramente más altas del mismo vino (razones 1: $\geq 0,1$) (**Figura 21b**). En estas últimas no se apreció efecto sustancial del vino blanco sobre el modo de difusión de la proteína.

Por el contrario, el vino tinto produjo una progresiva disminución del área de difusión de la proteína, hasta que alcanzó cierto “máximo” de restricción de la difusión en una relación de volúmenes 1:0,6 (**Figura 21c**). Se observó mediante la disminución de la tinción en las concentraciones mayores que el vino tinto produce la precipitación de BSA.

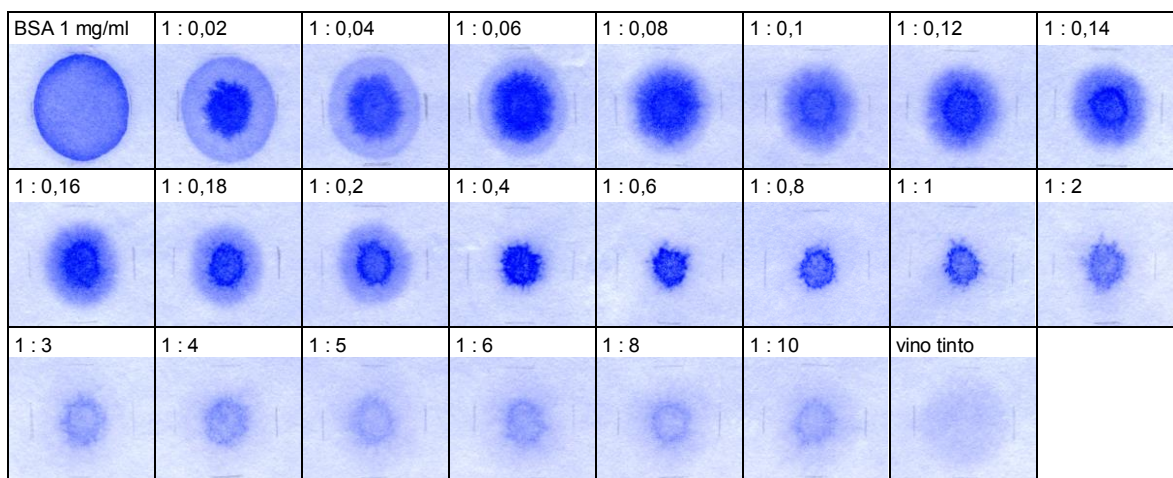
La evaluación de la capacidad del vino tinto como agente precipitante fue abordada en un ensayo de precipitación sobre membrana de celulosa, a partir de las diluciones preparadas para el ensayo de difusión. La **Tabla 8** señala la presencia de precipitado para cada dilución ensayada, representativa de tres repeticiones del ensayo, y las **Figuras 22 y 23** muestran los spots de las membranas de celulosa correspondientes a ambos ensayos, de difusión y de precipitación, dispuestos contiguos uno sobre otro de manera que se puedan cotejar y señalando la ocurrencia de precipitado mediante un símbolo asterisco en los spots del ensayo de precipitación. Las **Figuras 22 y 23** muestran los resultados de los ensayos hasta la relación de volúmenes 1:2. Aunque la **Tabla 8** muestra que el estudio consideró diluciones mayores, éste es el rango que evidencia la reactividad (efecto antidifusor y precipitante) entre la proteína BSA y el vino tinto, empleando nuestros métodos en membrana de celulosa.



a) Control: ensayo de difusión de BSA + agua



b) Control enológico: ensayo de difusión de BSA + vino blanco

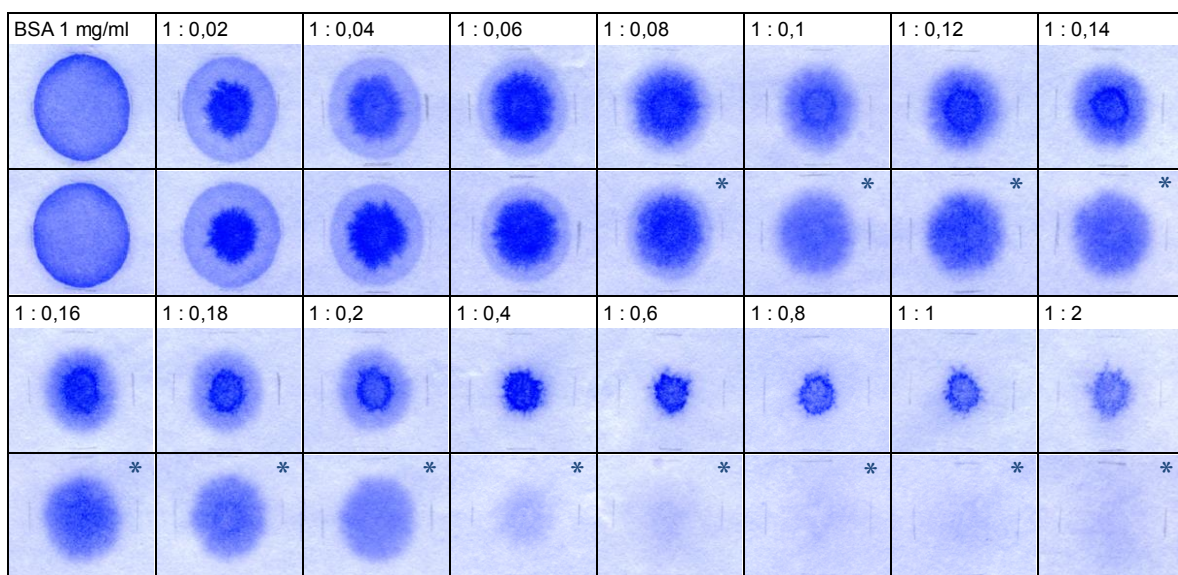


c) Ensayo de difusión de BSA + vino tinto

Figura 21. Alteración de la difusión de BSA por efecto de vino tinto. Los paneles muestran los spots de series de diluciones crecientes de BSA en (a) agua, (b) vino blanco y (c) vino tinto. Las diluciones aumentan consecutivamente de izquierda a derecha y continúan abajo. El experimento se realizó en triplicado, aquí se muestra 1 repetición, representativa.

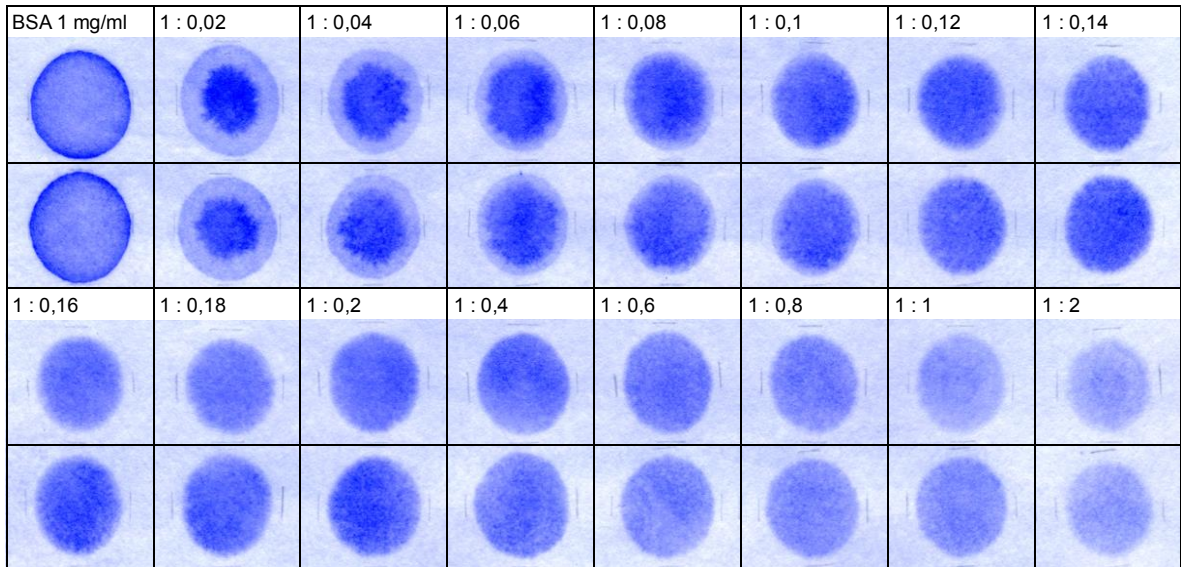
Tabla 8. Diluciones de BSA en vino tinto y registro de precipitados observados. Luego de centrifugar, se inspeccionaron los tubos Eppendorfs con las soluciones y se registró la pesquisa de pellets. Se requiere muy poco volumen de vino tinto para obtener precipitado en los tubos, el que además es abundante e identificable a simple vista. Mientras que, con vino blanco sólo se observó precipitado a diluciones por sobre 1:5 y de carácter muy limitado. (x: ausencia; ✓: presencia; √: presencia escasa)

Dilución	1:0,02	1:0,04	1:0,06	1:0,08	1:0,1	1:0,12	1:0,14	1:0,16	1:0,18	1:0,2	1:0,4	1:0,6	1:0,8	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:8	1:10
Concentración de vino (% v/v)	2,0	3,8	5,7	7,4	9,1	10,7	12,3	13,8	15,3	16,7	28,6	37,5	44,4	50,0	66,7	75,0	80,0	83,3	85,7	88,9	90,9
Observación de precipitado																					
agua	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
v. blanco	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	✓	✓	✓	✓
v. tinto	x	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

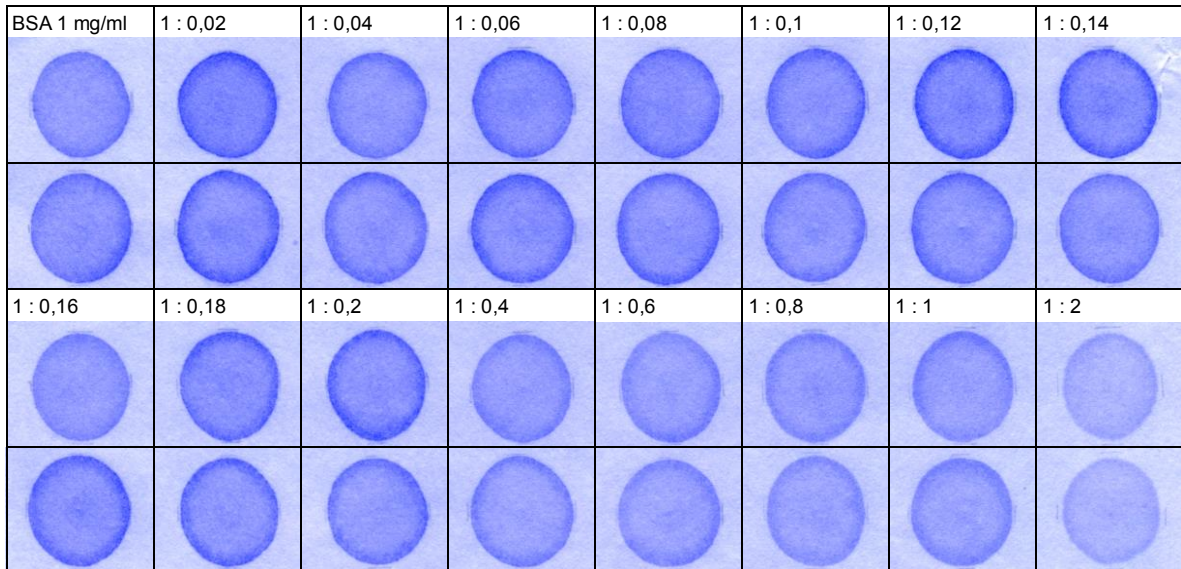


BSA + vino tinto

Figura 22. Ensayo de difusión y precipitación de BSA por efecto del vino tinto. Se muestran los spots de mezclas de proteína BSA y vino tinto correspondientes a ensayos de difusión y precipitación en membranas de celulosa, ubicados de forma contigua: arriba, spots de difusión y, abajo, su correspondiente spot de sobrenadante (ensayo de precipitación). Se muestran los spots de diluciones hasta 1:2 (Tabla 8). Observar en los sobrenadantes que a la centrifugación realizada (280 G, 2 min) se produce la pérdida de la aureola central teñida (desde 1:0,1), la aparición de precipitado (indicado con *, desde 1:0,08) y la desaparición de fracción proteica (desde 1:0,4). La dilución 1:0,4 podría corresponder a la dilución en que el vino tinto precipitó la totalidad de la proteína BSA.



a) Control enológico: BSA + vino blanco



b) Control: BSA + agua

Figura 23. Controles del efecto del vino tinto sobre la difusión y precipitación de BSA. Se muestran dos paneles, el superior (a) corresponde al control enológico con diluciones de BSA en vino blanco. El panel inferior (b), muestra el control con diluciones de la proteína en agua destilada. En ambos, las filas se ordenan en pares mostrando primero los spots de alícuotas de las mezclas (ensayo de difusión) y abajo, los spots de sobrenadantes (ensayo de precipitación). Spots con vino blanco muestran agregación inicialmente y, en comparación con las alícuotas de diluciones en agua, las zonas teñidas se ven ligeramente más pequeñas, pero no se observó precipitado. Con agua no existen alteraciones.

De acuerdo al registro de precipitados en la **Tabla 8** y al comportamiento de los sobrenadantes en las **Figuras 22 y 23**, vino tinto es un claro mejor precipitante de BSA en comparación con agua y con vino blanco. Para esclarecer el punto de equivalencia, hemos aprovechado la coloración natural del vino tinto como un indicador de la presencia de los polifenoles, la contraparte de la proteína en la precipitación. Así, se realizó la superposición de imágenes digitales de las membranas de celulosa pre y post-tinción CB, consiguiendo la identificación de ambos indicadores co-localizados: violeta para vino tinto y azul para proteína (**Figura 24**). La dilución 1:0,4 es el punto aproximado en que el vino tinto es capaz de precipitar la totalidad de la fracción proteica, se observa que la intensidad del color violeta en el spot del sobrenadante respectivo disminuye al mínimo o se extingue, debido a la precipitación de los componentes vínicos coloreados (antocianinas-taninos) junto a la proteína. Usualmente en este punto, el punto de equivalencia, se observa una tinción residual azul o coloración roja de límites difusos. Finalmente, el vino tinto a diferencia del vino blanco es capaz de precipitar la totalidad de la proteína BSA.

Los resultados del análisis morfológico de las imágenes digitales se muestran en la **Figura 25**. Se cuantificaron las áreas de difusión de la fracción proteica de cada spot de las diluciones de BSA en vino tinto y de los controles, vino blanco y agua. Los valores de área fueron normalizados por el control interno de cada celulosa y se graficaron las áreas relativas de acuerdo a la concentración de vino en las mezclas. El aumento de la concentración de vino tinto disminuyó dramáticamente el área de difusión del BSA (“área relativa de difusión de la fracción proteica”). Además, quedó de manifiesto que el vino blanco produce una disminución del área que está lejos de ser despreciable, por el contrario, produce una disminución de la difusión de BSA que es significativa (*two way-ANOVA*, con $p < 0,001$). El agua tuvo un efecto despreciable.

La curva del área de difusión de BSA en agua (situación control) (**Figura 25**) representa la máxima difusión de la proteína en la membrana de celulosa. Este máximo posible de difusión es propio de cada dilución.

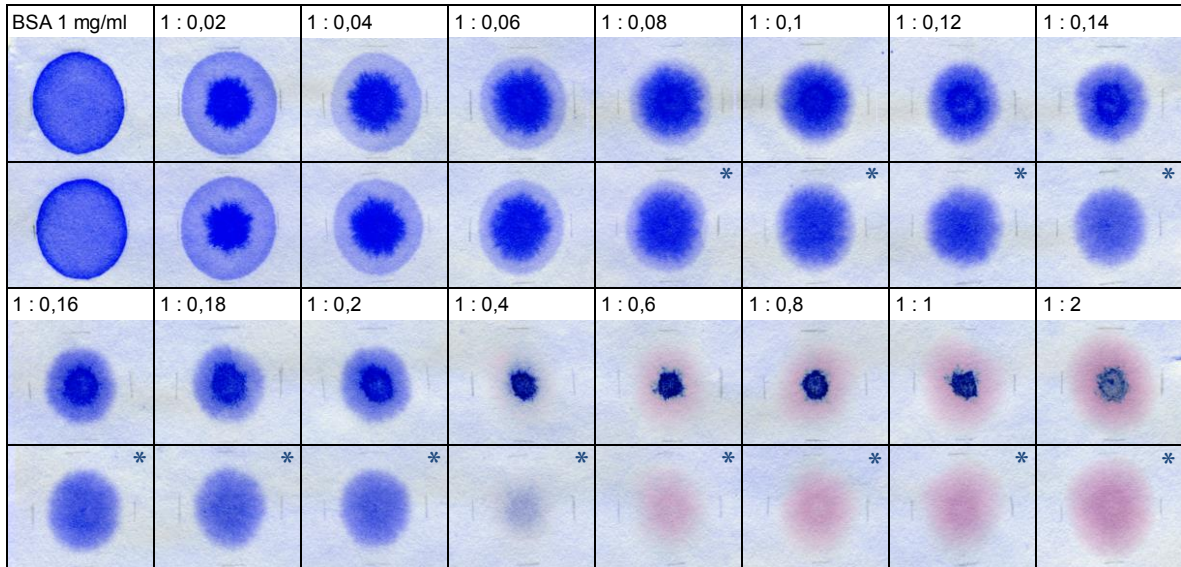


Figura 24. Identificación del punto de equivalencia BSA-vino tinto mediante la superposición de imágenes. Superposición de imágenes de membranas de celulosa obtenidas antes y después de la tinción con Coomassie Blue. Los spots correspondientes a ensayos de precipitación y difusión se ubican de forma contigua: arriba, spots de difusión y, abajo, su correspondiente spot de sobrenadante (ensayo de precipitación). La superposición muestra la ubicación del vino tinto en violeta y de la proteína en azul. El spot de sobrenadante que contenía la menor coloración antocianica del vino (violeta) y la primera en exhibir la desaparición prácticamente total de la proteína (azul) corresponde a la condición más próxima a la co-precipitación completa entre BSA y vino tinto, es decir, el Punto de Equivalencia = 1:0,4.

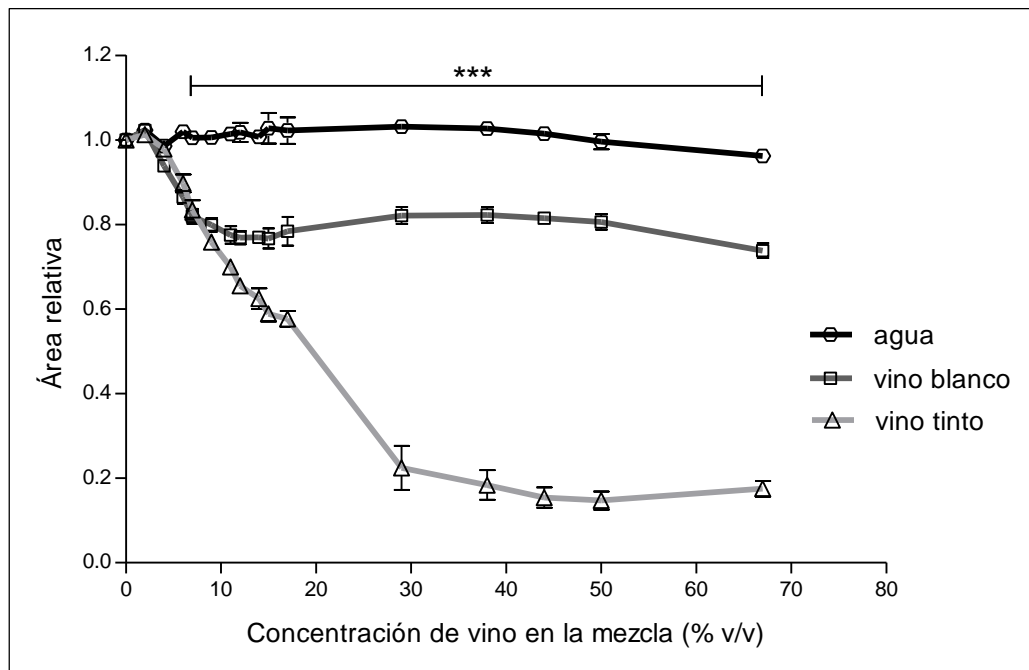


Figura 25. Disminución del área relativa de difusión de BSA en presencia de vino. Se grafica el área relativa (normalizada por el control interno de la celulosa) \pm SEM. A pesar de que el vino blanco no tiene un efecto tan notorio como el vino tinto, se observa que la disminución del área que provoca es significativa desde un 5,7% v/v de vino en la mezcla y mismo valor corresponde para vino tinto también (***) = $p < 0,001$ para todos los puntos de vinos blanco y tinto incluidos en la llave al comparar con el agua).

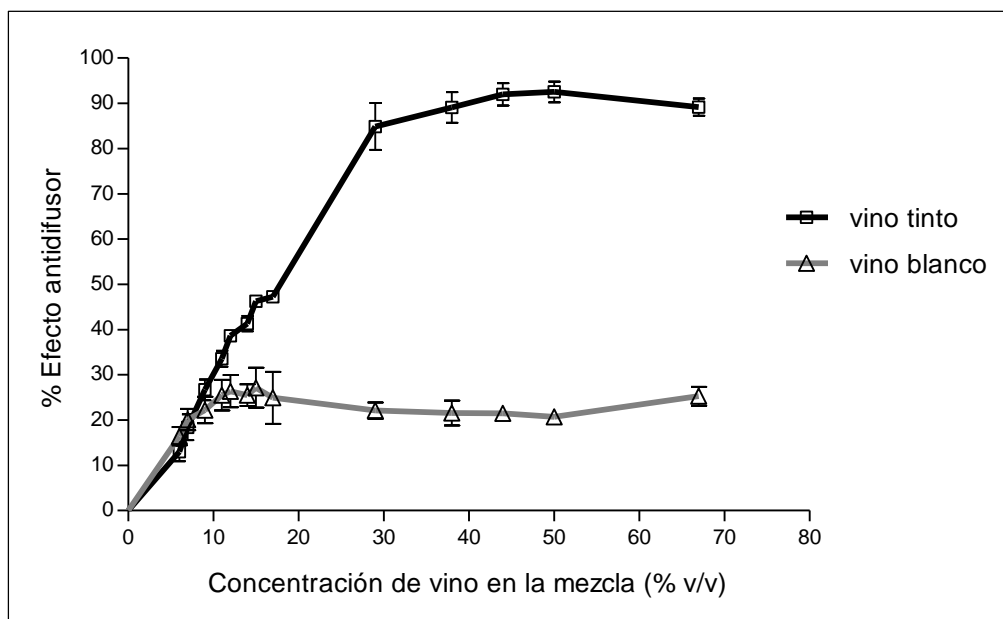


Figura 26. Efecto antidifusor sobre BSA de acuerdo a la concentración de vinos. El efecto antidifusor sobre BSA es dependiente de la concentración de los vinos tinto y blanco (% v/v de vino) en mezclas del estándar de proteína y tales reactivos enológicos. Se graficaron aquellos puntos donde el efecto observado es significativamente distinto del control en agua (Figura 25). El efecto antidifusor del vino tinto es marcadamente mayor que el del vino blanco.

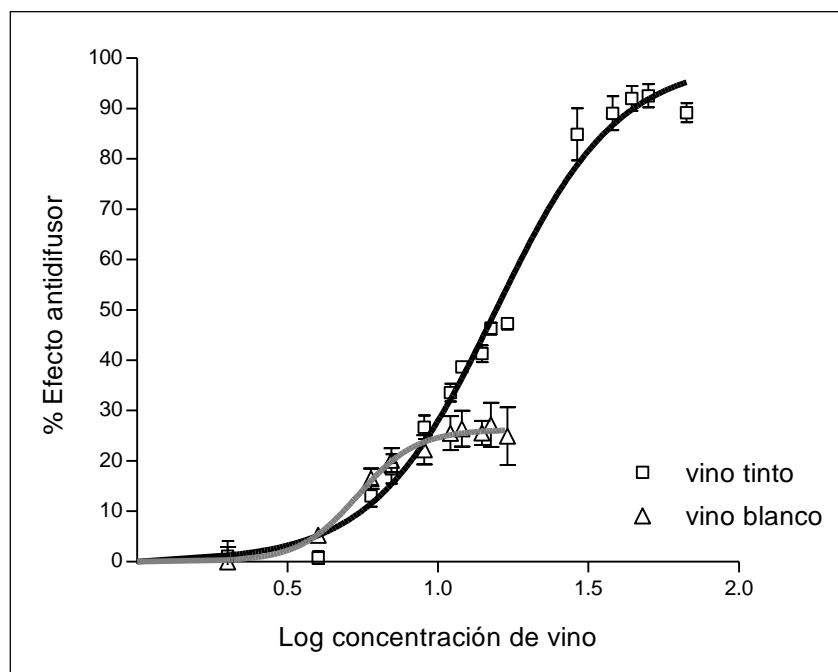


Figura 27. Efecto antidifusor sobre BSA en función del Logaritmo de la concentración de vinos. Comportamiento del efecto antidifusor en relación al logaritmo de la concentración de vino en la mezcla (% v/v) producido por vino tinto y por vino blanco en ensayo de difusión sobre membrana de celulosa. El vino tinto es capaz de generar un efecto antidifusor notoriamente mayor que el vino blanco.

En presencia de compuestos vínicos ocurren interacciones que dan origen a complejos. Estos complejos son en un principio (bajas concentraciones de vino) solubles y muestran área de difusión disminuida por el efecto antidifusor. El área de distribución del material depositado sobre la membrana de celulosa será siempre mayor que el calibre del dispositivo empleado para la carga (punta de micropipeta). Entonces, por definición, el máximo efecto antidifusor que podrá producirse será la diferencia entre el área de difusión en la condición control y el área mínima de difusión posible. Considerando lo anterior, se estableció como área mínima de difusión de una muestra depositada sobre membrana de celulosa $0,12 \text{ cm}^2$, superior al área del sistema (sección transversal de la punta del dispositivo) y menor que el área mínima observada de forma empírica.

Vino tinto y BSA experimentan interacciones que se reflejan en la disminución del área de difusión de la proteína. Se expresó la disminución del área como una respuesta porcentual. La respuesta máxima (100%) corresponde a la diferencia de área entre la difusión del control (agua) y el área mínima de distribución ($0,12 \text{ cm}^2$). Esta respuesta constituye la cuantificación de lo que denominamos como “efecto antidifusor”. Tomando los valores porcentuales se construyó un gráfico del efecto antidifusor en relación a la concentración de vino en la mezcla (**Figura 26**). De acuerdo al gráfico, el vino blanco muestra reactividad medible. El vino blanco y el vino tinto producen un efecto antidifusor sobre la proteína BSA, aunque el efecto del vino tinto es cuantitativamente más intenso.

Se representó en un nuevo gráfico el Porcentaje del Efecto Antidifusor en función del Logaritmo de la Concentración de vino (% v/v de vino en las mezclas) y se obtuvo curvas de tipo sigmoideas (**Figura 27**). En el caso del vino blanco, sin embargo, para la confección de este gráfico se consideró exclusivamente el rango de diluciones en que se registró inhibición de la difusión, es decir, concentraciones hasta 16.7% v/v. Al aumentar de esta concentración, el vino blanco no aporta mayor efecto antidifusor, incluso, el área relativa de difusión tiende a aumentar levemente (ver **Figura 25**). Sólo se consideraron los puntos en que se observa la respuesta aquí definida, esta es, la restricción de la difusión.

En el gráfico de la **Figura 27** se puede observar que el agente enológico (vino tinto o vino blanco) y la proteína BSA interactúan paulatinamente en un inicio, luego la interacción se va intensificando, en un tramo la curva muestra una relación directa (lineal) y, finalmente, la curva se desacelera, llegando al máximo de la respuesta. Considerado además el registro de precipitados (**Tabla 8**) y el comportamiento en la membrana de celulosa en los ensayos de precipitación, sabemos que el progreso de la interacción culmina cuando ocurre la insolubilización. Esta curva está construida en base a la cuantificación de los ensayos de difusión. Por tanto, al margen de la respuesta máxima observada en la curva fijamos como parámetro descriptor de la finalización de la interacción entre una suspensión proteica y un agente precipitante, el punto de equivalencia. Por su parte, la curva sigmoidea nos entrega otros dos posibles parámetros para la descripción de la interacción. Primero, el inicio de la interacción BSA-vino está descrito por la concentración de vino a la que se produce el efecto antidifusor mínimo, entendiendo como “concentración efectiva mínima” la concentración a la cual la disminución del área es significativamente distinta del control en agua y en el gráfico de la **Figura 27** correspondería al alzamiento de la curva sigmoidea. Segundo, cuando la interacción describe un comportamiento lineal, sería posible obtener de la curva un parámetro representativo de la progresión del efecto antidifusor. Según esto, el “concentración efectiva media” correspondería a la concentración a la que se produce la mitad del efecto antidifusor.

En suma, el método de evaluación de interacciones polifenoles-proteínas basado en un ensayo de difusión de proteínas sobre membrana de celulosa comprende los siguientes pasos:

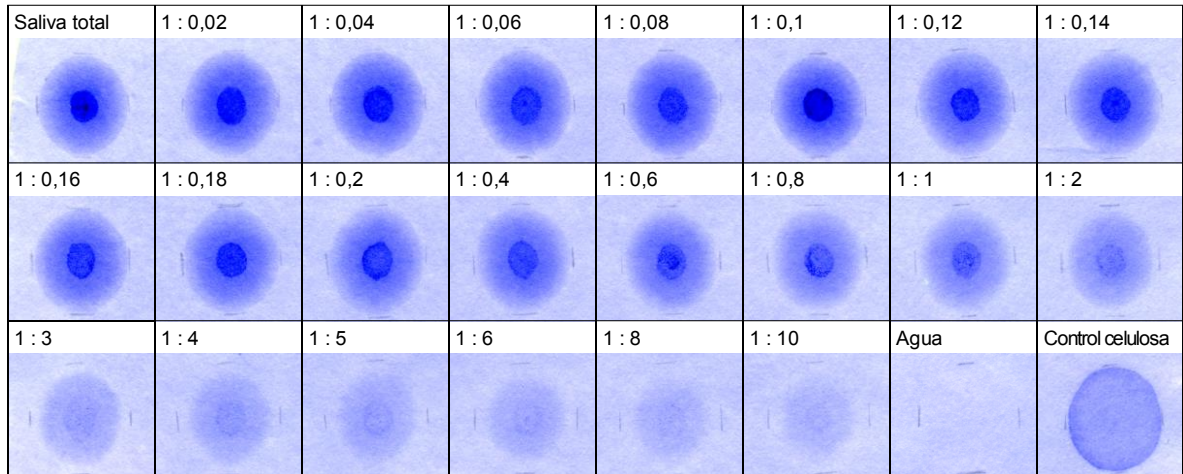
1. Estudio de difusión y precipitación de soluciones mezclas entre agente enológico y suspensión proteica sobre membrana de celulosa
2. Determinación de punto de equivalencia de la precipitación
3. Cuantificación de efecto antidifusor
4. Representación sigmoidea “Porcentaje de efecto antidifusor en función de Logaritmo de la concentración de agente enológico”

4.2. Evaluación de la interacción entre la fracción proteica de la saliva humana y polifenoles de interés enológico empleando un ensayo de difusión de proteínas sobre membrana de celulosa

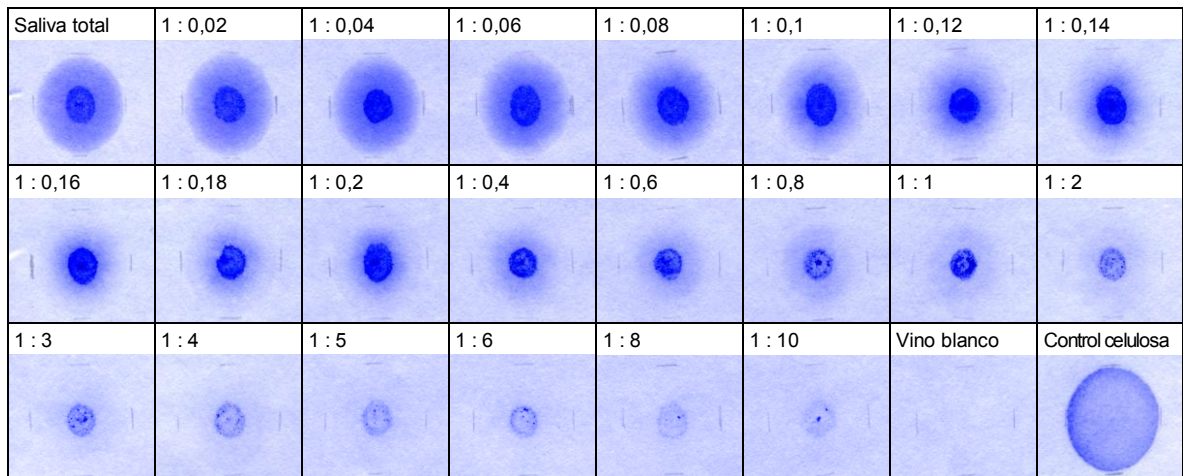
4.2.1. Interacción saliva-polifenoles: evaluación en membranas de celulosa

Difusión y precipitación de saliva en presencia de vino

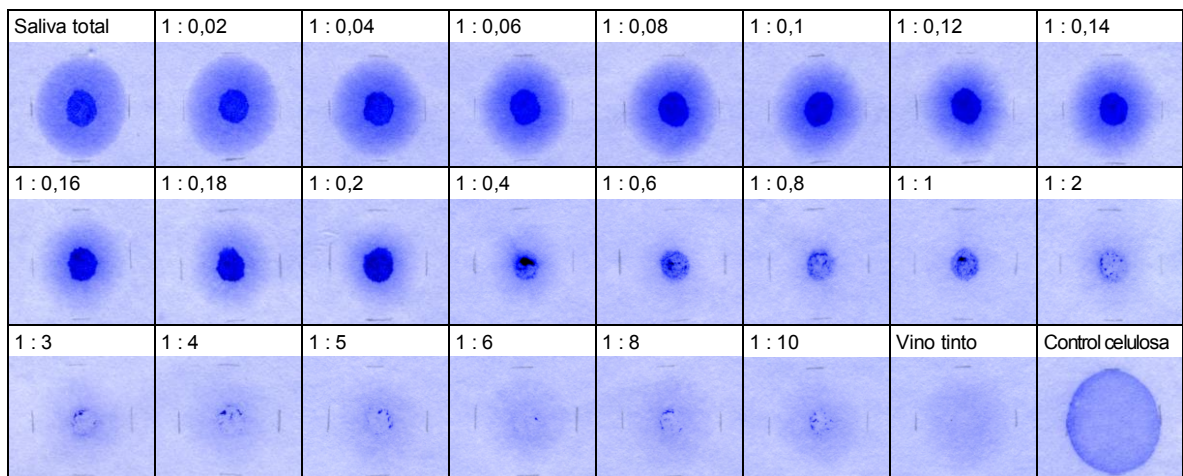
Se estudió el efecto del vino sobre la fracción proteica de la saliva total humana mediante ensayos de difusión y precipitación en membranas de celulosa. La **Figura 28** muestra una de las repeticiones del ensayo con vino tinto y vino blanco, además de la situación control en agua destilada. La **Tabla 9** muestra las diluciones relativas a cada spot en las membranas de celulosa, así como el registro de la observación de precipitados. En la **Figura 28**, el primer panel (**a**) corresponde al control de difusión de la saliva con las diluciones realizadas en agua destilada. En ellos, la saliva difunde bifásicamente sin alteración en todo el rango estudiado (1:0,02 a 1:10) y no existe precipitación, considerando el registro nulo de precipitados (**Tabla 9**) y que los spots de difusión y precipitación de las membranas de celulosa correspondientes comparados no manifiestan cambios (spots contiguos uno sobre otro en **Figura 29**). Por el contrario, el ensayo con diluciones de saliva en vino blanco da cuenta de interacción de la fracción proteica salival con los componentes del vino blanco (**Figura 30**). En comparación con el control en agua, la fase no difusible se intensifica y la zona ocupada por la fase difusible disminuye, siendo ambos indicadores de la formación de complejos solubles. La interacción entre vino blanco y saliva produce, además, la formación de complejos insolubles observados como sedimentos en los tubos (**Tabla 9**) y a través de la notable disminución de la tinción de la fracción proteica en los sobrenadantes del ensayo de precipitación (spots con asteriscos en panel inferior de **Figura 30**). Sin embargo, la precipitación es parcial. Por otra parte, los ensayos de difusión y de precipitación con vino tinto (**Figuras 28 y 31**) revelan que el decrecimiento de la fase difusible está acompañado por la precipitación de complejos (señalados con asterisco). La aparición de estos complejos insolubles antecede a la detección de cambios en la difusión sobre la membrana de celulosa.



a) Control: ensayo de difusión saliva + agua



b) Control enológico: ensayo de difusión saliva + vino blanco



c) Ensayo de difusión saliva + vino tinto

Figura 28. Alteración de la difusión de la fracción proteica salival por efecto del vino. Los paneles muestran los spots en membrana de celulosa de series de diluciones crecientes de saliva en (a) agua, (b) vino blanco y (c) vino tinto. Las diluciones aumentan consecutivamente de izquierda a derecha y continúan abajo. La tinción CB en azul revela la fracción proteica de la saliva. (Control celulosa = BSA 1 mg/ml)

Tabla 9. Diluciones de saliva en vino tinto y registro de precipitados observados. Luego de centrifugar, se inspeccionaron los tubos de reacción con las mezclas y se registró la pesquisa de pellets. Se requiere muy poco volumen de vino tinto para obtener precipitado, el que además es abundante. Si bien, con vino blanco (control enológico) se observó precipitado a diluciones posteriores y este no fue tan abundante, resultó inesperada la magnitud de la precipitación de saliva por parte de este vino. (x: ausencia; ✓: presencia)

Dilución	1:0,02	1:0,04	1:0,06	1:0,08	1:0,1	1:0,12	1:0,14	1:0,16	1:0,18	1:0,2	1:0,4	1:0,6	1:0,8	1:1	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:8	1:10
Conc. vino (% v/v)	2,0	3,8	5,7	7,4	9,1	10,7	12,3	13,8	15,3	16,7	28,6	37,5	44,4	50,0	66,7	75,0	80,0	83,3	85,7	88,9	90,9
Observación de precipitado																					
agua	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
v. blanco	x	x	x	x	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
v. tinto	x	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

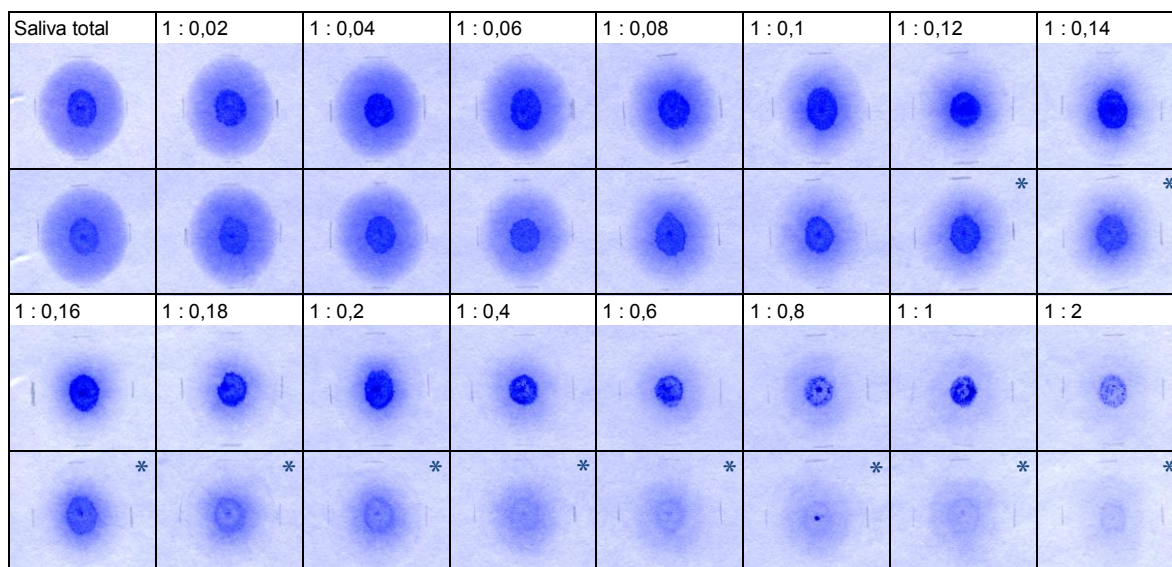


Figura 29. Ensayo de difusión y precipitación de saliva por efecto de vino blanco. Se muestran los spots de mezclas de saliva total humana y vino blanco correspondientes a ensayos de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa, ubicados en forma contigua: arriba, spots de difusión y, abajo, su correspondiente spot de sobrenadante (ensayo de precipitación). Se muestran los spots de diluciones hasta 1:2 (Tabla 9). En los sobrenadantes, la centrifugación realizada (280 G, 2 min) produce la aparición de precipitado (indicado con *, desde 1:0,12).

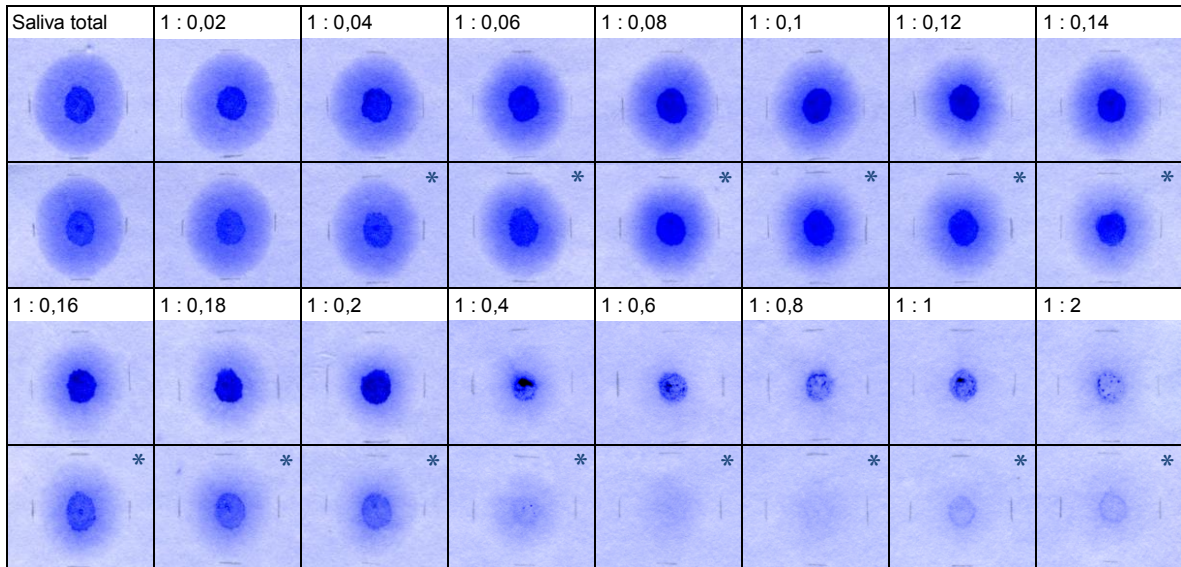


Figura 30. Ensayo de difusión y precipitación de saliva por efecto de vino tinto. Se muestran los spots de mezclas de saliva total humana y vino tinto correspondientes a ensayos de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa, ubicados en forma contigua: arriba, spots de difusión y, abajo, su correspondiente spot de sobrenadante (ensayo de precipitación). Se muestran los spots de diluciones hasta 1:2 (Tabla 9). En los sobrenadantes, la centrifugación realizada (280 G, 2 min) produce la aparición de precipitado (indicado con *, desde 1:0,04) y la desaparición de la fracción proteica (desde 1:0,4). La dilución 1:0,4 podría corresponder a la dilución en que el vino tinto precipitó la totalidad de la fracción proteica salival.

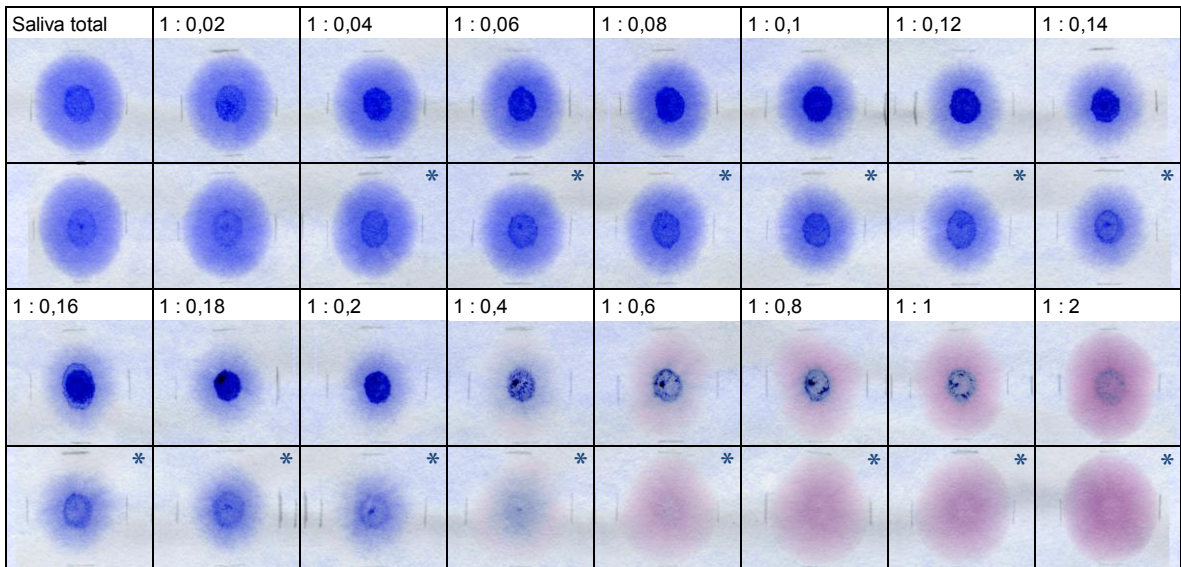


Figura 31. Identificación del punto de equivalencia entre saliva y vino tinto mediante la superposición de imágenes. Superposición de imágenes de membranas de celulosa obtenidas antes y después de la tinción con Coomassie Blue. Los spots correspondientes a ensayos de precipitación y difusión se ubican de forma contigua: arriba, spots de difusión y, abajo, su correspondiente spot de sobrenadante (ensayo de precipitación). La superposición muestra la ubicación del vino tinto en violeta y de la fracción proteica en azul. El spot de sobrenadante que contenía la menor coloración antocianica del vino (violeta) y la primera en exhibir la desaparición prácticamente total de la proteína (azul) corresponde a la condición más próxima a la co-precipitación completa entre saliva y vino tinto, es decir, el Punto de Equivalencia = 1:0,4.

Mediante la superposición de imágenes pre y post-tinción para proteínas de los ensayos de difusión y precipitación de saliva en presencia de vino tinto sobre membranas de celulosa, se determinó que el punto de equivalencia entre la fracción proteica salival y el vino tinto corresponde a la razón de volúmenes 1:0,4 (**Figura 31**).

Evaluación de interacción saliva-polifenoles

La cuantificación de las áreas de difusión de la fracción proteica en los spots de las membranas de celulosa mostró que el efecto antidifusor es significativo (ANOVA, $p < 0,001$) a partir de la dilución 1:0,12 (10,7%). En la **Figura 32**, se muestra el efecto de la adición de vinos blanco y tinto (con agua como control) sobre el área de difusión de la fracción proteica de la saliva. Se aplicó el análisis anteriormente definido, expresando el efecto antidifusor como una función del logaritmo de la concentración de vino en la mezcla (% v/v) (**Figura 33**). Las curvas sigmoideas obtenidas indican que en comparación con el vino blanco el vino tinto produce un efecto antidifusor muy agresivo sobre la fracción proteica salival. Tanto vino blanco como vino tinto presentan similar efecto antidifusor a concentraciones bajas, pero a concentraciones mayores el efecto del vino tinto sobrepasa el del vino blanco.

De manera notable, el vino blanco ejerce un efecto antidifusor mayor sobre saliva humana que sobre la proteína BSA (cuadro comparativo en **Figura 34**). Comparando en general ambos efecto antidifusores sobre proteína BSA y sobre la fracción proteica salival, las sigmoideas correspondientes a saliva se han desplazado ligeramente hacia la derecha, indicando que se requiere más vino para afectar la difusión de la fracción proteica de la saliva. Por otra parte, el tramo lineal de las curvas para saliva es más empinado que el propio para BSA, señalando que la transformación en la saliva sería más aguda o expedita.

Se determinaron los parámetros propuestos “concentración efectiva mínima” (CE mínima) y “concentración efectiva media” (CE media), los cuáles se informan en la **Tabla 10**, junto a la pendiente de las curvas de ajuste y a los puntos de equivalencia, para ambas series de datos (BSA y saliva).

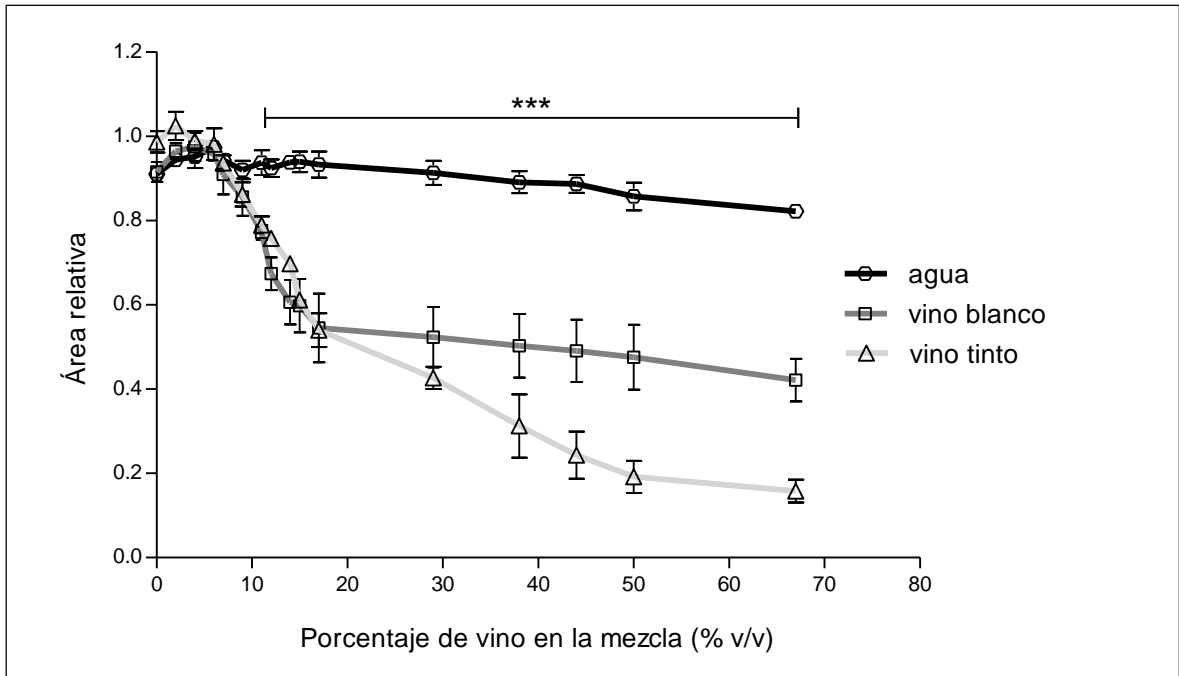


Figura 32. Disminución del área relativa de difusión de la fracción proteica salival en presencia de vino. Se grafica el área relativa (normalizada por el control interno de la celulosa) \pm SEM. Vinos blanco y tinto producen una disminución significativa del área de difusión, desde un 12,3% v/v de vino blanco en la mezcla y un 13,8% para vino tinto (***) = $p < 0,001$ para los puntos de vinos blanco y tinto incluidos en la llave al comparar con el agua).

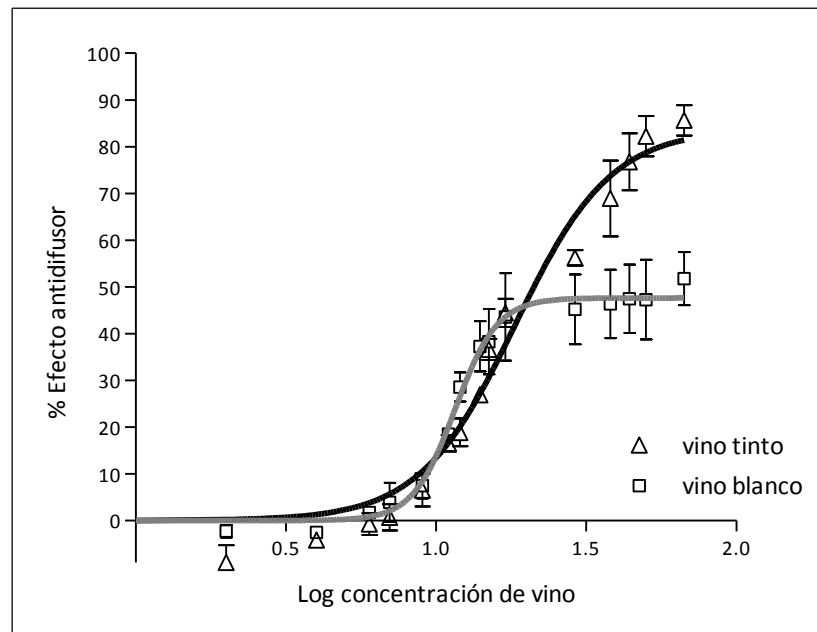


Figura 33. Efecto antifungoso sobre la saliva en función del Logaritmo de la concentración de vinos. Comportamiento del efecto antifungoso en relación al logaritmo de la concentración de vino en la mezcla (% v/v) producido por vino tinto y por vino blanco en ensayo de difusión sobre membrana de celulosa. El vino tinto es capaz de ejercer un efecto antifungoso notoriamente mayor que el vino blanco.

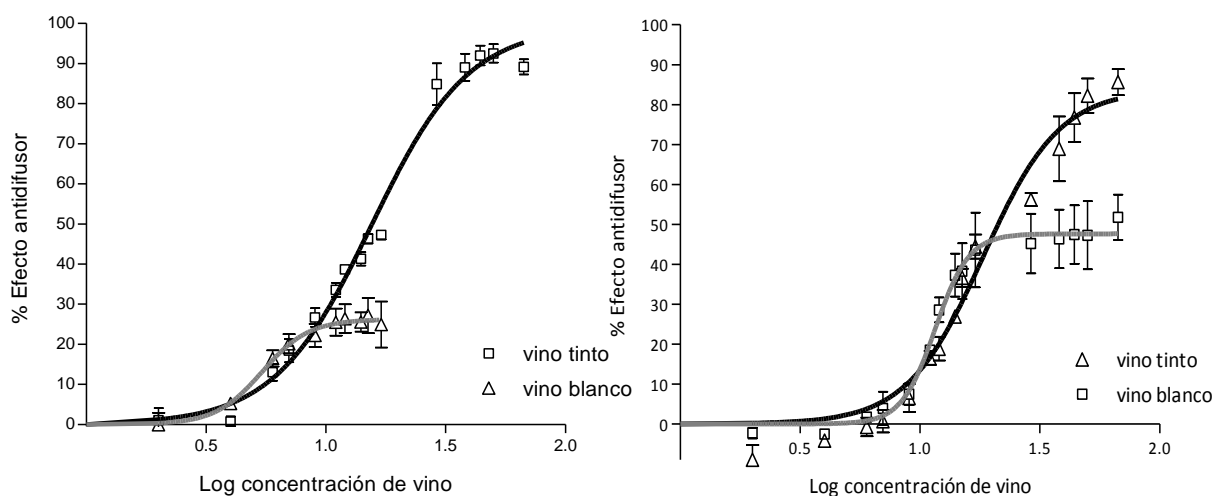


Figura 34. Efecto antifusor producido por vinos sobre una proteína modelo y la saliva humana. Gráfico para proteína BSA (izquierda) y gráfico para fracción proteica de saliva humana (derecha) correspondientes a las Figuras 27 y 33. Comparativamente, el vino tinto tiene un efecto antifusor más agresivo que vino blanco, ya sea sobre BSA o sobre saliva. El efecto de ambos vinos sobre BSA se inicia con menor concentración de vino tinto que sobre saliva. El efecto del vino blanco sobre la saliva es mayor que el apreciado sobre BSA. Y, el efecto antifusor del vino tinto sobre la saliva se desarrolla en un rango más acotado de concentraciones, denotando que las transformaciones en saliva ocurrirían con aumentos más pequeños de vino en la mezcla.

Tabla 10. Parámetros descriptivos de la interacción entre suspensiones proteicas y vinos a partir de evaluación en membranas de celulosa. Concentración efectiva mínima (CE mínima), concentración efectiva media (CE media) y punto de equivalencia de la precipitación obtenidos de la evaluación cuantitativa de la interacción entre suspensiones proteicas (BSA y saliva) y matrices vínicas (vino blanco y vino tinto) empleando ensayos de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa. Se incluyen además los valores en escala Logarítmica para la identificación del punto en el gráfico de las Figuras 27 y 33 y los valores de la pendiente de Hill. Los indicadores de la progresión del efecto antifusor CE mínima, CE media y pendiente de Hill difieren para BSA y saliva, mientras que el punto de equivalencia es el mismo para ambas suspensiones. (* = pendiente de Hill, entregada por la ecuación de la curva de ajuste empleada, ver detalle en **Tabla 5** de Material Complementario)

Parámetros	BSA		Saliva	
	Vino blanco	Vino tinto	Vino blanco	Vino tinto
CE mínima (% v/v)	5,7	5,7	12,3	13,8
Log CE mínima	0,76	0,76	1,09	1,14
CE media (% v/v)	5,4	15,5	11,6	18,4
Log CE media	0,73	1,19	1,06	1,26
Pendiente de Hill*	4,44	2,14	6,17	2,73
Punto de equivalencia	-	1:0,4	-	1:0,4

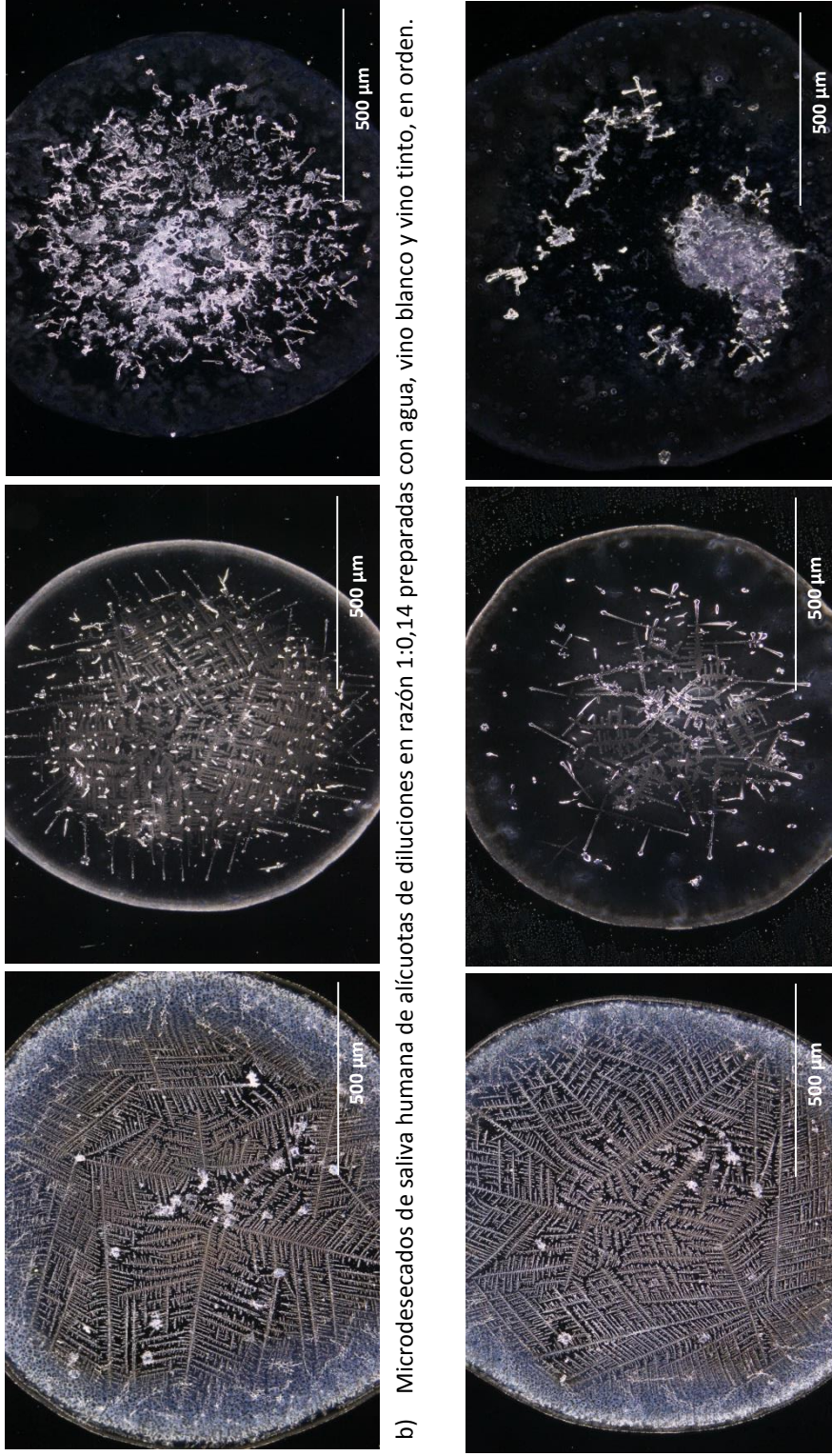
4.2.2. Estudio complementario de microdesecados de saliva

Microdesecados de saliva en presencia de vino

En nuestro modelo experimental, los cambios en las propiedades que manifiesta la fracción proteica de la saliva en contacto con polifenoles enológicos sobre membranas de celulosa, son atribuibles a interacciones macromoleculares. Con la finalidad de fundar esta inferencia, se implementó un ensayo complementario basado en la observación microscópica de alícuotas (1 μ l) de mezclas de saliva y vinos tinto y blanco en microscopio óptico con campo oscuro y objetivos 5X. Para ello, alícuotas correspondientes a las soluciones de los ensayos sobre membranas de celulosa fueron depositadas sobre portaobjetos de vidrio, en triplicado, y fotografiadas.

Los microdesecados de muestras salivales en presencia de vino blanco y de vino tinto mostraron cambios importantes con respecto a los microdesecados de la misma muestra salival obtenidos paralelamente en ausencia de vino (control de diluciones en agua). La **Figura 35** muestra que frente a una misma dilución, 1:0,14, en que el efecto antidifusor sobre la fracción proteica salival resultó similar sobre membranas de celulosa (12,3% v/v en **Figura 32** y a 1,09 en escala Log, **Figura 33**), los componentes macromoleculares de la saliva exhibieron una organización de micro-cristaloides claramente distinta de la observada con la misma saliva diluida equivalentemente en agua. Más aún, estas alteraciones observadas fueron cualitativamente distintas entre ambos vinos.

Se estudiaron también microdesecados de la dilución 1:0,2, donde la evaluación en membrana de celulosa muestra la progresión de las interacciones muy avanzada. En este punto (equivalente a 16,7% v/v y a 1,22 en escala Log, **Figura 33**) prácticamente se alcanza el efecto antidifusor máximo del vino blanco y el efecto antidifusor correspondiente a la CE media del vino tinto. En el microdesecado en presencia de vino tinto el entramado salival se ha perdido completamente como tal y el contenido proteico está muy agregado. Mientras que con vino blanco, se observa cierta distribución organizada, pero con una tendencia al reforzamiento de las estructuras alargadas.



b) Microdesecados de saliva humana de alícuotas de diluciones en razón 1:0,14 preparadas con agua, vino blanco y vino tinto, en orden.

a) Microdesecados de saliva humana de alícuotas de diluciones en razón 1:0,2 preparadas con agua, vino blanco y vino tinto, en orden.

Figura 35. Microdesecados de saliva humana en presencia de vinos blanco y tinto. Alícuotas de 1 μ l de diluciones de saliva en vino blanco, vino tinto y agua como control fueron depositadas sobre portaobjeto, secadas a temperatura ambiente y estudiadas en microscopio óptico con campo oscuro (aumento 5X). A modo general, la saliva total humana se observa altamente estructurada y diluciones bajas en agua no alteran su organización. (a) Microdesecados correspondientes a una dilución 1:0,14 (equivalente a 12,3% v/v y a 1,09 en escala Log), punto en que las curvas correspondientes a vino blanco y tinto producen prácticamente el mismo efecto antifusor (ver **Figura 33**). Sin embargo, la alteración observada sobre el entramado salival es cualitativamente distinta. (b) Microdesecados de una dilución 1:0,2 (equivalente a 16,7% v/v y a 1,22 en escala Log), punto muy próximo al efecto antifusor producido por la CE media del vino tinto (18%, **Figura 33**), el cual es próximo también al efecto antifusor máximo del vino blanco. Con esta concentración, el vino blanco produce un cambio en la organización de estructuras filamentosas, mientras que el vino tinto produce su desorganización y notoria agregación del material salival.

4.3. Evaluación de la interacción entre la fracción proteica de la saliva humana y vinos de distinta composición polifenólica empleando un ensayo de difusión sobre membrana de celulosa

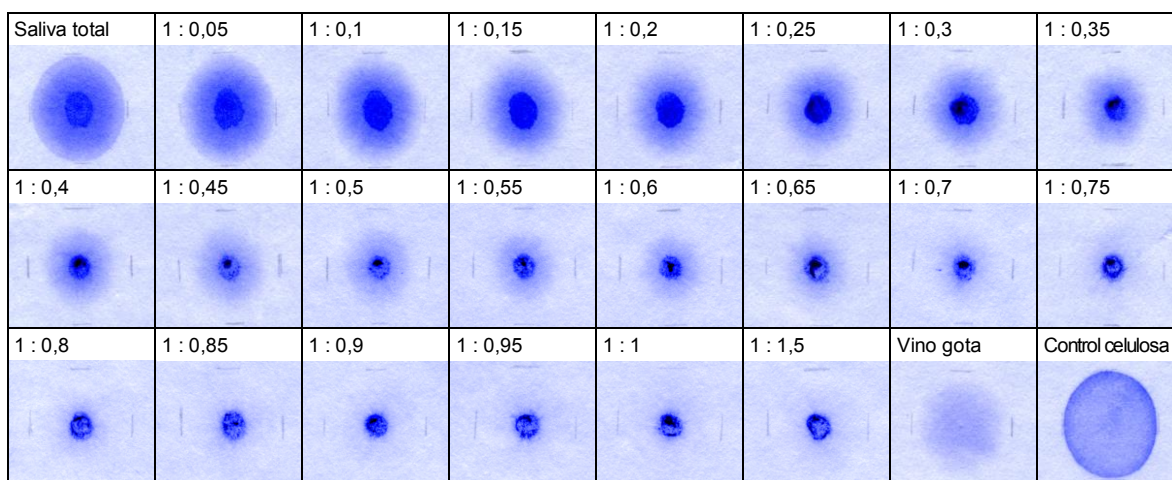
4.3.1. Interacción entre saliva y vinos con distinto contenido polifenólico: evaluación en membranas de celulosa

En estudios independientes se evaluó el efecto antidifusor sobre la saliva de dos vinos tintos semejantes, que difieren fundamentalmente en el contenido de polifenoles. De esta manera, se ensayó un “vino gota”, es decir, un vino en sus primeras etapas de elaboración y el correspondiente “vino prensa”, esto es, un vino gota al que se adicionó el material resultante de la compresión de orujo y que, por lo tanto, aporta un contenido adicional de polifenoles provenientes de hollejos y semillas. Así, ambos vinos provienen de la misma uva y comparten aproximadamente la composición general (ver en **Tabla 6**).

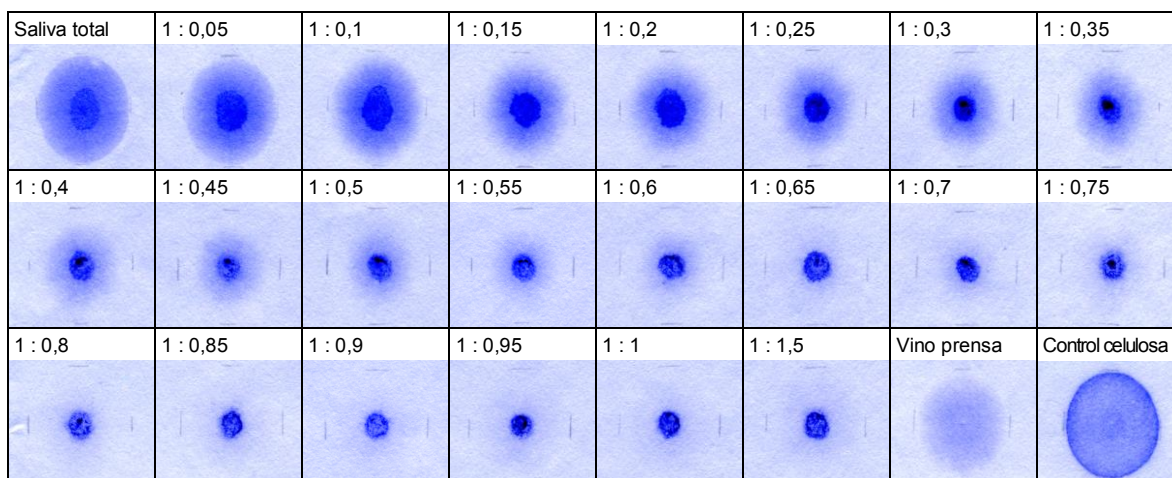
Los ensayos de difusión y precipitación en membranas de celulosa (**Tabla 11** y **Figura 36**) con vinos gota y prensa sólo pudieron realizarse en una única repetición. Se observó que hubo sólo diferencias marginales entre ellos en la alteración de la difusión de la fracción proteica salival sobre membrana de celulosa, ambos producen el efecto antidifusor conocido (**Figura 36**). Se observó que ambos vinos producen precipitación de la proteína salival en el mismo rango de diluciones (ver registro de precipitados en **Tabla 11**), lo que fue consistente con la disminución de las zonas teñidas y la intensidad de tinción en los spots del ensayo de precipitación sobre membrana de celulosa (resultados no mostrados). Se realizó la determinación del punto de equivalencia mediante la superposición de las imágenes correspondientes a estado pre y post-tinción de las membranas de celulosa del ensayo de precipitación (**Figura 37**) y por la presencia de abundante proteína residual en los spots de diluciones probables de co-precipitación saliva-vino, el enfoque fue reforzado con mediciones de las áreas coloreadas. Vinos gota y prensa exhibieron puntos de equivalencia similares entre ellos y similares al vino tinto estudiado anteriormente, correspondientemente en las diluciones 1:0,5 para gota y 1:0,45 para prensa.

Tabla 11. Diluciones de saliva y registro de precipitados en ensayo con vinos específicos. Diluciones preparadas, concentraciones de vino y registro de precipitados para soluciones mezclas entre saliva total humana y vinos gota y prensa. Tras una centrifugación, todas produjeron precipitado evidente. (×: ausencia; ✓: presencia)

Dilución	1:0,05	1:0,1	1:0,15	1:0,2	1:0,25	1:0,3	1:0,35	1:0,4	1:0,45	1:0,5	1:0,55	1:0,6	1:0,65	1:0,7	1:0,75	1:0,8	1:0,85	1:0,9	1:0,95	1:1	1:1,5
Conc. vino (% v/v)	4,8	9,1	13,0	16,7	20,0	23,1	25,9	28,6	31,0	33,3	35,5	37,5	39,4	41,2	42,9	44,4	45,9	47,4	48,7	50,0	60,0
Observación de precipitado																					
v. gota	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
v. prensa	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

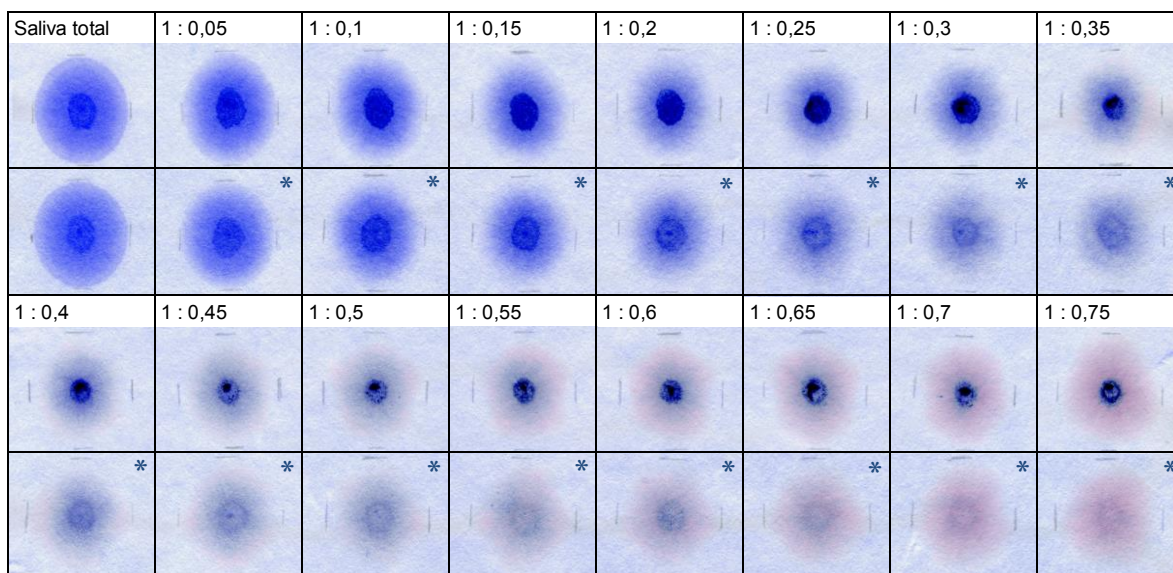


a) Ensayo de difusión saliva + vino gota

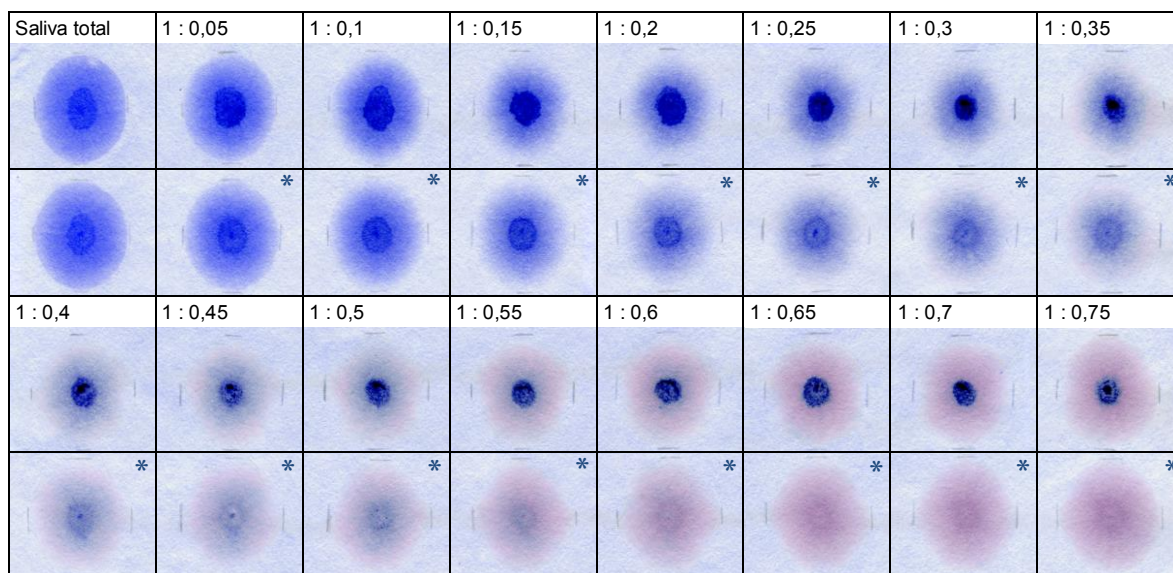


b) Ensayo de difusión saliva + vino prensa

Figura 36. Alteración de la fracción proteica salival por efecto de vinos gota y prensa. Los paneles muestran los spots en membrana de celulosa de diluciones crecientes de saliva en (a) vino gota y (b) vino prensa. Las diluciones aumentan consecutivamente de izquierda a derecha y continúan abajo. La tinción CB en azul revela la fracción proteica de la saliva. (Control celulosa = BSA 1 mg/ml)



a) Superposición de imágenes pre y post-tinción de membranas de celulosa en ensayo con vino gota



a) Superposición de imágenes pre y post-tinción de membranas de celulosa en ensayo con vino prensa

Figura 37. Identificación del punto de equivalencia entre saliva y vinos gota y prensa mediante superposición de imágenes. Superposición de imágenes de membranas de celulosa obtenidas antes y después de la tinción con Coomassie Blue. Los spots correspondientes a ensayos de precipitación y difusión se ubican de forma contigua: arriba, spots de difusión y, abajo, su correspondiente spot de sobrenadante (ensayo de precipitación). La superposición muestra la ubicación de los vinos en violeta y de la fracción proteica en azul. El spot de sobrenadante que contenía la menor coloración antocianica del vino (violeta) y la menor presencia de proteína (azul) corresponde a la condición más próxima a la co-precipitación completa entre saliva y vinos gota (a) y prensa (b). Específicamente, el punto de equivalencia para vino gota fue vinculado a la relación de volúmenes 1:0,5 y para vino prensa a la relación de volúmenes 1:0,45.

La cuantificación de las áreas de difusión de la fracción proteica en los spots de las membranas de celulosa mostró el efecto antidifusor de los vinos gota y prensa (**Figura 38**). Esta cuantificación fue realizada esta vez respecto de un ajuste lineal del comportamiento del control “saliva diluida en agua” en ensayos anteriores (**Figura 32**). Para la linealización, no se consideraron los primeros 2 puntos, cuyas áreas aumentan. Tanto vino gota como vino prensa exhiben muy similar efecto antidifusor.

Se aplicó el método de análisis anteriormente definido, expresando el efecto antidifusor como una función del logaritmo de la concentración de vino en la mezcla (% v/v) (**Figura 39**). Las curvas sigmoideas obtenidas indican un efecto antidifusor muy agresivo sobre la fracción proteica salival por parte de ambos vinos. Pero a concentraciones más bajas (inicios del efecto antidifusor), el efecto del vino prensa es ligeramente mayor que el del vino gota. Los parámetros descriptores del efecto antidifusor se pueden revisar en la **Tabla 12**.

A partir de la cuantificación de las áreas de difusión entre saliva y vinos blanco y tinto (evaluación anterior, **Figura 32**), se planteó el efecto antidifusor esta vez respecto de la linealización del control “saliva diluida en agua”, para establecer una comparación con los efectos aquí determinados para vinos gota y prensa. Los parámetros obtenidos se muestran junto a los de vino gota y vino prensa en la **Tabla 12** y el gráfico de las tendencias de las curvas de los 4 vinos de distinta composición polifenólica se muestran en la **Figura 40**. Entre los parámetros, no se calculó la concentración efectiva mínima (CE mínima) debido a que no se determinó cuál es la dilución mínima desde donde se produce una disminución del área de difusión significativa.

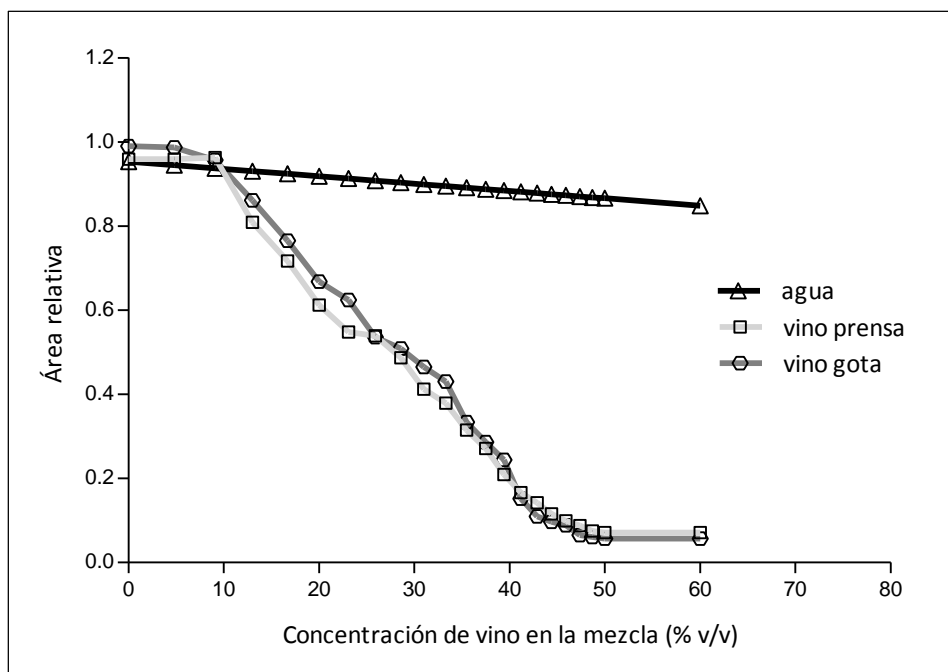


Figura 38. Disminución del área relativa de difusión de la fracción proteica salival en presencia de vinos gota y prensa. Gráfico del área relativa (normalizada por el control interno de la celulosa) de la fracción proteica salival en presencia de vinos gota y prensa, comparados con el ajuste lineal de la curva control en agua de ensayos anteriores (Figura 32) Vinos gota y prensa producen una disminución notoria del área de difusión.

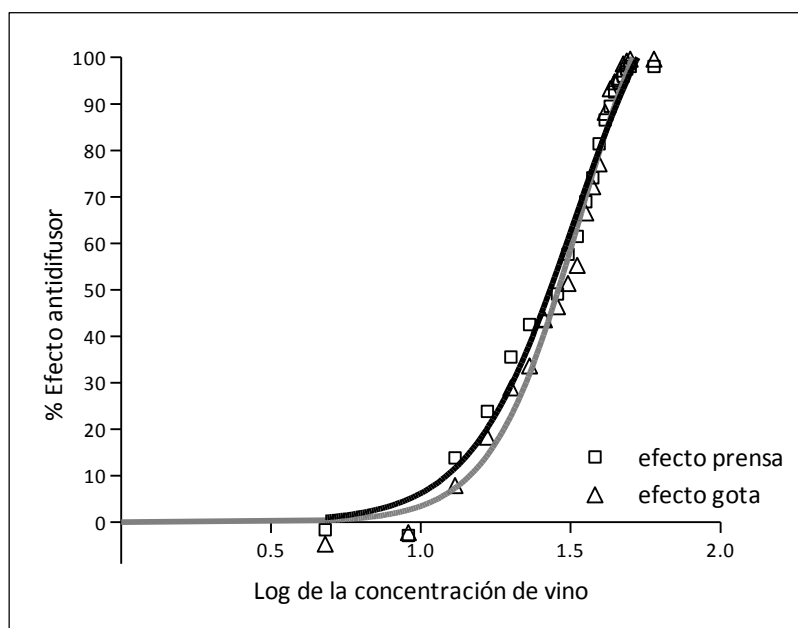


Figura 39. Efecto antidifusor sobre la saliva en función del Logaritmo de la concentración de vinos. Comportamiento del efecto antidifusor en relación al logaritmo de la concentración de vino en la mezcla (% v/v) producido por vino tinto y por vino blanco en ensayo de difusión sobre membrana de celulosa. El vino tinto es capaz de ejercer un efecto antidifusor notoriamente mayor que el vino blanco.

Tabla 12. Parámetros descriptivos de la interacción entre saliva y vinos de distinta composición polifenólica de acuerdo a evaluación en membranas de celulosa. Concentración efectiva media (CE media) y punto de equivalencia de la precipitación obtenidos de la evaluación cuantitativa de la interacción entre la fracción proteica salival y dos matrices vínicas específicas, vinos gota y prensa, empleando ensayo de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa. Se incluyen además los valores en escala Logarítmica para la identificación del punto en el gráfico de la **Figura 39** y los valores de la pendiente de Hill. Los indicadores de la progresión del efecto antidifusor CE media y pendiente de Hill son similares para vino gota y vino prensa, mientras que el punto de equivalencia es distinto. Vino prensa sería mejor precipitante, ya que se requiere menor concentración para alcanzar la precipitación total de la fracción proteica. Adicionalmente, las dos últimas columnas a la derecha, muestran los valores de los parámetros para los vinos anteriormente ensayados, vinos tinto y blanco. Este último análisis se realizó empleando como control la linealización de “saliva en agua” y no el control experimental, del mismo modo que para el análisis de los vinos gota y prensa en esta ocasión. (** = pendiente de Hill, entregada por la ecuación de la curva sigmoidea; ver detalle en **Tabla 6** de Material Complementario; *** = punto de equivalencia en ensayo anterior, **Figura 31**)

Parámetros	Linealización de Saliva		Linealización de Saliva	
	Vino gota	Vino prensa	Vino blanco	Vino tinto
CE media (% v/v)	33,5	32,2	11,5	18,6
Log CE media	1,52	1,51	1,06	1,23
Pendiente de Hill**	2,97	2,54	5,95	2,69
Punto de equivalencia	1:0,5	1:0,45	-	1:0,4***

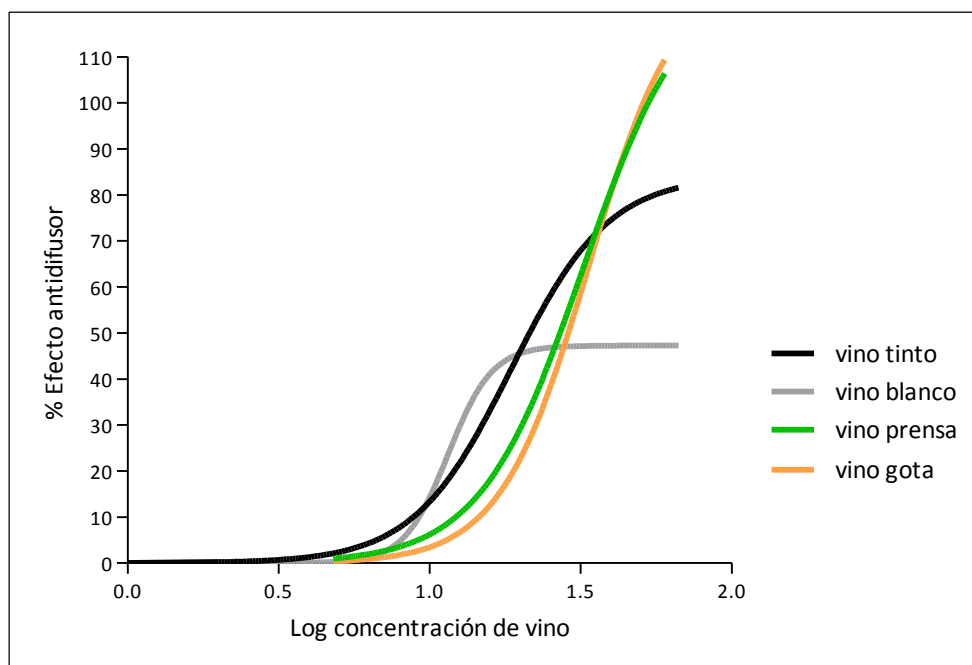


Figura 40. Efecto antidifusor de vinos de distinta composición polifenólica sobre la saliva. Evaluación de la interacción entre saliva y distintas matrices vínicas a partir de ensayos de difusión sobre membranas de celulosa. Las tendencias muestran que los vinos de mayor contenido fenólico total (**Tablas 5 y 6**), gota y prensa, tienen un exacerbado efecto antidifusor frente a un vino tinto comercial y, mayor aún sobre un vino blanco comercial de escaso contenido fenólico, a concentraciones sobre 20% (equivalente a la razón 1:0,25 proteína:vino y a 1,3 en escala Logarítmica). Sin embargo, con el vino tinto comercial se observaría un efecto con menor concentración en una mezcla con saliva.

5. DISCUSIÓN

5.1. Modo de difusión de suspensiones proteicas en membrana de celulosa

Ensayos de difusión y de precipitación sobre membranas de celulosa han sido empleados en el estudio del comportamiento de fluidos humanos complejos como la lágrima y la saliva, valiéndose de que la membrana de celulosa actúa como un soporte sólido en el que se inmoviliza y se detecta el componente proteico, mediante tinción con colorante selectivo (López-Cisternas *et al.*, 2007). El modo de difusión sobre membrana de celulosa permite la caracterización de los fluidos a partir de un enfoque macromolecular (López-Cisternas *et al.*, 2001; Morales-Bozo *et al.*, 2007; Obreque-Slier *et al.*, 2010c; Obreque-Slier *et al.*, 2012). Algunas publicaciones (López-Cisternas *et al.*, 2001; Obreque-Slier *et al.*, 2010a; Obreque-Slier *et al.*, 2010b; Obreque-Slier *et al.*, 2010c; Obreque-Slier *et al.*, 2012) y una diversidad de Tesis de pregrado y postgrado (Meza, 2011; Martínez, 2012; Obreque-Slier, 2010; entre otras) de nuestro grupo de investigación han empleado esta técnica como una herramienta reproducible en el estudio de fenómenos asociados a estos fluidos, fundamentalmente, de acuerdo a aspectos cualitativos.

La saliva total humana difunde sobre membrana de celulosa con un atributo característico, su modo de difusión bifásica, y de manera reproducible. Al diluir la saliva en agua, su difusión aumenta (área de difusión de fracción proteica y de solución total) En vista de que la saliva es un fluido organizado, este comportamiento se produciría debido a que con el aumento de la presencia de agua los sitios reactivos que se ocupaban de la interacción saliva-celulosa están ahora ocupados por moléculas de agua. El material salival es altamente hidrofílico y por ello vemos el aumento del área de difusión de la fracción proteica a diluciones bajas en agua, cuando la saliva se encuentra presumiblemente aún organizada (dilución hasta 1:2 según microdesecados, ver en Material Complementario, **Figura 2**). Por ello, en las diluciones muy bajas disminuye la interacción con la celulosa, aumentando el área de difusión de la fracción proteica. Sin embargo, a medida que aumenta la dilución de la saliva en agua, aumenta la retención por parte de la membrana de celulosa. Este aumento es comparativamente mayor que el observado para la proteína

estándar BSA. El material proteico de la saliva se encuentra altamente glicosilado, esta condición le otorga la capacidad de formar puentes de hidrógeno, los que podrían participar en la interacción con la celulosa. El contenido netamente proteico del BSA difundiría con menor retención que la saliva porque no contiene oligosacáridos que facilitan la interacción con la celulosa.

La complejidad y la organización de la saliva queda entrevista por el ensayo de difusión de “saliva alterada” sobre membranas de celulosa. Los resultados señalan que la observación de las fases difusible y no difusible de la saliva es dependiente de, al menos, la organización a través de enlaces disulfuro y de la presencia de macromoléculas, las cuales componen la fracción no difusible. Un aspecto novedoso de la técnica de detección de proteína sobre membranas de celulosa es la posibilidad de trabajar *in vitro* con un material complejo, como es la saliva total humana. Adicionalmente, los microdesecados de saliva revelan una estructuración no al azar de los componentes salivales, reforzando esta observación.

5.2. Método de evaluación de interacciones polifenoles-proteínas sobre membranas de celulosa

El estudio de la astringencia requiere del empleo de herramientas cuantitativas que permitan la evaluación expedita, objetiva, independiente y confiable de la interacción entre polifenoles de interés enológico y proteínas. Particularmente, la agregación y disminución del componente proteico en las fases difusible y no difusible de la saliva han sido vinculadas a la interacción de la saliva con taninos enológicos asociados a la sensación de astringencia (Obreque-Slier *et al.*, 2010c). La alteración del modo de difusión se asocia a la formación de interacciones moleculares que originan complejos supramoleculares menos difusibles (Morales-Bozo *et al.*, 2007), los cuales son el foco de la investigación *in vitro* asociada a la sensación de astringencia. De esta manera, se planteó inicialmente si la interacción observada entre un polifenol (ácido tánico) y BSA o saliva (ver en Material complementario, **Figura 1**) se comportaba de manera lineal en algún rango de estudio en los ensayos de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa. En este modelo,

entendemos como “interacción” el efecto antidifusor y el efecto precipitante de soluciones de polifenoles (particulares o vinos que los contengan) sobre soluciones proteicas (BSA o saliva), producidos por interacciones físico-químicas (hidrofóbicas, puentes de Hidrógeno y electrostáticas). Se implementó un protocolo de análisis de datos para optimizar la información obtenida de los ensayos de difusión y precipitación, determinando una dependencia lineal y generando una herramienta de estudio cuantitativo de las interacciones entre polifenoles o matrices vínicas que los contienen y saliva. La evaluación cuantitativa permite además establecer parámetros específicos de la progresión de las interacciones. Específicamente, la concentración efectiva mínima, la concentración efectiva media y la pendiente de las curvas, sumados al punto de equivalencia de la precipitación (Obreque *et al.* 2010a), confieren un conjunto de indicadores para futuras investigaciones en enología y viticultura. Otro indicador correspondiente es el Efecto máximo. Sin embargo, se observó que a diluciones altas del estudio, el efecto antidifusor máximo se sobrepone con la precipitación de la fracción proteica salival. Por tanto, la precipitación total corresponde a la interacción máxima por definición y este punto no es un valor en la curva de antidifusión, sino el punto de equivalencia.

El trabajo desarrollado en esta Tesis no permite plantear los parámetros en base a relaciones de concentraciones o de volúmenes que sean absolutas. Las concentraciones efectiva mínima y efectiva media señalan la concentración volumen-volumen en una mezcla a la que se produce el efecto respectivo, pero tratándose de reactivos no puros, los parámetros dependen de la concentración y composición de polifenoles de cada agente antidifusor. Asimismo, el Punto de Equivalencia de la precipitación (Obreque *et al.* 2010a) es semi-cuantitativo porque relaciona el reactivo enológico, que es un extracto polifenólico (vino), es decir, una mezcla de constituyentes, con la solución proteica, una proteína pura de concentración conocida. Mas, al emplear una muestra biológica compleja (saliva), nuevamente los valores no son absolutos. En estudios en que se han empleado polifenoles de masa molecular conocida o estimada y una masa conocida de proteína estándar precipitada (albúmina), ha sido posible estimar el número de moléculas

de polifenol precipitante necesarias por cada molécula de proteína precipitada (Obreque-Slier *et al.*, 2010a). En el caso del vino tinto, la literatura enológica suele emplear descriptores globales de la composición vínica, como son el contenido total de polifenoles (fenoles totales en cantidad equivalente de ácido gálico) o el contenido de taninos totales (en equivalentes de epicatequina). Es posible realizar dicha estandarización ponderando las concentraciones con la información composicional general de los vinos empleados, el criterio queda disponible de ser precisado de acuerdo a las aplicaciones concretas que se den a este método. Ciertamente, el comportamiento de las curvas sigmoideas persistiría.

Los taninos reaccionan con colorantes intensificando las tinciones (efecto mordiente). En el contexto general de nuestros experimentos, la reactividad del Coomassie Blue con las proteínas pudo verse potenciada por la presencia de los taninos del vino. Esto produciría la sobreestimación de la presencia de proteína no precipitada en los ensayos de precipitación y error en la estimación del punto de equivalencia. Para abordar esta dificultad en la identificación del punto de equivalencia, se estudió la superposición de imágenes basando el criterio también en la coloración violácea (antociánica). Mediante la superposición de imágenes se ha contribuido con una herramienta sencilla al esclarecimiento de forma gráfica del punto de equivalencia entre un agente y una suspensión proteica.

Una vez conocido y modelado el comportamiento de diluciones de saliva humana sobre membranas de celulosa, la evaluación (cuantitativa) de la interacción con reactivos enológicos mediante ensayos de difusión y precipitación se remite a pocas horas. Además, esta evaluación considera el material biológico más cercano al fenómeno fisiológico de la percepción de la astringencia, como es la saliva, antes que la sola evaluación de la interacción de los componentes enológicos con proteínas modelo. Estos aspectos representan considerables ventajas sobre los métodos que se han propuesto como correlatos analíticos de la astringencia. Futuras evaluaciones sensoriales establecerán el vínculo del método aquí propuesto con aspectos del conjunto de sensaciones denominado astringencia.

5.3. Interacción de vino con proteína modelo

A partir de los ensayos entre una proteína modelo (BSA) y un ácido tánico, se asoció una interacción conocida, es decir, la tendencia hacia la formación de complejos insolubles, con un comportamiento observable en membranas de celulosa, el efecto antidifusor. Describir la reactividad entre polifenoles de interés enológico y una proteína modelo es muy importante para llegar a comprender las interacciones que subtienden la experiencia sensorial al degustar un vino. En el mismo interés, se describió la reactividad de la proteína con el vino, esto es, con la matriz vínica completa.

En el estudio de la interacción entre BSA y vino tinto se observó que la formación de complejos, tanto en el efecto antidifusor y en el efecto precipitante, dependen de la presencia de vino en la mezcla. A medida que se aumenta la concentración de vino en la mezcla con proteína BSA, aumentan las respuestas antidifusora y precipitante, hasta un máximo. El efecto antidifusor, particularmente, quedó descrito mediante una relación sigmoidea entre el porcentaje del efecto antidifusor y el logaritmo de la concentración de vino en la mezcla.

Considerando al vino blanco como un control enológico, por un lado, el efecto precipitante del vino tinto se relacionaría directamente con el contenido de polifenoles presente en él, dado que cualquier efecto que pudiesen tener otros componentes de la matriz vínica, tales como etanol y ácidos orgánicos también presentes en vino blanco, no sería del tipo precipitante o no se estaría manifestando en ausencia de los polifenoles. Por otro lado, el efecto antidifusor estaría asociado principalmente a la presencia de los polifenoles (diferencia primordial entre vinos blanco y tinto), aunque también en parte, a otros componentes en matrices vínicas. De acuerdo a la literatura, la formación de complejos o la agregación se puede observar por influencia del grado alcohólico y del pH del vino (Kallithraka *et al.*, 1997; Obreque-Slier *et al.*, 2010c; Rinaldi *et al.*, 2012) y nuestros resultados son concordantes con esta observación, en vista de que se evidencia un leve efecto antidifusor por la presencia de una matriz vínica escasa en polifenoles pero con las características de grado alcohólico y pH habituales de los vinos. Sin embargo, el

vino blanco como reactivo enológico no cumple con la definición como agente de interacción que hemos establecido en el modelo, esto es, que produzca un efecto antidifusor y un efecto precipitante. Por el contrario, el vino tinto produce un efecto antidifusor intenso sobre BSA (sobre el 80%).

De acuerdo a la relación logarítmica establecida para el efecto antidifusor y unificando con el efecto precipitante observado, inferimos que: antes del punto de equivalencia o del efecto antidifusor máximo, en el tramo lineal superior de la curva, coexisten complejos solubles e insolubles, debido al aumento de la respuesta a medida que aumenta el vino tinto y a que se observaron sedimentos correspondientes a la precipitación parcial del contenido proteico en las mezclas. Este razonamiento sería consistente con los modelos que señalan que la precipitación es un evento que requiere de una agregación mayor de las proteínas producida por el vino tinto. De esta manera, el análisis de curvas concentración de vino o agente enológico versus efecto antidifusor puede aportar información adicional al Punto de Equivalencia en la caracterización de reactivos de interés enológico. Concretamente, el vino tinto es un intenso antidifusor con la capacidad de formar complejos solubles con una proteína modelo (albúmina), de manera dependiente de su concentración en la mezcla y con la capacidad de formar complejos insolubles, a diferencia del vino blanco, en el rango de diluciones del estudio.

En suma, la interacción entre vino tinto y BSA produce la formación de agregados (complejos). La difusión de estos sobre membranas de celulosa es menor que la difusión de la proteína pura. A concentraciones bajas de vino, los agregados serían de carácter soluble (no precipitan ante una centrifugación leve). A mayores concentraciones de vino, se observa la aparición de pellet en los tubos y aumenta el efecto antidifusor sobre la fracción proteica. En esta condición, coexistirían complejos solubles e insolubles. Con el aumento progresivo de la concentración de vino tinto ocurriría la sedimentación total de la fracción proteica. Esta interpretación se resume en la **Figura 41**.

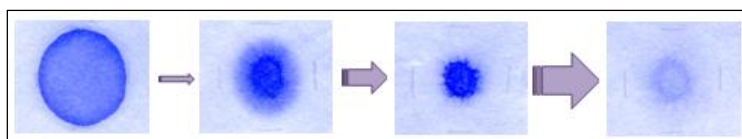
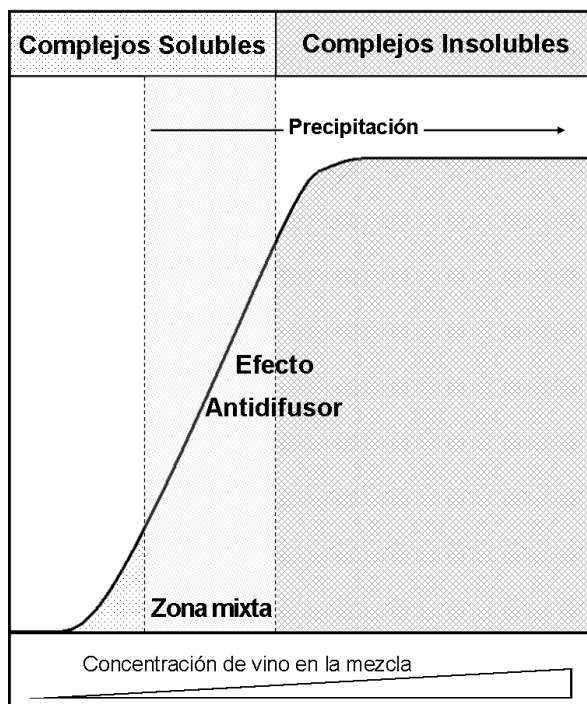


Figura 41. Interpretación de la interacción proteína-vino tinto. De acuerdo a una concentración específica de vino (concentración efectiva mínima, % v/v de vino en la mezcla), se iniciará el efecto antidifusor (formación de complejos solubles). A medida que aumenta el porcentaje de vino tinto en la mezcla, la agregación es dependiente de la concentración de vino. En determinado momento en la progresión, se generan complejos insolubles y estos coexisten con los complejos solubles (Zona Mixta). A concentraciones elevadas de vino tinto, la interacción transcurre directamente en la forma de complejos insolubles. Esta interpretación se aplica también al encuentro en solución de la fracción proteica salival con el vino tinto, cuya interacción también transcurre en etapas.

5.4. Interacción de matrices vínicas con saliva humana *in vitro*

Nuevamente, el efecto antidifusor y el efecto precipitante dependen de la presencia de vino en la mezcla. A medida que se aumentó la concentración de vino en la mezcla con saliva, aumentaron las respuestas antidifusora y precipitante, hasta un máximo. Particularmente, el efecto antidifusor del vino tinto sobre la fracción proteica salival quedó descrito mediante una relación sigmoidea entre el porcentaje del efecto antidifusor y el logaritmo de la concentración de vino en la mezcla. De manera similar al efecto observado sobre la proteína modelo BSA, tanto el vino blanco como el vino tinto presentan un efecto antidifusor equivalente a concentraciones bajas, pero a concentraciones mayores el efecto del vino tinto sobrepasa el del vino blanco. Sin embargo, el vino blanco tiene efecto antidifusor mayor sobre saliva humana que sobre la proteína BSA. En efecto, el vino blanco tiene capacidad precipitante sobre la fracción proteica salival, aunque parcial. Esta interacción observada se atribuye, principalmente, a otros componentes en matrices vínicas comunes para tintos y blancos, más que a la presencia de polifenoles (sumamente baja en el vino blanco). Según los antecedentes en la literatura, otros componentes del vino (tinto) como etanol y ácidos interactúan con el material proteico salival contribuyendo a los polifenoles en la agregación macromolecular (antidifusión) y a la formación de complejos insolubles (Obreque *et al.*, 2010c; Rinaldi *et al.*, 2012). Por un lado, el método de evaluación propuesto permitiría estudiar la contribución de estos componentes a la interacción y, por otro lado, sin lugar a dudas los resultados indican que es distinto el estudio de las interacciones empleando muestra salival que a través de una proteína modelo (idea reforzada con la observación de microdesecados salivales). Ampliando esta noción, con el empleo de BSA las contribuciones de otros componentes de la matriz vínica en el fenómeno de astringencia estarían siendo subestimadas.

Específicamente, con saliva humana el efecto antidifusor se inicia posteriormente que con BSA y se señala que la interacción se da en un tramo más acotado de concentraciones de vino. Pareciera ser que el vino tinto tienen mayor capacidad antidifusora sobre BSA (1

mg/ml), que las transformaciones en la agregación ocurrirían de forma más paulatina que con saliva y que para comenzar a agregar la saliva, a su vez, se requiere alcanzar mayor presencia de vino en la mezcla que para BSA. Así, la capacidad con que un agente enológico agrega BSA no necesariamente sería asociable a la capacidad complejante sobre la saliva de la boca, dependería del rango de concentración de vino.

De acuerdo al ensayo de matrices vínicas ricas en polifenoles, en la etapa inicial de la vinificación el prensado no habría aportado características al vino gota que le confieran la posibilidad de modificar la interacción con la proteína salival. Comparativamente con el vino tinto empleado, estos vinos alcanzaron mayor efecto antidifusor máximo, pero inician el efecto posteriormente al vino tinto. La diferencia en cantidad de polifenoles podría explicar las diferencias en la magnitud de la antidifusión (máxima). Otra diferencia entre estas matrices vínicas y la del vino tinto sería el nivel de complejidad de los polifenoles debido a la etapa de maduración por la que ha pasado el vino tinto. Según nuestros antecedentes, cabe preguntarse si polifenoles más complejos iniciarían un efecto antidifusor con menor concentración, mientras que los oligómeros podrían generar mayor agregación, pero con menor capacidad precipitante (mayor punto de equivalencia). Esto es interesante de acuerdo al antecedente de que oligómeros también producen astringencia (McRae *et al.*, 2011) y de que esta se encontraría más relacionada a la interacción que a la precipitación (Obreque-Slier *et al.*, 2010b).

Kallithraka *et al.*, 1998 observaron la aparición de un nuevo *peak* en el cromatograma de HPLC al estudiar saliva de individuos antes y después de degustar vino y una solución de vino modelo en base a extracto de semilla. Este nuevo *peak* fue atribuido a la aparición de complejos proteína-polifenoles solubles y, en vista de que el área del nuevo *peak* en presencia de solución modelo fue generalmente menor que el área obtenida para el vino, estos resultados indicarían que la interacción con el vino conduce a la formación de complejos menos solubles que los mismos formados con la solución modelo. Para esta Tesis, esta discusión fortalece la visión de estudiar por separado (con parámetros distintos) la capacidad precipitante y la capacidad formadora de complejos solubles. El

conjunto de parámetros establecido, podría ser aplicado en este caso para calificar al vino y la solución modelo en cuanto a su efecto complejante (antidifusor), previo a la precipitación.

En vista de todo lo anteriormente señalado, la interacción entre vinos tinto y la fracción proteica salival produce la formación de agregados (complejos). Esta interacción queda descrita en membranas de celulosa por un efecto antidifusor, respecto de la difusión de la fracción proteica sola. A concentraciones bajas de vino, los agregados serían de carácter soluble (no precipitan ante una centrifugación leve). A mayores concentraciones de vino, coexistirían complejos solubles e insolubles. Con el aumento progresivo de la concentración de vinos tinto ocurriría la sedimentación de la totalidad de la fracción proteica. Esta interpretación se resume en la **Figura 41**.

Desde un punto de vista analítico, nuestras observaciones permiten proponer una herramienta de estudio cuantitativo de las interacciones entre proteínas (BSA y fracción proteica de la saliva) con reactivos enológicos. Más allá, la aplicación de esta herramienta analítica permitiría comparar vinos (tintos) entre sí de acuerdo a los parámetros definidos y este método de evaluación cuantitativo sería una contribución al enólogo encargado de la práctica vinícola en la toma de decisiones, hasta ahora empíricas, sobre los momentos más apropiados para el término de una etapa y el inicio de la siguiente, en el manejo de los polifenoles en el vino y su potencialidad sensorial. Asimismo, el ensayo que se propone permitiría evaluar el desplazamiento o modificación de la curva por efecto de factores específicos de la matriz vínica, adicionales a los polifenoles. Entre éstos cabe destacar etanol, ácidos orgánicos, manoproteínas y pectinas. Las evaluaciones modelarían el efecto de estos componentes sobre la interacción *in vitro*.

Esta Tesis es una significativa contribución al estudio de interacciones polifenoles-proteínas sobre membranas de celulosa y un diseño experimental que focaliza el estudio sobre saliva y reactivos enológicos reales, con énfasis en la descripción objetiva de interacciones que han sido asociadas a la sensación de astringencia.

6. CONCLUSIONES

- La difusión de proteínas sobre membranas de celulosa es inhibida por la presencia de polifenoles. Para un determinado polifenol, dicho efecto antidifusor es dependiente de la concentración del polifenol. Cuando se emplea polifenoles como parte de una matriz vínica, el efecto antidifusor muestra una relación sigmoidea con el logaritmo de la concentración de polifenoles. La relación sigmoidea establecida es observable tanto con suspensiones homogéneas de albúmina como con saliva humana. Esta relación, altamente reproducible, permite su incorporación a un protocolo estandarizado de evaluación cuantitativa de interacciones entre polifenoles y proteínas.
- La solubilidad de la albúmina y de la fracción proteica de la saliva disminuye en presencia de polifenoles del vino pudiendo alcanzar la precipitación total, condición correspondiente al Punto de Equivalencia. Éste parámetro es parte integral de la evaluación cuantitativa de interacciones entre polifenoles y proteínas.
- El método desarrollado permite la evaluación de las interacciones entre saliva total humana y polifenoles en distintas matrices vínicas. Las concentraciones de proteínas en la saliva humana se corresponden con las requeridas para dicha evaluación.
- Los segmentos de las curvas sigmoideas que describen la interacción proteínas salivales-polifenoles del vino *in vitro* representarían la formación inicial de complejos solubles seguida de la formación de complejos insolubles. Al interactuar con saliva humana, distintas matrices vínicas producen distintas curvas sigmoideas, reflejando distinta capacidad para formar complejos solubles e insolubles.

7. BIBLIOGRAFÍA

American Society for Testing and Materials. Standard definitions of terms relating to sensory evaluation of materials and products. *Annual book of ASTM standards*. 2004

Bacon, J. R. y Rhodes, M. J. C. (1998) Development of a competition assay for the evaluation of the binding of human parotid salivary proteins to dietary complex phenols and tannins using a peroxidase-labeled tannin. *J Agric Food Chem*, **46**: 5083-5088

Bajec, M. R. y Pickering, G. J. (2008) Astringency: Mechanism and Perception. *Crit Rev Food Sci Nutr*, **48**: 1-18

Baxter, N., Lilley, T., Haslam, E., Williamson, M. (1997) Multiple interactions between Polyphenols and a Salivary Proline-Rich Protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochem*, 36(**18**): 5566-5577

Bennick, A. (2002) Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Crit Rev Oral Biol Med*, 13(**2**): 184-196

Castillo García, Encarna. Manual de Fitoterapia. ElsevierDoyma, S. L. 2007. Capítulo 3

Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., de Freitas, V. (2006) Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *J Agric Food Chem*, **54**: 8936-8944

Charlton, A., Baxter, N., Khan, L., Moir, A., Haslam, E., Davies, A., Williamson, M. (2002) Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J Agric Food Chem*, **50**: 1593-1601

Cheynier, V., Moutounet, M., Sarni-manchado, P. en Flanzky, C. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. AMD Ediciones, Mundi-Prensa. Primera edición, año 2000

De Freitas, V., Mateus, N. (2001) Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem*, **49**: 940-945

Esser, D., Álvarez-Llamas, G., Vries, M., Weening, D., Vonk, R., Roelofsen, H. (2008) Sample stability and protein composition of saliva: Implications for its use as a diagnostic fluid. *Biomark Insights*, **3**: 25-37

Gawel, R. (1998) Red wine astringency: a review. *Aust J Grape Wine Res*, **4**: 74-95

Glories, Y. (1984) La couleur des vins rouges. *Conn Vigne Vin*, **18**: 195-217

Hagerman, A., Butler, L. (1981) The specificity of proanthocyanidin-protein interaction. *J Biol Chem*, 256(**9**): 4494-4497

- Harbertson, J. F., Spayd, S. (2005) Measuring Phenolics in the Winery. *Am J Enol Vitic*, **53**:3, 280-288
- Horne, J., Hayes, J., Lawless, H. (2002) Turbidity as a measure of salivary protein reaction with astringent substances. *Chem Senses*, **27**: 653-659
- Jacobs, R., Wu, C. -H., Goossens, K., Van Loven, K., Van Hees, J., Van Steenberghe, D. (2002) Oral mucosal versus cutaneous sensory testing: a review of the literature. *J. Oral Rehab*, **29**: 923-950
- Jöbstl, E., O'Connell, J., Fairclough, J. P., Williamson, M. P. (2004) Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules*, **52**: 942-949
- Joslyn, M. A. y Goldstein, J. L. (1964) Astringency of fruits and fruit products in relation to phenolic content. *Adv Food Res*, **13**: 179-217
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M. (1997) Effect of pH on astringency in model solutions and wines. *J Agric Food Chem*, **45**: 2211-2216
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford N. M. (1998) Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *J Sensory Studies*, **13**, 29-43
- Kaufman, E, Lampster, I. (2000) Analysis of saliva for periodontal diagnosis. *J Clin Period* , **27**, 453-465
- Kennedy, J. A. (2008) Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Cien Inv Agr*, 35(2): 107-120
- Lee, C. B., Lawless, H. T. (1991) Time-course of astringent sensations. *Chem Sense*, **16**: 225-238
- Lesschave, I., Noble, A. (2005) Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am J Clin Nutr*, **81**: 330S-335S
- Llaudy, M., Canals, R., Canals, J-M, Rozés, N., Arola, L., Zamora, F. (2004) New method for evaluating astringency in red wines. *J Agric Food Chem*, **52**: 742-746
- López-Cisternas, J., Castillo, J., Traipe, L., López-Solís, R. (2007) A protein dry-binding assay on cellulose membranes for tear protein quantification. Use of convencional Schirmer Strips. *Cornea*, **26**: 970-976
- Lyman, B. J. y Green, B. G. (1990) Oral astringency: effects of repeated exposure and interactions with sweeteners. *Chem Senses*, **15**: 151-164

Martínez Fuentealba, Mario. (2012) Efecto de una pectina comercial sobre la interacción entre proantocianidinas de semilla de *Vitis vinífera* var. Carménère y la proteína salival. Memoria de título. Facultad de Ciencias Agronómicas-Universidad de Chile

Mateus, N., Carvalho, E., Luís, C., de Freitas, V. (2004) Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein–tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta*, **513**: 135–140

McRae, J. M., Kennedy, J.A. (2011) Wine and grape tannin interaction with salivary proteins and their impact on astringency: a review of current research. *Molecules*, **16**: 2348-2364

Meza Candia, Millaray. (2012) Efecto de una manoproteína sobre la interacción tanino-proteína salival. Memoria de Título. Facultad de Ciencias Agronómicas-Universidad de Chile

Morales-Bozo, I., Urzúa-Orellana, B., Landaeta, M; Montalbán, R., Torres, J., Pinochet, A., Valdeverde, G., Muñoz-Martínez, A. (2007) Molecular alterations in parotid saliva of infantile chronic recurrent parotitis. *Pediatr Res*, **6**: 203-208

Obreque-Slier, E., Peña-Neira, A., López-Solís, R., Ramírez-Escudero, C., Zamora-Marín, F. (2009) Phenolic characterization of commercial enological tannins. *Eur Food Technol*, **229**: 859-866

Obreque Slier, Elías. (2010) Caracterización fenólica de uvas de cultivar carménère y su relación con la sensación de astringencia. TESIS DOCTORAL. Universitat Rovira i Virgili

Obreque-Slier, E., Mateluna, C., Peña-Neira, R., López-Solís, R. (2010a) Quantitative Determination of Interaction between Tannic Acid and a Model Protein using Diffusion and Precipitation Assays on Cellulose Membrane. *J Agric Food Chem*, **58**: 8375-8379

Obreque-Slier, E., López-Solis, R., Peña-Neira, A., Zamora-Marín, F. (2010b) Tannin-protein interaction is more closely associated with astringency than tannin-protein precipitation: experience with two enological tannins and gelatin. *Int J Food Sci and Tech*, **45**: 2629-2636

Obreque-Slier, E., Peña-Neira, A., López-Solis, R. (2010c) Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *J Agric Food Chem*, **58**: 3729–3735

Obreque-Slier, E., Peña-Neira, A., López-Solis, R. (2012) Interactions of enological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *Int J Food Sci and Tech*, **45**: 88-93

Petti, S., Scully, C. (2009) Polyphenols, oral health and disease: a review. *J Dentistry*, **37**: 413-423

- Proctor, G. B., Carpenter, G. H. (2007) Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci Basic Clin*, **133**: 3-18
- Rinaldi, A., Gambuti, A., Moio, L. (2012) Precipitation of Salivary Proteins After the Interaction with Wine: The effect of ethanol, pH, Fructose and Mannoproteins. *J Food Sci*, **77**(4): C485-C490
- Rossetti, D., Yakubov, G. E., Stokes, J. R., Williamson, A. M., Fuller, G. G. (2008) Interaction of human whole saliva and astringent dietary compounds investigated by interfacial shear rheology. *Food Hydrocolloids*, **22**: 1068-1078
- Sarni-Manchado, P., Canals-Bosch, J-M., Mazerolles, G., Cheynier, V. (2008) Influence of the glycosylation of human salivary proline-rich proteins on their interactions with condensed tannins. *J Agric Food Chem*, **56**: 9563-9569
- Schipper, R. G., Silletti, E., Vingerhoeds, M. H. (2007) Saliva as a research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Arch Oral Biol*, **52**: 1114-1135
- Simon, C., Barathieu, K., Laguerre, M., Schmitter, J-M., Fouquet, E., Pianet, I., Dufourc, E. J. (2003) Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochem*, **42**: 10385-10395
- Silvers, A., Som, P. (1998) Salivary Glands. *Radiol Clin North Am*, **36**: 941-966
- Sun, B., Leandro, C., de Freitas, V., Spranger, I. M. (2006) Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *J Chromatography A*, **1128**: 27-38
- Trulsson, M. y Essick, G. K. (1997) Low-threshold mechanoreceptive afferents in the human lingual nerve. *J. Neurophysiol*, **77**: 737-748
- van Vliet, T., Van Aken, G. A., de Jongh, H. J., Hamer, R. J. (2009) Colloidal aspects of texture perception. *Adv in Colloid and Interface Sci* **150**: 27-40
- Walsh, L. (2008) Aspectos clínicos de biología salival para el Clínico Dental. *J Minim Interv Dent*, **1**: 5-25
- Waterhouse, A. L. (2002) Wine Phenolics. *Ann N Y Acad Sci*, **957**: 21-36
- Zamora Marín, F. Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos. AMD Ediciones, Mundi-Prensa. Primera edición, año 2003

8. MATERIAL COMPLEMENTARIO

8.1.1. Análisis composicional general de vinos

La caracterización de todos los vinos empleados se realizó en el laboratorio de los Viñedos Villaseñor (Itahue, VII Región del Maule) empleando los procedimientos que se señalan a continuación.

Determinación del pH

Corresponde a la determinación de la acidez real o concentración de iones H^+ , independientemente del tipo de ácido que el vino contenga. La determinación del pH entrega una medida relacionada con la cantidad de ácidos y también con su fuerza o grado de disociación. Se mide en un pHmetro, previa calibración con soluciones tampón estándares de pH 4,0 y pH 7,0, sumergiendo el electrodo en un volumen suficiente de vino. Se realizaron dos repeticiones de cada medición (Manual de Laboratorio de Análisis de Mostos y Vino, 2011).

Determinación de acidez total

La acidez total o acidez de titulación corresponde a la suma de los ácidos valorables luego de haber llevado el pH a 7 por adición de una solución alcalina. La cantidad de ácidos se determina por medio de titulación con una solución de hidróxido de sodio previamente valorada. Se emplea azul de bromotinol como indicador (viraje en pH de 6,0 a 7,6) (Manual de Laboratorio [...], 2011).

Determinación de acidez volátil

La acidez volátil es el conjunto de ácidos grasos de cadena corta, como el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico, entre otros, que se encuentran en el vino. Se producen durante la fermentación por efecto del metabolismo de la levadura. En concentraciones mayores a 0,7-0,8 g/L afectan negativamente la calidad del vino. La acidez volátil se determina con el método de Blarez que consiste en el arrastre de los ácidos empleando una corriente de vapor de agua y titulación del destilado con solución patrón de hidróxido de sodio 0,1 N. El valor de la acidez volátil se expresa en g/L de ácido acético (Manual de Laboratorio [...], 2011).

Determinación de azúcares reductores

Si un vino está bien fermentado contiene cantidades muy bajas de azúcares reductores residuales, un valor normal es inferior a 2 g/L. Estos azúcares corresponden principalmente a pentosas con características reductoras pero que no son fermentables, y en concentraciones normales le otorgan características de *vino seco*. Por el contrario, concentraciones mayores a 5 g/L de azúcares reductores conceden al vino un sabor dulzón, considerado un defecto sensorial. Estas concentraciones conducen al desarrollo importante de microorganismos patógenos (bacterias acéticas y lácticas) capaces de producir compuestos que deterioran el vino, incluso totalmente. La

determinación de azúcares reductores consiste en la cuantificación de sus grupos funcionales, cetonas y aldehídos, con una solución cupro-alcalina conocida como Licor de Fehling Causse-Bonnans, el cual se titula previamente con una solución de glucosa anhidra. En el vino existen otras sustancias reductoras que no son azúcares, los polifenoles. Estos se eliminan mediante “decoloración” del vino, adicionando carbón vegetal. Finalmente, se valora el vino decolorado con el Licor de Fehling Causse-Bonnans de título conocido. La concentración de azúcares del vino se expresa en g/L de glucosa (Manual de Laboratorio [...], 2011).

Determinación de intensidad colorante

La intensidad colorante y la luminosidad son características cromáticas del vino. De acuerdo a un análisis espectrofotométrico, dependiendo de su coloración se observarán máximos de absorbancia a 420 nm (color amarillo), a 520 nm (color rojo) o a 620 nm (color azul). Un vino tinto joven presenta un máximo en su espectro de absorción a 520 nm (rojo) y un mínimo de absorción a 420 nm (amarillo), mientras que en los vinos tintos envejecidos se puede reconocer un comportamiento a la inversa, con máximo de absorción a 420 nm y mínimo a 520 nm. El procedimiento para determinar la intensidad colorante consiste en medir las absorbancias a 420, 520 y 620 nm para los vinos tintos. La intensidad colorante del vino tinto corresponde a la adición de tres absorbancias. Para los vinos blancos, se determina sólo la absorbancia a 420 nm (Manual de Laboratorio [...], 2011).

Determinación de grado alcohólico

El grado alcohólico es el volumen en litros de etanol absoluto contenidos en 100 litros de vino (%v/v). Por convención se expresa en p/v multiplicando por la densidad del etanol. El rango normal de grados alcohólicos en el vino es de 9 a 16°. Su determinación es densitométrica y se basa en el empleo de un alcoholímetro (Manual de Laboratorio [...], 2011).

Determinación de anhídrido sulfuroso

El anhídrido sulfuroso (SO_2) se emplea como aditivo en vinificación de manera prácticamente imprescindible. La correcta utilización de SO_2 permite obtener vinos menos oxidados, con mejor color y mejor aroma. Sin embargo, un exceso de SO_2 puede alterar el color, el sabor y generar mercaptanos y sulfuro de hidrógeno, los cuales son perjudiciales para la salud. Para la determinación de SO_2 libre y total, se emplea el método de Ripper (oficial en Chile), basado principalmente en una titulación redox en que el SO_2 reacciona con yodo. La cuantificación de SO_2 total se diferencia de la determinación de SO_2 libre debido a que la primera involucra una hidrólisis en medio alcalino fuerte para liberar el HSO_3^- unido a acetaldehído y a otras moléculas orgánicas en el vino. Los resultados se expresan en mg/L SO_2 libre o total (Manual de Laboratorio [...], 2011).

Determinación de fenoles totales

La determinación de fenoles totales corresponde a la determinación del conjunto de compuestos fenólicos presentes en el vino. Se determinan midiendo la absorbancia a 280 nm

confeccionándose una curva de calibración con el estándar ácido gálico (Manual de Laboratorio [...], 2011).

Determinación de taninos totales

El método que se empleó para cuantificar taninos se basa en la capacidad de estos para formar complejos al interactuar con un polímero, resultando un precipitado que puede ser separado por centrifugación. Éste método emplea metilcelulosa como polímero. Alícuotas de vino son mezcladas con metilcelulosa y los complejos formados son precipitados con sulfato de amonio. Tras centrifugación se lee la absorbancia a 280 nm. Se emplea catequina o epicatequina como estándar (Manual de Laboratorio [...], 2011).

Determinación de antocianos totales

Los antocianos se caracterizan por otorgar el color rojo al vino. Para su determinación se emplea un método basado en que esta propiedad cromática cambia en presencia de decolorantes. El procedimiento consiste en realizar la decoloración de los antocianos en presencia de bisulfito de sodio y medir en espectrofotómetro la absorbancia a 520 nm. Las muestras de vino son acidificadas y alicuotadas. Cada muestra es subdividida en dos partes iguales. Una de estas es decolorada con metabisulfito de sodio y la otra es diluida en igual proporción en agua. Se lee la absorbancia de cada muestra respecto de su control (520 nm). Se emplea malvidina como estándar (Manual de Laboratorio [...], 2011).

8.1.2. Figuras y Tablas

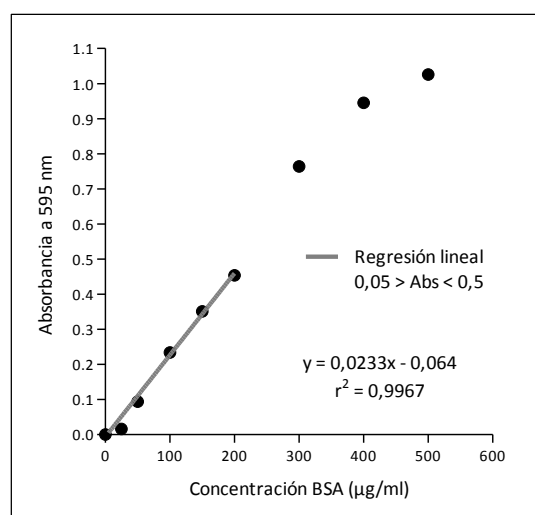


Figura 1. Curva de calibración para el método de Bradford. El rango donde existe el mejor ajuste lineal fue empleado como el rango óptimo de detección de nuestro sistema, con absorbancias mayores a 0,05 y menores a 0,5. La regresión lineal incluye los puntos dentro de este rango y el 0,0.

Tabla 1. Cuantificación de proteína en muestras de saliva. Detalle de las soluciones medidas para cada muestra salival: 3 determinaciones para STH diluida 1:6 y 3 determinaciones para solución patrón BSA 170 µg/ml. Se muestra un ejemplo de los valores y la concentración de proteína en saliva calculada según ellos.

Solución		Absorbancia a 595 nm	Promedio
Blanco 50 µl de agua		0,000	
STH 1:6 50 µl	1	0,188	0,209
	2	0,223	
	3	0,215	
BSA 170 µg/ml 50 µl	1	0,401	0,411
	2	0,407	
	3	0,425	
Concentración de proteína en STH		518 µg/ml	

Tabla 2. Diluciones de BSA en agua para estudio de difusión. Se mezclaron 50 µl de BSA con volúmenes crecientes de agua, cada dilución se detalla como una proporción entre BSA y agua. Se destaca la columna de las diluciones realizadas para el estudio de difusión en membrana de celulosa (**Figura 8**) y la columna de concentraciones de BSA en las mezclas, con las que se construyó el gráfico de la **Figura 10**.

Dilución	Volumen BSA (µl)	Volumen agua (µl)	Volumen total (µl)	Concentración de BSA (mg/ml)	Cantidad de proteína en spot (15 µl) (µg)
BSA 1mg/ml	50	0	50	1,000	15,00
1 : 0,1	50	5	55	0,909	13,64
1 : 0,2	50	10	60	0,833	12,50
1 : 0,5	50	25	75	0,667	10,00
1 : 1	50	50	100	0,500	7,50
1 : 2	50	100	150	0,333	5,00
1 : 4	50	200	250	0,200	3,00
1 : 10	50	500	550	0,091	1,36
1 : 20	50	1000	1050	0,048	0,71
1 : 30	50	1500	1550	0,032	0,48
1 : 40	50	2000	2050	0,024	0,37
1 : 50	50	2500	2550	0,020	0,29
agua	-	-	-	0,000	0,00

Tabla 3. Diluciones de saliva total humana en agua para estudio de difusión. Se mezclaron 50 µl de saliva total humana (STH) con volúmenes crecientes de agua, cada dilución se detalla como una proporción entre STH y agua. Se destaca la columna de las diluciones realizadas para el estudio de la difusión en membrana de celulosa (**Figura 12**) y la columna de concentraciones de STH en las mezclas, con las que se construyó el gráfico de la **Figura 14**. La concentración de proteínas de la muestra salival fue de 681 µg/ml (determinación mediante método de Bradford).

Dilución	Volumen STH (µl)	Volumen agua (µl)	Volumen total (µl)	Concentración de STH (% v/v)	Cantidad de proteína en spot (15 µl) (µg)
STH	50	0	50	100,0	10,22
1 : 0,1	50	5	55	90,9	9,29
1 : 0,5	50	25	75	66,7	6,81
1 : 1	50	50	100	50,0	5,11
1 : 2	50	100	150	33,3	3,41
1 : 4	50	200	250	20,0	2,04
1 : 10	50	500	550	9,1	0,93
1 : 20	50	1000	1050	4,8	0,49
agua	-	-	-	0,0	0,00

Tabla 4. Diluciones empleadas para la caracterización de la difusión de dos tipos de “saliva alterada”. La primera columna a la izquierda señala los spots en la **Figura 15** correspondientes a las diluciones realizadas. (S = saliva; SR = saliva reducida; SF = saliva filtrada)

Spot	Dilución	Volumen SR/SF (µl)	Volumen Agua (µl)	Volumen Total (µl)	Concentración de SR/SF (% v/v)
S	SR / SF	70	0	70	100,0
1	1 : 0,1	70	7	77	90,9
2	1 : 0,2	70	14	84	83,3
3	1 : 0,5	70	35	105	66,7
4	1 : 1	70	70	140	50,0
5	1 : 2	70	140	210	33,3
6	1 : 4	70	280	350	20,0
7	1 : 10	70	700	770	9,1
agua	agua	-	-	0,0	0,0

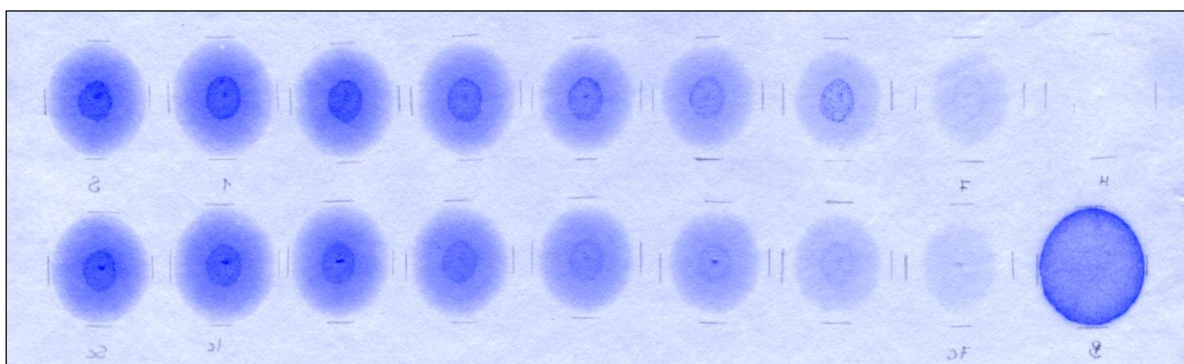


Figura 1. Efecto del ácido tánico sobre la difusión y precipitación de saliva total humana en membrana de celulosa. Ensayo de difusión (arriba) y sobrenadantes de ensayo de precipitación (abajo) sobre membrana de celulosa

Tabla 5. Detalles de ajuste de efecto antidifusor de vinos blanco y tinto a regresión no lineal “Log(agonista) versus respuesta, con pendiente variable”. Análisis realizado en software GraphPad Prism. La ecuación correspondiente a las curvas de los gráficos de las **Figuras 26 y 32** es la siguiente:

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{((\text{LogEC50} - X) * \text{HillSlope})})$$

Para BSA:

	Vino tinto	Vino blanco
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	= 0.0
Top	99,37	26,22
LogEC50	1,190	0,7334
HillSlope	2,141	4,442
EC50	15,50	5,412
Std. Error		
Top	3,188	1,656
LogEC50	0,02117	0,03608
HillSlope	0,1782	1,553
95% Confidence Intervals		
Top	92.93 to 105.8	22.82 to 29.61
LogEC50	1.148 to 1.233	0.6593 to 0.8074
HillSlope	1.781 to 2.500	1.256 to 7.629
EC50	14.05 to 17.10	4.564 to 6.418
Goodness of Fit		
R ²	0,9764	0,7789

Para saliva:

	Vino tinto	Vino blanco
Best-fit values		
Bottom	= 0.0	= 0.0
Top	83,83	47,62
LogEC50	1,264	1,063
HillSlope	2,725	6,165
EC50	18,35	11,56
Std. Error		
Top	4,312	2,145
LogEC50	0,03183	0,01830
HillSlope	0,3879	1,496
95% Confidence Intervals		
Top	75.12 to 92.53	43.29 to 51.95
LogEC50	1.199 to 1.328	1.026 to 1.100
HillSlope	1.942 to 3.508	3.145 to 9.185
EC50	15.82 to 21.27	10.62 to 12.59
Goodness of Fit		
R ²	0,9503	0,8571

Tabla 6. Detalles de ajuste de efecto antidifusor de vinos gota y prensa a regresión no lineal “Log(agonista) versus respuesta, con pendiente variable”. Análisis realizado en software GraphPad Prism. La ecuación correspondiente a las curvas se encuentra en **Tabla 5**. Los datos mostrados corresponden a los gráficos de las **Figuras 38** y **39**. En esta última, se incluyen los efectos calculados respecto de la linealización del control “saliva diluida en agua”. El detalle de la regresión lineal se muestra bajo la tabla.

Para saliva:

	Vino gota	Vino prensa	Vino tinto	Vino blanco
Best-fit values				
Bottom	= 0.0	= 0.0	= 0.0	= 0.0
Top	128,9	128,3	84,19	47,28
LogEC50	1,526	1,508	1,269	1,061
HillSlope	2,966	2,543	2,691	5,947
EC50	33,54	32,24	18,59	11,51
Span	= 128.9	= 128.3	= 84.19	= 47.28
Std. Error				
Top	11,98	11,86	6,011	1,040
LogEC50	0,03256	0,03716	0,04405	0,009166
HillSlope	0,3698	0,3017	0,5144	0,6657
95% Confidence Intervals				
Top	103.7 to 154.0	103.4 to 153.2	71.09 to 97.29	45.02 to 49.55
LogEC50	1.457 to 1.594	1.430 to 1.586	1.173 to 1.365	1.041 to 1.081
HillSlope	2.189 to 3.743	1.909 to 3.177	1.570 to 3.812	4.496 to 7.398
EC50	28.65 to 39.27	26.94 to 38.59	14.90 to 23.19	10.99 to 12.05
Goodness of Fit				
R ²	0,9821	0,9839	0,9735	0,9891

<p>Regresión lineal de áreas de difusión de saliva diluida en agua, ensayo de Figura 27a:</p> $y = -0,001749781x + 0,9531 \quad r^2 = 0,8101$
--

Tabla 7. Bitácora de muestras de saliva. Se cuantificó la concentración de proteínas presente en cada muestra de saliva colectada, mediante el método de Bradford. Aunque no todas las muestras se emplearon para ensayos mostrados en esta Tesis, la bitácora registra el rango de fluctuaciones de la concentración proteica del donante.

Fecha	Hora	Concentración de proteínas (µg/ml)
02-01-2012	12	590
03-01-2012	10	563
04-01-2012	11	598
09-01-2012	11	620
10-01-2012	11	507
09-03-2012	12	563
10-04-2012	10	401

11-04-2012	12	533
	18	560
16-05-2012	11	436
10-07-2012	11	656
12-07-2012	11	725
18-07-2012	12	700
07-08-2012	12	665
17-08-2012	11	600
18-08-2012	11	502
23-08-2012	10	561
30-08-2012	9	664
12-09-2012	10	631
13-09-2012	10	624
14-09-2012	10	556
11-10-2012	9	480
24-10-2012	9	508
26-10-2012	11	626
30-10-2012	10	522
07-11-2012	10	424
08-11-2012	11	567
08-04-2013	10	516
02-05-2013	10	681
09-05-2013	10	518
10-05-2013	10	601

Concentración promedio de proteínas en saliva
= 571 $\mu\text{g/ml}$

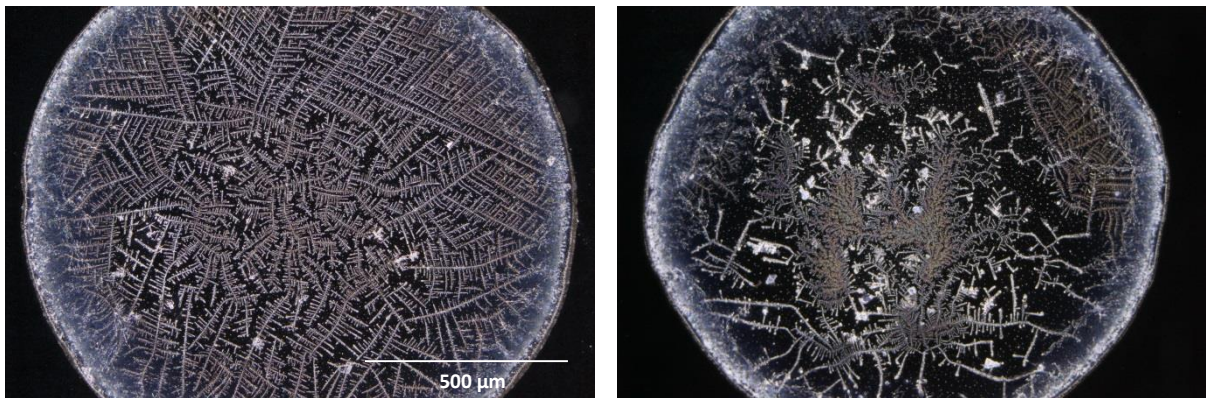


Figura 2. Microdesecados de saliva humana diluida en relación 1:2 en agua. Se observa que el material salival en algunas alícuotas persiste organizado y en otras no de la manera característica de la saliva. Los microdesecados sugieren que en esta dilución el entramado salival comienza a desorganizarse.