



**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**

**ESCUELA DE PREGRADO**

**MEMORIA DE TITULO**

**EFFECTO DE UNA MANOPROTEÍNA SOBRE LA INTERACCIÓN  
TANINO-PROTEÍNA SALIVAL**

**MILLARAY MEZA CANDIA**

**SANTIAGO-CHILE**  
**2012**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS**  
**ESCUELA DE PREGRADO**

**MEMORIA DE TÍTULO**

**EFFECTO DE UNA MANOPROTEÍNA SOBRE LA INTERACCIÓN  
TANINO-PROTEÍNA SALIVAL**

**EFFECT OF A MANNOPROTEIN ON TANNIN- SALIVARY PROTEIN  
INTERACTIONS**

**MILLARAY MEZA CANDIA**

**SANTIAGO – CHILE**  
**2012**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

**EFFECTO DE UNA MANOPROTEÍNA SOBRE LA INTERACCIÓN  
TANINO-PROTEÍNA**

**Memoria para optar al título  
Profesional de Ingeniero Agrónomo  
Mención: Enología y Vitivinicultura**

MILLARAY MEZA CANDIA

**PROFESORES GUÍAS**

Sr. Elías Obreque Slier.  
Ingeniero Agrónomo, Dr.

6,8

Sr. Remigio López Solís.  
Bioquímico, Dr.

6,6

**PROFESORES EVALUADORES**

Sr. Hugo Núñez Kalasic.  
Ingeniero Agrónomo, Mg. Sc.

6,5

Sr. Jaime Auger Saavedra.  
Ingeniero Agrónomo, Ph.D. MS.

6,0

**SANTIAGO - CHILE  
2012**

## AGRADECIMIENTO

Quiero agradecer a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este proyecto.

A mis padres, Manuel y Patricia, por entregarme el cariño, apoyo y confianza necesaria para realizar todas mis metas. Ellos son los pilares de mi vida.

A mis hermanos, Maylen y Manuel, que son la fuerza para sobrepasar cada obstáculo y así demostrarle que podemos lograr lo que queremos y sentirnos orgullosos. Los amo mucho.

A mis profesores, Elías Obreque y Remigio López, por su buena disposición, orientación, paciencia y por sobre todo el apoyo que me entregaron durante este proceso.

A mis amigas, Daniela Salazar, Myriam Toro, Patricia Rojas y Fernanda Méndez, que con nuestras reuniones de estudio y escritura, me ayudaron a realizar este proyecto, además de su inmensa amistad y cariño. También a nuestras familias, que nos atendieron y soportaron estas juntaciones.

A mis amigos y compañeros, especialmente de la “Generación 2005”, que logré tener durante este proceso estudiantil, gracias por el cariño, por los carretes y momentos inolvidables, como los paseos a la playa, cumpleaños, entre otros.

Agradecer al Proyecto Fondecyt 1110832 (Álvaro Peña Neira), por entregarme las herramientas y materiales necesarios para la realización de éste proyecto.

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<i>Palabras claves</i>	1
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<i>Key words</i>	2
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<i>Objetivo</i>	4
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>5</b>
LUGAR DEL ESTUDIO	5
MATERIALES	5
<i>Semillas, Saliva humana y Manoproteína</i>	5
<i>Solventes y Equipamiento</i>	5
MÉTODOS	6
<i>Tratamientos y Diseño Experimental</i>	6
<i>Procedimiento</i>	7
Preparación del extracto de semillas (ES)	7
Obtención de la Saliva	7
Preparación de solución de manoproteína (MP)	7
Preparación de Coomassie blue R-250 0,25%	7
Ensayos de difusión y precipitación	7
<i>Variables a medir</i>	8
Análisis polifenólico del ES	8
Ensayos de difusión y precipitación	8
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	9
<b>RESULTADOS</b>	<b>10</b>
<i>Composición fenólica del extracto de semillas</i>	10
<i>Interacción entre Manoproteína y ES o Saliva</i>	11
<i>Ensayo de interacción entre el complejo ES/MP con saliva</i>	15
<i>Ensayo de interacción del complejo ES/saliva con MP</i>	17
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>19</b>
<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>21</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>22</b>

## RESUMEN

La astringencia corresponde a una sensación táctil de sequedad, rugosidad y aspereza percibida en las mucosas de la boca, la cual está estrechamente relacionada con la interacción de proantocianidinas o taninos presentes en diferentes alimentos, tales como el vino, con las proteínas de la saliva.

Se ha observado que las manoproteínas, presentes en la pared celular de las levaduras, podrían interferir en la interacción proantocianidina-proteína salival, uniéndose a las proantocianidinas, formando estructuras moleculares estables que impiden su unión.

En este estudio se evaluó el efecto de una manoproteína sobre la interacción entre proteínas salivales y taninos proantocianidínicos de semillas de *Vitis vinifera* mediante ensayos de difusión y precipitación en membranas de celulosa.

Los resultados obtenidos, indican que la manoproteína utilizada interactúa tanto con las proteínas salivales así como con las proantocianidinas provenientes de semillas de *Vitis vinifera*.

Asimismo, la manoproteína usada, afecta significativamente la fuerte interacción entre las proteínas salivales y proantocianidinas de semillas de *Vitis vinifera*. Sin embargo, su efecto estaría estrechamente relacionado con el orden en que son mezclados los tres componentes.

### Palabras claves

Astringencia  
Proantocianidina  
Saliva  
Manoproteína

## ABSTRACT

Astringency corresponds to a sensation of dryness, roughness and harshness perceived in the mouth mucous, which is closely related to the interaction of proanthocyanidins or tannins present in different foods, such as wine, with saliva proteins.

It has been observed that the mannoproteins, present in the cell walls of yeast, might interfere with the interaction proanthocyanidin-salivary protein, joining the proanthocyanidins, forming stable molecular structures preventing such union.

The effect of a mannoprotein on the interaction between salivary proteins and tannins of seed of *Vitis vinifera* through diffusion and precipitation assays on cellulose membranes was evaluated in this study.

The results obtained indicate that the mannoprotein interacts with both the salivary proteins as well as with the proanthocyanidins coming from seeds of *Vitis vinifera*.

Likewise, the studied mannoprotein, significantly affects the strong interaction between the salivary proteins and proanthocyanidins of seeds of *Vitis vinifera*. However, this effect would be closely related to the order in which the three components are mixed.

### Key words

Astringency  
Proanthocyanidins  
Saliva  
Mannoprotein

## INTRODUCCIÓN

La astringencia corresponde a una sensación táctil de sequedad, rugosidad y aspereza en las mucosas de la boca, provocada por algunos componentes presentes en diversos alimentos, tales como las proantocianidinas o taninos de bayas de uva para la producción de vinos (Bajec y Pickering, 2008). Esta sensación, ha sido estrechamente relacionada con la interacción de las proantocianidinas con las proteínas de la saliva, lo cual provocaría una disminución en la propiedad lubricante de ésta (Prinz y Lucas, 2000).

Las interacciones entre proantocianidinas y proteínas dependen de diversos factores, tales como pH del medio (Kallithraka *et al.*, 1997), contenido de alcohol (Obreque-Slier *et al.*, 2010b), ácidos orgánicos (He *et al.*, 2006), minerales (Kaal *et al.*, 2007), fosfolípidos (He *et al.*, 2006), azúcares (He *et al.*, 2006), estructura y conformación de la proteína (López *et al.*, 2007), concentración y tamaño de la proantocianidina (Sarni *et al.*, 2008), polisacáridos y manoproteínas (Guadalupe y Ayestarán, 2008).

Las manoproteínas son componentes mayoritarios (25-50%) de la pared celular de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* (levadura ampliamente utilizada en la elaboración de vinos) que, junto con otros polisacáridos, proporcionan estructura y rigidez a la célula (López, E. 2010). Estos compuestos se liberan durante la fase de crecimiento activo de ellas y después de la muerte celular (autólisis). Diversos estudios han demostrado que las manoproteínas contribuyen a la estabilidad tartárica (por bloqueo de las reacciones de cristalización), proteica y de materia colorante (Caridi, 2006). Asimismo, se ha observado que las manoproteínas mejoran la percepción organoléptica contribuyendo a un aumento del cuerpo y volumen en boca de algunos alimentos. Finalmente, se ha observado que las manoproteínas interactuarían con los compuestos fenólicos provenientes de los vinos tintos, disminuyendo el amargor y la astringencia (López, 2010).

En el rango de pH del vino, las manoproteínas tienen cargas negativas y pueden establecer interacciones iónicas y electrostáticas con los componentes del vino, lo que deriva en la formación de complejos solubles o insolubles. Este proceso es dependiente en gran medida de su carga eléctrica neta y estructura de sus grupos funcionales (Cadiri, 2006). Se ha postulado, que las manoproteínas disminuirían la cantidad de proantocianidinas libres capaces de interactuar con las proteínas de la saliva, como también compensarían la pérdida de lubricación, derivada de la interacción tanino-proteína a través de un aumento de la viscosidad causada por la presencia de estos polisacáridos (Moreno *et al.*, 2009). La interacción entre taninos y manoproteínas produciría estructuras estables no reactivas con las proteínas de la saliva, con lo que disminuiría la astringencia asociada a la interacción taninos- proteínas salivales (Guadalupe y Ayestarán, 2008).

Diversos métodos han sido descritos para evaluar la interacción entre taninos y proteínas salivales, entre ellos destacan la nefelometría (Carvalho *et al.*, 2004), cromatografía líquida de alta resolución (Hatano *et al.*, 2003), electroforesis (Sarni *et al.*, 2008), cuantificación

de taninos precipitados por proteínas mediante metilcelulosa (Mercurio y Smith, 2008), uso de espectroscopía de fluorescencia (Kumar *et al.*, 2007) y espectrofotometría tras precipitación de ovoalbúmina (Llaudy *et al.*, 2004). La mayoría de estos métodos evalúan la interacción tanino-proteína mediante el uso de complejos equipos y largos tiempos de análisis. Además, estos métodos emplean diversos sustratos proteicos, tales como gelatina, seroalbúmina bovina (BSA) y ovoalbúmina, proteínas que poseen un comportamiento diferente al de las proteínas salivales.

Recientemente, ensayos de difusión y precipitación de proteínas basados en el empleo de membranas de celulosa se han utilizado para evaluar la interacción tanino-proteína (Obreque-Slier *et al.*, 2010a,b). Esta técnica se ha utilizado tanto con sustratos proteicos puros, como BSA, (Obreque-Slier *et al.*, 2010a) complejos, como gelatina, (Obreque-Slier *et al.*, 2010d) e incluso con sustratos proteicos de alta complejidad, como saliva y lágrima (López *et al.*, 2007). La técnica requiere un tiempo de análisis reducido y es de costo relativamente bajo. Considerando estas ventajosas características metodológicas y la escasa información sobre el efecto de las manoproteínas en la interacción tanino-proteína, parece razonable y de alto interés abordar en forma sistemática el estudio del efecto de las manoproteínas sobre la interacción tanino-proteínas empleando ensayos de difusión y precipitación.

## **Objetivo**

Evaluar el efecto de una manoproteína comercial sobre la interacción entre proteínas salivales y taninos proantocianidínicos de semillas de *Vitis vinifera*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar del estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Supramolecular del Programa de Biología Celular y Molecular-ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y en los Laboratorios de Química Enológica del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

### Materiales

#### Semillas, Saliva humana y Manoproteína

Para la preparación del extracto de semilla, las bayas del cultivar Carménère fueron cosechadas el 31 de mayo del 2010. Las bayas provenían de plantas de 6 años de edad de la Región del Maule ( $35^{\circ} 8,94' S$  y  $71^{\circ} 20,73' O$ ), cultivadas en sistema de conducción espaldera, orientación norte-sur y con una producción anual aproximada de 8.000 kilos/hectárea (Castro, 2009).

La saliva se obtuvo de un individuo sano de 24 años de edad, sin estimulación de la salivación y bajo condiciones similares a las propuestas por Obreque-Slier *et al.*, (2010b).

La manoproteína marca “Surli velvet” fue donada por la empresa de insumos enológicos Enartis Chile, Ltda., la cual corresponde a un complejo a base de polisacáridos procedente de paredes de levadura completamente soluble.

#### Solventes y Equipamiento

Los pliegos de membrana de celulosa Whatman N°1, fueron adquiridos en Whatman Ltda., Maidstone, Inglaterra. Membrana Millipore de tamaño de poro  $0,45 \mu m$ , adquiridos en Merck S.A., Chile. El ácido clorhídrico (densidad  $1,18 g/cm$ ) fue adquirido en Romil Chemicals Limited. Ácido tricloroacético, Coomassie blue, Etanol, Ácido acético y solventes grado pro-análisis y HPLC fueron adquiridos en Merck S.A., Chile.

El equipamiento utilizado consistió en una centrífuga 75008151 Labofuge Heraeus 400, bomba de vacío Thomas modelo N° 2522C-D2, agitador marca Barmstead/Lab-line, rotavapor Büchi R-210, espectrofotómetro Shimadzu UV-1700 Pharmaspec, microcentrífuga Sorvall modelo MC-12V y un agitador Vortex-Genie modelo K-550.

Para el análisis de fenoles de bajo peso molecular se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia acoplado a un detector de fotodiodos alineados (HPLC-DAD) marca Agilent Technologies 1200, con una bomba Quat G1311A, un inyector automático modelo ALS G1329A, un detector de arreglo de fotodiodos DAD modelo G1315B, un desgasificador modelo G1322A y una columna Waters Nova- pak C<sub>18</sub> (4 µm, 3,9 mm di x 300 mm).

## Métodos

### Tratamientos y Diseño Experimental

El estudio comprendió 3 ensayos independientes. En el ensayo 1 se evaluó la interacción entre concentraciones crecientes de manoproteína con el extracto de semilla o saliva (Cuadro 1). En el ensayo 2, se combinó inicialmente el extracto de semilla con MP, y luego de 5 minutos, se agregó la saliva (Cuadro 2). En el tercer ensayo se varió el orden de incorporación de los componentes utilizados en el ensayo 2. Así, se mezcló el extracto de semilla con la saliva y luego se agregaron distintas cantidades de manoproteína (Cuadro 2). Los ensayos fueron diseñados de forma completamente aleatorizada, cada uno con 4 tratamientos (T) (extracto de semillas, distintas concentraciones de manoproteína y saliva) y un tratamiento control (en ausencia de manoproteína) (Cuadro 2). La unidad experimental correspondió a la mezcla entre el extracto de semilla, manoproteína y saliva contenida en el tubo Eppendorf.

Cuadro 1. Tratamientos y volúmenes (µL) utilizados en la evaluación de la interacción entre la manoproteína con el extracto de semilla o saliva.

Tratamiento	Manoproteína	Saliva	Extracto de semilla	Agua
1	-	-	-	1400
2	100	-	-	1300
3	200	-	-	1200
4	300	-	-	1100
5	400	-	-	1000
6	-	100	-	1300
7	100	100	-	1200
8	200	100	-	1100
9	300	100	-	1000
10	400	100	-	900
11	-	-	1000	400
12	100	-	1000	300
13	200	-	1000	200
14	300	-	1000	100
15	400	-	1000	-

Cuadro 2. Tratamientos y volúmenes ( $\mu\text{L}$ ) utilizados en la evaluación de la interacción entre la manoproteína-extracto de semilla-saliva

Tratamiento	Extracto de semilla	Manoproteína	Saliva	Agua
1	1000	-	100	400
2	1000	100	100	300
3	1000	200	100	200
4	1000	300	100	100
5	1000	400	100	0

### Procedimiento

**Preparación del extracto de semillas (ES).** Las semillas se separaron manualmente desde las bayas, se lavaron con agua destilada y se secaron con papel absorbente. Posteriormente, 0.9 g de semillas se molieron con un mortero, y se mezclaron con 500 mL de agua destilada. La mezcla se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente, se centrifugó durante 30 minutos a 1852 G y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ . Finalmente, el pH del extracto de semillas fue ajustado a 3.5 con ácido clorhídrico (densidad 1.18 g/cm).

**Obtención de la Saliva.** La saliva fue colectada mediante un procedimiento convencional, sin empleo de estimulantes de salivación, en condiciones estandarizadas entre las 9:00 y 11:00 a.m. e inmediatamente antes de los experimentos. La saliva fue acumulada en la boca durante aproximadamente 1 minuto y expectorada en un contenedor de vidrio previamente esterilizado. Las muestras fueron mantenidas en hielo durante el experimento (Obreque-Slier *et al.*, 2010b).

**Preparación de solución de manoproteína (MP).** La manoproteína se preparó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor. Para ello, se preparó una solución inicial de manoproteína a una concentración de 1,5 g/L en agua destilada a 35°C con agitación constante durante 10 minutos, para luego ser filtrada a través de la membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ .

**Preparación de Coomassie blue R-250 0,25%.** 1,25 g de CB-R250 se pesaron para luego disolverse en 250 mL de isopropanol, agitándose mecánicamente durante 12 horas. Luego se agregó 200 mL de agua destilada y se agitó por 5 minutos, para posteriormente agregar 50 mL de ácido acético 100% (agitación por 5 minutos). Finalmente, la solución se filtró a vacío a través de papel filtro Whatman N°1.

**Ensayos de difusión y precipitación.** La saliva, el ES y la MP fueron mezclados de acuerdo a lo indicado en los Cuadros 1 y 2. En el ensayo 1, se mezclaron volúmenes crecientes de MP (100-400  $\mu\text{L}$ ) con volúmenes fijos de saliva o ES (Cuadro 1). En el ensayo 2, se mezclaron con apoyo de un vortex, 1000  $\mu\text{L}$  de ES con distintas cantidades de MP (100-400  $\mu\text{L}$ ), luego de 5 minutos de reposo se agregó 100  $\mu\text{L}$  de saliva a cada tubo Eppendorf (Cuadro 2). En el ensayo 3, se modificó el orden de los componentes,

mezclándose inicialmente el extracto de semilla con saliva y lo que fue seguido a la adición de distintas cantidades de manoproteína (Cuadro 2).

En el *ensayo de difusión*, las mezclas contenidas en cada tubo, se agitaron por 30 segundos (vortex) y luego de 5 minutos, una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  de cada mezcla se depositó sobre el papel de celulosa (Figura 1). Una vez que las muestras difundieron libremente en el papel, fueron secadas a 20°C y procesadas de acuerdo a lo descrito en trabajos previos (López et al., 2007; Obreque-Slier et al., 2010a; Obreque-Slier et al., 2010b; Obreque-Slier et al., 2010c). El papel con las muestras fue fijado en ácido tricloroacético (TCA) 5% durante 20 minutos, seguido de lavados con etanol 80% por 5 minutos y se tiñeron con Coomassie blue por 15 minutos. Finalmente, la membrana de celulosa fue lavada tres veces con ácido acético 7% v/v y una vez con agua destilada, por 30 segundos. La membrana de celulosa fue secada bajo una lámpara dispuesta a una distancia de 20 cm. Cada zona teñida azul en el sitio de colocación de las muestras representó el área de distribución de la proteína salival (Obreque-Slier *et al.*, 2010a). En el *ensayo de precipitación*, cada tubo Eppendorf con las mezclas utilizadas en el ensayo de difusión fue centrifugado a 600 G por 5 minutos. Luego, 20  $\mu\text{L}$  de cada sobrenadante fue depositada sobre la membrana de celulosa la que fue procesada de acuerdo al procedimiento descrito en el ensayo de difusión.

### **Variables a medir**

**Análisis polifenólico del ES.** Al ES se le cuantificó el contenido de fenoles totales mediante absorción espectrofotométrica a 280 nm (García-Barceló, 1990), taninos totales mediante el método de metilcelulosa (Mercurio *et al.*, 2007) y compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante HPLC-DAD (Obreque-Slier *et al.*, 2010c).

**Ensayos de difusión y precipitación.** El área ( $\text{cm}^2$ ) e intensidad (píxeles/ $\text{cm}^2$ ) de las zonas de difusión de la proteína en la membrana de celulosa se cuantificaron mediante el programa Image J.

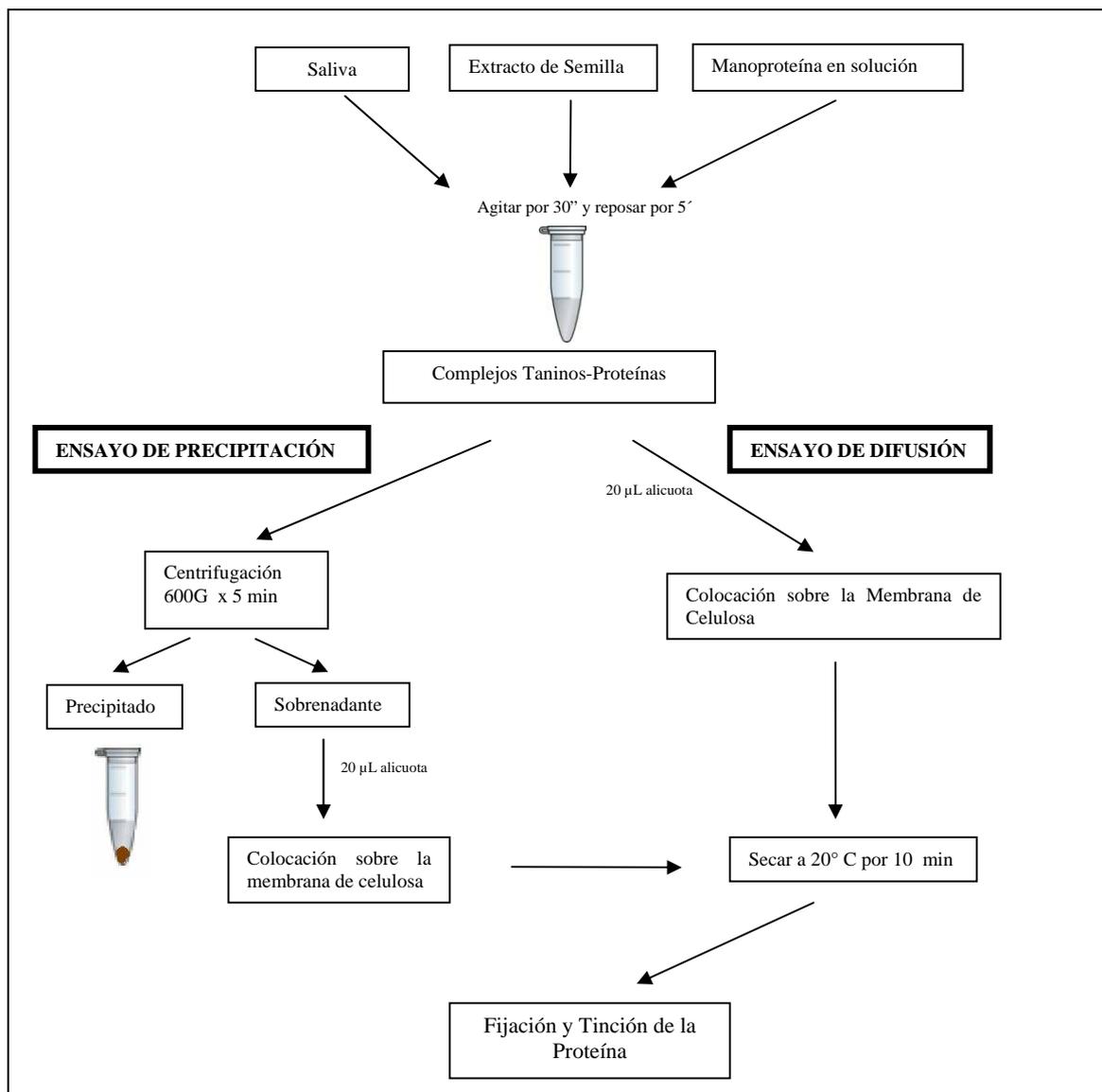


Figura 1. Evaluación de la interacción Extracto de semilla-MP-Proteína salival mediante el ensayo de difusión y precipitación de proteína sobre membrana de celulosa.

### Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados estadísticamente a través de ANDEVA utilizando el programa estadístico Minitab 16.1, y en caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de rango múltiple de Tuckey, con un nivel de significancia del 5%.

## RESULTADOS

### Composición fenólica del extracto de semillas

El Cuadro 3, muestra el contenido de fenoles y taninos totales del extracto de semilla (ES) utilizado en este estudio. El Cuadro 3 incluye los fenoles de bajo peso molecular cuantificados por HPLC-DAD. Dentro de los compuestos fenólicos flavonoides fue posible detectar dos monómeros [(+)-catequina (C) y (-)-epicatequina (EC)], tres proantocianidinas diméricas (B1, B2, y B3), y diversas proantocianidinas (P) y galatos de proantocianidinas (GP). El ácido gálico (AG) fue el único compuesto no flavonoide identificado (Figura 2).

Cuadro 3. Contenido de polifenoles (mg/k) del extracto de semilla

Compuestos	Concentración
Fenoles totales <sup>a</sup>	31,84
Taninos totales <sup>b</sup>	50,52
Ácido gálico <sup>a</sup>	9,0
Proantocianidina B3 <sup>c</sup>	9,6
Proantocianidina B1 <sup>c</sup>	2,6
(+)-Catequina <sup>c</sup>	128,6
Proantocianidina B2 <sup>c</sup>	27,6
(-)-Epicatequina <sup>b</sup>	67,2
Proantocianidinas <sup>c</sup>	16,8
Galato de Proantocianidinas <sup>a</sup>	9,4

<sup>a</sup> mg equivalente de ácido gálico/k de semilla. <sup>b</sup> mg equivalentes de epicatequina/k de semilla. <sup>c</sup> mg equivalentes de catequina/k de semilla.

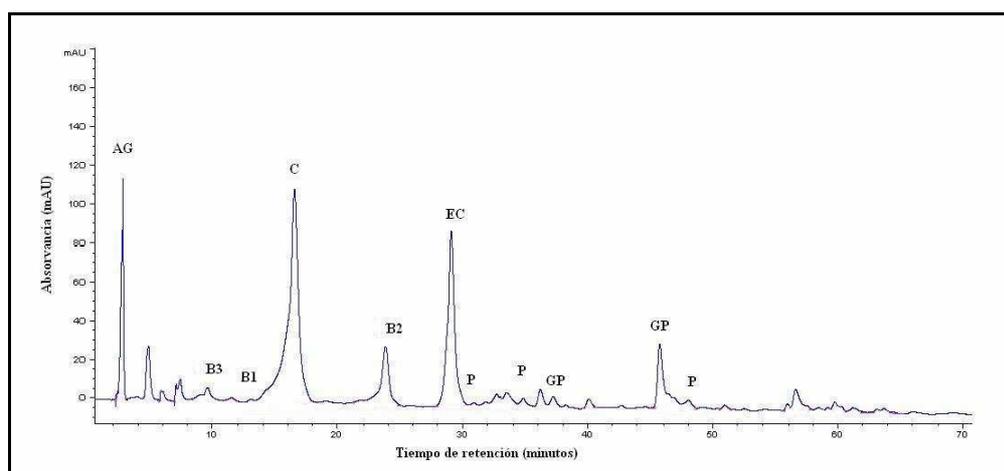


Figura 2. Cromatograma (280nm) de fenoles de bajo peso molecular en extractos de semillas Carmenère. Ver significado de letras en el texto.

### Interacción entre Manoproteína y ES o Saliva

**Ensayo de difusión.** En la Figura 4F se observa que la saliva humana diluida en agua (1/14) y colocada sobre el papel de celulosa, muestra la presencia de al menos dos componentes (modo bifásico de difusión). Uno de ellos, quedó representado por un material que permaneció en el sitio de depósito de la muestra (fase no difusible, más oscura y ubicada en el centro) mientras que otro componente proteico salival difundió radialmente acompañando al agua salival (fase difusible, de coloración más clara y ubicada externamente). Por el contrario, fue posible observar que el agua (Figura 4A) y el ES (Figura 4K), se distribuyeron de forma radial, pero presentaron una tinción nula (agua) o levemente teñida (ES). De la misma manera, cantidades crecientes de la manoproteína (MP) (Figura 4, B-E) no fueron detectadas por el Coomasie blue en el papel de celulosa.

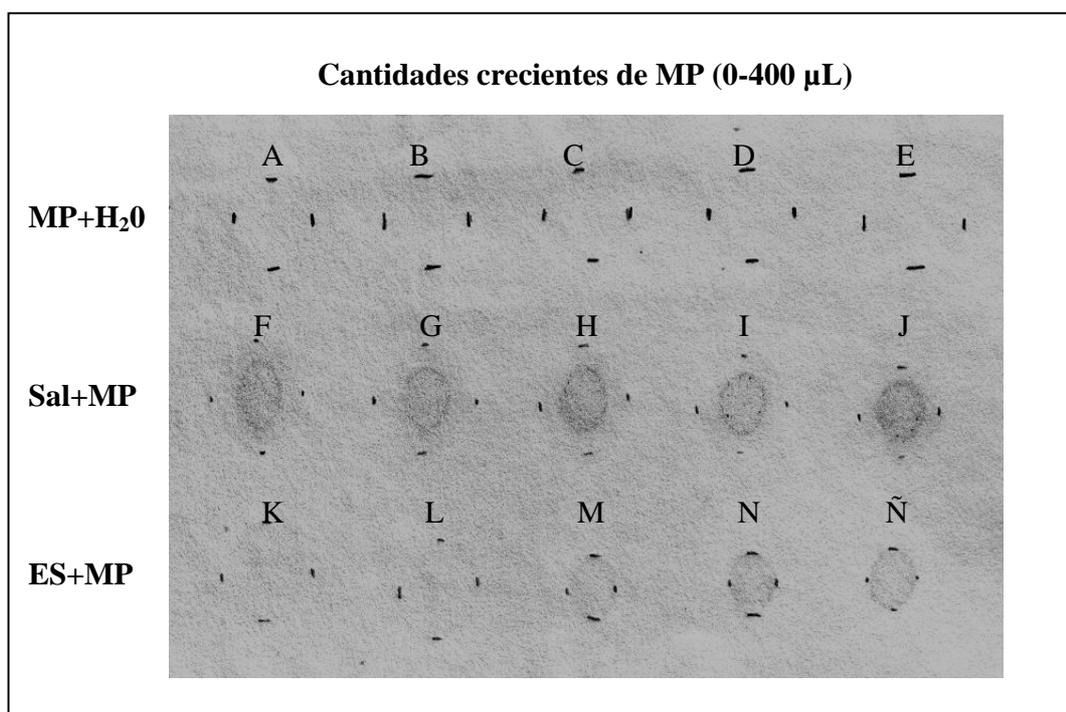


Figura 4. Ensayo de difusión entre MP, ES y saliva. A, corresponde a agua; B-E, cantidades crecientes de MP (100, 200, 300 y 400 $\mu$ L); F, saliva diluida en agua; G-J, saliva mezclada con concentraciones crecientes de MP; K, ES diluido en agua; L-Ñ, ES mezclado con concentraciones crecientes de MP.

Cuadro 4. Valores de área (cm<sup>2</sup>), intensidad (píxeles/cm<sup>2</sup>) del ensayo de difusión entre MP, ES y Saliva correspondiente a la Figura 4.

Sol. MP (μL)	Área de difusión (cm <sup>2</sup> )					
	0	100	200	300	400	
MP+H <sub>2</sub> O	1,8 ± 0,1 a	1,8 ± 0,1 a	1,9 ± 0,1 a	1,9 ± 0,0 a	1,9 ± 0,0 a	
Sal (FND)+MP	0,6 ± 0,0 a	0,6 ± 0,0 a	0,6 ± 0,0 a	0,6 ± 0,1 a	0,6 ± 0,0 a	
Sal (FD)+MP	1,4 ± 0,2 ab	1,4 ± 0,0 a	1,2 ± 0,0 b	1,2 ± 0,1 b	0,9 ± 0,0 c	
ES+MP	1,7 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 a	0,6 ± 0,0 b	0,6 ± 0,0 b	0,6 ± 0,0 b	

Sol. MP (μL)	Intensidad de difusión (píxeles/cm <sup>2</sup> )					
	0	100	200	300	400	
MP+H <sub>2</sub> O	12,3 ± 0,6 a	12,4 ± 0,6 a	11,8 ± 0,3 a	11,4 ± 0,3 a	11,6 ± 0,5 a	
Sal (FND)+MP	51,1 ± 0,4 a	47,7 ± 0,3 c	47,7 ± 0,0 c	47,0 ± 0,1 d	49,4 ± 0,3 b	
Sal (FD)+MP	42,3 ± 1,5 a	38,4 ± 0,7 b	37,4 ± 0,7 bc	35,6 ± 0,1 c	38,3 ± 0,4 b	
ES+MP	31,2 ± 0,6 c	36,6 ± 2,7 bc	36,1 ± 1,9 bc	42,0 ± 3,0 ab	43,7 ± 3,0 a	

\* MP, manoproteína; ES, extracto de semilla; Sal (FND), fracción no difusible de la saliva; Sal (FD), fracción difusible de la saliva. Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar. Letras diferentes en la fila indican diferencia estadística (p<0.05).

A partir de estos resultados, se procedió a mezclar cantidades crecientes de MP con saliva (Figura 4, G-J) o con ES (Figura 4, L-Ñ). Se pudo observar que al colocar la mezcla de saliva con cantidades crecientes de MP sobre la membrana de celulosa, el área de difusión de la fracción difusible de saliva (FD) disminuye significativamente hasta un 65% de su superficie inicial, mientras que el área de la fracción no difusible (FND) de la saliva permanece inalterable (Figura 4, G-J) (Cuadro 4). De la misma manera, se observó una disminución significativa de la intensidad de tinción (píxeles/cm<sup>2</sup>) tanto de la FD como de la FND de la saliva, cuando fueron agregadas cantidades crecientes de MP (Cuadro 4). Por otro lado, al colocar concentraciones crecientes de MP en presencia del ES, se pudo observar una disminución drástica del área de difusión del complejo MP/ES, así como un aumento en la fijación del colorante, a partir de la mezcla de ES con 200 μL de MP (Figura 4M y Cuadro 4).

**Ensayo de precipitación.** La interacción de una MP con ES o saliva también se evaluaron a través del empleo de membrana de celulosa tras la introducción de una etapa adicional anterior a la colocación de las muestras sobre las láminas de celulosa. En efecto, tras la mezcla del ES o de la saliva con cantidades crecientes de MP, los tubos fueron dejados reposar por 5 minutos y luego centrifugados para separar los precipitados. Sobre las láminas de celulosa se depositó alícuotas de los sobrenadantes de cada situación experimental. De esta manera, la precipitación de complejos MP/saliva y MP/ES estimada mediante la observación de la desaparición de la tinción de las alícuotas del sobrenadante depositadas sobre el papel de celulosa frente al colorante de proteínas (prueba de precipitabilidad) y la presencia de sedimentos, luego de la centrifugación, en los tubos eppendorf.

En este estudio, se observó que a medida que aumenta la cantidad de MP en la mezcla con saliva, las proteínas de la saliva sufrieron una disminución del área de difusión (Figura 5, G-J). Asimismo, se observó una disminución de la intensidad promedio, obteniéndose aproximadamente un 35% menos de tinción a mayor cantidad de MP (Cuadro 5), así como una diferencia visual en los sedimentos, al existir mayor compactación a cantidades mayores de MP. Por otra parte, tras la mezcla de ES con la MP, desapareció completamente la reactividad del sobrenadante frente al colorante (Figura 4, L-Ñ versus Figura 5, L-Ñ). El área de tinción de los complejos ES/MP no varió, pero disminuyó drásticamente su intensidad de coloración (Figura 5, L-Ñ), observándose mayor precipitado a mayores cantidades de MP.

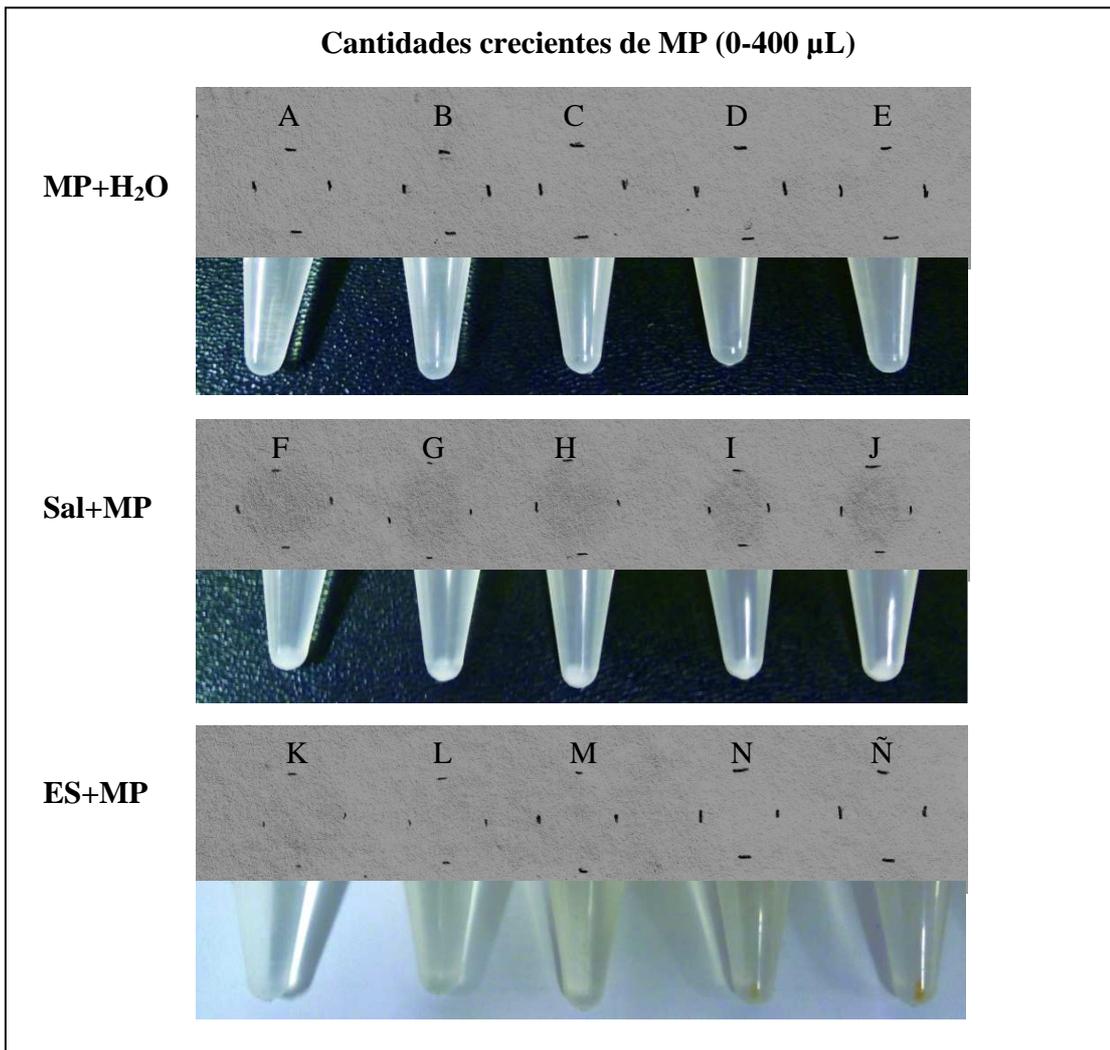


Figura 5. Ensayo de precipitación entre MP, ES y saliva. A, corresponde a agua; B-E, cantidades crecientes de MP (100, 200, 300 y 400 $\mu$ L); F, saliva diluida en agua; G-J, saliva mezclada con concentraciones crecientes de MP; K, ES diluido en agua; L-Ñ, ES mezclada con concentraciones crecientes de MP. Los tubos Eppendorf de la Figura corresponden a cada situación experimental.

Cuadro 5. Valores de área (cm<sup>2</sup>), intensidad (píxeles/cm<sup>2</sup>) del ensayo de precipitación entre MP, ES y saliva correspondiente a la Figura 5.

Sol. MP (μL)	Área de precipitación (cm <sup>2</sup> )				
	0	100	200	300	400
MP+H <sub>2</sub> O	1,8 ± 0,0 a	1,9 ± 0,1 a	2,0 ± 0,2 a	1,9 ± 0,1 a	1,9 ± 0,2 a
Sal+MP	1,8 ± 0,2 ab	1,7 ± 0,2 ab	1,9 ± 0,1 a	1,1 ± 0,1 c	1,4 ± 0,1 bc
ES+MP	1,6 ± 0,1 a	1,4 ± 0,2 a	1,6 ± 0,1 a	1,6 ± 0,1 a	1,5 ± 0,1 a
Intensidad de precipitación (píxeles/cm <sup>2</sup> )					
MP+H <sub>2</sub> O	11,6 ± 0,4 a	11,7 ± 0,1 a	11,0 ± 0,9 a	11,5 ± 0,6 a	10,9 ± 1,0 a
Sal+MP	24,5 ± 2,4 a	21,8 ± 2,1 ab	19,8 ± 1,2 ab	21,9 ± 2,0 ab	18,5 ± 0,9 b
ES+MP	29,3 ± 1,4 a	31,9 ± 4,5 a	16,8 ± 0,9 b	13,8 ± 0,9 b	14,0 ± 0,8 b

\* Ver leyenda Cuadro 4.

### Ensayo de interacción entre el complejo ES/MP con saliva

**Ensayo de difusión.** El efecto del complejo MP/ES sobre la difusibilidad de las proteínas salivales, fue evaluado mediante la mezcla inicial del ES con diferentes cantidades de MP, para después de 5 minutos, agregar la saliva (Cuadro 2). Luego, alícuotas de la mezcla de los tres elementos fueron depositadas sobre la membrana de celulosa.

En ausencia de MP (Figura 6A), la saliva mezclada con ES presentó un modo bifásico de difusión, similar a la saliva con agua (Figura 4F). Sin embargo, existió un aumento en la intensidad de tinción de la saliva cuando es mezclada con ES (Figura 6A versus 4F). Por otro lado, la Figura 6 (B-E) muestra que cantidades crecientes de MP mezclada con ES, provocaron una disminución significativa del área de la FD de la saliva (Cuadro 6). En el caso de la FND, mientras el área de difusión permaneció inalterable, la intensidad de dicha área aumentó significativamente con cantidades crecientes de MP (Cuadro 6).

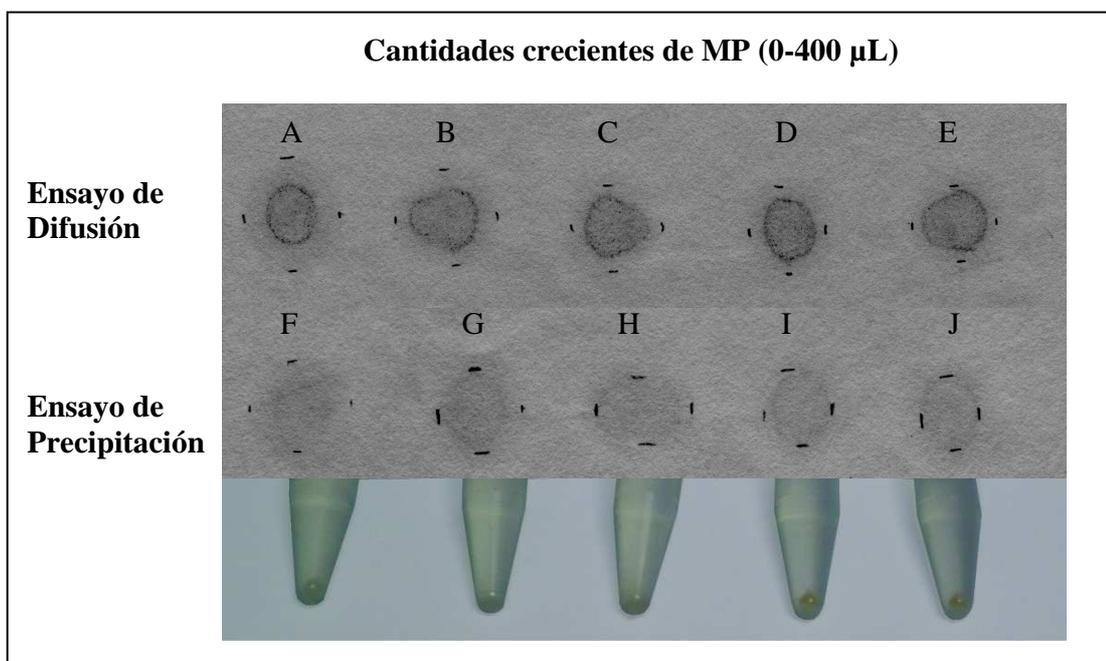


Figura 6. Interacción entre el complejo MP/ES con saliva. Ensayo de difusión: A, 100  $\mu\text{L}$  de saliva con 1000  $\mu\text{L}$  de ES en ausencia de MP; B-E, corresponden a la mezcla de 1000  $\mu\text{L}$  de ES con cantidades crecientes de MP (100, 200, 300 y 400 $\mu\text{L}$ ), para luego agregar 100  $\mu\text{L}$  de saliva. Ensayo de precipitación: F-J, corresponde a alícuotas del sobrenadante de cada muestra. Figura inferior muestra los tubos Eppendorff de cada muestra.

Cuadro 6. Valores de área (cm<sup>2</sup>), intensidad (píxeles) del ensayo de difusión de la interacción entre MP-ES y saliva correspondiente a la Figura 6, A-E.

Área de difusión (cm <sup>2</sup> )					
Sol. MP (μL)	0	100	200	300	400
ES-MP-Sal FND	0,6 ± 0,1 a	0,7 ± 0,1 a	0,6 ± 0,0 a	0,6 ± 0,1 a	0,6 ± 0,1 a
ES-MP-Sal FD	1,5 ± 0,2 a	1,0 ± 0,1 b	0,8 ± 0,1 bc	0,7 ± 0,0 c	0,5 ± 0,1 c
Intensidad de tinción (píxeles/cm <sup>2</sup> )					
ES-MP-Sal FND	44,2 ± 5,2 a	42,2 ± 3,0 a	46,9 ± 0,8 a	48,0 ± 2,3 a	44,3 ± 1,6 a
ES-MP-Sal FD	32,7 ± 4,1 b	34,1 ± 3,7 b	38,3 ± 3,1 ab	38,0 ± 1,7 ab	43,5 ± 1,3 a

\*Ver leyenda Cuadro 4.

**Ensayo de precipitación.** Las muestras del ensayo anterior, fueron centrifugadas, para luego depositar una alícuota del sobrenadante sobre la membrana de celulosa. La Figura 6 (F-J) y Cuadro 7, muestran que a medida que aumentó la cantidad de MP en la mezcla, se produjo una disminución estadísticamente significativa tanto del área de difusión del sobrenadante, así como de la intensidad promedio de coloración del área. De la misma manera, fue posible observar un aumento en la cantidad de precipitado en el fondo de los tubos Eppendorf (Figura 6).

Cuadro 7. Valores de área (cm<sup>2</sup>), intensidad (píxeles/cm<sup>2</sup>) del ensayo de precipitación de la interacción entre MP-ES y saliva correspondiente a la Figura 6, F-J.

Área de precipitación (cm <sup>2</sup> )					
Sol. MP (μL)	0	100	200	300	400
ES-MP-Sal	1,5 ± 0,1 a	1,4 ± 0,1 a	1,1 ± 0,1 b	1,0 ± 0,1 b	0,9 ± 0,1 b
Intensidad de tinción (píxeles/cm <sup>2</sup> )					
ES-MP-Sal	33,3 ± 1,6 ab	33,6 ± 1,3 a	30,8 ± 0,2 abc	30,3 ± 1,1 bc	28,9 ± 1,2 c

\* Ver leyenda Cuadro 4.

### Ensayo de interacción del complejo ES/saliva con MP

**Ensayo de difusión.** Con el objeto de evaluar el efecto de la MP sobre el complejo ES-saliva, se mezcló ES con saliva, y después de 5 minutos, se agregó cantidades crecientes de MP.

Como muestra la Figura 7A, la mezcla de ES con saliva en ausencia de MP, presenta un modo bifásico de difusión, similar al ensayo anterior (Figura 6A). Al agregarse volúmenes crecientes de MP al complejo ES-saliva, se observó una disminución menos marcada del área de la FD de la saliva (Figura 7A-E versus 6A-E). Sin embargo, se observó un aumento en la intensidad promedio tanto la FD como de la FND (Cuadro 8).

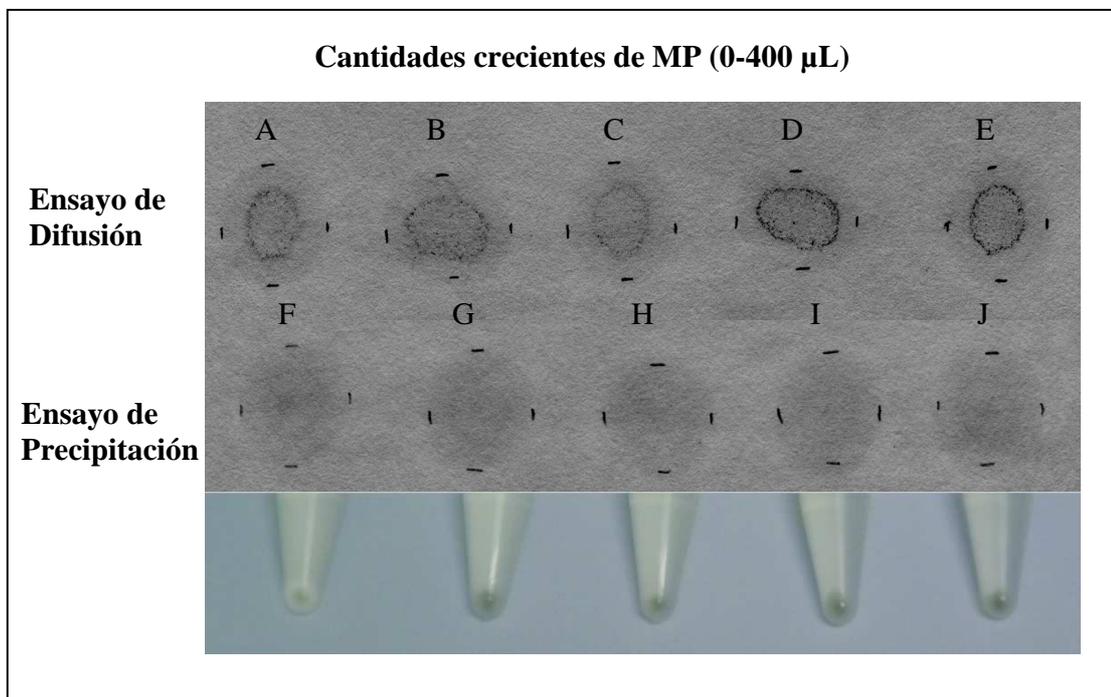


Figura 7. Interacción del complejo ES/saliva con MP. Ensayo de difusión: A, 100  $\mu\text{L}$  de saliva con 1000  $\mu\text{L}$  de ES en ausencia de MP; B-E, corresponden a la mezcla de 100  $\mu\text{L}$  de saliva con 1000  $\mu\text{L}$  de ES, para luego agregar cantidades crecientes de MP (100, 200, 300 y 400 $\mu\text{L}$ ). Ensayo de precipitación: F-J, corresponde alícuota del sobrenadante de cada muestra. Figura inferior muestra los tubos Eppendorff de cada muestra.

Cuadro 8. Valores de área (cm<sup>2</sup>), intensidad (píxeles/cm<sup>2</sup>) del ensayo de difusión de la interacción entre ES-Saliva y MP correspondiente a la Figura 7, A-E.

Área de difusión (cm <sup>2</sup> )					
Sol. MP (μL)	0	100	200	300	400
ES-Sal-MP FND	0,5 ± 0,0 b	0,7 ± 0,0 a	0,6 ± 0,0 b	0,7 ± 0,1 a	0,5 ± 0,0 b
ES-Sal-MP FD	1,4 ± 0,1 a	1,3 ± 0,1 ab	1,4 ± 0,0 a	1,1 ± 0,0 c	1,2 ± 0,1 bc
Intensidad de tinción (píxeles/cm <sup>2</sup> )					
ES-Sal-MP FND	38,6 ± 2,9 c	43,0 ± 1,7 bc	39,5 ± 0,5 bc	50,2 ± 2,6 a	44,6 ± 1,3 b
ES-Sal-MP FD	34,4 ± 1,0 c	36,5 ± 1,1 bc	35,0 ± 0,5 bc	39,4 ± 1,0 a	37,2 ± 0,7 ab

\*Ver leyenda Cuadro 4.

**Ensayo de precipitación.** Los tubos de las muestras del ensayo de interacción descrito anteriormente, fueron centrifugados y una alícuota del sobrenadante fue colocada sobre la membrana de celulosa. La Figura 7 (F-G) y Cuadro 9, muestran que a medida que aumenta la cantidad de MP en la mezcla, se produjo una disminución estadísticamente significativa del área de difusión de las proteínas salivales. Por el contrario, los valores de intensidad promedio (Cuadro 9), así como sus precipitados (Figura 7), no presentaron variaciones a medida que aumentó el contenido de MP, salvo cuando se agregó 300 μL de MP (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores de área (cm<sup>2</sup>), intensidad (píxeles/cm<sup>2</sup>) del ensayo de precipitación de la interacción entre ES-Saliva y MP correspondiente a la Figura 7, F-J.

Área de precipitación (cm <sup>2</sup> )					
Sol. MP (μL)	0	100	200	300	400
ES-Sal-MP	2,2 ± 0,0 a	2,0 ± 0,1 b	2,0 ± 0,1 b	1,8 ± 0,1 c	1,7 ± 0,1 c
Intensidad de tinción (píxeles/cm <sup>2</sup> )					
ES-Sal-MP	35,5 ± 0,7 a	34,8 ± 0,2 a	34,1 ± 0,0 a	32,5 ± 0,9 b	34,2 ± 0,1 a

\* Ver leyenda Cuadro 4.

## DISCUSIÓN

Las proteínas de la saliva humana tienen una alta afinidad con los compuestos polifenólicos (taninos condensados o proantocianidinas) y forman complejos altamente estables (Prinz y Lucas, 2000). La formación de estos complejos puede tener un papel importante en la promoción de la sensación de astringencia que se percibe en el consumo de comidas y bebidas ricas en proantocianidinas, tales como el vino (Bacon y Rhodes, 2000). Diversos factores pueden influir en la interacción entre proantocianidinas y proteínas tales como pH, contenido de alcohol, ácidos orgánicos, azúcares, polisacáridos y manoproteínas, entre otros (Kallithraka *et al.*, 1997; Obreque-Slier *et al.*, 2010b; He *et al.*, 2006; Guadalupe y Ayestarán, 2008).

En este estudio se analizó el efecto de una manoproteína comercial sobre la interacción entre proantocianidinas y saliva humana, a través de ensayos de difusión y precipitación sobre membrana de celulosa (Obreque-Slier *et al.*, 2010a). Para ello, se utilizó un extracto de semilla de bayas de *Vitis vinifera*, caracterizado por análisis espectrofotométrico (fenoles y taninos totales) y de HPLC-DAD (fenoles de bajo peso molecular). Los resultados demostraron que los contenidos polifenólicos generales y pormenorizados son coincidentes con lo observado en otros extractos de semillas de diferentes variedades (Obreque-Slier *et al.*, 2010c).

Por otra parte, se pudo observar que cuando alícuota de saliva diluida con agua (1/14) fue depositada sobre el papel de celulosa, el material salival que reaccionó con el colorante Coomassie blue se distribuyó en forma radial y de modo bifásico, coincidiendo con estudios previos (López *et al.*, 2007; Obreque-Slier *et al.*, 2010a; Obreque-Slier *et al.*, 2011b). Por el contrario, tanto el agua como el ES presentaron una tinción nula (agua) o levemente teñida (ES). Esta observación respaldaría la utilización de esta metodología para detectar mezclas proteicas, como la saliva (López *et al.*, 2007), en condiciones en que no se detectaron extractos ricos en polifenoles (Obreque-Slier, *et al.*, 2010a). De la misma forma, concentraciones crecientes de la MP no fueron detectadas por el colorante de proteína Coomassie blue en el papel de celulosa. Este hecho sugeriría que la composición de la MP (proteínas muy glicosiladas con restos de manosa) (Zamora, 2005; Lopez, 2010), impide su reactividad con el colorante.

Por otro lado, cuando se mezcló cantidades crecientes de MP con un volumen fijo de ES, para luego ser depositado en el papel, se observó una drástica disminución del área y un aumento de la intensidad de difusión. Este hecho respalda la hipótesis de alta afinidad entre polifenoles presentes en el ES y la MP (Cadiri, 2006; Guadalupe y Ayestarán, 2008). De la misma manera, cuando la saliva se mezcló con MP, se observó una evidente disminución del área e intensidad de difusión de las proteínas salivales. Esta observación demuestra que la MP interactúa con las proteínas salivales generando complejos MP/Proteína salival con menor capacidad de difundir sobre las membranas de celulosa. Ambas observaciones fueron respaldadas por el ensayo de precipitación, puesto que a medida que aumentó el

contenido de MP en la mezcla con ES o saliva, se observó una clara disminución del área y de la intensidad de tinción, debido a que probablemente los complejos MP/ES y MP/Saliva precipitaron tras la centrifugación (Siebert *et al.*, 1996; Saucier *et al.*, 2000; Guadalupe y Ayestarán, 2008; Guadalupe *et al.*, 2007).

La parte final del estudio correspondió a la evaluación de la interacción de los tres componentes (MP, ES y Saliva) en conjunto. Para ello, primero se mezclaron cantidades crecientes MP con una alícuota de ES, para luego de 5 minutos agregar una cantidad fija de saliva a la mezcla. En el ensayo de difusión se observó que cantidades crecientes de MP en las mezclas, provocaron una disminución evidente del área e intensidad de difusión de la FD de la saliva, permaneciendo inalterable el área e intensidad de la FND. Se detectó un aumento en la intensidad de tinción de la FD, ya que al difundir menos, el complejo salival se encuentra más concentrado. De la misma manera, se observó mediante el ensayo de precipitación, una disminución del área e intensidad de tinción, lo que se corrobora con un aumento en los precipitados en los tubos Eppendorf. Ambas observaciones sugieren que la interacción entre la MP y ES, genera complejos capaces de interactuar con las proteínas salivales, contrario a lo postulado por otros autores (Zamora, 2005; Escot *et al.*, 2001; Guadalupe y Ayestarán, 2008) que señalan que, en presencia de manoproteínas y/o polisacáridos, se agrupan con las proantocianidinas formando macroestructuras estables que al no poder reaccionar con las proteínas de la saliva disminuirían la sensación de astringencia. Esta observación se vería fuertemente respaldada por el color café de los precipitados presentes en todos los tubos Eppendorf, lo que indicaría que la MP es capaz de precipitar tanto al ES como a la proteína salival, lo que explicaría el efecto de la MP sobre la sensación de astringencia, tal como se describe en la literatura.

Al invertir el orden en que se mezclaron los distintos factores, esto es, mezclando previamente saliva con ES, para luego agregar la MP. En el ensayo de difusión, se observó que la saliva mantiene tanto su FD como la FND. Sin embargo, con mayores cantidades de MP, se produjo una disminución leve en el área de difusión de la saliva, y un aumento significativo en la intensidad de tinción, tanto de la FD como de la FND de la saliva, lo que podría deberse a que la MP hace más reactivo el colorante sobre el complejo ES/Saliva. Por su parte, en el ensayo de precipitación, se produjo tanto una leve disminución del área de coloración, con valores similares de intensidad de tinción, así como de los precipitados de las mezclas. Estas observaciones sugerirían que las proantocianidinas del ES son altamente reactivas frente a las proteínas salivales, formando un complejo muy estable concordante con diversos estudios (Sarni *et al.*, 2008; Sarni *et al.*, 1999; Prinz y Lucas, 2000). No obstante lo anterior, la adición de MP provocaría la formación de un complejo ES-saliva-MP, capaz de reaccionar levemente con el colorante y precipitar.

Estos últimos ensayos demostraron que el orden de los componentes en la mezcla afecta fuertemente la interacción entre los compuestos del ES, las proteínas de la saliva y la MP. Así, las proteínas salivales serían capaces de unirse fuertemente al complejo MP-ES, mientras que el complejo estable conformado por ES y saliva interactúa con la MP, la cual generaría cambios menos significativos en el modo de difusión y precipitación del complejo.

## CONCLUSIÓN

Bajo la condiciones del ensayo, la manoproteína utilizada en este estudio interactúa tanto con las proteínas salivales como con las proantocianidinas provenientes de semillas de *Vitis vinifera*.

Por otro lado, la manoproteína utilizada afecta la interacción entre las proantocianidinas del extracto de semilla y la saliva, ya que al unirse con las proantocianidinas, forman complejos capaces de interactuar con las proteínas salivales y precipitarlas. Sin embargo, el efecto de la MP es altamente dependiente del orden en que son agregados los distintos componentes.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Bacon, J. and M. Rhodes. 2000. Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from it. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 838-843.
- Bajec, M. and G. Pickering. 2008. Astringency: Mechanisms and perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 858–875
- Caridi, A. 2006. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek* 89: 417-422.
- Carvalho, E., N. Mateus, and V. De Freitas. 2004. Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions. *Analytica Chimica Acta* 513: 97-101.
- Castro, L. 2009. Evolución de la composición fenólica de bayas de *Vitis vinifera* L. cv. *Cabernet Sauvignon* y cv. *Carménère* durante la maduración. Memoria Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago.
- Escot, S., M. Feuillat, L. Dulau, C. Charpentier. 2001. Release of polysaccharides by yeast and the influence of released polysaccharides on color stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 7: 153–159.
- Garcia-Barcelo, J. 1990. Técnicas analíticas para vinos. GAB, Barcelona, España. p 300.
- Guadalupe, Z. and B. Ayestarán. 2008. Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic, and color composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9022-9029.
- Guadalupe, Z., A. Palacios, B. Ayestarán. 2007. Maceration Enzymes and Mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4854-4862.
- Hatano, T., M. Hori, R. Hemingway and T. Yoshida. 2003. Size exclusion chromatographic analysis of polyphenol-serum albumin complexes. *Phytochemistry* 63: 817-823.
- He, Q., B. Shi, and K. Yao. 2006. Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. *Food Chemistry* 95: 250-254.
- Kaal, J., K. Nierop, and J. Verstraten. 2007. Interactions between tannins and goethite- or ferrihydrite-coated quartz sand: Influence of pH and evaporation. *Geoderma* 139: 379-387.

Kallithraka, S., J. Bakker and M. Clifford. 1997. Effect of pH on astringency in model solutions and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2211-2216.

Kumar, R., N. Sarkar and R. Banerjee. 2007. Probing the interaction of ellagic acid with human serum albumin: A fluorescence spectroscopic study. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 192: 152-158.

Llaudy, M., R. Canals, J. Canals, N. Rozés, Ll. Arola and F. Zamora. 2004. New method for evaluating astringency in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 742-746.

López, E. 2010. El papel de las Manoproteínas. Agrovin, S.A. (Enero/Marzo). Disponible: [http://www.agrovin.com/agrv/pdf/documentacion/articulos/manoproteinas\\_elaboracion\\_vinos\\_calidad.pdf](http://www.agrovin.com/agrv/pdf/documentacion/articulos/manoproteinas_elaboracion_vinos_calidad.pdf). Leído el 06 de septiembre de 2010.

López, J., J. Castillo, L. Traipe and R. López. 2007. A protein dry-binding assay on cellulose membranes for tear protein quantification. Use of conventional Schirmer strips. *Cornea* 26: 970-976.

Mercurio, M., R. Damberg, M. Herderich, and P. Smith. 2007. High throughput analysis of red wine and grape phenolics adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4651-4657.

Mercurio, M. and P. Smith. 2008. Tannin quantification in red grapes and wine: comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 5528-5537.

Moreno, M.; M. Pozo e I. Andújar. 2009. Preparados enológicos comerciales a base de levaduras secas inactivas: modo de acción y principales aplicaciones durante la vinificación. Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Madrid, España.

Obreque-Slier, E.; C. Mateluna, A. Peña-Neira and R. López-Solís. 2010a. Quantitative determination of interactions between tannic acid and a model protein using diffusion and precipitation assays on cellulose membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 8375-8379.

Obreque-Slier, E. A. Peña-Neira and R. López-Solís. 2010b. Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3729-3735.

Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira, R. López-Solís, F. Zamora, J. Da Silva and O. Laureano. 2010c. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carmenere and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3591–3599.

Obreque-Slier, E., R. López-Solís, A. Peña-Neira, F. Zamora-Marín. 2010d. Tannin-protein interaction is more closely associated with astringency than tannin–protein precipitation: experience with two oenological tannins and a gelatin. *International Journal of Food Science and Technology* 45: 2629–2636.

Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira, R. López-Solís. 2011a. Interactions of enological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *LWT - Food Science and Technology*, 1-6.

Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira, R. López-Solís. 2011b. Precipitation of low molecular weight phenolic compounds of grape seeds cv. Carménère (*Vitis vinifera* L.) by whole saliva. *European Food Research and Technology* 232: 113-121.

Prinz J. and P. Lucas. 2000. Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation* 27: 991-994.

Sarni-Manchado, P., V. Cheynier, M. Moutounet. 1999. Interaction of grape seed tannins with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 42-47.

Sarni-Manchado, P., J. Canals, G. Mazerolles and V. Cheynier. 2008. Influence of the glycosylation of human salivary proline-rich on their interactions with condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9563-9569.

Saucier, C., Y. Glories, D. Roux. 2000. Interactions Tanins-colloides: Nouvelles avancées concernant la notion de “bons” et de “mauvais” tanins. *ReV. Oenologues* 94: 7–8.

Siebert, K., A. Carrasco, P. Lynn. 1996. Formation of protein-polyphenol haze in beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44: 1997-2005.

Smith, A. and A. Noble. 1998. Effects of increased viscosity on the sourness and astringency of aluminium sulphate and citric acid. *Food Quality and Preference* 9:139-144.

Zamora, F. 2005. Las manoproteínas; origen e interés enológico. *Revista "Enólogos"* n° 36 (julio-agosto 2005) " <http://www.enologo.com/tecnicos/eno36/eno36.html>" leído el 14 de julio de 2011