

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**INTERACCIÓN DIFERENCIAL DE EXTRACTOS DE TANINOS ENOLÓGICOS  
COMERCIALES MEDIANTE SALIVA HUMANA**

FERNANDO ANDRÉS DEPIX BARRAZA

SANTIAGO, CHILE

2011

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**INTERACCIÓN DIFERENCIAL DE EXTRACTOS DE TANINOS ENOLÓGICOS  
COMERCIALES MEDIANTE SALIVA HUMANA**

**DIFFERENTIAL INTERACTION OF COMMERCIAL ENOLOGICAL TANNIN  
EXTRACTS BY HUMAN SALIVA**

FERNANDO ANDRÉS DEPIX BARRAZA

SANTIAGO, CHILE

2011

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

## INTERACCIÓN DIFERENCIAL DE EXTRACTOS DE TANINOS ENOLÓGICOS COMERCIALES MEDIANTE SALIVA HUMANA

Memoria para optar al título profesional de:  
Ingeniero Agrónomo  
Mención: Enología

FERNANDO ANDRÉS DEPIX BARRAZA

<b>Profesores Guías</b>	<b>Calificación</b>
Sr. Álvaro Peña Neira Ingeniero Agrónomo – Enólogo, Dr.	6,8
Sr. Elías Obreque Slier Ingeniero Agrónomo – Enólogo, Dr.	6,5
<b>Profesores Evaluadores</b>	
Sr. Ítalo Chiffelle Gómez Bioquímico, Dr.	6,5
Sr. Osvaldo Salazar Guerrero Ingeniero Agrónomo, Dr.	6,5
<b>Colaborador</b>	
Sr. Remigio López Solís Bioquímico, Dr.	

SANTIAGO, CHILE

2011

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mis profesores guías, Álvaro Peña y Elías Obreque, por su buena disposición, orientación, apoyo y sobre todo por la paciencia que tuvieron durante todo el proceso.

También agradezco a mi profesor colaborador, Remigio López, por su conocimiento entregado, las acertadas correcciones y colaboración brindada en cada momento que necesite ayuda.

Especialmente doy gracias a mi familia, por el apoyo y confianza incondicional que me han entregado siempre.

A Francisca le agradezco toda la colaboración brindada en este proceso, además de su amor e incondicional apoyo.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>PALABRAS CLAVE</b>	2
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>KEY WORDS</b>	4
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
Objetivos	7
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	8
Lugar de Trabajo	8
Materiales	8
Métodos	9
Caracterización espectrofotométrica de taninos enológicos comerciales	9
Obtención de saliva	9
Detección de proteínas en membranas de celulosa	9
Interacción tanino-proteínas.	10
a. Ensayo de difusión de proteínas salivales sobre láminas de celulosa.	10
b. Ensayo de precipitación (observación directa y a través del empleo de láminas de celulosa).	11

Diseño experimental y análisis estadístico	11
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	12
Caracterización espectrofotométrica de taninos enológicos comerciales	12
Detección de proteínas en membranas de celulosa	13
Interacción de taninos y proteínas salivales: ensayos de difusión y precipitación sobre láminas de celulosa.	16
<b>CONCLUSIONES</b>	20
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	21
<b>ANEXO I</b>	26
<b>ANEXO II</b>	27

## RESUMEN

Una de las propiedades de los taninos es su capacidad de precipitar proteínas, fenómeno que ha sido asociado a su capacidad de producir astringencia.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la interacción de dos taninos enológicos comerciales de distinta naturaleza (hidrolizable y condensado) con proteínas de saliva humana. Se caracterizaron 10 taninos enológicos comerciales (TECs) mediante análisis espectrofotométricos de fenoles totales, taninos totales e índice de gelatina. A continuación se seleccionó un tanino condensado y otro hidrolizable, con los cuales se realizaron los ensayos de interacción tanino-proteínas de la saliva humana. Estos correspondieron a ensayos de difusión y precipitación sobre láminas de celulosa, empleando saliva humana como fuente de proteínas. Los ensayos consistieron básicamente en determinar la magnitud de la interacción entre taninos y proteínas tras mezclar concentraciones crecientes de cada uno de los dos TECs con una cantidad fija de saliva. Alícuotas de la mezcla (antes y después de centrifugación de la misma) fueron depositadas sobre láminas de celulosa, secadas, fijadas y teñidas para la detección de la distribución del material proteico.

Las concentraciones de fenoles totales observadas en los taninos seleccionados promediaron 437 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g TEC, valores ampliamente superiores a lo encontrado por diversos autores en extractos de semillas y hollejos (10-30 mg EAG/g y 5-15 mg EAG/g, respectivamente). El contenido de taninos totales en los TECs seleccionados promedió 18,2 mg equivalentes de cianidina (EC) /g TEC, valor que se encuentra dentro del rango de concentraciones de taninos totales observado por otros autores en extractos de semillas y hollejos (10-60 y 5-20 mg EC/g, respectivamente). No se observó relación entre el contenido de fenoles totales y el de taninos totales, pues un alto contenido de taninos totales no implicó necesariamente un alto contenido de fenoles totales y viceversa.

En los ensayos de interacción tanino-proteína correspondientes a los ensayos de difusión y precipitación sobre láminas de celulosa, se observaron diferencias notorias en la difusión y precipitación entre ambos tipos de TECs. Además ninguno de los dos TECs logro provocar el 100% de la precipitación de las proteínas salivales, formando además complejos solubles entre los taninos y las proteínas salivales.

A partir de los resultados de este estudio, se puede concluir que dos TECs distintos (hidrolizables y condensados) interactúan diferencialmente con las proteínas salivales y que la metodología aplicada permite la evaluación independiente, expedita y objetiva de las interacciones entre proteínas salivales y extractos de TECs.

**PALABRAS CLAVE**

Interacción tanino-proteína

Astringencia

Proteínas salivales

Tanino hidrolizable

Tanino condensado



## ABSTRACT

One of the main properties of tannins is its ability to precipitate proteins, a phenomenon that has been associated with its capacity to produce astringency.

The aim of this study was to evaluate the interaction of two different commercial enological tannins (hydrolysable and condensed) with human salivary proteins. 10 commercial enological tannins (TECs) were characterized by total phenols, total tannins and gelatin index. Afterwards, one condensed and one hydrolysable tannin were selected, with which the interaction tannin-human salivary protein tests were conducted. These tests were the diffusion and precipitation assays over cellulose sheets using human saliva as proteins source. These assays determined the magnitude of the interaction between tannins and proteins after a mix of an increasing concentration of each one of the two TECs with a constant quantity of saliva. Aliquots of the mix (before and after centrifugation) were spotted onto cellulose membranes, dried, fixed and stained for the detection of the protein material distribution.

The average total phenol concentration observed in the tannins was 437 mg EAG/g TEC, exceeding the values found in seeds and skins by several authors (10-30 mg EAG/g and 5-15 mg EAG/g, respectively). The total tannin concentration averaged 18,2 mg EC/g TEC, value within the range of total tannin concentration found by other authors in seeds and skins extracts (10-60 and 5-20 mg EC/g, respectively). A relation between the total phenol and the total tannin content was not observed, because a high total tannin content did not necessarily imply a high content of total phenols and vice versa.

In the tests of tannin-protein interaction corresponding to the assays of diffusion and precipitation on sheets of cellulose, there were marked differences in the diffusion and precipitation between the two types of TECs. Furthermore neither induces a 100% of the precipitation of salivary proteins; however they did form soluble complexes between tannins and salivary proteins.

From the results of this study, it is concluded that two different TECs (hydrolyzable and condensed) interact differentially with salivary proteins and that the methodology allows an expedite and objective independent evaluation of the interactions between salivary proteins and extracts from TECs.

**KEY WORDS**

Tannin-protein interaction

Astringency

Salivary proteins

Hydrolyzable Tannin

Condensed Tannin

## INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son productos del metabolismo secundario de los vegetales. Están ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal y su contenido en las plantas superiores sólo es superado por el de los hidratos de carbono (Pridham, 1965). Los compuestos fenólicos, divididos en: no flavonoides (ácidos fenólicos, estilbenos y taninos hidrolizables) y flavonoides (flavonoles, antocianos y taninos condensados), revisten gran importancia en enología debido a que aportan importantes características a los vinos. Así, los ácidos fenólicos, que comprenden ácidos benzoicos y ácidos cinámicos, aunque carecen de colores del espectro visible, pueden oxidarse y dar lugar a reacciones de pardeamiento en el mosto y en el vino. Los estilbenos tendrían funciones relacionadas con mecanismos de defensa en las bayas de uva. Los taninos hidrolizables, cedidos por la madera de roble al vino, que comprenden los taninos gálicos y taninos elágicos, contribuirían a la astringencia del vino. Entre los flavonoides, los flavonoles son los responsables del color amarillo de la piel de las uvas blancas. Asimismo, los antocianos son la fuente del color rojo azulado de la uva tinta y más tarde del vino. Finalmente, los taninos condensados (llamados también proantocianidinas) se encuentran presentes en todas las partes sólidas de las bayas (escobajo, semillas y hollejo). Están constituidos por un número variable de unidades elementales de monómeros de (+)-catequina y (-)-epicatequina, pudiendo esta última estar esterificada con ácido gálico. Estos taninos participarían en el amargor y astringencia de las uvas y el vino (Gawel, 1998, Zamora, 2003, Blouin y Guimberteau, 2004).

La astringencia abarca un complejo grupo de sensaciones que van desde una sequedad y aspereza de la cavidad bucal hasta un arrugamiento o fruncimiento de la mucosa y músculos alrededor de la boca (Lee y Lawless, 1991). La astringencia es probablemente uno de los atributos sensoriales más importantes en los vinos tintos y ha sido atribuida a la interacción y/o precipitación de complejos formados por los taninos del vino con las proteínas de la saliva (Prinz y Lucas, 2000, Zamora 2003, de Wijk y Prinz, 2006).

La saliva tiene diversas funciones protectoras del organismo, gran parte de las cuales dependen de la presencia de diversas familias de proteínas. Entre éstas destacan por su abundancia, las proteínas ricas en prolina (PRP) (Horne *et al.*, 2002). Existen tres tipos de éstas: ácidas, glicosiladas y básicas. Las PRPs ácidas y glicosiladas participan en el control de los niveles salivales de calcio libre y en la lubricación del bolo alimenticio, respectivamente (Bennick, 1982, Hatton *et al.*, 1985). Las PRPs básicas han sido relacionadas específicamente a la unión de taninos de la dieta, como un posible mecanismo de defensa frente a su ingesta (Hagerman y Butler, 1981, Bennick, 2002). También se ha descrito que las glicoproteínas de la saliva con propiedades lubricantes, como es el caso de las mucinas, PRP glicosiladas y amilasas, presentan una alta afinidad por los taninos (Asquit *et al.*, 1987, de Freitas y Mateus, 2001, Monteleone *et al.*, 2004, Nayak and Carpentier, 2008). Además de presentar funciones anti-bacterianas y anti-fúngicas, las histatinas también han sido vinculadas a la interacción con taninos por lo que se ha

sugerido una posible función en la astringencia (Yan y Bennick, 1995). Además de la diversidad estructural de las proteínas salivales con capacidad de interactuar con los taninos, se ha propuesto que dicha interacción es altamente dependiente de la concentración, tamaño y estructura de los taninos (Zamora, 2003).

La interacción entre taninos y PRPs ha sido concebida como un proceso conformado por tres etapas (Charlton *et al.*, 2002b, Jobstl *et al.*, 2004, Poncet-Legrand *et al.*, 2006). Inicialmente ocurriría agregación de los taninos con las proteínas formando complejos solubles. Luego los complejos se unirían para formar dímeros proteicos cubiertos de taninos que llegan a alcanzar un tamaño coloidal. En una tercera etapa, los dímeros interactuarían formando grandes agregados que crecen hasta precipitar. Diversos estudios han sugerido que la percepción de astringencia no solo involucraría los complejos tanino-proteína insolubles que se forman en la etapa 3 y precipitan sino que también los complejos solubles de la etapa inicial (Bacon y Rhodes, 2000, Charlton *et al.*, 2002b, Obreque-Slier *et al.*, 2010b, Sarni-Manchado *et al.*, 1999).

La interacción entre taninos y proteínas ha sido estudiada por diversos autores utilizando diferentes metodologías, entre las que cabe señalar los métodos espectrofotométricos (Serafini *et al.*, 1997, Llaudy *et al.*, 2004, Labieniec y Gabryelak, 2006), técnicas de resonancia nuclear magnética (NMR) (Richard *et al.*, 2001, Charlton *et al.*, 2002a, Simon *et al.*, 2003), microcalorimetría (Beart *et al.*, 1985), nefelometría (de Freitas y Mateus, 2001, Horne *et al.*, 2002, Carvalho *et al.*, 2004) y Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-DAD) (He *et al.*, 2006, Ramírez, 2008), entre otros. Muchas de estas técnicas son bastante precisas y válidas, aunque son lentas de ejecutar. Por otra parte, en la industria vitivinícola se utiliza ampliamente el Índice de Gelatina para evaluar la interacción entre taninos y proteínas y para estudiar su relación con la astringencia. Este índice mide la fracción de proantocianidinas de una muestra que permanece sin precipitar después de añadir un exceso de gelatina (Glories, 1978). Sin embargo, la gelatina es un material proteico altamente complejo y diverso, cuyas cualidades como agente precipitante dependen en gran parte de su origen, lo que afectaría la consistencia de los resultados obtenidos (Llaudy *et al.*, 2004). Este método tampoco considera la formación de complejos tanino-proteína que permanecen solubles (Obreque-Slier *et al.*, 2010b).

La inmovilización y tinción de proteínas en soportes sólidos es una técnica fundamental que forma parte de diversos métodos analíticos en bioquímica y biología molecular (Bramhall *et al.*, 1969, Morcol y Subramanian, 1999, López-Cisternas *et al.*, 2007). Esta técnica ha sido adaptada a una gran variedad de ensayos de laboratorio y demandas analíticas. Estudios anteriores han utilizado esta técnica para evaluar la interacción entre taninos condensados e hidrolizables con albúmina sérica bovina (BSA) (Carvalho *et al.*, 2004, Gao *et al.*, 2008, Obreque-Slier *et al.*, 2010b). Sin embargo, BSA es una proteína pura de conformación globular, que difiere en composición aminoacídica y conformación lineal con respecto de las PRPs y demás proteínas salivales (Asquith y Butler, 1985, Hagerman y Robins, 1987). Por ello, se ha considerado de alto interés caracterizar el empleo de saliva como material de estudio en la evaluación de la interacción tanino-proteína. Por tal motivo, en el presente estudio se han propuesto los siguientes objetivos:

**Objetivo General**

Evaluar la interacción de taninos de distinta naturaleza (taninos hidrolizables y condensados) con proteínas salivales.

**Objetivos Específicos**

Evaluar la interacción de taninos enológicos comerciales de distinta naturaleza (hidrolizable y condensado) mediante un ensayo de difusión de proteínas sobre láminas de celulosa.

Evaluar la interacción de taninos enológicos comerciales de distinta naturaleza (hidrolizable y condensado) mediante un ensayo de precipitación (formación de complejos insolubles).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar de Trabajo

El estudio fue realizado tanto en el laboratorio de Biología Supramolecular, Programa de Biología Celular y Molecular-ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (ensayos de interacción taninos-proteínas) y en el Laboratorio de Química Enológica del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile (caracterización de composición fenólica de los extractos de taninos).

### Materiales

#### Taninos

Se utilizaron 10 taninos de uso enológico (Anexo I) obtenidos de distintas empresas proveedoras de insumos enológicos del mercado nacional (Partner S.A., Industrias Vínicas S.A. y Navarro y Cía. Ltda.). Los taninos utilizados y sus códigos asignados en el presente estudio fueron los siguientes: Tan'cor (T<sub>1</sub>), Tanin spécial chène (T<sub>2</sub>), Harmotan (T<sub>3</sub>), Vinitan (T<sub>4</sub>), Tanin gallique a l'alcool (T<sub>5</sub>), Pro tanin R-instantáneo (T<sub>6</sub>), Exceltan (T<sub>7</sub>), Tanino quebracho (T<sub>8</sub>), Tanirouge (T<sub>9</sub>) y Tanirouge extra (T<sub>10</sub>). Para su empleo, cada tanino enológico comercial (TEC) fue disuelto en agua destilada a una concentración final de 3 mg/mL, mediante agitación durante 10 minutos seguida de filtración a través de una membrana de tamaño de poro 0,45 µm.

#### Saliva

Se utilizó saliva total proveniente de un voluntario varón, adulto joven (26 años de edad) y sano.

#### Ensayos de difusión y precipitación sobre láminas de celulosa

Se emplearon láminas de celulosa pura (Whatman 1) adquiridos en Whatman Ltd. Maidstone, Inglaterra.

Para la detección de proteínas se utilizó Coomassie Blue R-250, adquirido en Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, Missouri, EEUU. Como proteína estándar (1 mg/mL) se empleó albúmina sérica bovina (BSA) de masa molecular 66.000 daltons (D), también adquirida en Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, EEUU. Los solventes de grado pro análisis requeridos para el procesamiento de las láminas de celulosa fueron adquiridos en Oxiquim, Chile.

Los siguientes equipos fueron utilizados: Microcentrífuga Sorvall MC-12V, espectrofotómetros Unicam modelo Helios Gamma y Shimadzu UV-160A, agitador de vaivén Hofer modelo Red Rocker PR50.

## **Métodos**

### **Caracterización espectrofotométrica de taninos enológicos comerciales**

Los diez TECs fueron caracterizados mediante análisis de a) fenoles totales (recopilados por Bordeau y Scarpa, 1998), b) taninos totales (recopilados por Zoecklein *et al.*, 2000) y c) índice de gelatina (Glories, 1978). Además en un estudio paralelo (Ramírez, 2008), los taninos empleados en el presente estudio fueron caracterizados mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-DAD) (Anexo II). A partir de aquella caracterización y la de este estudio, se seleccionó un tanino condensado (TEC T<sub>4</sub>) y un tanino hidrolizable (TEC T<sub>5</sub>). Con ambos taninos seleccionados se realizaron los estudios de interacción taninos-proteínas salivales que se detallan más adelante.

### **Obtención de saliva**

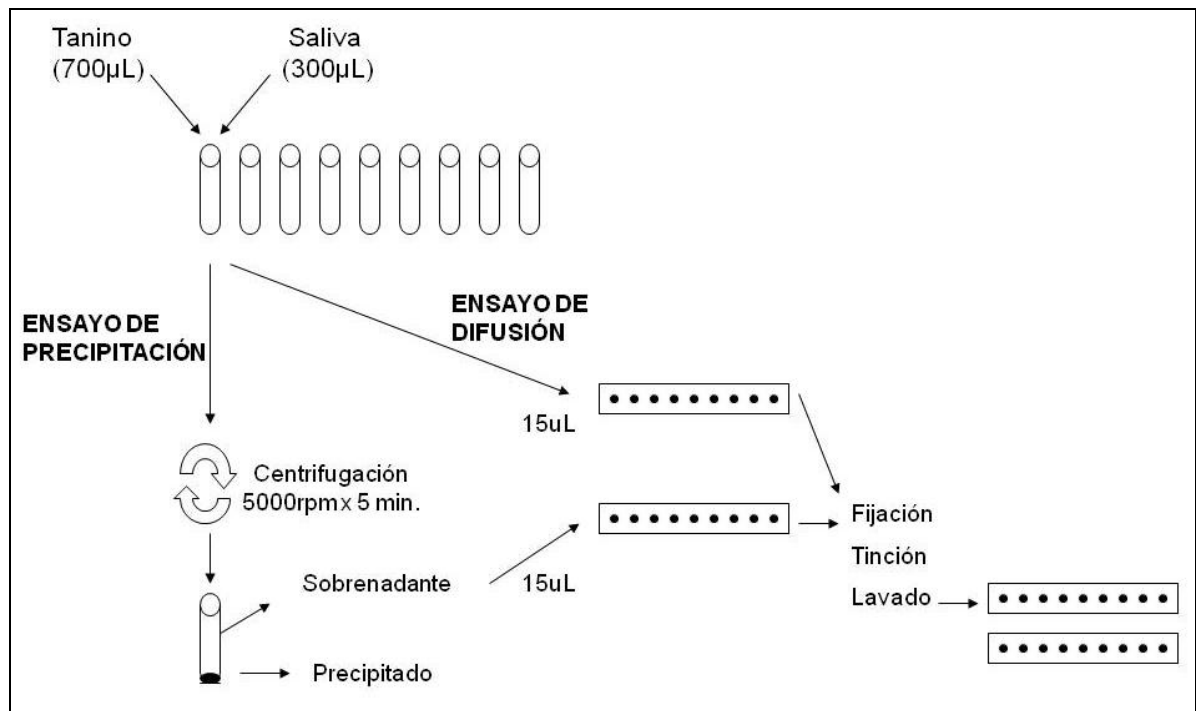
La saliva fue colectada mediante un procedimiento convencional pasivo (sin empleo de estimulantes de salivación) en condiciones estandarizadas: entre 9:00 y 11:00 a.m. e inmediatamente antes de los experimentos. La saliva fue acumulada en la boca durante intervalos de 1 minuto y expectorada en un contenedor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

### **Detección de proteínas en membranas de celulosa**

Se sembraron alícuotas de 15  $\mu$ L de BSA (1 mg/mL) y de saliva sobre puntos específicos de una lámina de celulosa sostenida horizontalmente. Una vez que todas las muestras colocadas sobre la lámina de celulosa habían difundido radialmente, se las dejó secar a temperatura ambiente. A continuación, la lámina fue fijada y procesada para la detección de proteínas de acuerdo al siguiente protocolo: fijación en ácido tricloroacético 5% p/v (5 minutos), enjuague en etanol 80% (5 minutos), tinción de proteínas en Coomassie blue R-250 0,25% (20 minutos), lavado exhaustivo de la lámina de celulosa en ácido acético 7% v/v hasta alcanzar un fondo claro y secada bajo el calor de una lámpara (López-Cisternas *et al.*, 2007).

### Interacción tanino-proteínas.

**a.- Ensayo de difusión de proteínas salivales sobre láminas de celulosa:** Se mezcló 700  $\mu\text{L}$  de concentraciones crecientes de una solución de TEC (condensado o hidrolizable) (0 - 0,15 - 0,3 - 0,45 - 0,6 - 0,75 - 0,9 - 1,05 - 1,2  $\text{mg/mL}$ ) con un volumen fijo de saliva (300  $\mu\text{L}$ ) o agua (Control) (Figura 1). Luego de 5 minutos se tomaron de cada tubo, alícuotas de 15  $\mu\text{L}$  las cuales fueron sembradas sobre una membrana de celulosa sostenida horizontalmente desde sus márgenes. Una vez que las muestras habían difundido radialmente, se marcó con lápiz grafito el límite de la difusión, para luego secar a temperatura ambiente las láminas de celulosa. Posteriormente se sometió a la lámina de celulosa a pasos secuenciales de fijación con ácido tricloroacético 5% p/v (5 minutos), enjuague en etanol 80% (5 minutos) y tinción de las proteínas con 0,25% de Coomassie blue R-250 (20 minutos). Posteriormente, la lámina de celulosa fue lavada exhaustivamente con ácido acético 7% v/v hasta alcanzar un fondo claro en la lámina. Finalmente, la lámina de celulosa fue secada bajo una lámpara (López-Cisternas *et al.*, 2007). El color azul de cada mancha representa la distribución alcanzada por la proteína de cada situación experimental.



**Figura 1.** Evaluación de la interacción tanino-proteína salival mediante el ensayo de difusión de proteínas sobre membranas de celulosa y el ensayo de precipitación de complejos insolubles taninos-proteínas salivales.



**b. Ensayo de precipitación (observación directa y a través del empleo de láminas de celulosa).** Al igual que en el ensayo de difusión, inicialmente se efectúan las mezclas de taninos y saliva en tubos Eppendorf. Tras la incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos, las mezclas TEC-saliva de cada tubo fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 5 minutos, para obtener un sobrenadante y un precipitado apreciable a simple vista. De cada sobrenadante se tomaron alícuotas de 15  $\mu$ L para ser sembradas sobre una lámina de celulosa. Esta fue fijada, teñida, lavada y secada de la misma manera descrita en el ensayo de difusión (Figura 1) (López-Cisternas *et al.*, 2007). Al igual que en el ensayo de difusión, cada zona teñida de color azul en la lámina de celulosa representa la distribución alcanzada por las proteínas en la condición experimental respectiva. La repetitividad de ambos procedimientos fue verificada por los resultados de experimentos independientes realizados por un mismo operador. La reproducibilidad de ambos procedimientos fue verificada por comparación con los resultados obtenidos por dos operadores distintos con una misma muestra de saliva (López-Cisternas *et al.*, 2007).

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

La caracterización de taninos enológicos comerciales fue separada en tres ensayos (fenoles totales, taninos totales e índice de gelatina). Para los cuales se utilizó un diseño completamente al azar con tres repeticiones, donde los tratamientos correspondieron a los 10 taninos enológicos comerciales. Cada uno de estos taninos constituyó una unidad experimental.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza, utilizando el programa estadístico Minitab Release 13.32. En presencia de diferencias significativas entre los tratamientos se realizó una prueba de rango múltiple de Tuckey, con un nivel de significancia del 5%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización espectrofotométrica de taninos enológicos comerciales

El Cuadro 1 muestra el contenido de fenoles totales, el contenido de taninos totales y el índice de Gelatina de los 10 TECs obtenidos en el mercado nacional. El contenido promedio de fenoles totales de los extractos de taninos enológicos fue de 437 mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g TEC, con un rango entre 260,1 mg EAG/g TEC correspondiente a T<sub>6</sub> y 1036,9 mg EAG/g TEC correspondiente a T<sub>5</sub>. Las concentraciones de fenoles totales observadas en estos TECs fueron ampliamente superiores a las encontradas por diversos autores en extractos de semillas y hollejos (10-30 mg EAG/g y 5-15 mg EAG/g, respectivamente) (Peña-Neira *et al.*, 2004, Canals *et al.*, 2005, Pérez *et al.*, 2006, Yilmaza y Romeo, 2006; Obreque-Slier *et al.*, 2010c).

El contenido de taninos totales encontrados en los TECs promedió 18,2 mg equivalentes de cianidina (EC)/g TEC, valor que se encuentra dentro del rango de concentraciones de taninos totales observadas por otros autores en extractos de hollejos y semillas (5-20 y 10-60 mg EC/g, respectivamente) (Peña-Neira *et al.*, 2004, Canals, *et al.*, 2005; Obreque-Slier *et al.*, 2010c). El rango observado en el contenido de taninos totales varió entre 1,2 mg EC/g TEC para los taninos T<sub>3</sub> y T<sub>7</sub>, y 72,9 mg EC/g TEC para el tanino T<sub>8</sub>. Estos valores deben ser analizados sobre la base de que la reacción de Bate-Smith (1981) empleada para la determinación de este parámetro permite solamente la cuantificación de taninos proantocianidínicos y no la de los taninos hidrolizables.

A partir del conjunto de datos anteriores, no se observó relación alguna entre el contenido de fenoles totales y el contenido de taninos totales, es decir, en estos productos un alto contenido de taninos totales no implica necesariamente un alto contenido de fenoles totales y viceversa. Es importante consignar que en un estudio paralelo se caracterizó a este mismo conjunto de TECs mediante análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Ramírez, 2008) y se demostró para cada uno de ellos su naturaleza proantocianidínica o hidrolizable. Sin embargo, la composición fenólica señalada en las fichas técnicas de algunos de estos TECs presentó incongruencias con los resultados obtenidos en el laboratorio (Ramírez, 2008). Tales diferencias podrían generar dificultades en la aplicación de estos TECs para fines específicos en la industria del vino.

**Cuadro 1.** Contenido de fenoles totales, taninos totales e índice de gelatina en los extractos de taninos enológicos comerciales.

TEC	Fenoles totales			Taninos totales			Índice de gelatina		
	(mg de EAG/g TEC)			(mg de EC/g TEC)			(% )		
T <sub>1</sub>	368.31	±	16 e	3.57	±	1.56 a	29.33	±	1.78 b
T <sub>2</sub>	438.8	±	8.8 g	14.18	±	2.05 c	37.78	±	3.93 c
T <sub>3</sub>	330.26	±	12 c	1.2	±	1.56 a	2.55	±	1.25 a
T <sub>4</sub>	308.91	±	16 b	23.11	±	2.27 d	73.76	±	4.26 e
T <sub>5</sub>	1036.87	±	9.3 i	9.06	±	2.95 b	67.22	±	2.35 e
T <sub>6</sub>	260.1	±	14 a	23.71	±	5.62 d	36.58	±	3.07 c
T <sub>7</sub>	351.94	±	16 d	1.25	±	1.46 a	52.73	±	1.17 d
T <sub>8</sub>	363.02	±	16 de	72.85	±	2.85 e	32.26	±	0.79 bc
T <sub>9</sub>	391.92	±	5.8 f	21.13	±	3.69 d	48.29	±	0.49 d
T <sub>10</sub>	520.04	±	2.2 h	12.03	±	1.56 c	8.61	±	1.22 a

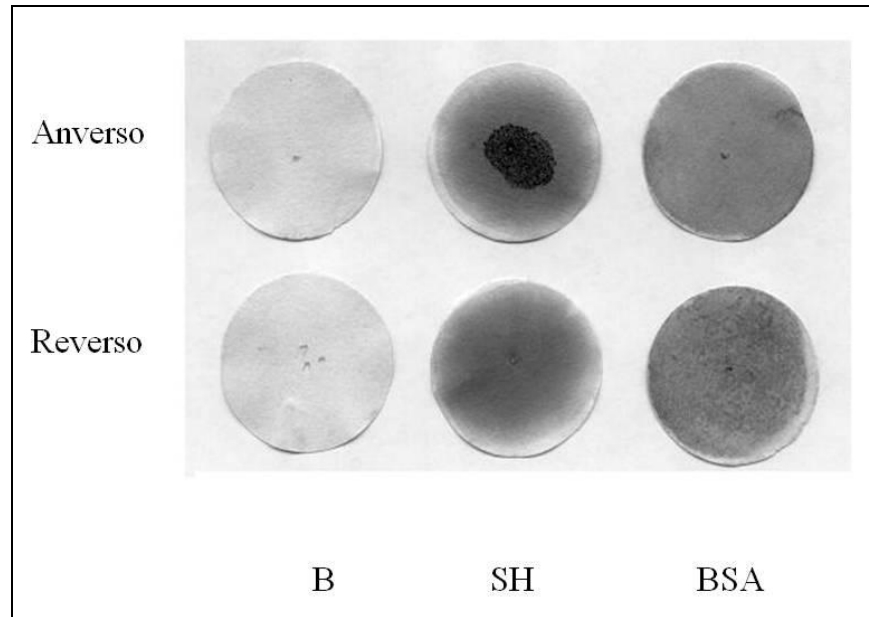
Letras distintas en una misma columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo a la prueba de “Tuckey” ( $p < 0,05$ ). TEC – tanino enológico comercial, EAG – equivalentes de ácido gálico,  $\sigma$  – desviación estándar, EC – equivalentes de cianidina.

El Índice de gelatina de los TECs utilizados en este estudio promedió 38,9 %, siendo los TECs T<sub>3</sub> y T<sub>10</sub> los que obtuvieron el menor valor (bajo 9%) mientras que los TECs T<sub>4</sub> y T<sub>5</sub> superaron el 67 %. El Índice de Gelatina relaciona la capacidad de una gelatina comercial para precipitar los compuestos fenólicos de un extracto, con la percepción de astringencia. Sin embargo, en la determinación de este índice el diferencial de cuantificación del contenido de los taninos totales antes y después de la precipitación con gelatina se lleva a cabo utilizando la reacción de Bate-Smith, la que de acuerdo a lo señalado anteriormente, cuantifica sólo los taninos de carácter proantocianidínico. Esta observación, sumada a lo descrito por Ramírez (2008), sugeriría la inexistencia de una relación entre la naturaleza del TEC y su Índice de Gelatina. Este comentario se ve particularmente ejemplificado con el TEC T<sub>4</sub>, el cual fue definido como 100% hidrolizable por Ramírez (2008) y en el presente estudio presentó el mayor valor de Índice de Gelatina de entre todos los TECs analizados (Cuadro 1).

### Detección de proteínas en membranas de celulosa

La Figura 2 muestra el modo de difusión sobre láminas de celulosa de dos fluidos con un contenido de proteínas semejante: albúmina sérica bovina (BSA, 1 mg/mL) y saliva humana de un sujeto normal. Al ser depositada sobre un punto de la membrana de celulosa, la suspensión de BSA difundió en forma radial y humectó una superficie de forma aproximadamente circular. El procesamiento de la lámina de celulosa para detectar la distribución alcanzada por la proteína, detección efectuada por tinción con el colorante selectivo para proteínas Coomassie blue, mostró que ésta se desplazó homogéneamente junto al agua de la suspensión (modo monofásico de difusión), en coincidencia con lo observado por otros autores (López-Cisternas *et al.*, 2007; Obrequé-Slier *et al.*, 2010b). Esta

observación sugiere que la capacidad de interacción de la BSA con el agua es mayor que con la lámina de celulosa.

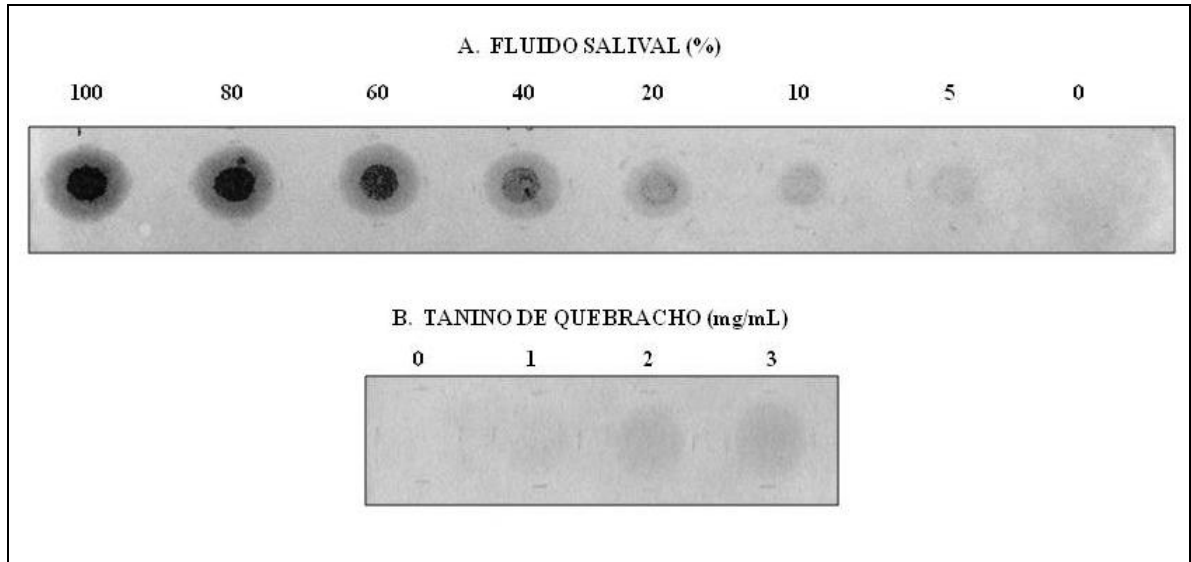


**Figura 2.** Modos de difusión de proteínas sobre láminas de celulosa. B - blanco (agua), SH - saliva humana, BSA - seroalbúmina bovina.

Cuando el análisis del modo de difusión se hizo empleando fluido salival humano como material proteico (SH), se observó al menos dos componentes salivales (modo bifásico de difusión). Uno de ellos corresponde a un material que permaneció en el sitio de depósito de la muestra, al que se denomina fracción no difusible (FND). El otro componente proteico salival difundió radialmente acompañando al agua salival, componente al que se denomina fracción difusible (FD). Este comportamiento ha sido descrito en estudios previos (López-Cisternas *et al.*, 2007; Obrequé-Slier *et al.*, 2010a y 2010b). La inspección de la cara reversa de la lámina de celulosa, es decir, aquella sobre la cual no se depositaron las suspensiones proteicas, mostró sólo material proteico difusible. Esta observación respalda la existencia de una organización mayor de las proteínas no difusibles cuyo tamaño determinaría su retención sobre la superficie del lado anverso de la lámina. Por el contrario, el material difusible correspondería a proteínas más libres y fácilmente arrastrables por el agua. De esta manera, sería posible esperar que la interacción de este tipo de proteínas con compuestos afines por ellas, como es el caso de los taninos, provoque una alteración de su difusión (Gawel, 1998).

Por otra parte, cuando la saliva fue diluida con agua destilada (entre 80% a 5%) se observó una pérdida paulatina de las FDs y FNDs en la membrana de celulosa (Figura 3A). De este modo, la intensidad de tinción de la FD disminuyó gradualmente a medida que aumentó el contenido de agua en la mezcla, hasta hacerse débilmente perceptible (dilución 10%). Por el contrario, a pesar que la FND de la saliva se vio fuertemente disminuida con cantidades

crecientes de agua, se pudo apreciar fácilmente su tinción aún con la mayor dilución (5%). Cabe destacar que aún con las mayores diluciones el comportamiento bifásico de la difusión de los componentes proteicos de la saliva se mantuvo inalterado.



**Figura 3.** Modo de difusión del fluido salival (diluciones) y de una solución de tanino de quebracho sobre membranas de celulosa sometidas a fijación y tinción con Coomassie blue.

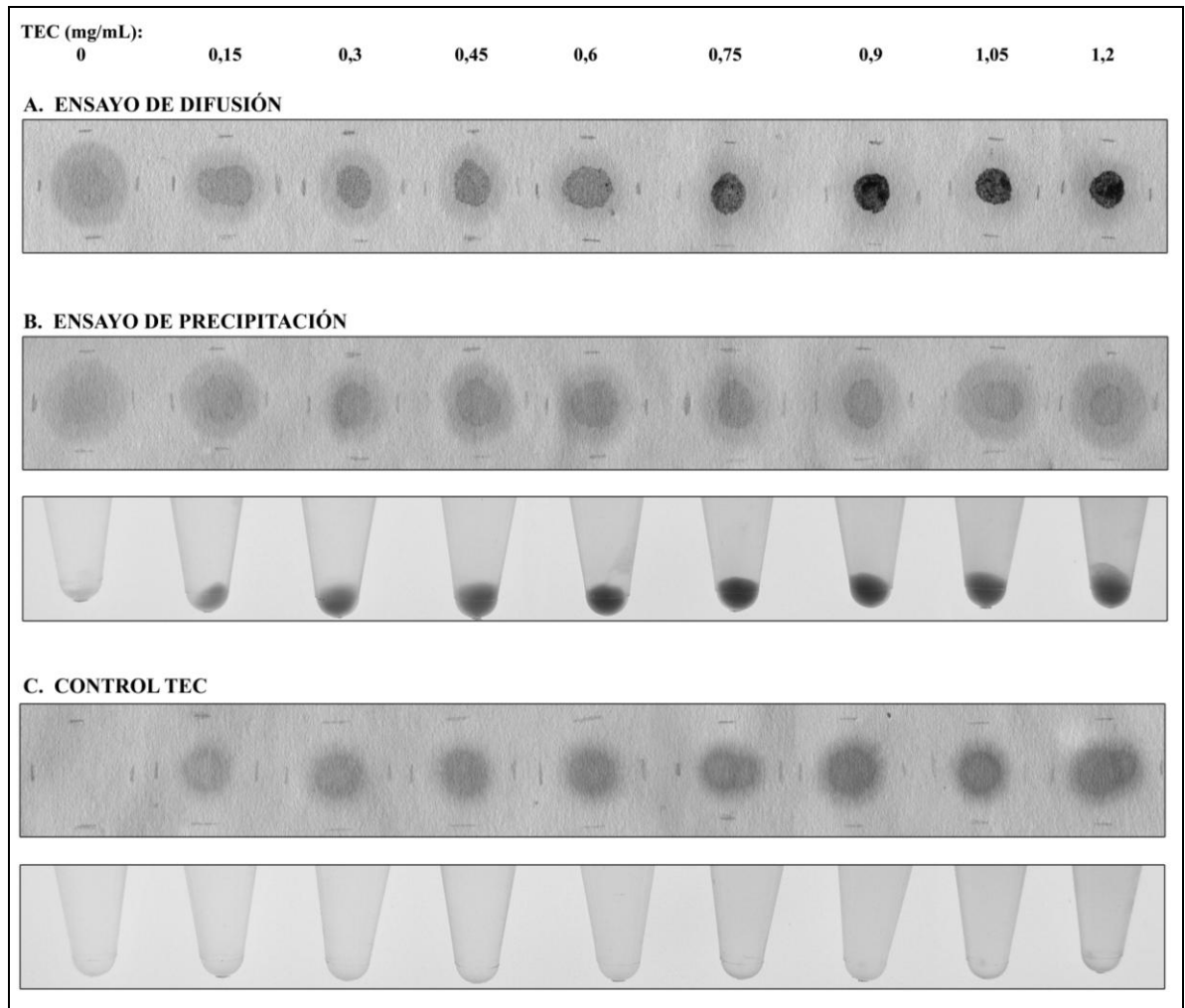
Conocida es la propiedad mordiente de los taninos, esto es, su capacidad para unirse en forma relativamente inespecífica a superficies y moléculas orgánicas (Colombini *et al.*, 2007, Burkinshaw y Kumar, 2009). Por este motivo, una de las preguntas preliminares a resolver en el presente estudio decía relación con la selectividad de tinción de las proteínas por el colorante Coomassie blue en presencia de taninos. Para abordar esta pregunta, sobre láminas de celulosa se depositaron alícuotas de 15  $\mu$ L de diferentes concentraciones (1-3 mg/mL) de un extracto de tanino condensado (extracto de quebracho) (Figura 3B). Tras el procesamiento estándar de la membrana de celulosa (fijación, lavado y tinción) no se observó una tinción mayor sobre el papel, salvo una muy tenue coloración azul dependiente de la concentración de la solución de tanino depositada. Tal coloración, así como su distribución, representaría la reactividad del tanino con las fibras de celulosa de la membrana (difusión algo menor que la correspondiente al agua de la solución) y el efecto mordiente retenedor del colorante (Obrique-Slier *et al.*, 2010b). La intensidad de la coloración fue evidentemente muy tenue en comparación con la correspondiente a la exhibida por las suspensiones proteicas a ser usadas en los experimentos. Esta observación sugiere que la metodología a ser aplicada para la detección de las proteínas en presencia o ausencia de taninos es claramente selectiva para las proteínas frente a los taninos.

### **Interacción de taninos y proteínas salivales: ensayos de difusión y precipitación sobre láminas de celulosa.**

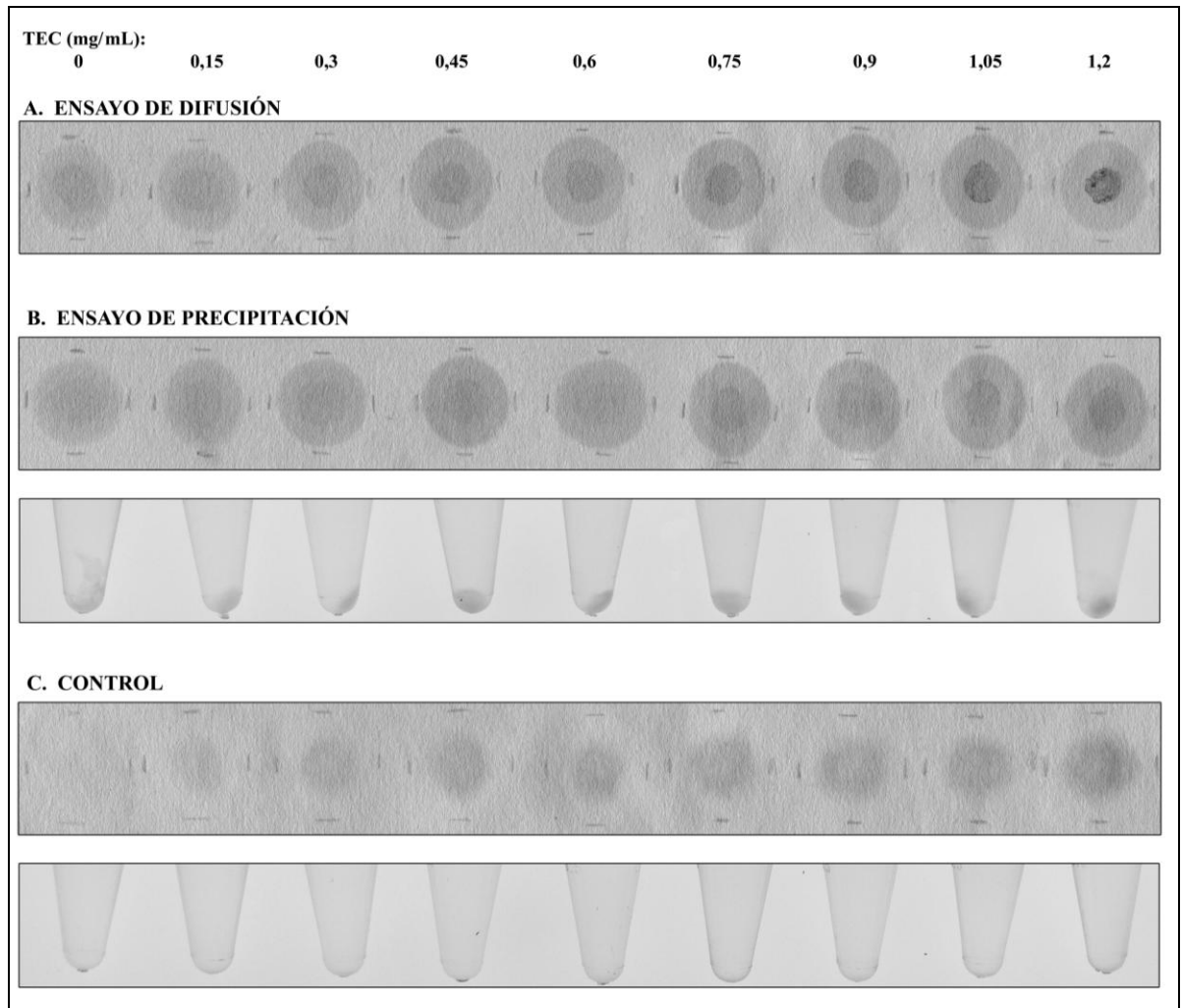
La precipitación de proteínas mediante taninos es un parámetro objetivo y ampliamente utilizado para evaluar la interacción entre ambos tipos moleculares (Obreque-Slier *et al.*, 2010b). En este estudio, se evaluó el efecto de dos TECs tanto en la difusión de la proteína salival sobre matrices de celulosa así como sobre la precipitación de la fracción proteica salival. Para ello, tras la mezcla de las soluciones de TECs con alícuotas de saliva, los tubos fueron dejados reposar durante 5 minutos. En el caso del ensayo de difusión, alícuotas de la mezcla saliva-taninos fueron depositadas sobre láminas de celulosa, las que fueron procesadas para analizar el modo de difusión de la fracción proteica de la saliva. A continuación, los tubos con las mezclas fueron centrifugados para hacer sedimentar los complejos taninos-proteínas insolubles. En este caso, alícuotas de los sobrenadantes fueron depositadas sobre láminas de celulosa, las que fueron procesadas para detectar las proteínas no precipitadas. En este ensayo, la precipitación de complejos tanino-proteína fue estimada a través de la evaluación de la desaparición de la tinción frente al colorante de proteínas (Ensayo de precipitación). En las Figuras 4 y 5 se muestra la capacidad de dos TECs, uno de tipo condensado y otro de tipo hidrolizable, para restringir la difusión de las proteínas salivales sobre las láminas de celulosa así como también producir la precipitación de la proteína salival.

En el ensayo de difusión se pudo observar que concentraciones crecientes de TEC condensado produjeron una disminución progresiva en la intensidad de coloración y en el tamaño de la FD de la saliva, sumado a un notable aumento en la intensidad de la coloración de la FND (Figura 4A). Aunque estos efectos fueron perceptibles a partir de la concentración más baja de TEC condensado (0,15 mg/mL), aquellos resultaron evidentes con las concentraciones más altas del TEC condensado (0,75 a 1,2 mg/mL).

Con el TEC hidrolizable el resultado fue completamente distinto (Figura 5A). En efecto, la mezcla del tanino hidrolizable con la saliva mantuvo inalterado el modo bifásico de difusión de la proteína salival, observándose sólo un progresivo y muy leve aumento en la intensidad de la coloración tanto en la FND y la FD. Este efecto se hizo evidente al aumentar la concentración del tanino (1,05 y 1,2 mg/mL). Cabe destacar que en este último caso, la FD permaneció prácticamente inalterada durante el ensayo, salvo una leve disminución de su coloración en la muestra más concentrada (1,2 mg/mL) (Figura 5A). Esto podría representar una afinidad menor de este tipo de tanino, en comparación con el tanino condensado, por las proteínas de la FD de la saliva.



**Figura 4.** Efecto de un TEC condensado sobre (A) la difusión de proteínas salivales en membranas de celulosa y (B) la precipitación de las proteínas salivales, ensayadas por detección de las proteínas no precipitadas en membrana de celulosa (panel B superior) o por inspección directa en el tubo de centrifugación (panel B inferior). En la parte superior de la figura se indica la concentración (mg/mL) de los 700 $\mu$ L de TEC condensado agregados a un volumen constante de 300  $\mu$ L de saliva. En C, a manera de control, se muestra la tinción de la membrana de celulosa sembrada con cantidades crecientes de tanino (panel superior) y la ausencia de material sedimentable en mezclas donde la saliva humana fue reemplazada por agua.



**Figura 5.** Efecto de un TEC hidrolizable sobre (A) la difusión de proteínas salivales en membranas de celulosa y (B) la precipitación de las proteínas salivales, ensayadas por detección de las proteínas no precipitadas en membranas de celulosa (panel B superior) o por inspección directa en el tubo de centrifugación (panel B inferior). En la parte superior de la figura se indica la concentración (mg/mL) de los 700 $\mu$ L de TEC hidrolizable agregados a un volumen constante de 300  $\mu$ L de saliva. En C, a manera de control, se muestra la tinción de la membrana de celulosa sembrada con cantidades crecientes de tanino (panel superior) y la ausencia de material sedimentable en mezclas donde la saliva humana fue reemplazada por agua.

En el ensayo de precipitación, cuando la saliva fue mezclada con concentraciones crecientes de TEC condensado se observó la formación de un sedimento insoluble de complejos de proteínas salivales-tanino condensado cuyo tamaño aparente se relacionó directamente con la masa de tanino agregado. El análisis de los sobrenadantes de las mezclas saliva-tanino condensado sobre láminas de celulosa mostró la existencia de proteína salival sin precipitar aún cuando se empleó las más altas concentraciones de taninos. Probablemente, mayores



concentraciones de taninos condensados podrían haber producido la precipitación total de la proteína salival. No obstante, la comparación de las imágenes de difusión de la proteína salival presente en los sobrenadantes en presencia del tanino condensado mostró algunas características sugerentes de la existencia de complejos solubles entre taninos condensados y proteínas salivales. En efecto, en las concentraciones medias de TEC condensado (0,3 a 0,9 mg/mL) la FD disminuyó su área, y las intensidades de la coloración de ésta y de la FND aumentaron (Figura 4B). Estos complejos solubles en estas condiciones intermedias no precipitan (Sarni-Manchado *et al.*, 1999, Bacon y Rhodes, 2000, Charlton *et al.*, 2002b, Obreque-Slier *et al.*, 2010b). En las concentraciones más altas de este tanino condensado se observó un modo de difusión bifásico semejante al que se observa en ausencia de taninos. Posiblemente, tales imágenes representan la fracción de proteínas salivales no reactivas con el tanino condensado utilizado en este estudio.

En contraste, al mezclar concentraciones crecientes de saliva con el TEC hidrolizable (Figura 5B), los resultados observados fueron completamente distintos a lo observado con el TEC condensado. En efecto, la masa de proteína salival aparentemente precipitada por el TEC hidrolizable fue muy menor. Esta observación fue consistente con la observación de una alta reactividad de la proteína salival presente en el sobrenadante aún con las dosis más altas del tanino hidrolizable. Asimismo, la reactividad de la fracción proteica salival en presencia de las distintas concentraciones de tanino hidrolizable, mostró una mayor coloración con el colorante Coomassie blue. Este conjunto de observaciones es consistente con la formación preferente de complejos solubles entre el tanino hidrolizable y las fracciones salivales proteicas difusible (FD) y no difusible (FND).

Tomadas en conjunto las observaciones anteriores, es posible afirmar que ninguno de ambos taninos en las condiciones ensayadas produjo la precipitación completa de las proteínas salivales. Sin embargo, ambos taninos darían origen también a la formación de complejos solubles al interactuar con las proteínas salivales. No obstante tales similitudes entre ambos taninos, la capacidad de ellos para interactuar y formar precipitados insolubles con las proteínas salivales es notablemente distinta. De igual modo, la capacidad de alterar las propiedades de difusión de las proteínas salivales sobre las láminas de celulosa, otro indicador de la interacción tanino-proteína salival, también estaría en estrecha relación con la naturaleza del tanino (Sarni-Manchado *et al.*, 1999, Obreque-Slier *et al.*, 2010a).

## CONCLUSIONES

- Distintos taninos comerciales de uso enológico interactúan diferencialmente con las proteínas salivales.
- La metodología aplicada permite la evaluación independiente, expedita y objetiva de las interacciones entre proteínas y extractos de taninos de interés enológico.
- El tanino enológico comercial condensado empleado interactúa con las proteínas salivales generando principalmente complejos taninos-proteínas salivales insolubles mientras que el tanino enológico comercial hidrolizable utilizado en el estudio genera principalmente complejos taninos-proteínas salivales de carácter soluble.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Asquith, T.N. and L.G. Butler. 1985. Use of dye-labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *Journal of Chemical Ecology* 11: 1535-1544.
- Asquit, T.N., J. Uhling, H. Mehansho, L. Putman, D.M. Carlson and L. Butler. 1987. Binding of condensed tannins to salivary proline-rich glycoproteins: the role of carbohydrate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 35: 331-334.
- 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.
- Bate-Smith, E. 1981. Astringent tannins of the leaves of germain species. *Phytochemistry* 20: 211-216.
- Beart, J.E., T.H. Lilley and E. Haslam. 1985. Plant polyphenols secondary metabolism and chemical defense: some observations. *Phytochemistry* 24: 33-38.
- Bennick, A. 1982. Salivary proline-rich proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry* 45: 83-99.
- Bennick, A. 2002. Interaction of plant biopolyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 13(2): 184-196.
- Blouin, J. y G. Guimberteau. 2004. Maduración y madurez de la uva. Pp.72-78. Ediciones Mundi- Prensa, Madrid, España. 149p.
- Bordeau, E. y V. Scarpa. 1998. Análisis químico del vino. Ediciones de la Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 253p.
- Bramhall, S., N. Noack, M. Wu and J.R. Loewenberg. 1969. A simple colorimetric method for determination of protein. *Analytical Biochemistry* 31: 146-148.
- Burkinshaw, S.M. and N. Kumar. 2009. The mordant dyeing of wool using tannic acid and FeSO<sub>4</sub>, Part 1: Initial findings. *Dyes and Pigments* 80: 53-60.
- Canals, R., M. Llaudy, J. Valls, J. Canals and F. Zamora. 2005. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from skin and seeds of tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4019-4025.

- Carvalho, E., N. Mateus and V. de Freitas. 2004. Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions. *Analytica Chimica Acta* 513: 97-101.
- Charlton, A., E. Haslam and M. Williamson. 2002a. Multiple conformations of the proline-rich protein/epigallocatechin gallate complex determined by time-average nuclear overhauser effects. *Journal of the American Chemical Society* 124: 9899-9905.
- Charlton, A., A. Baxter, L. Khan, A. Moir, E. Haslam, A. Davies and P. Williamson. 2002b. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1593-1601.
- Colombini, M.P., A. Andreotti, C. Baraldi, I. Degano and J. Lucejko. 2007. Colour fading in textiles: A model study on the decomposition of natural dyes. *Microchemical Journal* 85: 174-182.
- de Freitas, V. and N. Mateus. 2001. Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 82(2): 113-119.
- de Wijk, R. and J. Prinz. 2006. Mechanisms underlying the role of friction in oral texture. *Journal of Texture Studies* 37: 413-427.
- Gao, X., S. Ge, Q. Cai, K. Zeng, C. Grimes. 2008. Kinetic study on the interaction between tannin and bovine serum albumin with a wireless magnetoelastic biosensor. *Sensors and Actuators* 129: 929-933.
- Gawel, R. 1998. Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 74-95.
- Glories, Y. 1978. Recherche sur la matière colorante des vins rouges, thèse de doctorat et sciences, Université de Bordeaux II. Bordeaux, Francia. 364p.
- Hatton, M., R. Loomis, M. Levine and L. Tabak. 1985. Masticatory lubrication: The role of carbohydrate in the lubricating property of a salivary protein albumin complex. *Biochemical Journal* 230: 817-820.
- Hagerman, A.E. and L.G. Butler. 1981. The specificity of the proanthocyanidin-protein interaction. *Journal of Biological Chemistry* 256: 4494-4497.
- Hagerman, A.E. and C.T. Robins. 1987. Determination of protein in tannin-protein precipitates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 13(5): 1243-1259.
- He, Q., B. Shi and K. Yao. 2006. Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. *Food Chemistry* 95: 250-254.

Horne, J., J. Hayes and H.T. Lawless. 2002. Turbidity as a measure of salivary protein reactions with astringent substances. *Chemical Senses* 27: 653-659.

Jobstl, E., J. O'Connell, J.P. Fairclough and M.P. Williamson. 2004. Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules* 5(3): 942-949.

Labieniec, M. and T. Gabryelak. 2006. Interactions of tannic acid and its derivatives (ellagic and gallic acid) with calf thymus DNA and bovine serum albumin using spectroscopic method. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 82: 72-78.

Lee, C.B. and H.T. Lawless. 1991. Time-course of astringent materials. *Chemical Senses* 16: 225-238.

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

López, R.O. and D. Miranda. 1986. Changes in the polypeptide composition of mouse parotid glands alter stimulation of secretion and DNA síntesis by isoproterenol. *Biochimica et Biophysica Acta* 881: 422-429.

López-Cisternas, J., J. Castillo-Díaz, L. Traipe-Castro and R. López-Solís. 2007. A protein dye-binding assay on cellulose membranes for tear protein quantification. *Cornea* 26: 970-976.

Monteleone, E., N. Condelli, C. Dinnella and M. Bertuccioli. 2004. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference* 15: 761-769.

Morcol, T. and A. Subramanian. 1999. A red-dot-blot protein assay technique in the low nanogram range. *Analytical Biochemistry* 270: 75-82.

Nayak, A. and G.H. Carpentier. 2008. A physiological model for tea induced astringency. *Physiology & Behavior* 95: 290-294.

Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira and R. López-Solís. 2010a. 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., C. Mateluna, A. Peña-Neira and R. López-Solís. 2010b. 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(14): 8375-8379.

- Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira, R. López-Solís, F. Zamora-Marín, J. Ricardo-Da Silva, and O. Laureano. 2010c. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from carménère and cabernet sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(6): 3591-3599.
- Peña, A., M. Dueñas, A. Duarte, T. Hernández, I. Estrella and E. Loyola. 2004. Effects of ripening stages and of plant vegetative vigor on the phenolic composition of grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon in the Maipo valley (Chile). *Vitis* 43: 51-57.
- Pérez-Margariño, S. and M.L. González-San Jose. 2006. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry* 96: 197-208.
- Poncet-Legrand, C., A. Edelmann, J.L. Putaux, D. Cartalade, P. Sarni-Manchado and A. Vernhet. 2006. Poly(L-proline) interactions with flavan-3-ols units: Influence of the molecular structure and the polyphenol/protein ratio. *Food Hydrocolloids* 20: 678-697.
- Pridham, I.B. 1965. Low molecular weight phenols in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 16: 13-16.
- Prinz, J.F. and P.W. Lucas. 2000. Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation* 27: 991-994.
- Ramírez, C. 2008. Efecto de una gelatina sobre la precipitación de la composición fenólica de un tanino enológico. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 62p.
- Richard, T., S. Verge, B. Berke, J. Vercauteren and J.P. Monti. 2001. NMR and simulated annealing investigations of bradykinin in presence of polyphenols. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 18(4): 627-637.
- Sarni-Manchado, P., V. Cheyner and M. Moutounet. 1999. Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 42-47.
- Serafini, M., G. Maiani and A. Ferro-Luzzi. 1997. Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 3148-3151.
- Simon, C., K. Barathieu, M. Laguerre, J. Schmitter, E. Fouquet, I. Pianet and E.J. Dufourc. 2003. Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochemistry* 42: 10385-10395.
- Yan, Q. and A. Bennick. 1995. Identification of histatins as tannin, binding proteins in human saliva. *Biochemical Journal* 311: 341-347.

Yilmaza, Y. and T. Romeo. 2006. Oxigen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis* 19: 41–48.

Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. AMV Ediciones. Madrid, España. 225p.

Zoecklein, B., K. Fugelsang, B. Gump y F. Nury. 2000. *Análisis y producción de vino*. Pp. 79–539. Editorial Acribia. Zaragoza, España. 613p.

## ANEXO I

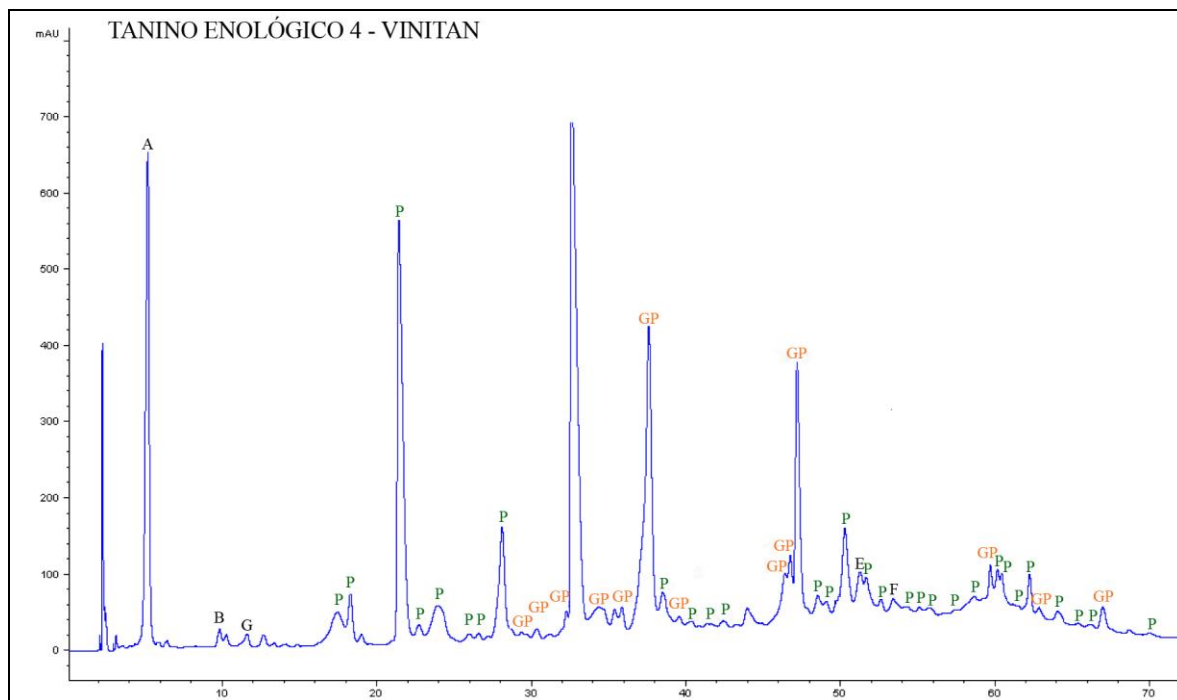
Información técnica de los TECs entregada por los proveedores.

<b>Código</b>	<b>Nombre TEC</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Origen Botánico</b>	<b>Composición Fenólica</b>
T <sub>1</sub>	Tan 'cor	Partner S.A	roble	mescla t. condensado / t. hidrolizable (elágico)
T <sub>2</sub>	Tanin Spécial Chêne	Industrias Vínicas S.A.	roble	100% tanino hidrolizable
T <sub>3</sub>	Harmotan	Industrias Vínicas S.A.	vegetal / roble	mescla 70% t. condensado / 30% t. hidrolizable
T <sub>4</sub>	Vinitan	Industrias Vínicas S.A.	orujo de uva	100% tanino condensado
T <sub>5</sub>	Tanin Gallique à l' alcool	Industrias Vínicas S.A.	agalla de roble	100% tanino hidrolizable
T <sub>6</sub>	Pro Tanin R-instantaneo	Industrias Vínicas S.A.	vegetal	100% tanino condensado
T <sub>7</sub>	Exceltan	Industrias Vínicas S.A.	uva / roble	mescla 50% t. condensado / 50% t. hidrolizable (elágico)
T <sub>8</sub>	Tanino quebracho	Navarro y Cía. Ltda.	quebracho	100% tanino hidrolizable
T <sub>9</sub>	Tanirouge	Navarro y Cía. Ltda.	roble	mescla t. condensado / t. hidrolizable (elágico)
T <sub>10</sub>	Tanirouge extra	Navarro y Cía. Ltda.	uva / roble	mescla t. condensado / t. hidrolizable (elágico y gálico)

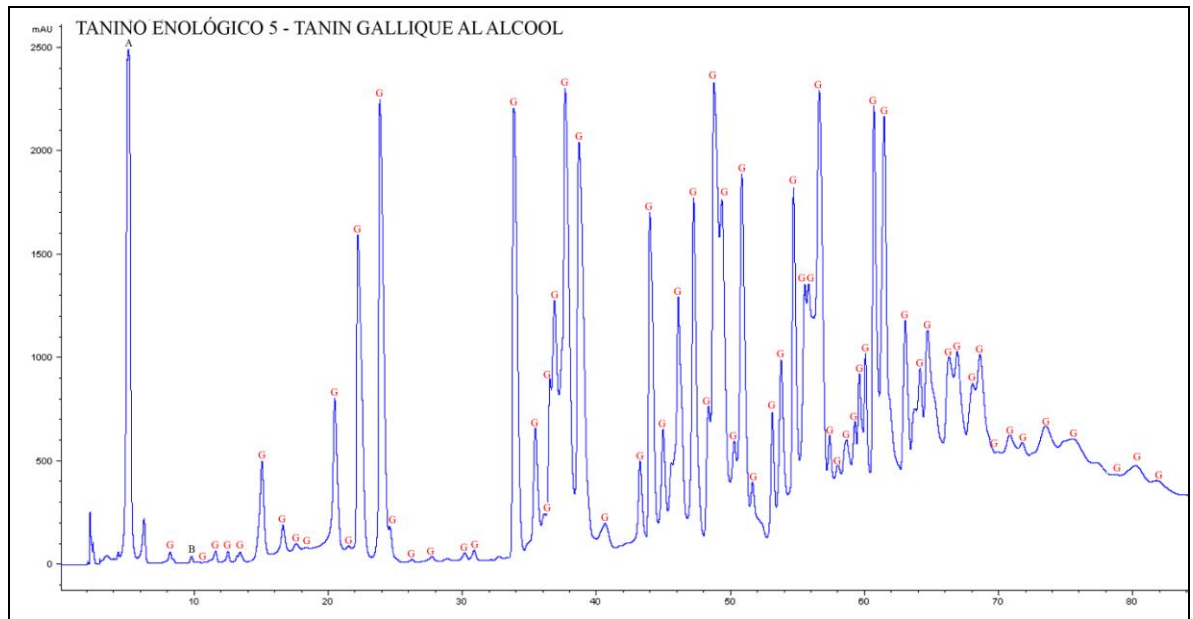
T – tanino enológico y t – tanino



## ANEXO II



**Figura 6.** Cromatograma HPLC-DAD del TEC condensado (T4). Detección a  $280 \pm 15$  nm. A – ácido gálico, B – ácido protocatéquico, E – ácido elágico, F – flavonol, G – galotanino, GP – galato de procianidina y P – proantocianidina.



**Figura 7.** Cromatograma HPLC-DAD del TEC hidrolizable (T5). Detección a  $280 \pm 15\text{nm}$ . A – ácido gálico, B – ácido protocatéquico y G – galotanino.