

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TITULO

**EFEECTO DE UNA PECTINA COMERCIAL SOBRE LA INTERACCION ENTRE
PROANTOCIANIDINAS DE SEMILLA DE *Vitis vinifera* var. Carménère Y LA
PROTEINA SALIVAL**

MARIO ALEJANDRO MARTINEZ FUENTEALBA

**SANTIAGO, CHILE
2012**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TITULO

**EFEECTO DE UNA PECTINA COMERCIAL SOBRE LA INTERACCION ENTRE
PROANTOCIANIDINAS DE SEMILLA DE *Vitis vinifera* var. Carménère Y LA
PROTEINA SALIVAL**

**EFFECT OF A COMMERCIAL PECTIN ON THE INTERACTION BETWEEN
SEED PROANTHOCYANIDINS OF *Vitis vinifera* var. Carménère AND THE
SALIVARY PROTEIN**

MARIO ALEJANDRO MARTINEZ FUENTEALBA

SANTIAGO, CHILE
2012

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS

ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TITULO

**EFFECTO DE UNA PECTINA COMERCIAL SOBRE LA INTERACCION ENTRE
PROANTOCIANIDINAS DE SEMILLA DE *Vitis vinifera* var. Carmènère Y LA
PROTEINA SALIVAL**

MARIO ALEJANDRO MARTINEZ FUENTEALBA

Memoria para optar al título profesional de
Ingeniero Agrónomo

Profesores Guía	Calificaciones
Sr. Elías Obreque S. Ingeniero Agrónomo, PhD	6,8
Sr. Remigio López C. Bioquímico, PhD	7,0
Profesores Evaluadores	
Sr. Ítalo Chiffelle G. Bioquímico, Dr.	7,0
Sr. Fernando Santibáñez Q. Ingeniero Agrónomo, PhD.	6,5

**SANTIAGO, CHILE
2012**

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mi Señor Jesucristo por darme su fortaleza en cada minuto de mi vida;
Gracias a mis Amados Padres Mario y Marisol por su infinito apoyo y amor incondicional,
por darme una sonrisa cuando mi corazón lloraba, por ser la palabra sabia cuando la
confusión me inundaba, por luchar por mí aunque eso significara dejar su propia felicidad, ,
gracias por ser los mejores padres del mundo;

Gracias a mi hermanita Carolina por llenar mi vida de alegría y ser mi gran amiga y
confidente;

Gracias a mis dos angelitos Tata Juan y mi pequeña Aurorita que hoy me observan desde el
cielo pero jamás se han marchado de mi corazón;

Gracias Mi Amor, Mi Carito, por luchar a mi lado, por darme el ánimo necesario para
seguir adelante, gracias por amarme a pesar de todos mis defectos , mi cielo cumplimos
nuestro sueño de formar una familia, hemos salido adelante juntos y nuestras lágrimas se
han vuelto sonrisa, te amo mucho y siempre estaremos juntos;

Gracias mi Hijita, mi Valentina, el amor que siento hacia ti es tan grande que no existen
palabras para describir este sentimiento, te amo desde el minuto que supe vendrías al
mundo y verte crecer es el regalo más maravilloso que he podido recibir.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
Palabras Claves	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Objetivo.....	4
MATERIALES Y MÉTODOS	5
Materiales	5
Lugar del estudio	5
Semillas.....	5
Pectina comercial.....	5
Materiales e instrumental.....	5
Métodos	6
Tratamientos y Diseño Experimental	6
Procedimientos.....	8
Preparación del extracto acuoso de semillas.....	8
Obtención de saliva.....	8
Preparación de la solución de pectina.....	8
Prueba de difusión y prueba de precipitación.....	9
Variables a medir	11
Composición polifenólica.....	11
Área de difusión e Intensidad tinción de las proteínas salivales.....	11
Análisis estadístico	11
RESULTADOS.....	12
Caracterización del extracto de semilla.....	12

Interacción de pectina con proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva..... 13

 Detección de la fracción proteica de la saliva sobre una membrana de celulosa 13

 Prueba de difusión 13

 Prueba de precipitación..... 17

 Interacción de pectina con las proantocianidinas del extracto de semilla diluido a 1/8 en agua. Prueba de difusión y prueba de precipitación..... 21

Efecto de pectina sobre la interacción entre proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva..... 24

 Prueba de difusión y prueba de precipitación..... 24

Interacción de pectina con complejos proantocianidinas de semilla-proteínas de la saliva 27

 Prueba de difusión y prueba de precipitación..... 27

DISCUSIÓN 31

CONCLUSIONES 34

BIBLIOGRAFÍA 35

RESUMEN

Las proantocianidinas son compuestos fenólicos presentes en frutas y bebidas tales como el vino tinto. Estas interactúan con las proteínas de la saliva en la cavidad oral generando agregados insolubles los que al precipitar obstruyen la lubricación de las superficies orales causando una sensación de sequedad, rugosidad y aspereza conocida comúnmente como astringencia. Esta interacción es altamente dependiente del pH del medio, contenido de alcohol, tipo de proteína, concentración y tamaño de las proantocianidinas y de la presencia de polisacáridos en solución.

En este estudio se evaluó el efecto de un polisacárido comercial de origen vegetal (pectina), sobre la interacción entre proantocianidinas de semilla de *Vitis vinifera* var. Carménère y la proteína salival mediante ensayos de difusión y precipitación sobre una membrana de celulosa.

Según las condiciones descritas en este estudio, la pectina tiene afinidad e interactúa tanto con las proteínas de las distintas fracciones de la saliva humana (fracción difusible y no difusible), como con las proantocianidinas de *Vitis vinifera* var. Carménère

Por su parte, al mezclar pectina con extracto de proantocianidinas de semilla *Vitis vinifera* var. Carménère y adicionar saliva después de 10 min, se observó que la pectina interfiere con la interacción entre las proantocianidinas de semilla y las proteínas salivales, fenómeno que se asociaría a la disminución de la astringencia.

Al variar el orden de los factores y mezclar extracto de proantocianidinas de semilla de *Vitis vinifera* var. Carménère con saliva y posteriormente adicionar pectina, esta interactúa con agregados de proantocianidinas de semilla/proteínas salivales formando complejos ternarios de pectina/proantocianidinas de semilla/proteína salival con características hidrofílicas.

A partir de lo anteriormente expuesto, es posible concluir que la pectina modifica la interacción entre las proantocianidinas de semilla *Vitis vinifera* var. Carménère y la proteína salival.

Palabras Claves

Astringencia
Proantocianidina
Proteína salival
Pectina

ABSTRACT

Proanthocyanidins are phenolic compounds occurring in fruits and drinks, such as red wine. These compounds interact with the salivary fraction of saliva in the oral cavity, thus producing insoluble aggregates. Those precipitates interfere with lubrication of the oral surfaces, which result in the drying, roughing and puckering sensation that is known as astringency. That interaction is highly dependent on a number of factors of the medium, such as pH, ethanol content, type of protein, proanthocyanidin concentration and size and presence of polysaccharides.

In the present study we evaluated the effect of a commercial polysaccharide of plant origin (pectin) on the interaction between seed proanthocyanidins from *Vitis vinifera* var. Carménère and the protein fraction of saliva. To that end, we conducted diffusion and precipitation assays on cellulose membranes.

We showed that pectin interacts both with the diffusible and non diffusible protein fractions of saliva and with the *Vitis vinifera* var. Carménère proanthocyanidins. In addition, we found that when pectin is mixed with a proanthocyanidin extract 10 minutes before adding saliva, the interaction between seed proanthocyanidins and the salivary protein fraction is clearly reduced. This effect would be closely related to an ameliorative effect of pectin on astringency. We also showed that by changing the order of addition of the reactants, that is, by firstly mixing the seed proanthocyanidin extract with saliva to be followed by the addition of pectin, the polysaccharide interacted with seed proanthocyanidin/salivary protein complexes to produce hydrophilic ternary complexes.

Altogether, this study showed that pectin affects the interaction between proanthocyanidins from *Vitis vinifera* var. Carménère and the protein fraction of saliva.

Key words

Astringency

Proanthocyanidin

Salivary protein

Pectin

INTRODUCCIÓN

La astringencia ha sido descrita como una sensación de rugosidad y aspereza en la superficie bucal, atribuida a la interacción de los compuestos fenólicos de una amplia variedad de vegetales, alimentos y bebidas, con las proteínas presentes en la saliva (Horne *et al.*, 2002; Dinella *et al.*, 2009). En el caso del vino, los responsables de la sensación de astringencia serían los polímeros de flavan-3-oles, comúnmente conocidos como proantocianidinas (De Freitas and Mateus, 2001). Estos compuestos están presentes en hollejos y semillas de uva de vid, desde donde son extraídos durante el proceso de vinificación (Riou *et al.*, 2002). Químicamente, la sensación de astringencia se asocia a la unión y subsecuente precipitación de las proteínas salivales al unirse con las proantocianidinas (Kielhorn and Thorngate, 1999). Así se ha postulado la formación de complejos insolubles entre polifenoles y las proteínas salivales (De Freitas and Mateus, 2001). Esta interacción es altamente dependiente del pH del medio (Kallithraka *et al.*, 1997), contenido de alcohol (Obreque-Slier *et al.*, 2010b), tipo de proteína (López *et al.*, 2007), concentración y tamaño de la proantocianidina (Sarni-Manchado *et al.*, 2008) y presencia de polisacáridos en solución (Mateus *et al.*, 2004).

Se ha observado que ciertos tipos de polisacáridos, como las pectinas, inhiben la precipitación de proteínas causada por los polifenoles (Carvalho *et al.*, 2006b). El término pectina se asigna a una clase de polisacáridos ricos en ácido galacturónico, cuyos grupos carboxilos están parcialmente esterificados con metanol (Jolie *et al.*, 2010). Las pectinas son moléculas altamente heterogéneas que representan alrededor del 30% de la masa de la pared primaria de la célula vegetal (Flanzy, 2000).

Debido a la acción de enzimas pécticas durante la maduración de la uva y posteriormente los variados tratamientos de vinificación, ciertos grupos de polisacáridos pécticos, como los ramnogalacturonanos I y II (RG I y II) y los polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (AGPs), traspasan al vino para conformar el principal grupo de polisacáridos de origen vegetal presentes en esta bebida (Boulet *et al.*, 2007).

Diversos estudios han propuesto que los polisacáridos pécticos podrían establecer interacciones electrostáticas con moléculas como las proteínas (Vernhet *et al.*, 1996) y proantocianidinas (Riou *et al.*, 2002) e interferir con la interacción entre ambos (Ozawa *et al.*, 1987). Este efecto se debería a la capacidad de la pectina para encapsular a la proantocianidina, modificando su reactividad, inhibiendo así su habilidad para unirse con las proteínas. Asimismo, algunos estudios postulan que los fragmentos de pectina solubles, como los RG II y AGPs, modificarían la autopóimerización de las proantocianidinas en el vino tinto (Riou *et al.*, 2002). Por su parte, la pectina sería capaz de interactuar con los agregados proantocianidina/proteína, formando un complejo ternario polisacárido/proteína/polifenol soluble en medio acuoso (De Freitas *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006a; Carvalho *et al.*, 2006b).

Debido a su importancia, se han implementado variadas metodologías para evaluar la interacción tanino-proteína, tales como titulación microcalorimétrica (Frazier *et al.*, 2003), técnicas basadas en turbidimetría (De Freitas y Mateus, 2001), uso de nefelómetros (Monteleone *et al.*, 2006), técnicas de cromatografía de alta resolución (Kallithraka *et al.*, 2000), uso de resonancia magnética nuclear (Simon *et al.*, 2003), técnicas de dispersión de luz (Lin *et al.*, 2003), índice de precipitación de ovoalbúmina (Llaudy *et al.*, 2004), entre otros.

La nefelometría y otras técnicas de dispersión de luz han sido altamente empleadas en los estudios del efecto de polisacáridos sobre la interacción tanino-proteína ((De Freitas *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006a; Carvalho *et al.*, 2006b). En estos estudios se han utilizado diversos sustratos proteicos, como seroalbúmina bovina (BSA) (De Freitas *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006a) y proteínas purificadas de la saliva humana (Carvalho *et al.*, 2006b). Sin embargo, la utilización de estas metodologías involucra equipos de alto costo y personal altamente capacitado. A esta limitación, se suma que los sustratos proteicos hasta ahora utilizados poseen en general un comportamiento distinto al de una matriz proteica compleja, como es el caso de la saliva humana.

Recientemente, ensayos de difusión y precipitación de proteínas sobre membranas de celulosa han sido utilizados para evaluar la interacción proantocianidina-proteína salival (Obreque-Slier *et al.*, 2010a, 2010b). Estos métodos permiten utilizar sustratos proteicos puros, tales como BSA (Obreque-Slier *et al.*, 2010b), complejos como gelatina (Obreque-Slier *et al.*, 2010c) y mezclas proteicas de alta complejidad, como es el uso de la saliva humana (López-Cisterna *et al.*, 2007). Esta metodología es de bajo costo y rápida ejecución, aspectos que hacen factible su aplicación en cualquier laboratorio.

Considerando la complejidad de los polisacáridos pécticos presentes en bayas de vid y vinos, y el escaso conocimiento respecto a su efecto sobre la interacción entre los taninos y las proteínas salivales, particularmente en lo referente a la ausencia de estudios que hayan utilizado saliva humana como sustrato proteico, en este estudio se propone el siguiente objetivo:

Objetivo

Evaluar el efecto de una pectina comercial sobre la interacción entre la fracción proteica de la saliva y las proantocianidinas extraídos de semillas de *Vitis vinífera* variedad Carménère.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

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.

Semillas

Para la preparación del extracto de semilla, se cosecharon bayas del cultivar Carménère el 31 de mayo del 2010. Las bayas provenían de plantas de 6 años de edad de la Región del Maule (35° 8,94' S y 71° 20,73' O), cultivadas en sistema de conducción en espaldera, orientación norte-sur y con una producción anual aproximada de 8.000 kg/ha (Castro, L. 2009). Las semillas fueron extraídas de las bayas de forma manual y posteriormente almacenadas a -4°C, hasta su uso en el presente estudio.

Saliva humana

La saliva se obtuvo de un individuo sano de 30 años de edad, sin historial de consumo de tabaco, alcoholismo o utilización de medicamentos, sin evidencias de enfermedad y que presentaba un flujo de saliva (sobre 1mL/min) (Obreque-Slier *et al.*, 2010b).

Pectina comercial

Se utilizó una pectina comercial de manzana consistente en ácido poly-D- galacturónico esterificado con metanol, (70-75% de esterificación). Esta pectina fue adquirida en Sigma-Aldrich Chemicals (Saint Louis, Missouri, USA).

Materiales e instrumental

Las membranas de celulosa Whatman N°1 en pliegos fueron adquiridos en Whatman Ltda., Maidstone, Inglaterra. Membranas Millipore de tamaño de poro 0,45 µm, fueron adquiridos en Merck S.A., Chile. El ácido clorhídrico (densidad 1,18 g/cm³) fue adquirido en Romil

Chemicals Limited. El ácido tricloroacético, Coomassie blue, etanol, ácido acético y solventes grado pro-análisis y grado HPLC fueron adquiridos en Merck S.A., Chile.

Los equipos utilizados fueron una centrífuga 75008151 Labofuge Heraeus 400, bomba de vacío Thomas modelo N° 2522C-D2, agitador marca Barmstead/Lab-line, rotavapor Buchi 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 C₁₈ (4 µm, 3,9 mm di x 300 mm).

Métodos

Tratamientos y Diseño Experimental

El estudio contempló 3 ensayos independientes entre sí. En el primer ensayo (Interacción de pectina con proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva) se mezclaron volúmenes crecientes (0-140 µL) de una solución acuosa de pectina (10g/L) con un volumen fijo de a) de un extracto original de semilla o b) saliva humana. Como control se mezclaron volúmenes crecientes de pectina (0-140 µL) con agua, el volumen final de la mezcla fue de 1400 µL (Cuadro 1). En el segundo ensayo (Efecto de pectina sobre la interacción entre proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva) se mezcló un volumen fijo de extracto original de semilla previamente diluido a 1/8 en agua, con volúmenes crecientes (0-140 µL) de la solución de pectina (10 g/L). Luego de 10 minutos de reposo, a la mezcla se agregó un volumen fijo de saliva (Cuadro 2). En el tercer ensayo (Interacción de pectina con el complejo proantocianidinas de semilla-proteínas de la saliva) se varió la adición de los componentes utilizados en el ensayo 2. Un volumen fijo de extracto original de semilla diluido 1/8 en agua, se mezcló con un volumen fijo de saliva, luego de 10 minutos de reposo, fueron agregados volúmenes crecientes (0-140 µL) de solución de pectina (10 g/L) a la mezcla (Cuadro 2). En los 3 ensayos, las mezclas fueron hechas en tubos Eppendorf y el volumen final de las mezclas fue siempre de 1400 µL.

Los tres ensayos se realizaron bajo un diseño completo al azar, cada uno con seis tratamientos (distintos volúmenes de pectina) y un tratamiento control (ausencia de pectina). La unidad experimental correspondió a las diferentes mezclas entre el extracto de semilla, solución de pectina y saliva, depositadas, secadas y teñidas sobre membrana de celulosa.

Cuadro 1. Tratamientos y volúmenes utilizados en el ensayo Interacción de pectina con proantocianidinas de semilla y proteínas de saliva.

Tratamientos (μL de Pectina)	Saliva	Extracto de Semilla	Pectina (10 g/L)	Agua destilada
	μL			
0	-	-	0	1400
20	-	-	20	1380
40	-	-	40	1360
60	-	-	60	1340
80	-	-	80	1320
100	-	-	100	1300
120	-	-	120	1280
140	-	-	140	1260
0	-	1000	0	400
20	-	1000	20	380
40	-	1000	40	360
60	-	1000	60	340
80	-	1000	80	320
100	-	1000	100	300
120	-	1000	120	280
140	-	1000	140	260
0	100	-	0	1300
20	100	-	20	1280
40	100	-	40	1260
60	100	-	60	1240
80	100	-	80	1220
100	100	-	100	1200
120	100	-	120	1180
140	100	-	140	1160

Cuadro 2. Tratamientos y volúmenes utilizados en el ensayo sobre el efecto de pectina en la interacción entre proantocianidinas de semilla y las proteínas de la saliva y en el ensayo de interacción de pectina con el complejo proantocianidinas de semilla-proteínas de la saliva.

Tratamientos (μL de Pectina)	Saliva	Extracto de Semilla	Pectina (10 g/L)	Agua destilada
	μL			
0	100	1000	0	1300
20	100	1000	20	1280
40	100	1000	40	1260
60	100	1000	60	1240
80	100	1000	80	1220
100	100	1000	100	1200
120	100	1000	120	1180
140	100	1000	140	1160

Procedimientos

Preparación del extracto acuoso de semillas. Las semillas fueron separadas manualmente desde las bayas recolectadas, lavadas con agua destilada, secadas con papel absorbente y conservado en frío a -4°C . Posteriormente, 25 g de semillas fueron triturados con un mortero y mezcladas con 500 mL de agua destilada a temperatura ambiente. La mezcla fue agitada durante 2,5 h a 20°C , y centrifugadas durante 30 min a 1852 g. El sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de $0,45\ \mu\text{m}$. La solución obtenida fue diluida con agua destilada 1:1. El pH del extracto de semillas fue ajustado a 3,5 con ácido clorhídrico (densidad $1,18\ \text{g/cm}^3$).

Obtención de saliva. La saliva fue colectada antes de cada experimento entre 9:00 y 12:00 h AM con el propósito de minimizar las variaciones diurnas de la composición salival (Sarni-Machado *et al.*, 2008). Esta fue acumulada en la boca durante 1 minuto y expectorada en un contenedor de vidrio esterilizado. La saliva fue mantenida en hielo durante el experimento, por un tiempo máximo 20 min (Obreque-Slier *et al.*, 2010b).

Preparación de la solución de pectina. Se preparó una solución de pectina (polvo comercial) a una concentración de 10 g/L. La solubilización inicial se hizo en agua destilada a 35°C con agitación y temperatura constantes durante 40 min.

Prueba de difusión y prueba de precipitación. En la *prueba de difusión*, las mezclas contenidas en cada tubo Eppendorf, fueron agitadas por 30 s (vortex). Luego de 5 min de reposo, las mezclas fueron agitadas por 5 s (vortex) y 20 μ L de cada mezcla fue depositada en un punto previamente establecido sobre el papel de celulosa (Figura 1). Cada muestra difundió libremente en forma radial sobre el papel. Una vez colocadas todas las muestras, el papel fue secado 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 seco con las muestras fue consecutivamente fijado en ácido tricloroacético (TCA) 5% durante 20 min, lavado con etanol 80% por 5 min y teñido con coomassie blue por 15 min. La membrana de celulosa fue desteñido con ácido acético 7% v/v hasta que el fondo del papel estuvo completamente claro. Finalmente, se realizó un lavado con agua destilada durante 30 s. La membrana de celulosa fue secada con la ayuda de una lámpara dispuesta a una distancia de 20 cm. Cada zona teñida azul en el sitio de colocación de cada una de las muestras representó el área de distribución de la proteína salival (Obreque-Slier et al., 2010a). En la *prueba de precipitación*, los tubos Eppendorf con las mezclas utilizadas en el ensayo de difusión fueron centrifugados a 600 g por 5 minutos. Luego, alícuotas de 20 μ L de cada sobrenadante fueron depositadas sobre una membrana de celulosa, la que fue procesada de acuerdo al mismo procedimiento descrito en el ensayo de difusión (Figura 1).

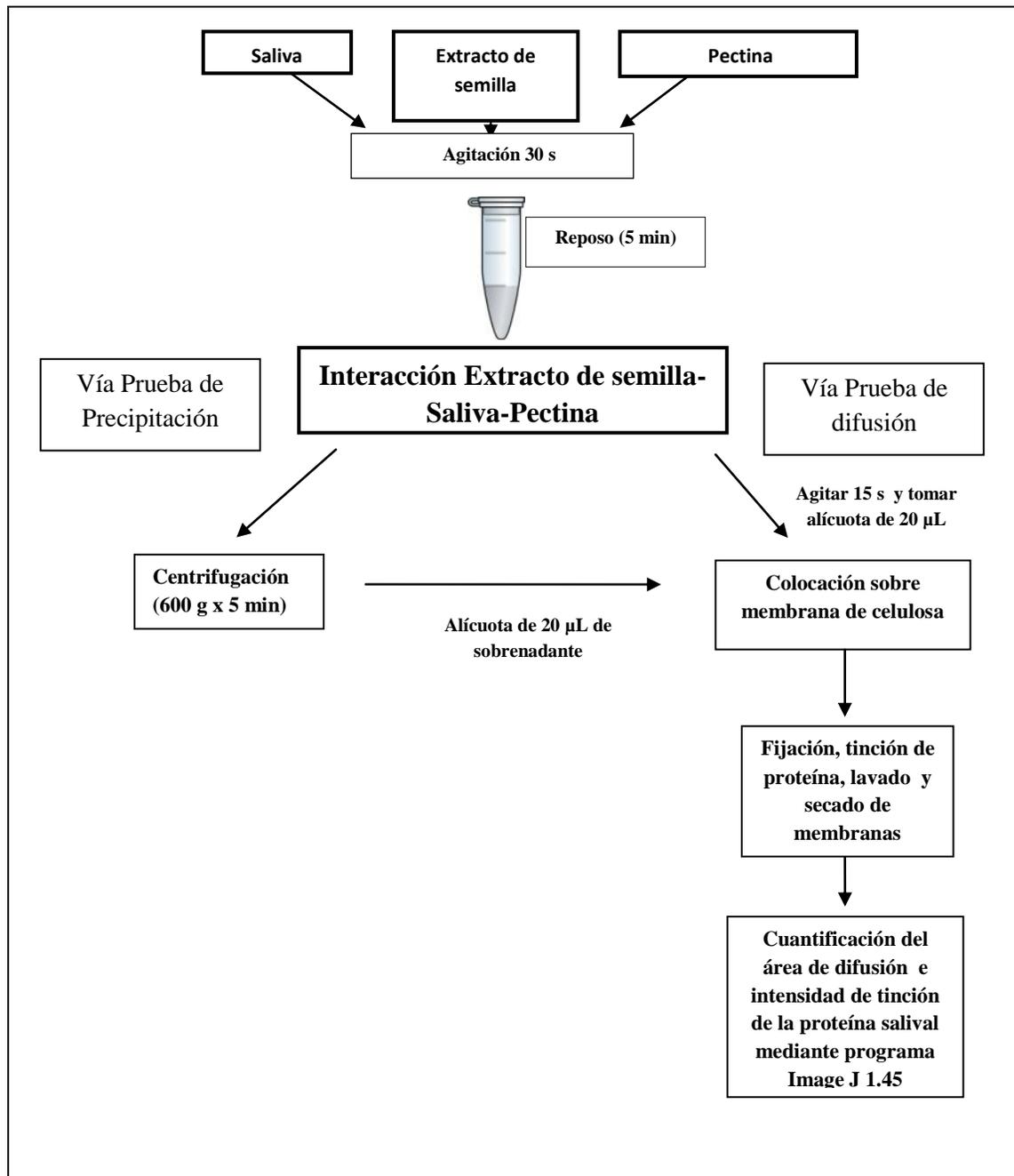


Figura 1. Diagrama de Prueba de difusión y Prueba de precipitación de proteínas sobre membrana de celulosa.

Variables a medir

Composición polifenólica. La caracterización del extracto de semilla consistió en la cuantificación del 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).

Área de difusión e Intensidad tinción de las proteínas salivales. El área de difusión (cm^2) e intensidad de tinción ($\text{píxeles}/\text{cm}^2$) de las proteínas salivales en la membrana de celulosa fueron medidas mediante el uso del programa Image J 1.45.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente mediante ANDEVA con un nivel de confianza del 95% a través del programa estadístico INFOSTAT versión libre. En caso de existir diferencias significativas se utilizó el test de rango múltiple de Tuckey.

RESULTADOS

Caracterización del extracto de semilla

El Cuadro 3 muestra la composición fenólica del extracto de semilla de *Vitis vinifera* variedad Carménère usado en este estudio. Mediante análisis por HPLC-DAD fue posible identificar algunos compuestos fenólicos flavonoides, tales como, monómeros [(+)-catequina (CAT) y (-)-epicatequina (EP)], proantocianidinas diméricas (B1, B2, B3 y B4), galatos de proantocianidina (GP) y diversas proantocianidinas (P). El ácido gálico (AG) fue el único compuesto no flavonoide identificado (Figura 2). Las concentraciones de los diversos compuestos fenólicos de bajo peso molecular se muestran en el cuadro siguiente (cuadro 3):

Cuadro 3. Composición fenólica del extracto de semilla *Vitis vinifera* var. Carménère.

Compuestos fenólicos	Concentración mg/Kg
Fenoles totales ^a	80,78
Taninos Totales ^b	58,66
Ácido gálico ^c	99,32
(+)-Catequina ^d	404,21
(-)-Epicatequina ^e	201,82
Proantocianidina B1 ^d	15,57
Proantocianidina B2 ^d	79,68
Proantocianidina B3 ^d	25,51
Proantocianidina B4 ^d	30,56
Otras Proantocianidinas ^d	75,91
Galatos de Proantocianidina ^c	14,01

^a Expresado como mg de ácido gálico/kg de semilla medido por absorción espectrofotométrica a 280 nm; ^b Expresado como mg de catequina/kg de semilla medido por el método de metilcelulosa; ^c Expresado como mg de ácido gálico /kg de semilla medido por HPLC (280 nm); ^d Expresado como mg de catequina/kg de semilla medido por HPLC (280 nm); ^e Expresado como mg de epicatequina/kg de semilla medido por HPLC (280 nm).

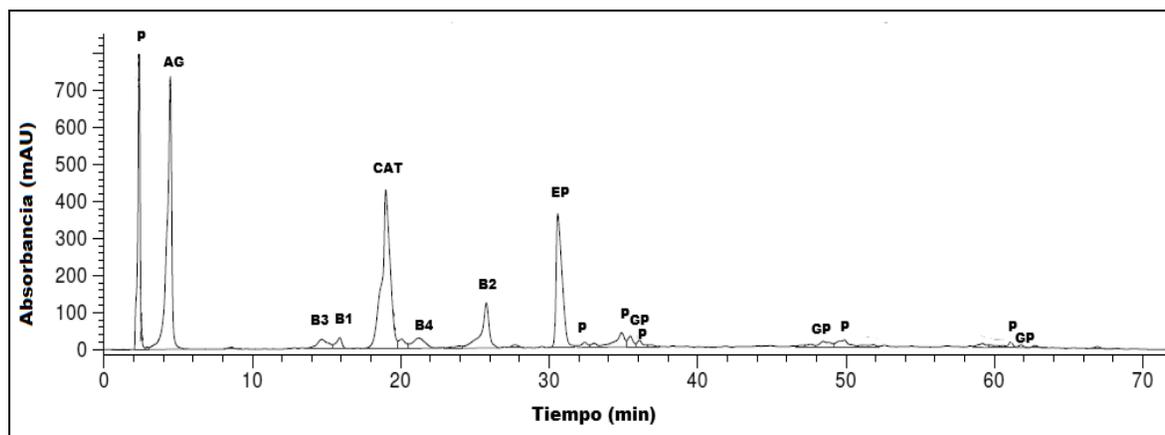


Figura 2. Cromatograma representativo (280 nm) de compuestos fenólicos de bajo peso molecular del extracto de semilla de la variedad Carménère. CAT: catequina; EP: epicatequina; B1, B2, B3 y B4: proantocianidinas diméricas; GP: galatos de proantocianidinas; P: diversas proantocianidinas; AG: ácido gálico.

Interacción de pectina con proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva

Detección de la fracción proteica de la saliva sobre una membrana de celulosa

Una alícuota de 20 μL de saliva entera fue colocada sobre un punto en una membrana de celulosa. La saliva difundió en forma radial. Al ser fijada y teñida con un colorante de proteínas fue posible observar sobre el punto de colocación de la muestra un área circular pequeña e intensa (denominada fracción proteica salival no difusible (FND)), rodeada por una zona teñida mas levemente (fracción proteica salival difusible (FD)) (Figura 3).

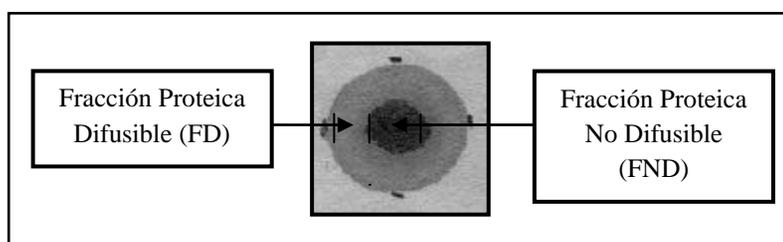


Figura 3. Detección de la fracción proteica de la saliva sobre una membrana de celulosa.

Prueba de difusión

En la Figura 4 A-0, se observa que una alícuota de 20 μL de agua, depositada sobre una membrana de celulosa no es detectada por tinción con Comassie blue. Asimismo, la mezcla de volúmenes crecientes de solución de pectina con agua (20-140 μL) no fue teñida por el colorante de proteínas sobre el papel de celulosa (Figura 4 A20-140).

Por contraste el extracto de semilla depositado en un punto de la superficie de celulosa y sometido a tinción con el colorante Comassie blue, permitió observar un área menor de difusión radial teñida homogéneamente (Figura 4 B0). Cuando se realizó el ensayo con el extracto de semilla mezclado con volúmenes crecientes de pectina se observó la aparición de un halo que rodeó el área difusión antes descrita. Esta zona periférica (halo) se volvió más amplia a medida que aumentaba la cantidad de pectina mezclada (20-140 μL) con una cantidad constante de extracto de semilla (1000 μL) (Figura 4 B20-140).

Por otra parte, la saliva diluida (1:14) (Figura 4, C0) o mezclada con pectina, (Figura 4, C20-140), mantuvo el modo bifásico de difusión descrito anteriormente.

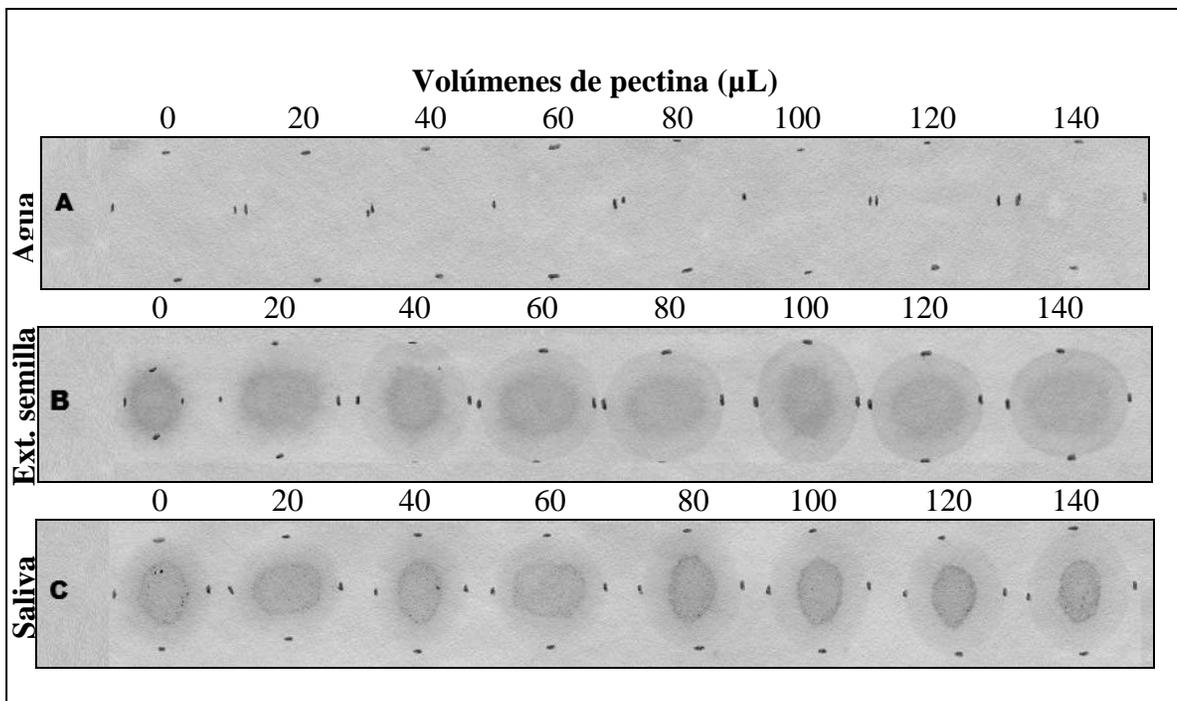


Figura 4. Ensayo Interacción de pectina con taninos de semilla y proteínas de la saliva mediante prueba de difusión. Volúmenes crecientes solución de pectina (10 g/L) fueron mezcladas con agua, extracto de semilla o saliva. Todas las mezclas alcanzaron un volumen final de 1400 μL . Veinte μL de cada mezcla fueron depositados, fijados y teñidos sobre una membrana de celulosa. A0 corresponde a agua, A20-140, agua mezclada con volúmenes crecientes de solución de pectina (20-140 μL). B0 indica 1000 μL de extracto de semilla en ausencia de pectina. B20-140, 1000 μL de extracto de semilla con volúmenes crecientes (20-140 μL) de pectina. C0, 100 μL de saliva sin pectina y C20-140, 100 μL de saliva en presencia de cantidades crecientes de pectina (20-140 μL).

Sin embargo, la adición de volúmenes crecientes de pectina alteró la difusión de las proteínas de saliva, aumentando notable y progresivamente el área de la FD, mientras que paralelamente la FND sufrió una clara contracción del área de difusión (Figura 4 C20-

140). En todos los casos se observó que el colorante Comassie blue tiñó el área de difusión de la mezcla de saliva con pectina.

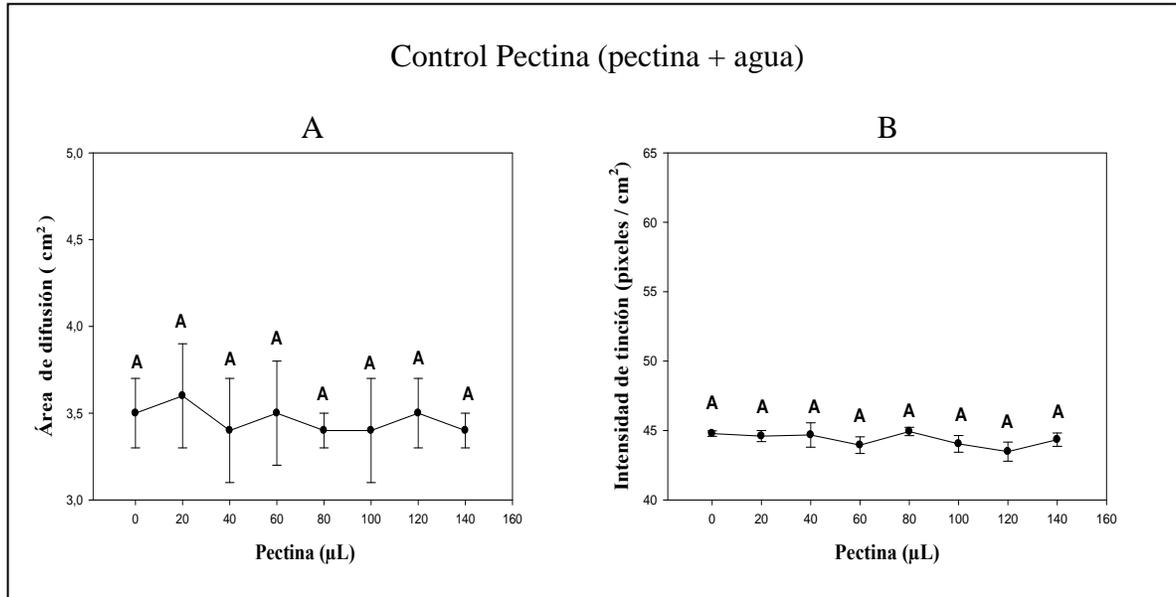


Figura 5. Análisis cuantitativo del ensayo interacción de pectina con proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva mediante la prueba de difusión. Los gráficos muestran el área de difusión (cm²) (A) e intensidad de tinción (píxeles/cm²) (B) de las imágenes de difusión que se muestran en la Figura 4 A0-140 (lámina superior). Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Como se había señalado antes, el agua pura y la solución de pectina diluida en agua no es teñida por Comassie blue sobre la membrana de celulosa. Sin embargo, para evaluar el área de difusión e intensidad de tinción de la mezcla agua-pectina, se marcó la zona húmeda producida por la alícuota puesta sobre la superficie de celulosa antes de ser secada y teñida. Los valores obtenidos indicaron que volúmenes crecientes de la solución de pectina (10 g/L) mezclados con agua no presentan diferencias estadísticas significativas, en la área de difusión e intensidad de tinción, con el agua pura (Figura 5).

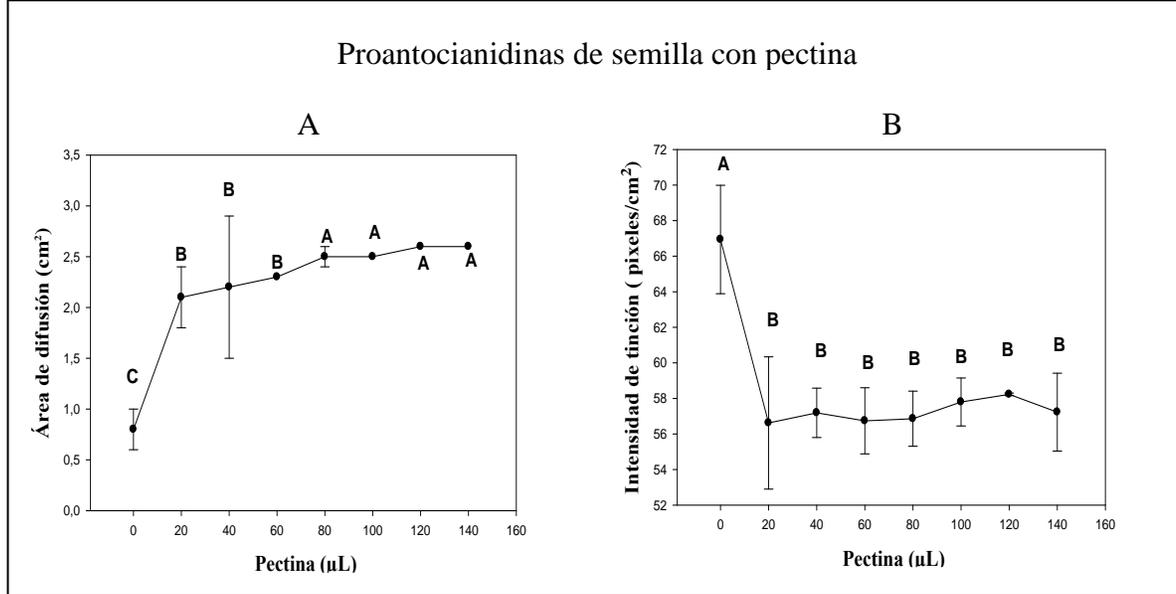


Figura 6. Análisis cuantitativo del ensayo interacción de pectina con proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva mediante prueba de difusión. Los gráficos muestran el área de difusión (cm²) (A) e intensidad de tinción (píxeles/cm²) (B) de las imágenes de difusión que se muestran en la Figura 4 B0-140 (lámina central). Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Se pudo observar que 20 µL de solución de pectina, fueron suficientes para modificar el área de difusión del extracto de semilla, produciendo un aumento significativo de ésta (Figura 6 A). Asimismo las adiciones mayores de pectina (40-60 µL) provocaron el mismo efecto que la dosis menor de pectina. Por el contrario, al agregar dosis aún mayores de solución de pectina (80 a 140 µL), estas generaron aumentos del área de difusión del extracto de semilla, que fueron estadísticamente significativas (Figura 6 A).

Por otra parte, la intensidad de tinción del extracto de semilla generada por el Comassie blue, disminuyó drásticamente a partir de la dosis menor de pectina ensayada (20 µL). Sin embargo, al adicionar volúmenes superiores de la solución de pectina, la intensidad de tinción no experimentó diferencias mayores (Figura 6 B).

La Figura 7 A, muestra el efecto de la pectina sobre las proteínas de la saliva, así el área de difusión de la fracción proteica difusible de la saliva (FD) experimentó un aumento constante y significativo de su área de difusión a partir de la adición de 60 µL de solución de pectina, alcanzando el máximo valor con aplicación de 140 µL de pectina. Por contraste el área de difusión de la fracción proteica no difusible de la saliva (FND), no presentó diferencias mayores respecto al control (0 µL de solución de pectina) (Figura 7 A).

Las intensidades de tinción de las áreas de difusión de ambas fracciones proteicas de la saliva (FD y FND), no fueron modificadas por la presencia de solución de pectina (Figura 7 B).

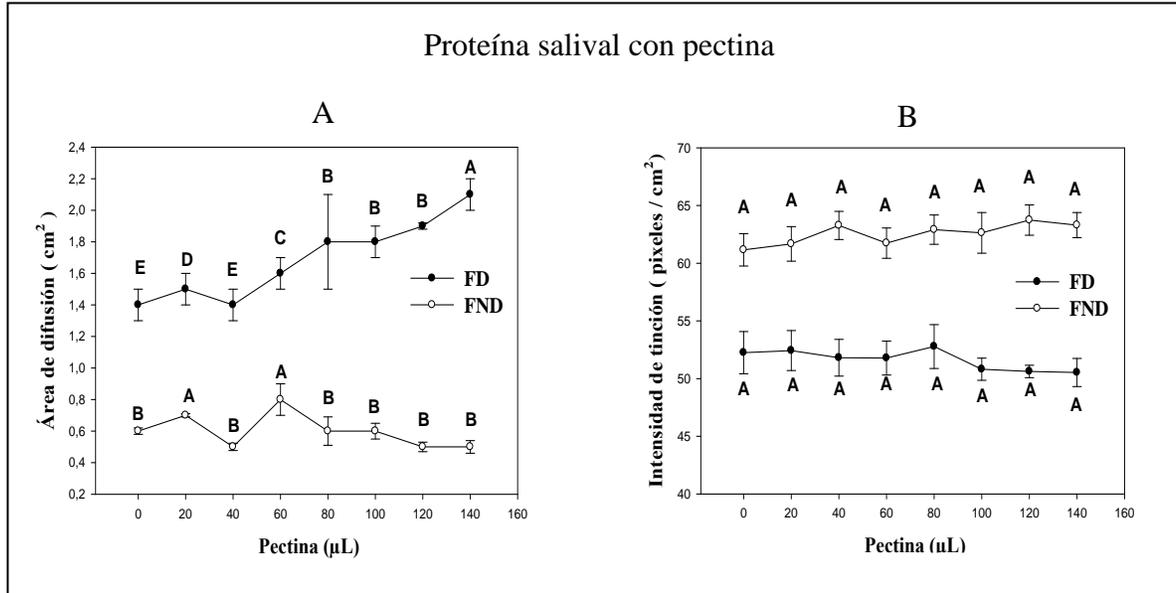


Figura 7. Análisis cuantitativo del ensayo interacción de pectina con proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva mediante prueba de difusión. Los gráficos muestran el área de difusión (cm²) (A) e intensidad de tinción (píxeles/cm²) (B) de las imágenes de difusión de la Figura 4 A0-140 (lámina inferior). FD corresponde a la fracción proteica salival difusible y FND a la fracción proteica salival no difusible. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Prueba de precipitación

En esta prueba, el efecto de pectina sobre las proantocianidinas del extracto de semilla y las proteínas de la saliva se evaluó observando la tinción con Comassie blue que presentan alícuotas de los sobrenadantes que resultan al centrifugar las mezclas que se usaron en la prueba de difusión. Así, de la misma forma que en la prueba de difusión tanto el agua pura o pectina diluida en agua no fueron detectadas por Comassie blue sobre la membrana de celulosa (Figura 8 A0-140). Por el contrario, el extracto de semilla mantuvo una intensidad homogénea en ausencia de pectina, al igual que lo observado en la prueba de difusión (Figura 8 B0). Sin embargo, la adición de volúmenes crecientes de pectina provocó la formación de un modo bifásico de difusión del material detectable por Comassie blue (Figura 8 B20-140).

Por su parte, la proteína salival en ausencia de pectina mostró una difusión bifásica característica observándose que la FD se distinguió ligeramente mientras que la FND ocupó

un área de tamaño mayor (Figura 8 C0). Posteriormente al mezclar volúmenes crecientes de pectina con saliva (20-140 μL), se distinguió que la FD aumentó su tamaño neto, volviéndose más nítida, mientras que el área de la FND disminuyó claramente y su nitidez aumento con el incremento de la cantidad de pectina aplicada (Figura 8 C20-140).

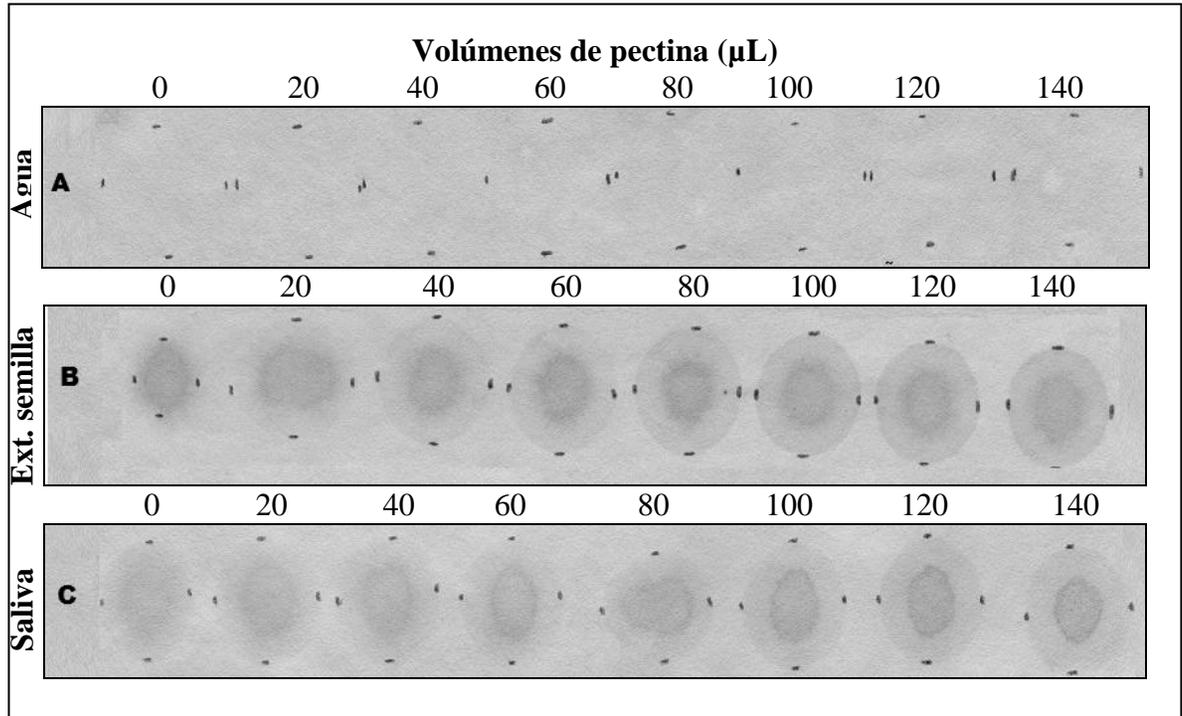


Figura 8. Ensayo interacción de pectina con taninos de semilla y proteínas de la saliva. Prueba de precipitación. Los tubos Eppendorf que contenían las mezclas de volúmenes crecientes solución de pectina (10 g/L) con agua, extracto de semilla o saliva utilizadas en la prueba de difusión (ver leyenda Figura 4) fueron centrifugadas a 600 g. Veinte μL del sobrenadante de cada mezcla fueron depositados, fijados y teñidos sobre una membrana de celulosa. A0 corresponde a agua, A20-140, agua mezclada con volúmenes crecientes de solución de pectina (20-140 μL). B0 indica 1000 μL de extracto de semilla en ausencia de pectina. B20-140, 1000 μL de extracto de semilla con volúmenes crecientes (20-140 μL) de pectina. C0, 100 μL de saliva sin pectina y C20-140, 100 μL de saliva en presencia de cantidades crecientes de pectina (20-140 μL).

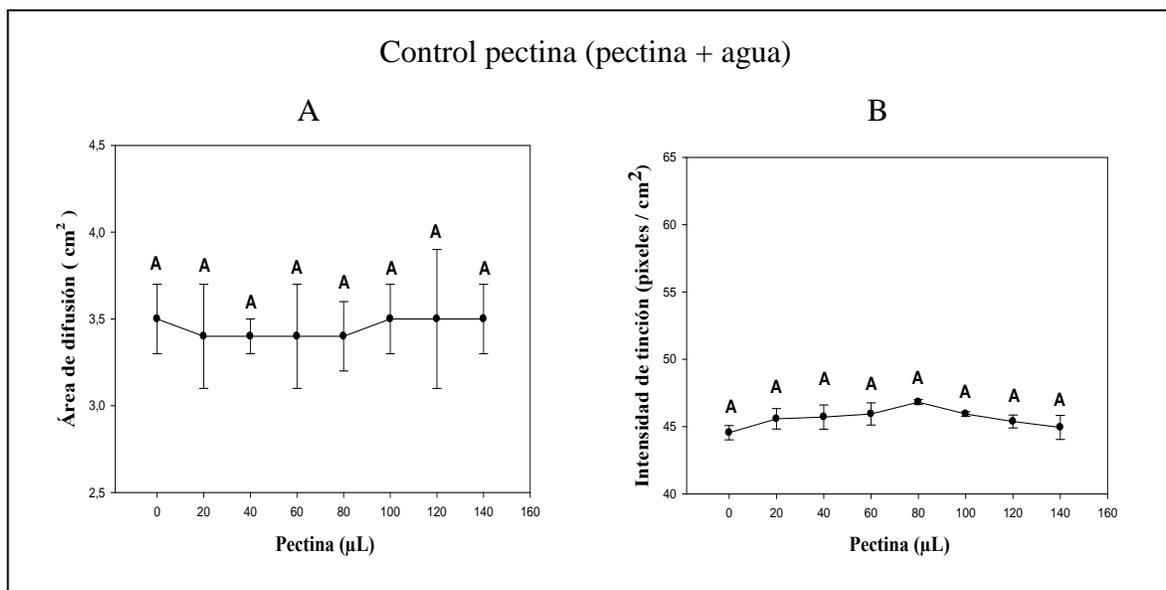


Figura 9. Análisis cuantitativo de la interacción de pectina con proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva mediante prueba de precipitación. Los gráficos muestran el área de difusión (cm²) (A) e intensidad de tinción (píxeles/cm²) (B) de las imágenes de la Figura 8 A0-140 (lámina superior). Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

De la misma forma que en la prueba de difusión los valores observados del área de difusión e intensidad de tinción indicaron que volúmenes crecientes de la solución de pectina (20 a 140 μ L) mezclados con agua no presentan diferencias estadísticas significativas con el agua pura (0 μ L de pectina) (Figura 9).

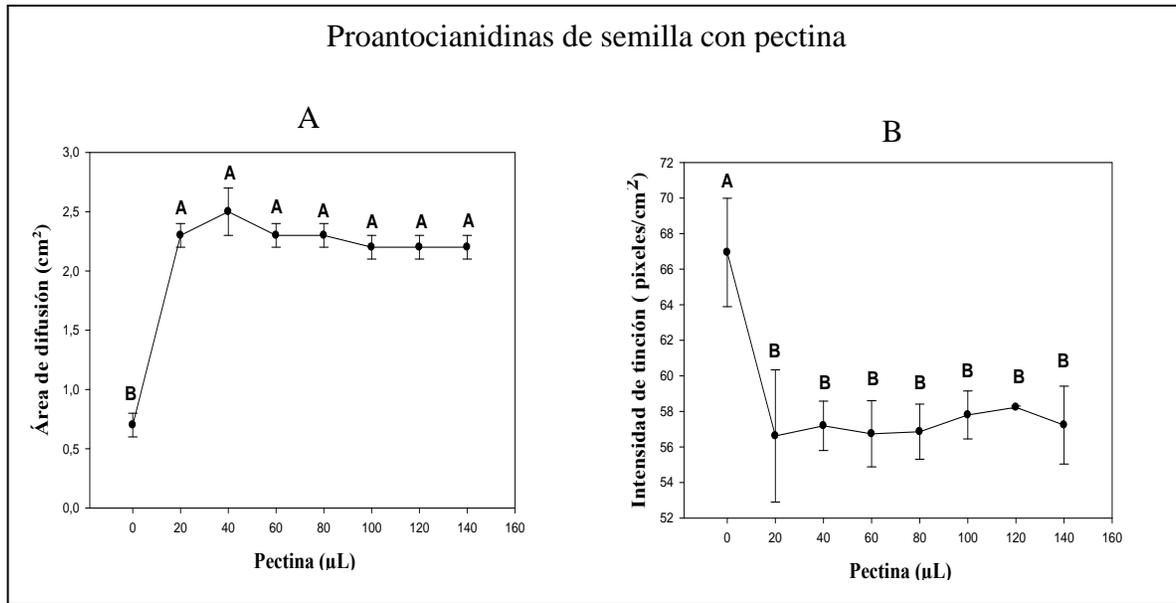


Figura 10. Análisis cuantitativo de la interacción de pectina con proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva mediante prueba de precipitación. Los gráficos muestran el área de difusión (cm²) (A) e intensidad de tinción (píxeles/cm²) (B) de la Figura 8B0-140 (lámina central). Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Por el contrario, según muestra la Figura 10 A, el área ocupada por la alícuota del sobrenadante del extracto de semilla aumentó notablemente cuando se mezcló con una cantidad mínima de la solución de pectina (20 μ L). A pesar de la adición de volúmenes crecientes de pectina, el área de difusión del extracto de semilla permaneció constante, (Figura 10A). Por otra parte, la intensidad de tinción con Comassie blue del extracto de semilla disminuyó drásticamente en presencia de 20 μ L de pectina la cual no varió tras adiciones mayores de solución de pectina (20-140 μ L) (Figura 10 B).

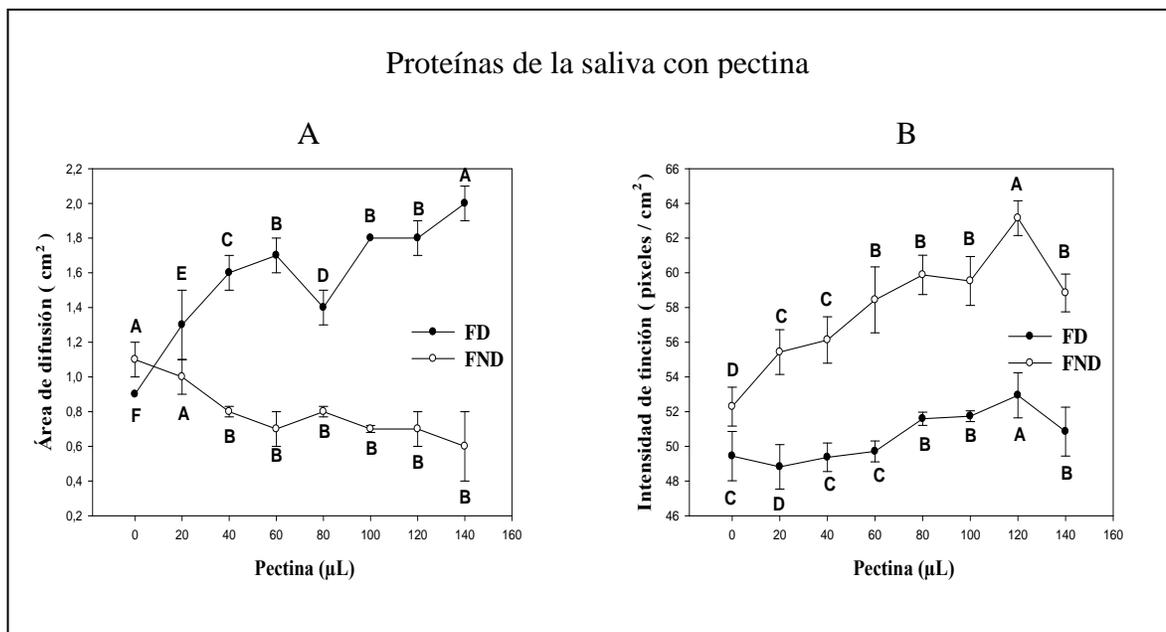


Figura 11. Análisis cuantitativo de la interacción de pectina con proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva mediante prueba de precipitación. Los gráficos muestran el área de difusión (cm^2) (A) e intensidad de tinción (píxeles/ cm^2) (B) de la Figura 8-C0-140 (lámina inferior). FD corresponde a la fracción proteica salival difusible y FND la fracción proteica salival no difusible. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Para el caso del material proteico salival no precipitado, el área de la FD aumentó gradual y significativamente a medida que el contenido de pectina en la mezcla fue incrementado (Figura 10-A). Por el contrario, el área de la FND disminuyó, también continuamente con la presencia creciente de este polisacárido en la mezcla. Por otro lado, se observó que la intensidad de la FD aumentó desde la dosis mínima de pectina alcanzando su máximo valor con 120 μL . Por su parte el promedio de la intensidad de la FND aumentó significativamente desde los 20 μL de solución de pectina (Figura 10-B).

Interacción de pectina con las proantocianidinas del extracto de semilla diluido a 1/8 en agua. Prueba de difusión y prueba de precipitación.

Con el objetivo de disminuir la concentración de proantocianidinas presentes en el extracto de semilla y alcanzar así valores similares a los del vino tinto, el extracto de semilla fue diluido en agua a razón 1:8 (Figura 12 D0 y P0). Este nuevo extracto fue utilizado en los siguientes ensayos.

De acuerdo a la Figura 12-D0 el extracto de semilla diluido, fijado y teñido con Comassie blue sobre una membrana de celulosa presenta una intensidad de tinción muy leve con

respecto al extracto sin diluir utilizado en los ensayos anteriores. Por otra parte, la adición de pectina aumentó el área de difusión del extracto de semilla (Figura 12, D20-140). Al centrifugar las muestras por 5 minutos y depositar el sobrenadante del extracto de semilla diluido sobre el papel de celulosa, en presencia y ausencia de pectina (Figura 12, P0-140), éste sufrió un comportamiento similar a lo ocurrido con la prueba de difusión (Figura 12 D0-140), es decir, aumentó su área de difusión.

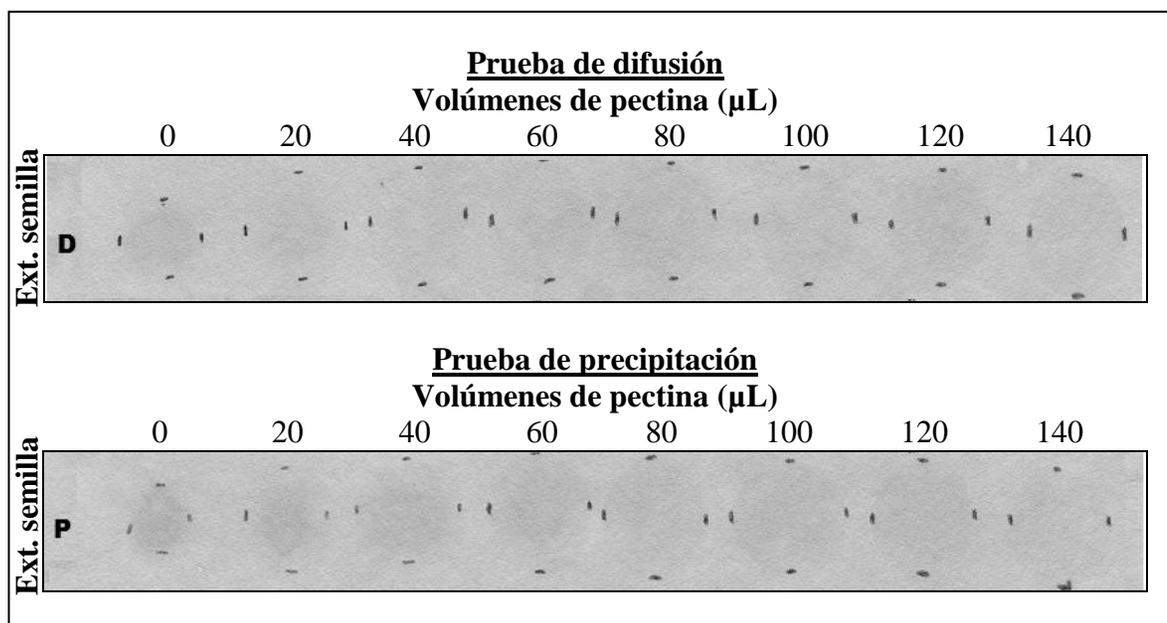


Figura 12. Interacción de pectina con las proantocianidinas del extracto de semilla diluido. Prueba de difusión y prueba de precipitación. Volúmenes crecientes de solución de pectina (10 g/L) fueron mezcladas con 1000 µL de extracto original de semilla diluido a 1/8. Todas las mezclas fueron llevadas a un volumen final de 1400 µL con agua. Veinte µL de cada mezcla fueron depositados, fijados y teñidos sobre una membrana de celulosa. B0 indica 1000 µL de extracto de semilla en ausencia de pectina. B20-140, 1000 µL de extracto de semilla con volúmenes crecientes (20-140 µL) de pectina. P0-140 corresponden a las imágenes obtenidas de alícuotas de 20 µL del sobrenadante de las muestras utilizadas en la prueba de difusión, centrifugadas a 600 g (prueba de precipitación).

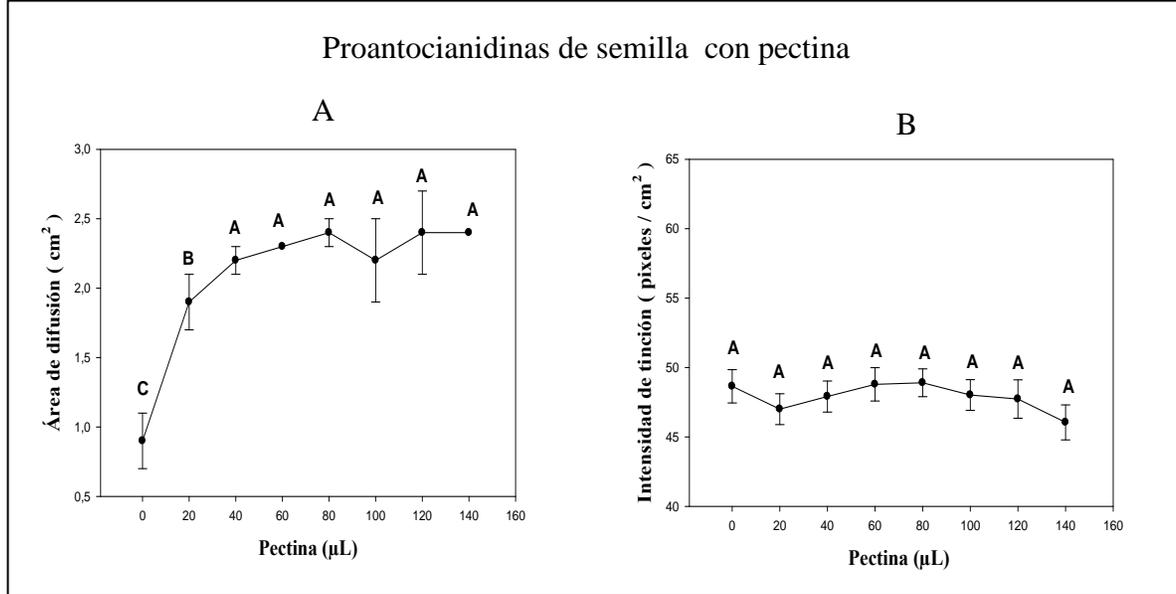


Figura 13. Análisis cuantitativo de la interacción de pectina con proantocianidinas de semilla diluidos mediante prueba de difusión. Los gráficos muestran el área de difusión (cm^2) (A) e intensidad de tinción (píxeles/ cm^2) (B) de las imágenes de la Figura 12 D0-140 (lámina superior). Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Tanto en la prueba de difusión como en la prueba de precipitación (Figuras 13 y 14) la concentración mínima de pectina empleada ($20\mu\text{L}$) aumentó abruptamente el área de difusión del extracto de polifenoles de semilla con respecto al tratamiento control (extracto de semilla en ausencia de pectina). Asimismo se observó que cantidades mayores de solución de pectina (40 a $140\mu\text{L}$) adicionados al extracto de semilla generaron un aumento progresivo del área de difusión. En consecuencia, la solución de pectina modificó la difusión del extracto de semilla generando diferencias estadísticas con respecto al control (extracto de semilla en ausencia de pectina) (Figuras 13 A y 14 A).

Por otra, la intensidad de tinción de las proantocianidinas del extracto de semilla sobre la membrana de celulosa, no se vió afectada por la presencia de pectina, este fenómeno observado es coincidente en la prueba de difusión (Figura 13 B) y prueba de precipitación (Figura 14 B).

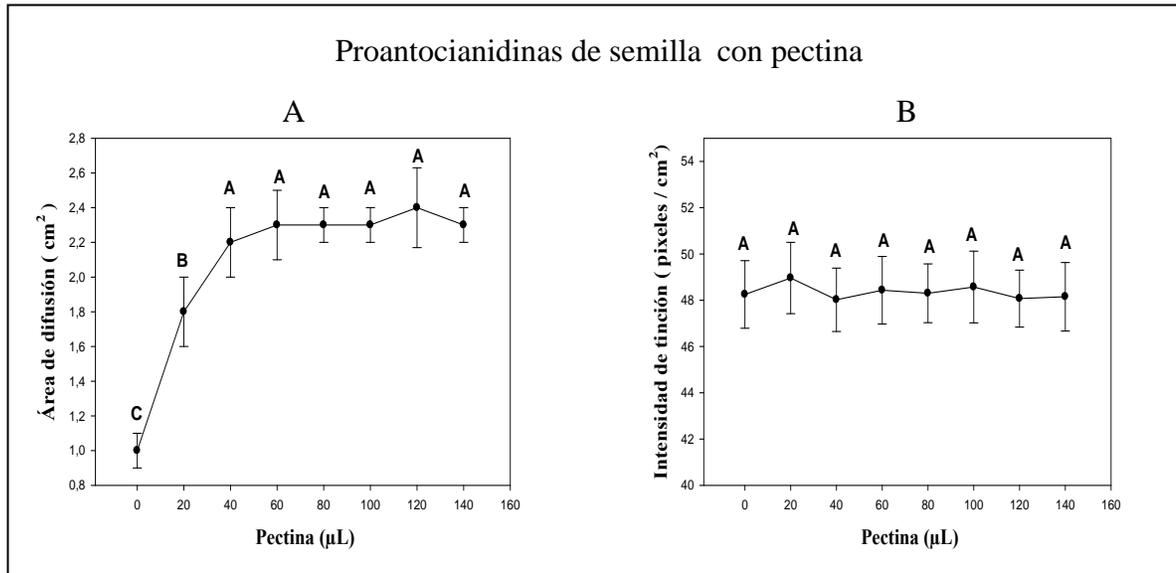


Figura 14. Análisis cuantitativo de la interacción de pectina con proantocianidinas del extracto de semilla diluido mediante prueba de precipitación. Los gráficos muestran el área de difusión (cm²) (A) e intensidad de tinción (píxeles/cm²) (B) de las imágenes de la Figura 12 P0-140. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos experimentales (volúmenes de pectina).

Efecto de pectina sobre la interacción entre proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva.

Prueba de difusión y prueba de precipitación.

Se prepararon mezclas entre un volumen fijo de extracto original de semilla diluido a 1/8 (1000 µL) con volúmenes crecientes de pectina (20-140 µL), después de 10 minutos, se agregó a cada mezcla un volumen fijo de saliva (100 µL). Consecutivamente alicuotas de la mezcla resultante entre estos tres elementos fueron colocadas sobre la membrana de celulosa, fijadas y teñidas (Figura 15 D0-140) lo que permitió observar que la proteína salival al ser mezcladas con las proantocianidinas del extracto de semilla y la pectina mantuvo un modo bifásico de difusión descrito anteriormente, observándose claramente una fracción proteica salival difusible (FD) y una fracción proteica salival no difusible (FND) (Figura 15 D0-140).

Al evaluar visualmente las imágenes de la Figura 15, se observó que la saliva mezclada con el extracto de semilla en ausencia de pectina (Figura 15 D0) presentó una FND muy nítida e intensa en su coloración y una FD menos coloreada pero bien definida. Por su parte la presencia de pectina favoreció un aumento de la intensidad de tinción de la FD

haciéndola más evidente a la inspección visual en todas las condiciones experimentales ensayadas (Figura 15 D0-140).

Cuando las muestras anteriores fueron sometidas a la prueba de precipitación (ensayo de los sobrenadantes), se observó una tendencia similar a la descrita anteriormente, aunque con leves diferencias como fueron, una tinción menor de la FD sobre el papel de celulosa y mayor tamaño del área de difusión de la FND, con respecto a lo observado en paralelo en la prueba de difusión (Figura 15 P0-140).

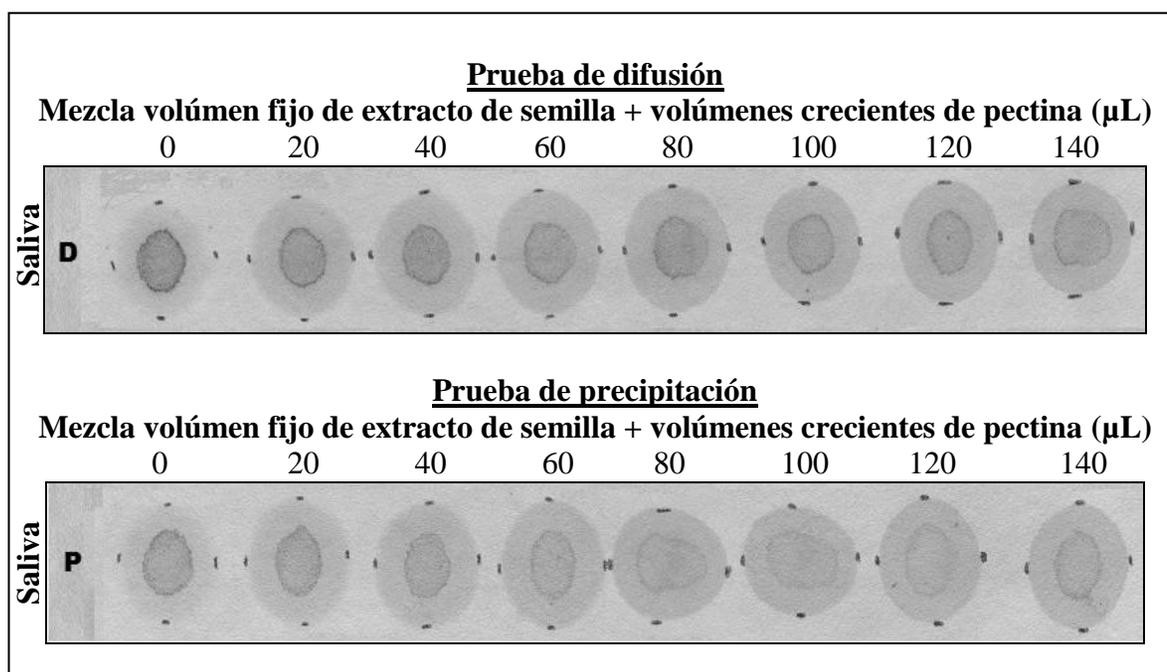


Figura 15. Ensayo efecto de pectina sobre la interacción entre proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva. Mil μL de extracto original de semilla diluido a $1/8$ fueron mezclados con volúmenes crecientes de pectina, después de 10 min, se agregó a la mezcla 100 μL de saliva. Todas las mezclas fueron llevadas a un volumen final de 1400 μL con agua. Alicuotas de 20 μL de las mezclas fueron depositadas sobre la membrana de celulosa, fijadas y teñidas con comassie blue. D0 corresponde a 100 μL de saliva con 1000 μL de extracto de semilla en ausencia de pectina. D20-140 indica volúmenes crecientes de pectina en la mezcla extracto de semilla-saliva-pectina (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 μL). P0-140 corresponden a las imágenes obtenidas de alícuotas de 20 μL del sobrenadante de las muestras utilizadas en la prueba de difusión, centrifugadas a 600 g (prueba de precipitación).

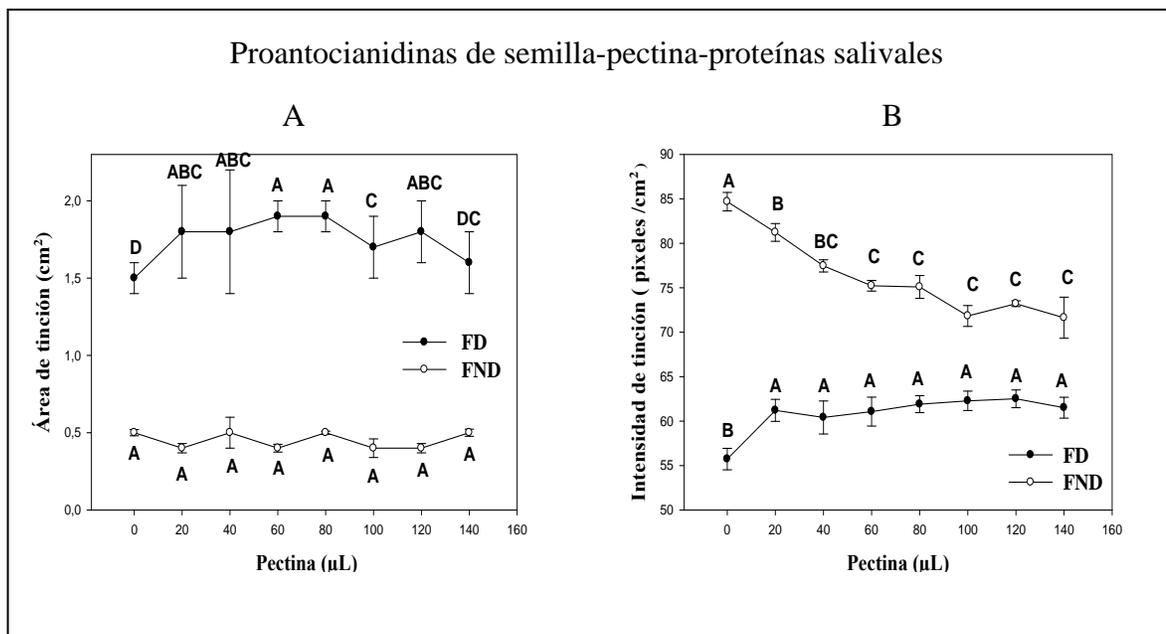


Figura 16. Análisis cuantitativo del efecto de pectina sobre la interacción entre proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva mediante prueba de difusión. Los gráficos muestran el área de difusión (cm^2) (A) e intensidad de tinción ($\text{píxeles}/\text{cm}^2$) (B) de las imágenes de la Figura 15 D0-140 (lámina superior). FD corresponde a la fracción proteica salival difusible y FND la fracción proteica salival no difusible. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Al cuantificar el área de difusión y la intensidad de tinción de las muestras presentadas en la prueba de difusión (Figura 15, D0-140) se observó que la presencia de los volúmenes menores de la solución de pectina en la mezcla extracto de semilla-saliva-pectina, provocaron un aumento del área de difusión y de la intensidad de tinción de la FD (Figura 16 A y B) con respecto al control (saliva-extracto de semilla en ausencia de pectina). Por otra parte, en las condiciones experimentales señaladas, el área de difusión de la FND permaneció inalterable, mientras que la presencia de pectina a partir de la dosis mínima (20 μL), generó una disminución sostenida de la intensidad de tinción de la FND (Figura 16 B).

Al centrifugar las muestras correspondientes a las mezclas de un volumen fijo de saliva, volúmenes crecientes de pectina y un volumen fijo de extracto de semilla, se observó que el área de la FD aumentó sustantivamente, mientras que la intensidad de dichas áreas aumentó gradual y significativamente (Figura 17 A y B). Por el contrario, el área de difusión de la FND de la saliva no mostró diferencias significativas entre la condición control (0 μL de pectina) y la adición de volúmenes crecientes de pectina mezcladas con extracto de semilla y saliva. En este caso, la intensidad de tinción disminuyó paulatinamente a medida que aumentó la cantidad de pectina en la mezcla (Figura 17 A y B).

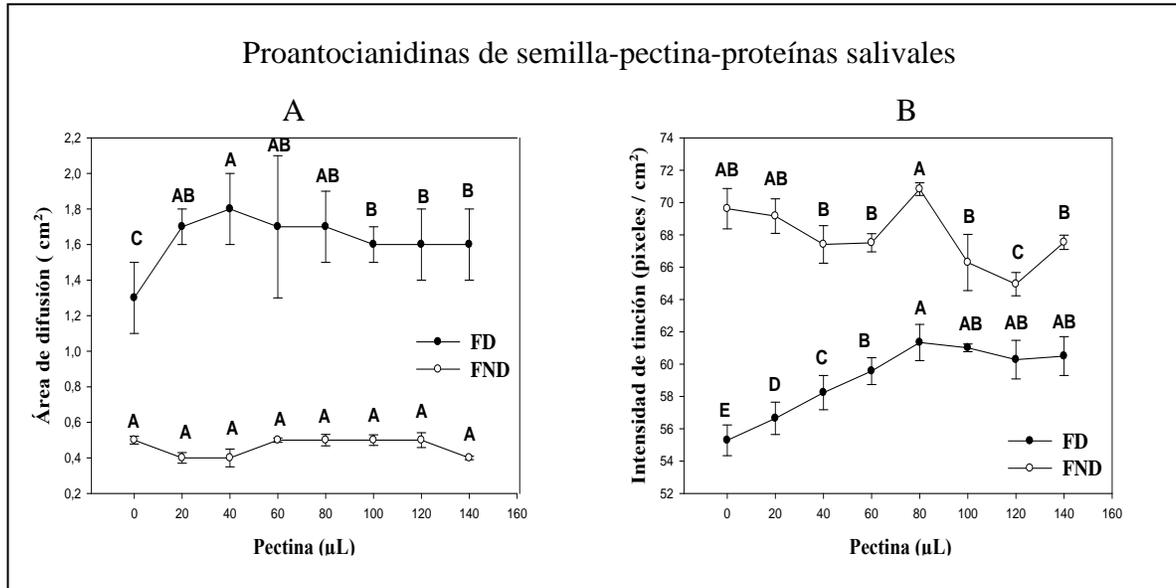


Figura 17. Análisis cuantitativo del efecto de pectina sobre la interacción entre proantocianidinas de semilla y proteínas de la saliva mediante prueba de precipitación. Los gráficos muestran el área de difusión (cm^2) (A) e intensidad de tinción (píxeles/ cm^2) (B) de las imágenes de la Figura 15 P0-140 (lámina inferior). FD corresponde a la fracción proteica salival difusible y FND la fracción proteica salival no difusible. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Interacción de pectina con complejos proantocianidinas de semilla-proteínas de la saliva

Prueba de difusión y prueba de precipitación

Con respecto al anterior, en este ensayo se invirtió el orden en que fueron mezclados la pectina, el extracto de semilla y la saliva con el propósito de analizar el efecto que presentan cantidades crecientes de pectina sobre los complejos proantocianidinas de semillas-proteína salival originados en la mezcla extracto de semilla-saliva. Para ello, diez minutos después de preparada la mezcla entre un volumen fijo de saliva (100 μL) y extracto de semilla (1000 μL) se agregaron volúmenes crecientes de pectina. Estas muestras fueron sometidas a la prueba de difusión y prueba de precipitación descritas anteriormente (Figura 18 D y P).

En este ensayo y al igual que en el anterior, las proteínas salivales mantuvieron su modo bifásico de difusión sobre la membrana de celulosa (Figura 18, D0-140). El análisis de las

imágenes de la Figura 18 mediante inspección visual permitió apreciar que los diferentes tratamientos con pectina hicieron que la FD de la saliva aumentará su área de difusión progresivamente a partir de la adición de 20 μL de pectina. Por su parte, la FND mantuvo su intensidad de tinción junto con experimentar una disminución de su área de difusión, en relación aparente con el volumen de pectina aplicado (Figura 18 D0-140).

Una vez realizada la prueba de precipitación con muestras anteriores, se pudo observar que la FND de la condición control, presentó una intensidad de coloración menor que la del control de la prueba de difusión (ambos controles corresponden a extracto de semilla con saliva en ausencia de pectina) (Figura 18, D0 versus P0). Por su parte se observó un aumento del área de difusión de la FD. Sin embargo no fue posible apreciar directamente (inspección visual) el real efecto de la pectina sobre la intensidad de tinción de las muestras centrifugadas (Figura 18 P0-140).

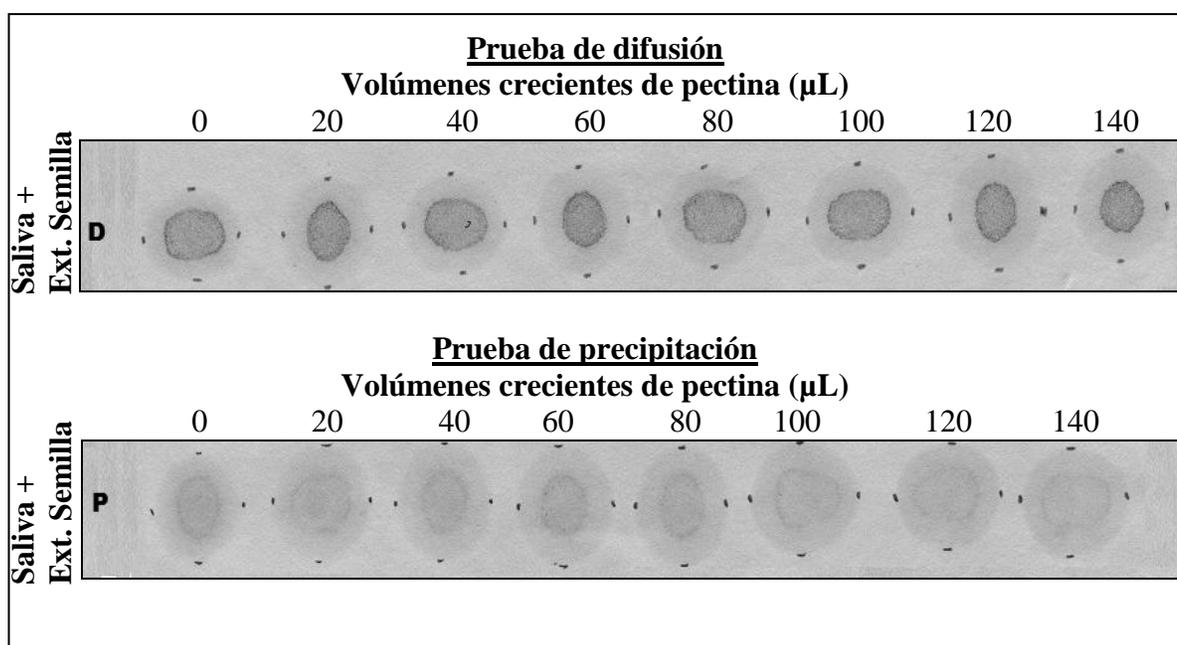


Figura 18. Ensayo interacción de pectina con complejos proantocianidinas de semilla-proteínas de la saliva. Prueba de difusión y prueba de precipitación. Mil μL de extracto de semilla fueron mezclados con 100 μL de saliva, después de 10 min, se agregó a la mezcla volúmenes crecientes de pectina. Todas las mezclas fueron llevadas a un volumen final de 1400 μL con agua. Alícuotas de 20 μL de las mezclas fueron depositadas sobre la membrana de celulosa y teñidas con comassie blue. D0 corresponde a 100 μL de saliva con 1000 μL de extracto de semilla en ausencia de pectina. D20-140 indica adición de volúmenes crecientes de pectina (20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 μL) a la mezcla extracto de semilla-saliva. P0-140 corresponden a las imágenes obtenidas de alícuotas de 20 μL del sobrenadante de las muestras utilizadas en la prueba de difusión, centrifugadas a 600 g (prueba de precipitación).

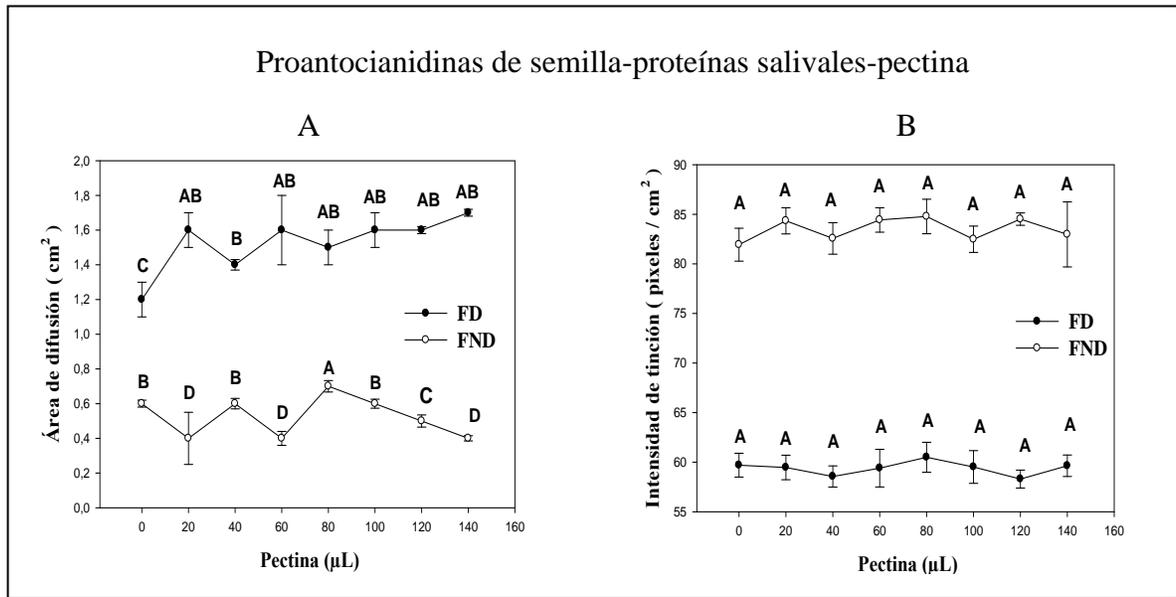


Figura 19. Análisis cuantitativo de la interacción de pectina con complejos proantocianidinas de semilla-proteínas de la saliva mediante prueba de difusión. Los gráficos muestran el área de difusión (cm²) (A) e intensidad de tinción (píxeles/cm²) (B) de las imágenes de la Figura 18 D0-140 (lámina superior). FD corresponde a la fracción proteica salival difusible y FND la fracción proteica salival no difusible. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

En el estudio cuantitativo del área de difusión y de la intensidad de tinción (Figura 19) de las imágenes obtenidas en la prueba de difusión sobre la membrana de celulosa, se pudo apreciar que la pectina adicionada a la mezcla de saliva con extracto de semilla provocó un aumento progresivo del área de difusión de la FD a partir de la mínima dosis de solución de pectina (20 μ L) (Figura 19 A). Por el contrario, en esta prueba, el área de difusión de FND, tuvo un comportamiento errático (Figura 19 A). Por su parte, las intensidades de tinción de la FD y la FND no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos experimentales (Figura 19 B).

Al analizar las imágenes obtenidas en la prueba de precipitación (análisis de los sobrenadantes), se observó que el área de difusión y la intensidad de tinción (Figura 20) de las mezclas de la prueba anterior (extracto de semilla-saliva con pectina) mostraron aumento del área de difusión de la FD de la saliva a partir de la adición de 20 μ L de solución de pectina (Figura 20 A). En tanto, el área de la FND solo presentó cambios menores en presencia de pectina (Figura 20 A). Por su parte, la intensidades de tinción de la fracciones FD y FND no sufrieron variaciones en presencia de volúmenes crecientes de la solución con pectina (Figura 20 B).

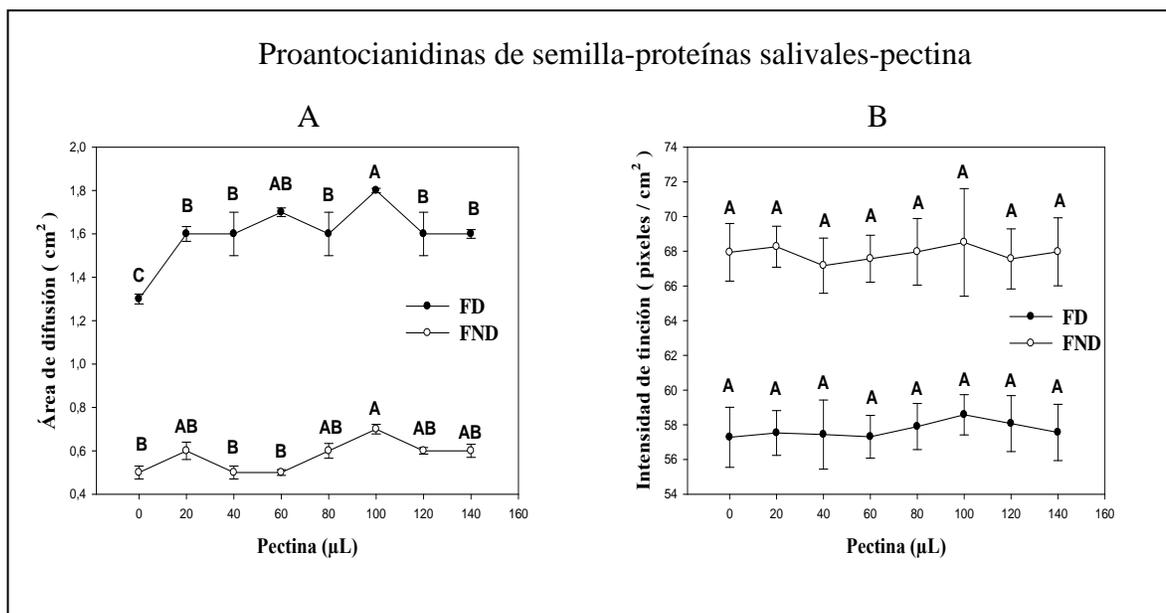


Figura 20. Análisis cuantitativo de la interacción de pectina con complejos proantocianidinas de semilla-proteínas de la saliva mediante la prueba de precipitación. Los gráficos muestran el área de difusión (cm^2) (A) e intensidad de tinción ($\text{píxeles}/\text{cm}^2$) (B) de las imágenes de la Figura 18 P0-140 (lámina inferior). FD corresponde a la fracción proteica salival difusible y FND la fracción proteica salival no difusible. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

DISCUSIÓN

Los polímeros de flavan-3-oles, comúnmente conocidos como proantocianidinas o taninos condensados (De Freitas & Mateus, 2001), han sido asociados fuertemente a la sensación de astringencia debido a su alta afinidad por las proteínas salivales (Sarni-Manchado *et al.*, 2008). Las proantocianidinas interactúan con las proteínas salivales en la cavidad oral, produciendo agregados insolubles que precipitan, alterando la lubricación del paladar y mucosas (Mateus *et al.*, 2004). A pesar de esta alta afinidad, se ha sugerido que la interacción entre proteína salival-polifenol, podría verse afectada por la presencia de algunos polisacáridos en solución (Ozawa *et al.*, 1987; Carvalho *et al.*, 2006a).

En el presente estudio se evaluó el efecto de la pectina, sobre la interacción entre proantocianidinas de semillas de *Vitis vinífera* var. Carménère con la fracción proteica salival mediante pruebas de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa (López-Cisternas *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2010; Obreque-Slier *et al.*, 2010a; Obreque-Slier *et al.*, 2010b; Obreque-Slier *et al.*, 2010c; Obreque-Slier *et al.*, 2011; Obreque-Slier *et al.*, 2012). Esta metodología permite la detección, evaluación selectiva y cuantitativa de la fracción proteica presente en la saliva humana (López-Cisternas *et al.*, 2007). Estas características representarían la principal ventaja con respecto a diversos trabajos que han utilizado sustratos proteicos homogéneos como seroalbúmina bovina (Mateus *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006a; De Freitas *et al.*, 2003) o algún tipo de proteína salival purificada (Ozawa *et al.*, 1987; Carvalho *et al.*, 2006b).

En este estudio, los compuestos fenólicos utilizados fueron extraídos desde semilla de bayas de *Vitis vinífera* var. Carménère. y el extracto de semillas fue analizado mediante HPLC-DAD y espectrofotometría. Los resultados muestran que las concentraciones de polifenoles de bajo peso molecular, fenoles y taninos totales observadas en el extracto son coincidentes con la descrita en estudios precedentes (Peña Neira *et al.*, 2004; Pastor del Rio and Kennedy, 2006; Obreque-Slier *et al.*, 2010a; Obreque-Slier *et al.*, 2010b).

Las proteínas de la saliva humana depositadas sobre un punto de una membrana de celulosa, difunden en forma radial y de manera bifásica. Esto quiere decir que al ser fijadas y teñidas se puede apreciar una fracción proteica salival difusible (FD) y otra no difusible (FND) (López-Cisternas *et al.*, 2007; Obreque-Slier *et al.*, 2010a; Obreque-Slier *et al.*, 2011). Al ser diluida la saliva en agua (1:14), o al ser mezclada con pectina, extracto de semilla o con ambas, las proteínas de la saliva mantienen estrictamente su forma bifásica de difusión sobre la membrana de celulosa.

El agua pura y la solución de pectina depositadas sobre la membrana de celulosa no son detectados por el colorante de proteínas. Por el contrario, el extracto de semilla, es claramente teñible por el Coomassie blue (colorante de proteínas) sobre el papel, presentando una difusión radial, homogénea y monofásica. La afinidad que presenta este

colorante específico de proteínas (Comassie blue) por el extracto de semilla, es de carácter inespecífico y correspondería al conocido “efecto mordiente” (Obreque-Slier *et al.*, 2010a) A través de este “efecto” se favorece la fijación de colorantes sobre la fibra por parte de las proantocianidinas de semilla presentes en el extracto de semilla.

En este estudio volúmenes crecientes de pectina fueron mezclados con extracto de semilla, con el propósito de evaluar la interacción y afinidad entre este polisacárido y las proantocianidinas de semilla. La presencia de pectina provocó un aumento del área de difusión del extracto de semilla sobre la membrana de celulosa, con la notoria formación de un modo bifásico de difusión similar a lo observado con las proteínas de la saliva. Esta observación sugiere fuertemente la existencia de interacciones moleculares entre la pectina y las proantocianidinas (De Freitas *et al.*, 2003).

Entre los numerosos fenómenos fisiológicos que caracterizan la maduración de la uva, destaca un reblandecimiento muy rápido de la baya (Flanzy, 2000), debido a la degradación masiva de la pared celular, principalmente de la lámina media. Esta es una capa fina de material que se ubica entre las paredes de células vecinas y que está constituida casi exclusivamente por pectinas (Taiz y Zeiger, 2006). En este proceso, ocurre una liberación significativa de fragmentos pécticos solubles al medio celular (Ozawa *et al.*, 1987) los cuáles podrían interactuar con un número importante de compuestos fenólicos, tales como las proantocianidinas presentes en las capas hipodermales del hollejo de la baya de vid (Adams, 2006). Asimismo, la alta presencia de pectina en el mosto de uva (Flanzy, 2000) y según las observaciones de este estudio la interacción entre las pectinas y las proantocianidinas se presentaría desde las primeras etapas de la vinificación.

Otros autores han propuesto, que las pectinas pueden establecer interacciones electrostáticas con ciertos tipos de macromoléculas, como las proteínas (Vernhet *et al.*, 1996). En este estudio, la mezcla de saliva con volúmenes crecientes de pectina, provocó un aumento progresivo y constante del área de difusión de la fracción proteica salival difusible (FD) sobre la membrana de celulosa. Por su parte, la adición progresiva de pectina, generó un aumento de la intensidad de tinción de las fracciones proteicas de la saliva (FD y FND) en aquellas muestras de saliva-pectina que fueron centrifugadas (prueba de precipitación). Lo anterior sugiere que habría un aumento de la masa de proteína salival que queda en solución y que la pectina interactuaría con las proteínas de la saliva y, limitaría la sedimentación de estas macromoléculas al ser centrifugadas.

Luego de ser comprobada la reactividad de la pectina con las proantocianidinas del extracto de semilla y con las proteínas salivales, se procedió a mezclar cantidades crecientes de una solución de pectina con una cantidad fija del extracto de semilla para luego de 10 minutos agregar una cantidad fija de saliva. La fracción proteica salival mantuvo su modo bifásico de difusión en presencia de pectina y extracto de semilla. Sin embargo, el área de difusión y la intensidad de tinción de la fracción proteica difusible de la saliva aumentó gradualmente a medida que la solución de pectina aumentó en la mezcla extracto de semilla-saliva-pectina. Esto fue coincidente con los resultados obtenidos al centrifugar las

muestras (prueba de precipitación). Una de las posibles explicaciones de este fenómeno, es que la pectina habría modificado la interacción entre las proantocianidinas de semilla y las proteínas de la saliva favoreciendo la difusión de las proteínas sobre la membrana de celulosa.

Diversos estudios señalan que la pectina es capaz de prevenir e inhibir la agregación proantocianidina-proteína salival gracias a su habilidad para encapsular a los polifenoles (proantocianidinas) e interferir así con la capacidad de estos para unirse a las proteínas (De Freitas *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006a; Carvalho *et al.*, 2006b). Este mecanismo explicaría la disminución de la astringencia debido a la presencia de ciertos polisacáridos pécticos en el vino tinto (Sarni-Manchado *et al.*, 2008). Además, nuestros estudios sugieren que la disminución de astringencia podría asociarse a la interacción de la pectina con las fracciones proteicas de la saliva.

A partir de los resultados anteriores, se modificó el orden de adición de los componentes en la mezcla con el propósito de observar el efecto de la pectina sobre complejos taninos de semilla/proteínas de la saliva. Así, se mezcló extracto de semilla con saliva y luego de 10 minutos se agregó volúmenes crecientes de pectina. Los resultados mostraron un aumento del área de la FD y FND de la proteína salival y un nulo efecto sobre la intensidad de tinción de ambas fracciones proteicas de la saliva sobre la membrana de celulosa. Estos resultados, que denotan interacción, también se observan con muestras centrifugadas a 600 G. Estas observaciones sugieren que la pectina interactúa con complejos proantocianidinas de semilla/proteínas salivales favoreciendo la difusibilidad de este complejo sobre la membrana de celulosa. Así las pectinas, podrían formar una capa que rodea al complejo proantocianidinas-proteína, produciendo la formación de una estructura ternaria pectina/proantocianidinas/proteína (De Freitas *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2006a; Carvalho *et al.*, 2006b) de carácter hidrofílico y consecuentemente, más soluble en un sistema acuoso (Carvalho *et al.*, 2006a). En algunos casos, este efecto permitiría la resolubilización de los agregados insolubles entre los polifenoles/proteínas (De Freitas *et al.*, 2003). Este resultado respaldaría el uso de pectina como enjuague entre degustaciones secuenciales de bebidas o soluciones ricas en compuestos fenólicos (Centeno, 2006), gracias a la capacidad de este polisacárido, para interactuar con complejos insolubles proantocianidinas/proteína salival, volverlos hidrofílicos e incluso, resolubilizarlo, en la cavidad bucal permitiendo así su remoción.

CONCLUSIONES

La pectina tiene afinidad e interactúa tanto con las proteínas de las distintas fracciones de la saliva humana (fracción difusible y no difusible), como con las proantocianidinas de *Vitis vinífera* var. Carménère.

La pectina interfiere con la interacción entre las proantocianidinas de semilla de *Vitis vinífera* var. Carménère y las proteínas salivales, fenómeno que se asociaría a la disminución de astringencia.

La pectina interactúa con agregados proantocianidinas de semilla de *Vitis vinífera* var. Carménère/proteínas salivales formando complejos ternarios pectina/proantocianidinas de semilla/proteína salival con características hidrofílicas.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, D. 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 249-256.

Boulet, J.C., P. Williams and T. Doco. 2007. A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 69: 79-85.

Carvalho, E., M.J. Povoas, N. Mateus and V. De Freitas. 2006a. Application of flow nephelometry to the analysis of the influence of carbohydrates on protein-tannin interactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86: 891-896.

Carvalho, E., N. Mateus, B. Plet, I. Pianet, E. Dufourc and V. De Freitas. 2006b. Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 54: 8936-8944.

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. 57p.

Centeno, R. 2006. Creación de un panel de degustación especializado en astringencia y amargor. Memoria Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago. 53p.

De Freitas, V and N. Mateus. 2001. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 940-945.

De Freitas, V., E. Carvalho and N. Mateus. 2003. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry* 81: 503-509.

Dinnella, C., A. Recchia, G. Fia, M. Bertuccioli and E. Monteleone. 2009. Saliva characteristics and individual sensitivity to phenolic astringent stimuli. *Chemical Senses and Flavor* 34: 295-304.

Flanzy, C. 2000. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV Ediciones, Madrid. España. 782 p.

Frazier, R., A. Papadopoulou, I. Mueller-Harvey, D. Kisson and R. Green. 2003. Probing protein-tannin interactions by isothermal titration microcalorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5189-5195.

García-Barceló, J. 1990. Técnicas analíticas para vinos. Ediciones Gab, Barcelona, España. 1713p.

Hayashi, N., T. Ujihara and K. Kohata. 2005. Reduction of catechin astringency by the complexation of gallate-type catechins with pectin. *Postharvest Biology and Technology* 69: 1306-1310.

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

Jolie, R.P., T. Duvetter, A.M. Van Loey and M.E. Hendrick. 2010. Pectin methylesterase and its proteinaceous inhibitor: a review. *Carbohydrate Research* 345: 2583-2595

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.

Kallithraka, S., J. Bakker and M. Clifford. 2000. Interaction of (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin B2 and procyanidin C1 with pooled human saliva in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 81: 261-268.

Kielhorn, S. and J. Thorngate. 1999. Oral sensations associated with the flavan-3-ols (+)-catechin and (-)-epicatechin. *Food Quality and Preference* 10: 109-116.

Lin, H., P. Chen, T. Cheng and R. Chen. 2004. Formation of tannin-albumin nano-particles at neutral pH as measured by light scattering techniques. *Analytical Biochemistry* 325: 117-120.

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.

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.

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

Mercurio, M., R. Damberg, M. Herderich, and P. Smith. 2007. High throughput analysis of red wine and grape phenolic 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.

- Monteleone, E., N. Condelli, C. Dinnella and M. Beruccioli. 2006. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference* 17: 96-107.
- Müller, K., C. Figueroa, C. Martínez, M. Medel, E. Obreque, A. Peña-Neira, I. Morales-Bozo, H. Toledo and R. López-Solis. 2010. Measurement of saliva volume in the mouth of members of a trained sensory panel using a beetroot (*Beta vulgaris*) extract. *Food Quality and Preference* 21: 569-574.
- Obreque-Slier, E., C. Mateluna, A. Peña-Neira and R. López-Solis. 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-Solis. 2010b. Enhancement of both salivary-protein-enological tannin interaction and astringency perception by ethanol. *Journal Agricultural Food Chemistry* 58: 3729-3735.
- Obreque-Slier, E., R. López-Solis, A. Peña-Neira and F. Zamora-Marín. 2010c. Tannin-protein interaction is more closely associated with astringency than tannin-protein precipitation: Experience with two oenological tannin and a gelatin. *International Journal of Food Science and Technology* 45: 2629-2636.
- Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira and R. López-Solis. 2011. Precipitation of low molecular weight phenolic compounds of grape seeds cv. Carménere (*Vitis vinifera* L.) by whole saliva. *European Food Research and Technology* 232: 113-121.
- Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira and R. López-Solis. 2012. Interaction of enological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *LWT-Food Science and Technology* 45: 88-93.
- Ozawa, T., T.H. Lilley and E. Haslam. 1987. Polyphenol interaction: Astringency and loss of astringency in ripening fruit. *Phytochemistry* 26: 2937-2942.
- Pastor del Rio, J. and J.A. Kennedy. 2006. Development of proanthocyanidin in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 125–132.
- Peña-Neira, A., M. Dueñas, A. Duarte, T. Hernández, I. Estrella and E. Loyola. 2004. Effects of ripening stages 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.
- Sarni-Manchado, P., J.M. Canals-Bosch, G. Mazerolles and V. Cheynier. 2008. Influence of the glycosylation of human salivary proline-rich proteins on their interactions with condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9563-9569.

Simon, C., K. Barathieu, M. Laguerre, J. Schmitter, E. Fouquet, I. Pianet and E. Dufourc. 2003. Three dimensional structure and dynamics of wine tannin-saliva protein complexes. A multitechnique approach. *Biochemistry* 42: 10385-10395.

Riou, V., A. Vernhet, T. Doco and M. Moutounet. 2002. Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids* 16:17-23.

Taira, S., M. Ono and N. Matsumoto. 1997. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. *Postharvest Biology and Technology* 12: 265-271.

Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Fisiología vegetal*, volumen II. 3^a edición. Universitat Jaume I, Castelló de la Plana, España. 682p.

Vernhet, A., P. Pellerin, C. Prieur, J. Osmianski and M. Moutounet. 1996. Charge properties of some grape and wine polysaccharide and polyphenolic fractions. *American Journal of Enology and Viticulture* 47: 25-30.