



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA INTERACCIÓN
TANINO-PROTEÍNA Y SU RELACIÓN CON LA SENSACIÓN DE ASTRINGENCIA**

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo y
al Grado de Magíster en Enología y Vitivinicultura

CRISTINA BEATRIZ HOYUELOS ALVAREZ

Directores de Tesis

ELÍAS OBREQUE SLIER

REMIGIO LÓPEZ SOLÍS

Profesores Consejeros

CARLA JARA CAMPOS

MARCELA MEDEL MARABOLÍ

SANTIAGO - CHILE

2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA INTERACCIÓN
TANINO-PROTEÍNA Y SU RELACIÓN CON LA SENSACIÓN DE ASTRINGENCIA**

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Título Profesional de
Ingeniero Agrónomo y al Grado de Magíster en Enología y Vitivinicultura.

	Memoria de Título	Tesis de Grado
DIRECTORES DE TESIS		
Elías Obreque Slier Ing. Agrónomo, Enólogo, Dr.	6,7	Aprobada
Remigio López Solís Bioquímico, Dr.	7,0	Aprobada
PROFESORES EVALUADORES		
Carla Jara Campos Ing. Agrónomo, Enólogo, Dr.	6,7	Aprobada
Marcela Medel Marabolí Ing. Agrónomo, Enólogo, Dr.	6,5	Aprobada

Santiago - Chile
2014

ÍNDICE

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
CAPÍTULO II: EFECTO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA INTERACCIÓN TANINO-PROTEÍNA Y SU RELACIÓN CON LA SENSACIÓN DE ASTRINGENCIA	9
RESUMEN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
PALABRAS CLAVE	10
ABSTRACT	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.11
KEYWORDS	11
INTRODUCCIÓN	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.12
Hipótesis de trabajo	14
Objetivo General	¡Error! Marcador no definido.14
Objetivos Específicos	¡Error! Marcador no definido.14
MATERIALES Y MÉTODOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.15
Lugar de Estudio	¡Error! Marcador no definido.15
Materiales	¡Error! Marcador no definido.15
Semillas	¡Error! Marcador no definido.15
Saliva Humana	¡Error! Marcador no definido.15
Reactivos químicos	¡Error! Marcador no definido.16
Equipos instrumentales	¡Error! Marcador no definido.16
Métodos	¡Error! Marcador no definido.17
Tratamientos y Diseño experimental	¡Error! Marcador no definido.17
Procedimientos	18
Análisis estadístico	¡Error! Marcador no definido.24
RESULTADOS	¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.25
Caracterización del extracto de semilla	¡Error! Marcador no definido.25
Difusión de los ácidos orgánicos en membranas de celulosa	¡Error! Marcador no definido.27
Difusión y precipitación de las proantocianidinas en presencia de ácido orgánico	28
Difusión y precipitación de BSA en presencia de ácido orgánico	¡Error! Marcador no definido.31

Difusión y precipitación del complejo BSA-proantocianidinas en presencia de ácido orgánico	3	¡Error! Marcador no definido.
Difusión y precipitación de las proteínas salivales en presencia de ácido orgánico		¡Error! Marcador no definido.
Difusión y precipitación del complejo saliva-proantocianidinas en presencia de ácido orgánico		¡Error! Marcador no definido.
Evaluación Sensorial		¡Error! Marcador no definido.
DISCUSIÓN		49
CONCLUSIONES		53
BIBLIOGRAFÍA		¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.54
ANEXOS		¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.
ANEXO I Pauta Determinación de intensidad		62
ANEXO II Pauta Test de Ranking. Medio agua		63
ANEXO III Pauta no estructurada para análisis sensorial descriptivo		¡Error! Marcador no definido.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a mis padres, Manuel y Ana Cecilia, por todo el apoyo y confianza brindada durante mi largo proceso educativo. Por entregarme el cariño y amor necesario para realizar mis metas.

A mi hermana, Ana Camila, quien siempre ha estado a mi lado, preocupándose y dándome su amor y comprensión.

A Nicolás, gracias por tu amor e infinita paciencia durante este largo proceso. Gracias por motivarme siempre a seguir con esta difícil tarea.

A mis profesores, Elias Obrequé y Remigio López, por su calidez, orientación y excelente disposición y por sobre todo, el generoso apoyo que me entregaron a lo largo de este último tiempo.

A mis amigas Camila, Isabel, Paz y Nahomi, que siempre me escucharon y tuvieron una palabra de apoyo. Gracias por su inmensa amistad y cariño.

A mis amigos Aaron y Bernardo, quienes estuvieron constantemente presentes y facilitando las labores de este trabajo. A mi amigo, Francisco, gracias por tu amistad y palabras de aliento, a pesar de la distancia.

Finalmente, agradecer al Proyecto FONDECYT 1110832, por entregarme las herramientas y materiales necesarios para la realización de éste proyecto.

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Astringencia

La astringencia, se ha definido como una sensación táctil generada por la pérdida de lubricación en la cavidad bucal (Smith y Noble, 1998) o como una sensación de sequedad y aspereza percibida como un estímulo difuso que requiere tiempo para su desarrollo (Bate-Smith, 1973). Entre los descriptores más comunes podemos encontrar: sensación de sequedad, sensación de tiza, arrugamiento de las papilas gustativas y aspereza en la boca (Vidal *et al.*, 2004).

Una serie de mecanismos se han propuesto para explicar el fenómeno de la astringencia, pero la hipótesis comúnmente aceptada indica que se trataría de una interacción y precipitación entre compuestos fenólicos, específicamente las proantocianidinas, y las proteínas salivales (Nayak y Carpenter, 2008; Obreque-Slier *et al.*, 2010a). Prinz y Lucas (2000); Sarni *et al.* (2008) y McRae y Kennedy (2011), señalan que las principales proteínas que participan en el mecanismo de astringencia, son las proteínas con un alto contenido de prolina (PRP) y las ricas en histidina, las cuales tienen gran afinidad por los taninos proantocianidínicos. Este efecto fisicoquímico produciría una reducción en la eficiencia de lubricación de la saliva (Lyman y Green, 1990). Recientemente, se ha observado que la astringencia estaría más estrechamente relacionada con la interacción entre proantocianidinas y proteínas salivales que con la precipitación del complejo (Payne *et al.*, 2009; Obreque-Slier *et al.*, 2010d).

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de las plantas (Tomás-Barberán y Espín, 2001) que se caracterizan por poseer un núcleo bencénico sustituido por uno o varios grupos hidroxilo (-OH) (Monagas *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2006). La clasificación de los compuestos pertenecientes a la familia de los polifenoles o compuestos fenólicos es un problema verdaderamente complejo, debido a que estos constituyen una larga y compleja familia de moléculas con diversas estructuras, propiedades y tamaños (Ojeda *et al.*, 2002; Monagas *et al.*, 2005).

Sin embargo, su clasificación está basada sobre la distinción entre compuestos no flavonoides y flavonoides (Peña, 1998; Zoecklein *et al.*, 2001; Hidalgo, 2003; Zamora, 2003). Cada una de estas familias, a su vez, se subdivide en diversos grupos. Así, por ejemplo, los compuestos no flavonoides están conformados por los ácidos fenólicos y estilbenos. Por su parte, la familia de compuestos flavonoides se compone de los flavonoles, antocianos y flavanoles (Peña, 1998; Flanzy, 2000; Ojeda *et al.*, 2002).

En el caso del vino, se ha observado que los responsables de la sensación de astringencia serían los taninos hidrolizables y/o condensados. Los taninos hidrolizables están conformados por los taninos gálicos y los taninos elágicos. La estructura de los primeros, está dada por una molécula de glucosa esterificada con una o varias moléculas de ácido gálico, mientras que la estructura de los segundos es mucho más compleja y asociada a la presencia de ácido elágico. Estos compuestos son extraídos de la madera con que tiene contacto el vino durante su elaboración (Zamora, 2003). En el caso de los taninos condensados, también conocidos como proantocianidinas o flavan-3-ol, son polímeros de más de 10 subunidades de flavanoles. 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). Así, su concentración en el vino dependerá por una parte, de la carga polifenólica de la materia prima y por otro, de los procesos dentro de la bodega que favorezcan su extracción (Zamora, 2003).

Factores que influyen en la astringencia

Diversos estudios han reportado que la interacción entre los taninos proantocianidínicos y las proteínas de la saliva puede ser originada por atracción electrostática, interacciones de tipo hidrofóbico o por medio de puentes de hidrógeno (Haslam, 1996; Zamora, 2003), siendo esta última unión la más frecuente de encontrar entre taninos-proteínas (Gawel *et al.*, 2001). Estas interacciones son altamente dependiente del pH del medio (Kallithraka *et al.*, 1997a), contenido de alcohol (Obreque-Slier *et al.*, 2010b), tipo de proteína (López *et al.*, 2007), concentración y tamaño de la proantocianidina (Sarni-Machado *et al.*, 2008), polisacáridos (Mateus *et al.*, 2004) y manoproteínas (Guadalupe y Ayestarán, 2008). Un factor de alta relevancia, que afecta la interacción tanino-proteína y consecuentemente la sensación de astringencia corresponde a la presencia de los ácidos orgánicos (Lawless *et al.*, 1996; Kallithraka *et al.*, 1997; Fontoin *et al.*, 2008).

Ácidos Orgánicos de la uva, mostos y vinos

Los ácidos orgánicos son sustancias que se caracterizan por la presencia de una o más funciones ácidas, constituidas por grupos carboxílicos (-COOH) en su molécula. Se encuentran en estado libre, salificados o parcialmente salificados (Flanzy, 2000). Se ha observado que la acidez titulable de las uvas suele variar entre 5,0 y 16 g L⁻¹ dependiendo de la variedad, condiciones climáticas, prácticas culturales y madurez del fruto. En los vinos se encuentran diversos ácidos orgánicos siendo comunes los ácidos tartárico, málico y cítrico, los cuales proceden de la uva, esencialmente de la pulpa de las bayas, mientras que el ácido láctico, es producido de los fenómenos fermentativos y acciones bacterianas (Lawless *et al.*, 1996; Zoecklein *et al.*, 2001).

El ácido tartárico, es el más abundante en el vino y también el más estable, representando más de dos tercios del total. Su aporte al vino es conferirle características de fruta madura, sabores frescos y agradables, lo que se conoce como notas vinosas (Centeno, 2006). Su concentración puede variar entre 1,0 a 6,0 g L⁻¹, y en elevadas cantidades puede generar un vino con alta dureza y astringencia. Por su parte el ácido málico, proporciona al vino notas ásperas poco agradables, como de verdor. Su concentración entre 0 a 4,0 g L⁻¹, depende muy directamente de la maduración del fruto y por lo tanto, también del clima (Flanzy, 2000). Asimismo, el ácido cítrico es el tercero en importancia entre los de origen natural, encontrándose en concentraciones muy inferiores (0,2 a 0,6 g L⁻¹), aportando sensaciones agradables, frutales, aromáticas y vivas (Golder, 2008).

Finalmente, el ácido láctico surge inicialmente de la fermentación maloláctica y eventualmente durante la fermentación alcohólica. En la fermentación maloláctica, la transformación del ácido málico en ácido láctico supone una desacidificación biológica en el vino, un aumento de la estabilidad microbiológica y le confiere ligereza al vino por ser el ácido láctico más suave y menos agresivo que el ácido málico (Contreras 2002; Golder, 2008). Según las condiciones de fermentación el contenido de éste ácido puede variar entre 0,0001 y 3,0 g L⁻¹ (Ribereau-Gayon *et al.*, 1962; Maicas *et al.*, 2000).

Por otro lado, el sabor ácido que se percibe en el vino viene condicionado por la abundancia de protones, es decir, por la acidez real o pH. El pH está relacionado con la cantidad de ácidos y también con su fuerza, es decir, su grado de disociación y es definido como el logaritmo inverso de la concentración molar de los iones H⁺. Se encuentran en una solución que permite conocer y expresar el grado de acidez o alcalinidad de una determinada sustancia. Una forma conveniente de expresar la relativa fortaleza de un ácido es mediante el valor de su pKa (Flanzy, 2000). En un vino, los únicos ácidos que pueden tener una acción sobre el pH son el ácido tartárico, málico, cítrico y láctico, donde el primero es el que juega un papel más importante (Flanzy, 2000; Pérez, 2003).

Se ha observado que los ácidos orgánicos, intervienen de manera determinante en los equilibrios gustativos, aromáticos y nutritivos de la baya, y en consecuencia, en el vino. Estos compuestos tienen una fuerte influencia sobre las reacciones químicas, fisicoquímicas y bioquímicas que se presentan en la maduración del fruto, en la elaboración y en la evolución de los productos transformados, en donde la naturaleza y concentración de los ácidos formados están relacionadas con las distintas técnicas de elaboración (Flanzy, 2000). La principal propiedad de los ácidos orgánicos es la de contribuir, en gran medida, a la acidez del vino que condiciona la estabilidad, el color, sabor y el aspecto. Una disminución de la acidez se traduce en una falta de brillo, un aspecto gustativo más plano, y el vino se convierte en un medio mucho más frágil desde el punto de vista microbiológico. Contrariamente, cuando tiene demasiada acidez, el vino presenta una agresividad molesta, pero a la vez, una mayor estabilidad microbiológica (Flanzy, 2000). Finalmente, se ha descrito que los ácidos orgánicos tendrían un efecto relevante sobre la sensación de astringencia percibida por un panel de degustadores.

Ácidos Orgánicos y astringencia

Una de las propiedades conocidas de los ácidos orgánicos es que intervienen en la sensación de astringencia (Hartwing y McDaniel, 1995). La adición de ácidos reduce el pH de una solución y aumenta el porcentaje de taninos, en la forma de "fenolato" y por lo tanto aumenta la probabilidad de enlaces hidrógeno (Kallithraka *et al.*, 1997).

Algunos estudios, han evaluado el efecto de ciertos ácidos orgánicos (málico y láctico) sobre la percepción de astringencia (Lawless *et al.* 1996; Kallithraka *et al.*, 1997a y 1997b; Fontoin *et al.*, 2008). En estas investigaciones, se han utilizado soluciones con fenoles provenientes de un extracto de semilla, a pH de 3.2 y 3.5. Los resultados obtenidos permitieron determinar que las concentraciones de cada ácido (entre 0,25 y 5,0 g L⁻¹), no afectaron significativamente la sensación de astringencia, a pesar de las diferencias que presentaron los distintos ácidos en la percepción de acidez (Kallithraka *et al.*, 1997). Resultados similares fueron obtenidos por Fontoin *et al.* (2008), mediante la adición de diferentes concentraciones de ácido tartárico (0, 2, 4 y 6 g L⁻¹) a soluciones de taninos oligoméricos a un pH constante de 3.5, en donde no se observaron diferencias significativas en la percepción de la astringencia.

De acuerdo a un estudio efectuado por Lawless *et al.* (1996), los cuales evaluaron la relación entre la astringencia y la acidez del ácido láctico, acético y cítrico a distintos pHs (3, 5 y 7), se observó que la intensidad de la astringencia y acidez disminuyen al aumentar el pH. Por otro lado, la acidez percibida a un mismo pH es diferente entre los ácidos. Sin embargo, los atributos táctiles asociados a la astringencia (sequedad y rugosidad en la cavidad bucal) fueron similares al utilizar todos los ácidos. Así, los autores concluyeron que el pH es el factor que tuvo más influencia sobre la astringencia. Esta fuerte dependencia del pH, sugiere que la astringencia de estos ácidos es el resultado directo de sus propiedades ácidas y no solo debido a los mecanismos de enlace de hidrógeno, previamente sugerido como una explicación de la astringencia por efecto de las interacciones entre taninos y proteínas salivales.

En concordancia con las investigaciones antes señaladas, los resultados obtenidos por Sowalsky y Noble (1998), permitieron observar que los ácidos tartárico, málico, cítrico y láctico utilizando una solución modelo y dos dosis de cada ácido (0,45 y 1,0 g L⁻¹), tienen influencia sobre la astringencia pero en función del pH, ya que ni el anión específico ni la concentración del ácido influyen en la intensidad de percepción, a pesar de afectar significativamente la acidez percibida.

Contrariamente, Kallithraka *et al.* (1997a), evaluaron el efecto del ácido málico antes y después de la ingesta de una solución modelo con taninos proantocianidínicos. Estos autores, observaron un aumento significativo de la astringencia cuando la solución de ácido málico fue degustada, después de la solución de taninos, sugiriendo una acción del ácido sobre los complejos tanino-proteína formados en la cavidad bucal, con el consecuente aumento de la precipitación de éstos.

Por otro lado, se ha inferido que las interacciones iónicas parecen ser el mecanismo más probable de las interacciones entre taninos-proteínas, por ende, de la generación de la astringencia. De la misma manera, dado que las proteínas pueden ser desnaturalizadas, perdiendo su conformación habitual a un pH bajo, parece razonable inferir que las funciones lubricantes y protectoras de las proteínas salivales se verían comprometidas con un bajo pH. Por otro lado, algunos autores han propuesto que la acidez podría afectar el caudal y la composición salival, lo que generaría cambios en la capacidad buffer de la saliva y la producción de proteínas salivales, afectando la modulación de la astringencia (Lawless *et al.*, 1996). Esta observación sería corroborada por Davies *et al.* (2009), quienes demostraron que las bebidas ácidas estimulan un mayor porcentaje de flujo salival, en comparación con la estimulación generada por el agua.

Aunque diversos estudios han reportado el efecto de los ácidos orgánicos sobre la interacción tanino-proteína, en la totalidad de ellos se ha empleado como metodología la evaluación sensorial, la cual arroja resultados contradictorios. Así, algunos autores muestran una estrecha relación entre la variación de la percepción de astringencia y la concentración de los ácidos orgánicos (Kallithraka *et al.*, 1997a). Mientras, otros autores observan una tendencia contraria (Lawless *et al.*, 1996; Kallithraka *et al.*, 1997b; Fontoin *et al.* 2008). Actualmente, los ensayos de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa representa una metodología que ha permitido la evaluación expedita, rápida y simple de la interacción tanino-proteína y la utilización de sustratos complejos como la saliva (Obreque-Slier *et al.*, 2010a).

A partir de los antecedentes anteriormente expuestos, se observa que existe limitada referencia sobre comparaciones simultáneas entre diferentes ácidos orgánicos a distintas concentraciones y su efecto sobre la percepción de astringencia. De la misma manera, aunque la concentración de los ácidos orgánicos no tendría efectos directos sobre la astringencia, la sensación ácida favorecería la salivación, generando una mayor producción de proteínas salivales, por ende, una mayor interacción con los taninos. Más aún, el uso de las pruebas de difusión y precipitación en membranas de celulosa, podría ser una importante herramienta para aportar a la discusión del efecto de los ácidos orgánicos sobre la interacción tanino-proteína y consecuentemente sobre la astringencia.

CAPÍTULO II

EFFECTO DE LOS ÁCIDOS ORGÁNICOS SOBRE LA INTERACCIÓN TANINO-PROTEÍNA Y SU RELACIÓN CON LA SENSACIÓN DE ASTRINGENCIA

RESUMEN

La astringencia es una sensación táctil, generada por la reducción de la lubricación en la cavidad bucal y considerada como uno de los aspectos sensoriales más importantes en las características de los vinos. Esta sensación, es generalmente atribuida a la interacción de proantocianidinas o taninos condensados, provenientes principalmente de la semilla, con proteínas salivales y la subsecuente agregación y precipitación de los complejos taninos-proteínas. Se ha observado que diversos factores influyen en la interacción tanino-proteína, tales como pH, alcohol, composición polifenólica y contenido de polisacáridos, entre otros. Un factor escasamente estudiado corresponde al efecto de los ácidos orgánicos sobre la interacción tanino-proteína y consecuentemente sobre la percepción de astringencia.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de diversos ácidos orgánicos sobre la interacción entre proantocianidinas de semilla de *Vitis vinifera* var. Carménère y proteínas salivales y la astringencia percibida por un panel de degustadores. Para ello, el comportamiento de difusión de las proteínas salivales se evaluó mediante el uso de los ensayos de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa. Los ensayos fueron realizados en presencia proantocianidinas provenientes de un extracto de semillas y de ácidos orgánicos (ácido tartárico, málico, cítrico y láctico) de diferentes tipos y concentraciones. Paralelamente, los extractos de semillas en presencia de los distintos ácidos orgánicos fueron evaluados sensorialmente por un panel entrenado.

Se observó que los ácidos orgánicos utilizados interactúan con las proteínas salivales, afectando su interacción con las proantocianidinas de semillas. Este efecto estaría estrechamente relacionado con el tipo y concentración del ácido orgánico. Sensorialmente, la presencia de los distintos ácidos orgánicos afectan la sensación de astringencia, independiente del tipo y concentración del ácido orgánico.

PALABRAS CLAVE

Proantocianidinas, proteína, astringencia, ácidos orgánicos.

ABSTRACT

Astringency is a tactile sensation generated by the reduced lubrication in the buccal cavity and considered one of the most important characteristics of the wine sensory aspects. This sensation is generally attributed to the interaction of proanthocyanidins or condensed tannins, mainly from seed, with salivary proteins and subsequent aggregation and precipitation of tannin-protein complexes. It has been observed that various factors influence the tannin-protein interaction such as, pH, alcohol, phenolic composition and content of polysaccharides, among others. A factor scarcely studied correspond to the effect of organic acids on the tannin-protein interaction and consequently the perception of astringency.

The aim of this study was to evaluate the effect of various organic acids on the interaction between seed proanthocyanidins of *Vitis vinifera* var. Carmenere and salivary proteins and perceived astringency by a panel of tasters. For this, the diffusion behavior of salivary proteins was evaluated using diffusion and precipitation assays on cellulose membranes. The tests were conducted in the presence of proanthocyanidins from seed extract and organic acids (tartaric, malic, citric and lactic acid) of different types and concentrations. Similarly, seed extracts in the presence of various organic acids were evaluated by a trained sensory panel.

It was observed that the organic acids used interact with salivary proteins, affecting its interaction with seed proanthocyanidins. This effect would be closely related to the type and concentration of the organic acid. Sensory, the presence of different organic acids affect astringency sensation, independent of the type and concentration of the organic acid.

KEYWORDS

Proanthocyanidins, protein, astringency, organic acids.

INTRODUCCIÓN

La astringencia es una sensación táctil de rugosidad, sequedad y aspereza, generada en la cavidad bucal debido a la interacción de los compuestos fenólicos presentes en diversos alimentos, bebidas y vegetales, con las proteínas salivales (Horne *et al.*, 2002; Llaudy, 2004; Dinella *et al.*, 2009). En la uva, las proantocianidinas o taninos condensados de las pieles reaccionan con menor intensidad con las proteínas que aquellos que provienen de semillas y tallos (De Freitas and Mateus, 2001; Llaudy, 2004). Asimismo, la afinidad de los polifenoles es mayor con proteínas y polipéptidos de alto contenido de prolina, tales como las proteínas de la saliva. Químicamente, se ha postulado que la sensación de astringencia, está asociada a la unión y subsecuente precipitación de las proteínas salivales al unirse con las proantocianidinas (Kielhorn and Thorgate, 1999; De Freitas and Mateus, 2001).

Se ha observado que la interacción tanino-proteína depende de diversos factores tales como el pH (Kallithraka *et al.*, 1997), contenido de alcohol (Obreque-Slier *et al.*, 2010a), azúcares (Quiang *et al.*, 2006), polisacáridos, minerales, concentración y tamaño de los taninos (Llaudy, 2004), manoproteínas (Guadalupe y Ayestarán, 2008) y ácidos orgánicos (Lawless *et al.*, 1996). El vino tiene principalmente seis ácidos orgánicos, unos provenientes de la uva (esencialmente de la pulpa de las bayas) y otros resultantes de los fenómenos fermentativos y acciones bacterianas (Lawless *et al.*, 1996). En el primer caso, los ácidos orgánicos se forman durante el proceso de maduración natural de la planta (ácido tartárico, málico y cítrico). Por el contrario, los ácidos láctico, succínico y acético son aquellos derivados de los procesos fermentativos y de las acciones bacterianas en el mosto (Lawless *et al.*, 1996).

Los ácidos orgánicos han sido estudiados como factor influyente sobre la interacción tanino-proteína y astringencia. Según Bloudin *et al.* (1979) (citado por Flanzky, 2000), el gusto ácido percibido en el vino, está condicionado por la abundancia de protones, es decir, por la acidez real o pH, siendo los ácidos orgánicos que tienen acción sobre el pH del vino el tartárico, málico, cítrico y láctico.

Diversos estudios han evaluado el efecto de ciertos ácidos orgánicos, sobre la percepción de la astringencia (Lawless *et al.*, 1996; Kallithraka *et al.*, 1997a; Sowalsky y Noble, 1998; Fontoin *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2009). En estas investigaciones, se han utilizado soluciones con polifenoles provenientes de extractos de semillas o taninos comerciales, concentraciones entre 0,25 a 6 mg mL⁻¹ de ácidos orgánicos y diferentes pHs. En general, se deduce que los ácidos orgánicos afectan la percepción de la astringencia en la medida que sea modificado el pH de la solución (Lawless *et al.*, 1996; Sowalsky y Noble, 1998; Davies *et al.*, 2009). Asimismo, a un mismo pH, la concentración de los ácidos orgánicos no tendría efectos directos sobre la astringencia (Kallithraka *et al.*, 1997a; Fontoin *et al.*, 2008) ni tampoco el anión específico (Sowalsky y Noble, 1998).

Diversos estudios han evaluado el impacto de los ácidos orgánicos sobre la astringencia, usando grupos de evaluadores expertos (Lawless *et al.*, 1996; Kallithraka *et al.*, 1997a; Sowalsky y Noble, 1998; Fontoin *et al.*, 2008; Davies *et al.*, 2009). Estos ensayos podrían estar sujetos a cierta subjetividad (Centeno, 2006). Recientemente, se han implementado ensayos de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa, lo cual ha permitido la evaluación expedita, rápida y simple de la interacción tanino-proteína y además la utilización de sustratos proteicos puros como BSA (Obreque-Slier *et al.*, 2010a), complejos como gelatina (Obreque-Slier *et al.*, 2010d) e incluso con sustratos proteicos de alta complejidad como la saliva (López *et al.*, 2007). En todos ellos se ha encontrado asociaciones con la percepción de astringencia.

Considerando las ventajosas características metodológicas de los ensayos de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa, el escaso y controversial conocimiento del efecto de los ácidos orgánicos sobre la interacción entre taninos y las proteínas salivales, se ha propuesto la siguiente hipótesis.

Hipótesis de trabajo

Los ácidos orgánicos de interés enológico aumentan la interacción entre los taninos proantocianidínicos y las proteínas salivales, lo que provoca un aumento en la sensación de astringencia.

Objetivo General

Evaluar el efecto de diferentes ácidos orgánicos de interés enológico sobre la interacción entre taninos proantocianidínicos de semillas con las proteínas salivales y su relación con la sensación de astringencia.

Objetivos Específicos

Evaluar el modo de difusión y precipitación de las proteínas salivales sobre membranas de celulosa, al interactuar con taninos proantocianidínicos en presencia de diferentes concentraciones de cuatro ácidos orgánicos de interés enológico.

Evaluar sensorialmente el efecto de cuatro ácidos orgánicos en presencia de taninos proantocianidínicos sobre la percepción de astringencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de Estudio

Los ensayos de difusión y precipitación se realizaron en el Laboratorio de Biología Supramolecular del Programa de Biología Celular y Molecular-ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Las determinaciones analíticas y los análisis sensoriales fueron realizados en los Laboratorios de Química Enológica, Análisis cromatográfico y Análisis Sensorial del Departamento de Agroindustria y Enología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Materiales

Semillas

Para la preparación del extracto de semilla, se cosecharon bayas del cultivar Carménère con 24 °Brix, en Mayo del 2013 y provenientes de plantas de 10 años de edad, las cuales estaban ubicadas en la Región del Maule (35° 8, 94´ S y 71° 20,73´ O) (Castro, 2009). Las plantas produjeron alrededor de 8000 kg ha⁻¹, estaban cultivadas en sistema de conducción espaldera y con orientación norte-sur. Las semillas fueron extraídas de las bayas de forma manual y posteriormente fueron almacenadas a -4°C, hasta su uso.

Saliva Humana

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

Panel sensorial

Para los análisis sensoriales se utilizó un panel compuesto por 12 evaluadores entrenados en astringencia (Centeno, 2006).

Reactivos químicos

La Seroalbúmina bovina (BSA), Coomassie Blue G250 y ácidos orgánicos [tartárico (W304409), málico (240176), cítrico (251275) y láctico (L1750)], fueron adquiridos en Sigma Aldrich (San Louis, Missouri, EEUU). Se utilizaron pliegos de membrana de celulosa Whatman #1, comercializadas por la empresa Whatman Limitada (Maidstone, Inglaterra). Los solventes grado pro-análisis y HPLC, y la solución amortiguadora de Fosfato de sodio a pH 4 y pH 7 requeridos para el ensayo de difusión de membranas y los análisis preliminares se obtuvieron en Merck S.A. (Santiago, Chile).

Equipos instrumentales

Los equipos utilizados fueron: centrífuga 75008151 Labofuge Heraeus 400; bomba de vacío Thomas modelo N° 2522C-D2; agitador marca Barnstead/Lab-line®; rotavapor modelo R-210, marca Buchi®; espectrofotómetro UV-VIS de doble haz, modelo PharmaSpec UV-1700 marca Shimadzu®; microcentrífuga modelo MC-12 V marca Sorvall® y un agitador Vortex-Genie modelo K-550. Para ajustar el pH se utilizó un pH-metro de sobremesa modelo PL-700PV marca Lab-Tec®, con un electrodo de vidrio.

Para el análisis de fenoles de bajo peso molecular, se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, acoplada 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). Para la realización del fraccionamiento de flavanoles se emplearon cartuchos Sep-Pak Plus tC 18 (Waters, Irlanda).

Métodos

Tratamientos y Diseño experimental

Se realizaron tres ensayos independientes (Cuadro 1). El primero, correspondió al ensayo de difusión y precipitación con mezclas de 100 μL de saliva, 800 μL de extracto de taninos proantocianidínicos en presencia de las distintas concentraciones de los diferentes ácidos orgánicos (0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 - 2,0 - 3,0 y 4,0 mg mL^{-1} de ácidos tartárico, málico, cítrico y ácido láctico).

En el segundo ensayo, se mantuvieron las condiciones anteriormente descritas, reemplazando la saliva por BSA. Las mezclas de proteína (BSA o saliva)-proantocianidinas en presencia de los distintos ácidos orgánicos, fueron ajustadas a un pH de 3.5. En ambos ensayos, los testigos correspondieron a las mezclas entre saliva o BSA (100 μL) y 800 μL de extracto de taninos proantocianidínicos, en ausencia de los ácidos orgánicos.

El tercer ensayo, correspondió a las muestras evaluadas por un panel sensorial entrenado en astringencia.

Para el primer y segundo ensayo la unidad experimental correspondió a las diferentes mezclas entre el extracto de taninos proantocianidínicos en presencia de una concentración de ácido orgánico y saliva o BSA, respectivamente. En cuanto al tercer ensayo, la unidad experimental correspondió a 8 mL del extracto de taninos proantocianidínicos en presencia de una concentración de ácido orgánico (0 - 0,6 - 1,0 - 4,0 mg mL^{-1}) contenidos en una copa de vidrio transparente.

Cuadro 1. Tratamientos y Diseño de experimentos

Ensayo	Descripción	Diseño experimental	Tratamientos y repeticiones	Unidad experimental	
1	Efecto de ácidos orgánicos sobre la difusión y precipitación del complejo tanino-proteínas salivales	Factorial completamente al azar.	4x9	AO*-STH-T con 3 repeticiones por tratamiento	15 μ L de mezcla
2	Efecto de ácidos orgánicos sobre la difusión y precipitación del complejo tanino-BSA	Factorial completamente al azar.	4x9	AO*-BSA-T con 3 repeticiones por tratamiento	15 μ L de mezcla
3	Evaluación de percepción de astringencia	Factorial completamente al azar.	4x4	AO**-STH-T con 12 repeticiones por tratamiento	8 mL de solución modelo

*AO, ácido orgánico (tartárico, málico, cítrico o láctico); STH, saliva total humana; T, extracto taninos proantocianidínicos. * Corresponde a 0 - 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1,0 - 2,0 - 3,0 - 4,0 mg mL⁻¹ de ácido orgánico. ** Corresponde a 0 - 0,6 - 1,0 y 4,0 mg mL⁻¹ de ácido orgánico.

Procedimientos

Caracterización del extracto de semilla. El extracto de taninos de semillas fue caracterizado química y físicamente, según los análisis del Cuadro 2.

Preparación de Seroalbúmina Bovina (BSA). Para preparar una solución de 1 mg mL⁻¹ de BSA, 100 mg de BSA se disolvieron en 50 mL de agua destilada a 35-40 °C con agitación constante durante 24 horas. Luego, se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos y filtró a través de una membrana de 0,45 μ m. La absorbancia a 280 nm de la solución final se ajustó a 0,70 con agua destilada.

Cuadro 2. Resumen de las determinaciones analíticas aplicadas

Análisis	Método	Extracto taninos	Extracto taninos-ácido orgánico
Fenoles totales	Espectrofotometría a 280 nm (García Barceló, 1990)	x	
Taninos totales	Método Metilcelulosa (López <i>et al.</i> , 2007)	x	
Fraccionamiento de taninos	Separación en columnas y posterior reacción con vainillina en medio ácido (Sun <i>et al.</i> , 1998)	x	
Fenoles de bajo peso molecular	HPLC-DAD (Obreque-Slier <i>et al.</i> , 2010c)	x	
Acidez total	Titulación con NaOH 0,1N en presencia de fenoltaleína (Jaramillo, 2002)		x

Obtención de saliva. La saliva fue colectada antes de cada experimento entre 9:00 y 12:00 hrs. con el propósito de minimizar las variaciones diurnas de la composición salival (Sarni-Machado *et al.*, 2008). La saliva fue acumulada en la boca durante 1 minuto y expectorada en un contenedor de vidrio esterilizado, la cual fue mantenida en hielo durante el experimento, por un tiempo máximo de 20 min (Obreque-Slier *et al.*, 2010b). Luego de preparados los extractos de taninos proantocianidínicos con los diferentes ácidos orgánicos, se mezclaron con saliva o BSA y se evaluó la interacción mediante ensayos de difusión y precipitación en membrana de celulosa, a través de la metodología propuesta por Obreque-Slier *et al.* (2010a).

Tinción de proteínas sobre membranas de celulosa. De acuerdo a la metodología propuesta por Obreque-Slier *et al.* (2010b), alícuotas de las muestras de proteínas (saliva o BSA) fueron depositadas sobre membranas de celulosa. Una vez depositadas las muestras, las láminas de celulosa fueron secadas a temperatura 20°C y sumergidas en ácido tricloracético 5% por 5 minutos para fijar las proteínas. Posteriormente, las membranas fueron lavadas en etanol 80% por 5 minutos y teñidas en Coomassie Blue G250 0,025% durante 10 minutos con agitación mecánica constante. Luego, se realizaron dos lavados consecutivos de las láminas con ácido acético 7%. Finalmente, las membranas fueron sometidas a dos lavados con agua destilada y secadas a 20 °C. Cada zona teñida azul en el sitio de colocación de las muestras representó el área de distribución de la proteína (Obreque-Slier *et al.*, 2010a).

Preparación del extracto de taninos proantocianidínicos. Las semillas se separaron de las bayas, se lavaron con agua destilada y se secaron con papel absorbente. Así, 10 g de semillas se molieron con un mortero y se mezclaron con 500 mL de agua destilada. La mezcla ajustada a pH 3,5 se agitó durante 2 horas, se centrifugó a 3500 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,45 µm. El extracto de semillas se diluyó en agua (1:4), para evitar el efecto mordiente de las proantocianidinas en la membrana de celulosa (Obreque-Slier *et al.*, 2010a).

A un volumen de 20 mL del extracto de taninos proantocianidínicos se le adicionó una cantidad definida de los distintos ácidos orgánicos. Luego, a cada una de estas mezclas se les ajustó el pH a 3.5 con una solución de NaOH 0,1N. Los extractos fueron almacenados a 20 °C, hasta su uso posterior.

Evaluación de la interacción tanino-proteína mediante ensayos de difusión y precipitación. En la *prueba de difusión*, se mezclaron saliva o BSA con extracto de taninos en presencia de los ácidos orgánicos. Luego, cada mezcla fue agitada por 30 segundos y dejadas en reposo por 5 minutos, como se señala en la Figura 1A. Las membranas de celulosa fueron sujetadas a un soporte en posición horizontal (Figura 1B) y 15 μ L de cada mezcla fue depositada en un punto previamente establecido sobre el papel de celulosa (Figura 1C). Cada muestra difundió libremente en forma radial sobre el papel. Una vez colocadas todas las muestras, el papel fue secado a temperatura ambiente y procesado de acuerdo a lo descrito previamente (López *et al.*, 2007; Obreque-Slier *et al.*, 2010a; Obreque-Slier *et al.*, 2010b; Obreque-Slier *et al.*, 2010c).

En la *prueba de precipitación*, los tubos Eppendorf, con las mezclas utilizadas en el ensayo de difusión, se centrifugaron a 3000 rpm por 5 minutos. A partir de cada sobrenadante, se cargaron alícuotas de 15 μ L sobre una membrana de celulosa, la que fue procesada de acuerdo al procedimiento descrito en el ensayo de difusión (Figura 1A). Esta observación se completó mediante la inspección visual del precipitado en los tubos (Obreque-Slier *et al.*, 2010b).

Una vez realizado los ensayos, las membranas teñidas se escanearon para su análisis. Las imágenes digitalizadas fueron sometidas a análisis morfométricos mediante el software Image-J. Se cuantificó el área (cm^2) e intensidad (píxeles cm^{-2}) de las zonas de difusión de la proteína sobre la membrana de celulosa (Meza, 2012).

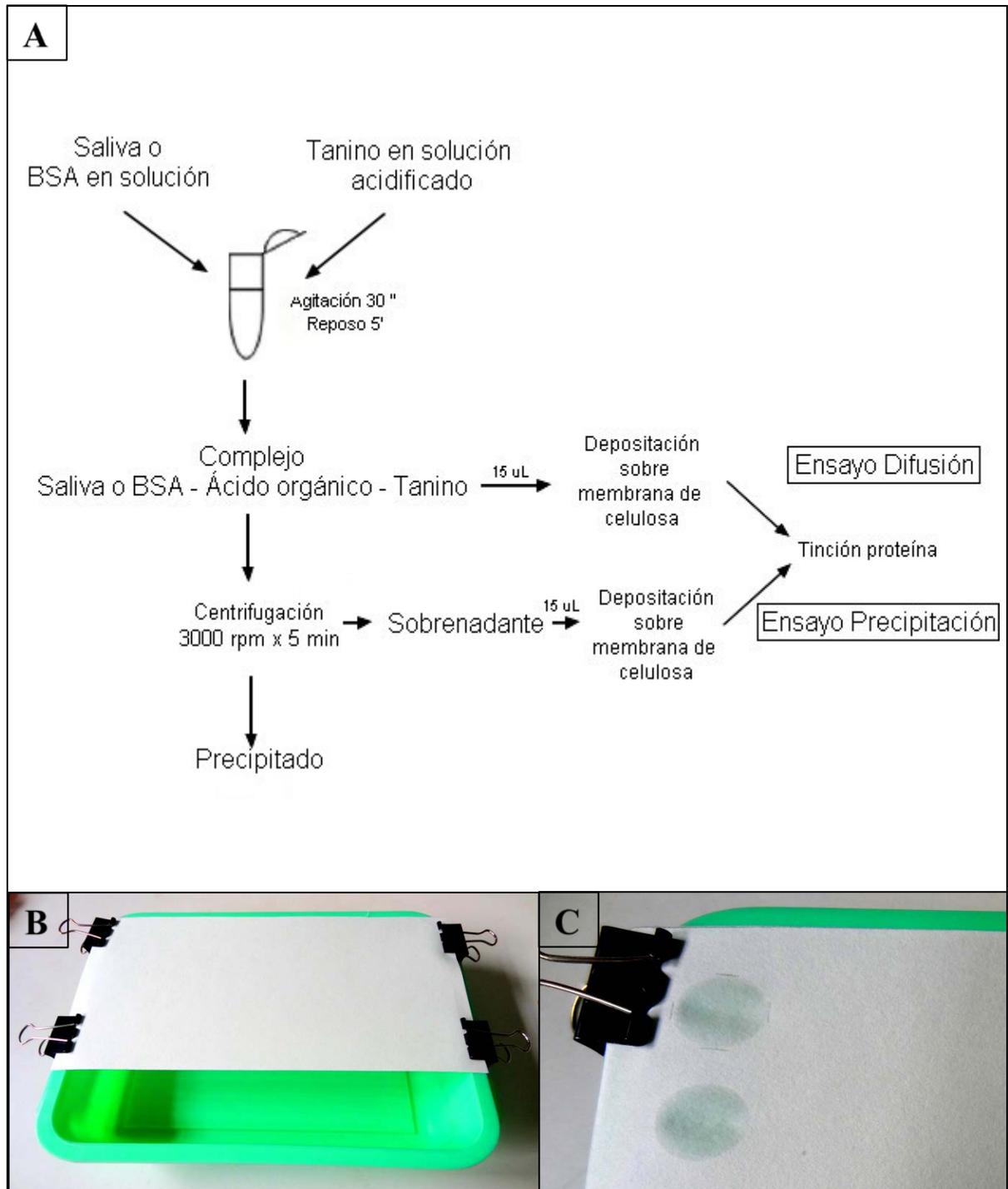


Figura 1. (A) Protocolo de ensayos de difusión y de precipitación en membranas de celulosa. (B) Superficie de celulosa disponible para cargar alícuotas, sostenida en posición horizontal. (C) Alícuotas cargadas en la membrana de celulosa. Se observan spots húmedos y la marca de grafito señalando el límite de la difusión.

Análisis Sensorial. Un total de 12 personas fueron seleccionadas y entrenadas para la evaluación sensorial de los parámetros de acidez y astringencia en tres sesiones. El grupo estuvo conformado por 7 hombres y 5 mujeres en un rango de edad entre 23 y 53 años. El entrenamiento consistió en el reconocimiento de soluciones estándares astringentes y ácidas, y en el ordenamiento de intensidades en soluciones acuosas (soluciones modelo) utilizando el Test de Intensidad (Anexo I) y el Test de Ranking (Anexo II). Sumado a esto, los panelistas debieron reconocer el tipo de ácido para luego describir la percepción de la solución. Luego de esto, 750 mL del extracto de taninos de semillas fue mezclado con 750 mL de agua destilada y se mezclaron con las distintas concentraciones de los ácidos orgánicos. Los matraces se sometieron a agitación constante y se ajustó el pH a 3.5. La preparación se realizó horas previas a la evaluación.

En una sesión, los 12 evaluadores degustaron 8 mL de cada mezcla del extracto de taninos proantocianidínicos con los diferentes ácidos orgánicos. Las muestras y el testigo (correspondiente al extracto de taninos proantocianidínicos en ausencia de ácido orgánico) fueron entregadas en forma randomizada en vasos de vidrio y con una temperatura ambiente de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Llaudy *et al.*, 2004). Para la evaluación, los panelistas mantuvieron la muestra en la boca durante 10 segundos, para luego eliminarla. Entre cada muestra los panelistas se enjuagaron la boca con 15 mL de una solución de 1 g L^{-1} de pectina durante 20 segundos. Mediante una pauta descriptiva no estructurada (Anexo III), con escala de 0-15 cm, el evaluador debió señalar la intensidad de astringencia percibida, donde cero indicaba la nula y quince la máxima sensación de astringencia.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los distintos ensayos de difusión, precipitación y evaluación sensorial fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA) al 5% de confianza. En caso de encontrarse diferencias significativas se compararon las medias mediante la prueba de Rango Múltiple de Tukey. Estos análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Infostat, mientras que los gráficos mediante el software SigmaPlot.

RESULTADOS

Caracterización del extracto de semilla

El Cuadro 3, muestra la composición fenólica del extracto de semillas 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).

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

Compuestos fenólicos	Concentración mg g⁻¹
Fenoles totales ^a	16,1
Taninos totales ^b	2,1
Ácido gálico ^c	0,080
(+)-Catequina ^d	0,103
(-)-Epicatequina ^e	0,152
Proantocianidina B1 ^d	0,008
Proantocianidina B2 ^d	0,027
Proantocianidina B3 ^d	0,010
Proantocianidina B4 ^d	0,011
Otras Proantocianidinas ^d	0,070
Galatos de Proantocianidina ^c	0,023
Monómeros ^f	0,57
Oligómeros ^f	1,85
Polímeros ^f	1,70

^a mg de ácido gálico g⁻¹ de semilla; ^b mg de catequina g⁻¹ de semilla; ^c mg de ácido gálico g⁻¹ de semilla; ^d mg de catequina g⁻¹ de semilla; ^e mg de epicatequina g⁻¹ de semilla; ^f mg fracción g⁻¹ de semilla.

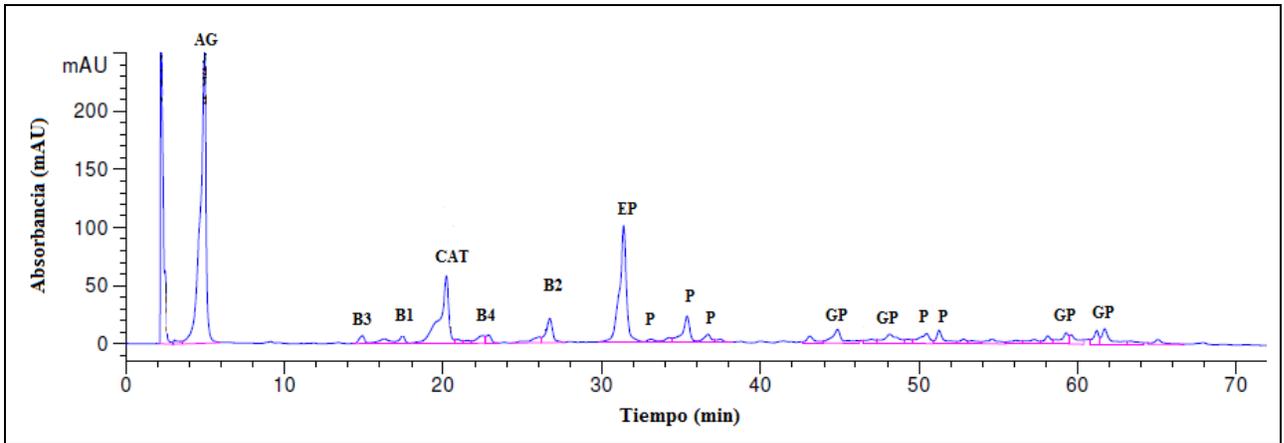


Figura 2. Cromatograma representativo (280 nm) de compuestos fenólicos de bajo peso molecular del extracto de semilla de la variedad Carménère. CAT: catequina; EP: epicatequina; B1, B2, B3 y B4: proantocianidinas diméricas; GP: galatos de proantocianidinas; P: diversas proantocianidinas; AG: ácido gálico.

Se observó que los polifenoles de bajo peso molecular más abundantes fueron (+)-catequina y (-)-epicatequina, mientras que las proantocianidinas B3 y B4 presentaron las menores concentraciones. El Cuadro 3, muestra que la fracción oligomérica fue la más abundante con un 44,9 %, luego la fracción polimérica con un 41,3% y finalmente la fracción monomérica con un 13,8%.

Difusión de los ácidos orgánicos en membranas de celulosa

En este ensayo se utilizaron cuatro ácidos orgánicos (tartárico, málico, cítrico y láctico) en distintas concentraciones (1, 2, 3 y 4 mg mL⁻¹). Alícuotas de 15 µL de cada una de estas soluciones se colocaron sobre membranas de celulosa, las cuales fueron procesadas según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos. En la Figura 3, se observa que ninguno de las soluciones de ácidos orgánicos presentó una tinción con el colorante Coomassie Blue G250 sobre la membrana de celulosa.

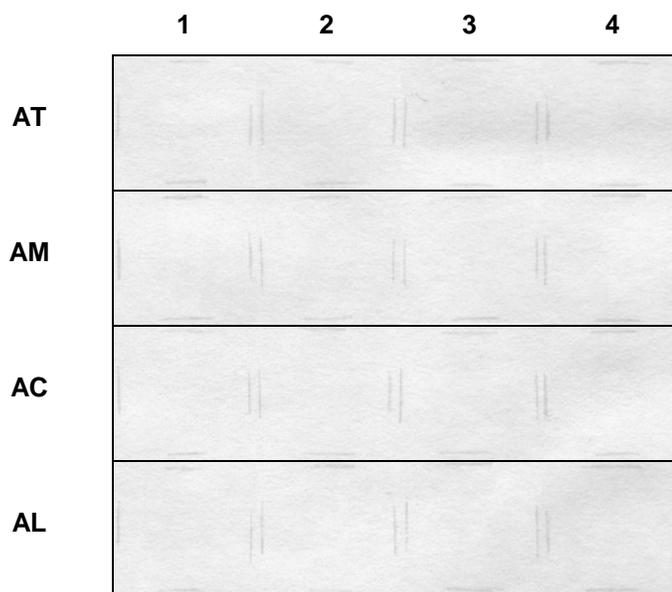


Figura 3. Ensayo de reactividad de ácidos orgánicos sobre membranas de celulosa (AT, ácido tartárico; AM, ácido málico; AC, ácido cítrico y AL, ácido láctico). Quince µL de cada ácido orgánico en una concentración determinada (1, 2, 3 o 4 mg mL⁻¹) fueron depositados, fijados y teñidos sobre una membrana de celulosa.

Difusión y precipitación de las proantocianidinas en presencia de ácido orgánico

En el ensayo se evaluó la difusibilidad y precipitabilidad sobre membranas de celulosa de las proantocianidinas mezcladas con distintos ácidos orgánicos a diferentes concentraciones (0,2 - 4,0 mg mL⁻¹). Además, a los distintos extractos se les midió la acidez de titulación, observando que a medida que aumentó el contenido de ácido orgánico se incrementó el valor de la acidez de titulación (Cuadro 4).

Se observó que la muestra T_{3.5} (extracto de proantocianidinas en agua destilada a pH 3.5 en ausencia de ácido orgánico), muestra una alteración de su área e intensidad de difusión cuando el pH decrece de 6.0 a 3.5 (T *versus* T_{3.5}). Del mismo modo, la totalidad de las muestras fueron teñidas por el colorante de proteínas sobre el papel de celulosa independiente de la concentración y tipo de ácido orgánico (Ensayo de difusión, Figura 4A).

Luego de centrifugar las mezclas del ensayo de difusibilidad, 15 µL de los sobrenadantes fueron colocados sobre las membranas de celulosa (Ensayo de precipitación, Figura 4B). No se observaron diferencias significativas en el área (datos no mostrados) e intensidad de tinción entre las distintas muestras (Cuadro 5). Asimismo, no se observaron precipitados en los tubos Eppendorf de los distintos tratamientos (datos no mostrados). Finalmente, se percibió una disminución de la intensidad de tinción en las muestras sometidas al ensayo de precipitaciones comparadas con el ensayo de difusión (Figura 4).

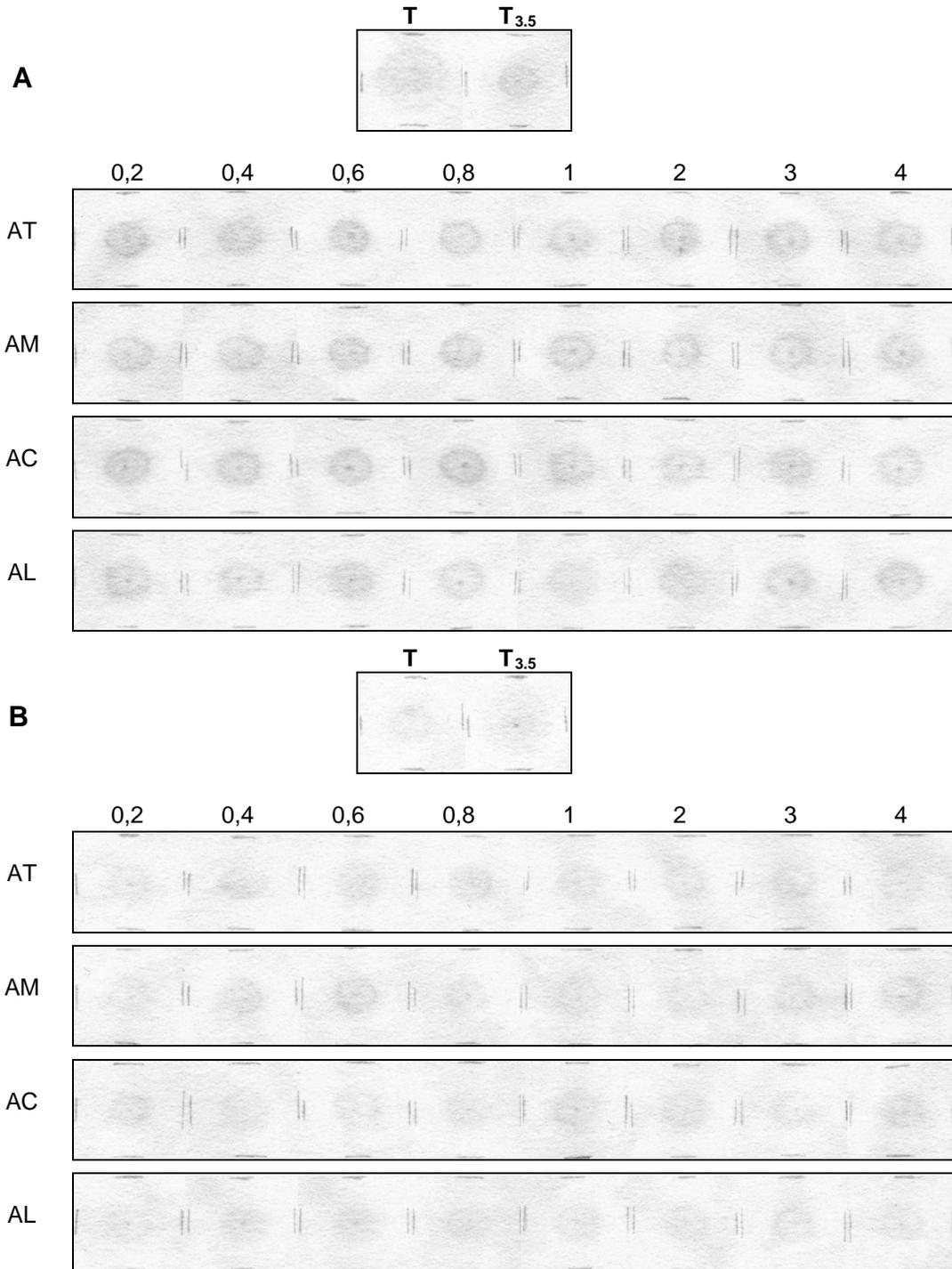


Figura 4. Difusión de proantocianidinas en presencia de distintos ácidos orgánicos. Prueba de difusión (A) y precipitación (B). Quince μL del extracto de proantocianidinas en presencia de distintas concentraciones ($0,2 - 4,0 \text{ mg mL}^{-1}$) de ácidos orgánicos (AT, ácido tartárico; AM, ácido málico; AC, ácido cítrico; AL, ácido láctico) fueron depositados, fijados y teñidos sobre una membrana de celulosa. T, proantocianidinas en agua destilada a pH 6.0. T_{3.5}, proantocianidinas en agua destilada a pH 3.5 en ausencia de ácido orgánico.

Cuadro 4. Acidez de titulación ($\text{g L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$) de las mezclas ácido orgánico-proantocianidinas

	Á. Tartárico	Á. Máfico	Á. Cítrico	Á. Láctico
(mg mL^{-1})				
0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
0,4	0,2	0,2	0,3	0,3
0,6	0,2	0,3	0,3	0,3
0,8	0,3	0,2	0,5	0,4
1	0,4	0,5	0,8	0,6
2	0,7	0,9	1,2	0,9
3	1,2	1,4	1,8	1,4
4	1,9	2,0	2,1	1,9

Cuadro 5. Intensidades de tinción de proantocianidinas en presencia de ácido orgánico (Figura 4)

mg mL^{-1}	Intensidad de Difusión (píxeles cm^{-2})			
	AT-T	AM-T	AC-T	AL-T
0	6,1 \pm 0,0 Aa	6,1 \pm 0,0 Aa	6,1 \pm 0,0 Aa	6,1 \pm 0,0 Aa
0,2	6,7 \pm 0,4 Aa	6,7 \pm 1,1 Aa	6,7 \pm 4,2 Aa	7,0 \pm 0,4 Aa
0,4	6,7 \pm 0,7 Aa	6,8 \pm 0,1 Aa	6,8 \pm 0,9 Aa	6,8 \pm 0,9 Aa
0,6	6,8 \pm 0,8 Aa	6,8 \pm 0,3 Aa	6,6 \pm 0,6 Aa	6,6 \pm 0,6 Aa
0,8	6,8 \pm 0,3 Aa	6,6 \pm 0,2 Aa	6,7 \pm 0,2 Aa	6,7 \pm 0,2 Aa
1	6,7 \pm 0,5 Aa	6,7 \pm 0,6 Aa	6,8 \pm 0,5 Aa	7,1 \pm 0,7 Aa
2	6,8 \pm 0,7 Aa	6,5 \pm 0,5 Aa	6,6 \pm 0,4 Aa	6,6 \pm 0,5 Aa
3	6,8 \pm 0,5 Aa	7,0 \pm 0,7 Aa	6,6 \pm 0,4 Aa	6,9 \pm 0,4 Aa
4	6,7 \pm 0,9 Aa	6,7 \pm 0,3 Aa	6,9 \pm 0,7 Aa	6,8 \pm 1,6 Aa
mg mL^{-1}	Intensidad de Precipitación (píxeles cm^{-2})			
	AT-T	AM-T	AC-T	AL-T
0	2,5 \pm 0,0 Aa	2,5 \pm 0,0 Aa	2,5 \pm 0,0 Aa	2,5 \pm 0,0 Aa
0,2	3,1 \pm 0,9 Aa	3,2 \pm 0,7 Aa	2,8 \pm 0,3 Aa	2,8 \pm 0,3 Aa
0,4	3,3 \pm 0,2 Aa	3,1 \pm 0,1 Aa	3,3 \pm 0,6 Aa	3,3 \pm 0,6 Aa
0,6	3,3 \pm 0,4 Aa	3,3 \pm 0,3 Aa	3,5 \pm 0,1 Aa	3,5 \pm 0,1 Aa
0,8	3,0 \pm 0,3 Aa	3,4 \pm 0,6 Aa	2,8 \pm 0,3 Aa	2,8 \pm 0,3 Aa
1	3,1 \pm 0,4 Aa	3,4 \pm 1,2 Aa	3,3 \pm 0,6 Aa	3,4 \pm 0,3 Aa
2	3,1 \pm 0,0 Aa	3,2 \pm 0,1 Aa	3,4 \pm 0,2 Aa	3,1 \pm 0,8 Aa
3	3,1 \pm 0,3 Aa	3,2 \pm 0,9 Aa	3,1 \pm 2,9 Aa	3,2 \pm 0,3 Aa
4	3,1 \pm 0,4 Aa	3,3 \pm 0,6 Aa	3,1 \pm 0,6 Aa	3,3 \pm 0,4 Aa

Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar. Letras mayúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas concentraciones de ácido. Letras minúsculas en las filas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tipos de ácido.

Difusión y precipitación de BSA en presencia de ácido orgánico

Una alícuota de 15 μL de BSA (1 mg mL^{-1}) (BSA, Figura 5) fue depositada en una membrana de celulosa, la que fue procesada según lo descrito previamente. Se observó un modo monofásico de difusión, con una distribución de la fracción proteica homogénea, sin agregaciones ni retención por parte de la celulosa o interferencia de la difusión. Similar tendencia se percibió al diluir BSA en agua destilada (1:8), a excepción de una disminución en el área e intensidad de difusión de BSA (BSA- H_2O , Figura 5A). Sin embargo, al disminuir el pH desde 6.7 a 3.5 de la muestra de BSA- H_2O , se produjo una restricción en el área de difusión y un aumento en la intensidad de coloración (BSA- $\text{H}_2\text{O}_{3.5}$, Figura 5A).

Al evaluar la difusión de BSA en presencia de distintos ácidos orgánicos, se observó que la presencia de cualquier tipo de ácido orgánico aumentó la intensidad del área de difusión. No obstante, no se observaron diferencias en la intensidad y área de difusión al usar distintas concentraciones y tipos de ácidos orgánicos (Ensayo de difusión, Figura 5A y Cuadro 6).

A continuación, los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos y 15 μL de los sobrenadantes fueron depositados sobre las membranas de celulosa (Ensayo de precipitación, Figura 5B). En general, se apreció un efecto similar a lo observado en el ensayo de difusión (Cuadro 6).

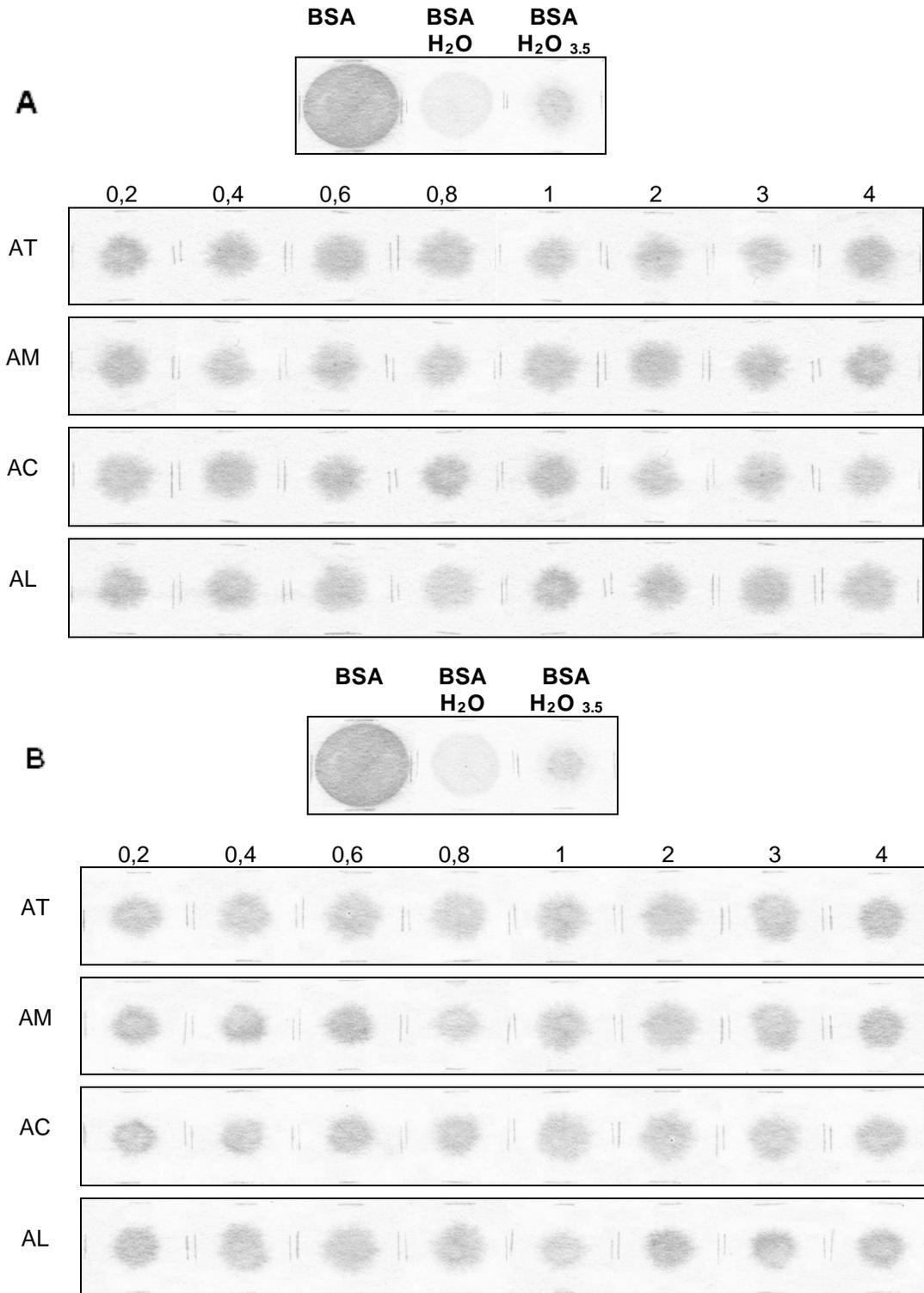


Figura 5. Difusión de BSA en presencia de distintos ácidos orgánicos. Prueba de difusión (A) y precipitación (B). 800 μ L de las distintos ácidos orgánicos (AT, ácido tartárico; AM, ácido málico; AC, ácido cítrico; AL, ácido láctico) fueron mezclados con 100 μ L de BSA. BSA-H₂O, proteína diluida en agua destilada. BSA-H₂O_{3.5}, proteína diluida en agua destilada ajustada a pH 3.5 y en ausencia de orgánico.

Cuadro 6. Intensidades de tinción de BSA en presencia de los distintos ácidos orgánicos (Figura 5)

Intensidad de Difusión (píxeles cm⁻²)				
mg mL⁻¹	AT-T	AM-T	AC-T	AL-T
0	7,8 ± 0,2 Aa	7,8 ± 0,2 Aa	7,8 ± 0,2 Aa	7,8 ± 0,2 Aa
0,2	12,0 ± 0,8 Ba	12,1 ± 0,9 Ba	11,8 ± 0,3 Ba	11,7 ± 2,1 Ba
0,4	10,9 ± 0,7 Ba	10,5 ± 0,9 Aba	11,0 ± 0,4 Ba	12,0 ± 1,0 Ba
0,6	11,5 ± 0,2 Bab	11,7 ± 1,1 Bab	10,1 ± 0,3 Ba	12,5 ± 1,4 Bb
0,8	11,3 ± 0,1 Ba	10,1 ± 0,6 ABa	11,7 ± 1,4 Ba	12,0 ± 0,8 Ba
1	11,7 ± 2,1 Ba	12,0 ± 0,9 Ba	12,0 ± 0,8 Ba	10,9 ± 0,7 ABa
2	11,5 ± 0,4 Ba	11,1 ± 2,0 Ba	10,9 ± 0,7 Ba	11,7 ± 2,1 Ba
3	12,0 ± 0,9 Ba	12,2 ± 0,8 Ba	11,1 ± 2,0 Ba	12,0 ± 0,8 Ba
4	11,6 ± 0,5 Ba	10,6 ± 1,7 ABa	12,2 ± 0,8 Ba	10,9 ± 0,7 ABa
Intensidad de Precipitación (píxeles cm⁻²)				
mg mL⁻¹	AT-T	AM-T	AC-T	AL-T
0	6,7 ± 0,2 Aa	6,7 ± 0,2 Aa	6,7 ± 0,2 Aa	6,7 ± 0,2 Aa
0,2	12,0 ± 1,6 Ba	12,0 ± 0,4 Ca	11,7 ± 0,0 Ba	12,5 ± 0,4 Ba
0,4	11,4 ± 0,3 Bab	12,0 ± 1,2 Cbc	10,8 ± 0,1 Ba	13,0 ± 0,5 Bc
0,6	10,2 ± 0,3 Ba	10,8 ± 1,3 BCa	10,4 ± 0,6 Ba	12,3 ± 2,1 Ba
0,8	10,2 ± 0,4 Ba	9,7 ± 0,6 Ba	11,1 ± 0,7 Ba	9,6 ± 2,3 ABa
1	10,8 ± 0,1 Ba	12,0 ± 1,6 Ca	12,3 ± 1,4 Ba	10,4 ± 0,6 Ba
2	12,0 ± 1,6 Ba	10,8 ± 0,1 BCa	12,0 ± 1,6 Ba	12,0 ± 1,6 Ba
3	10,8 ± 1,1 Ba	10,4 ± 0,6 BCa	11,4 ± 0,3 Ba	12,0 ± 1,6 Ba
4	10,4 ± 0,6 Ba	11,4 ± 0,3 BCa	12,0 ± 1,6 Ba	10,8 ± 0,1 Ba

Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar. Letras mayúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas concentraciones de ácido. Letras minúsculas en las filas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tipos de ácido.

Difusión y precipitación del complejo BSA-proantocianidinas en presencia de ácido orgánico

En la Figura 6, se observa que al mezclar el extracto de semillas con BSA, la intensidad del área de difusión de la proteína se intensifica con respecto al control (BSA-H₂O *versus* BSA-T). Sin embargo, al disminuir el pH de la mezcla de 6.4 a 3.5, el área de difusión disminuye drásticamente (BSA-T *versus* BSA-T_{3.5}, Figura 6). Asimismo, al colocar una alícuota de la mezcla del extracto de proantocianidinas y BSA en presencia de los distintos ácidos orgánicos sobre la membrana de celulosa (Figura 6), se apreció que la proteína difundió de manera similar que la mezcla BSA-proantocianidinas en ausencia de ácido orgánico (BSA-T_{3.5}, Figura 6). Asimismo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el área e intensidad de tinción entre las muestras y el control (Cuadro 7).

Por otro lado, al centrifugar las muestras del ensayo de difusión, se observó una desaparición completa de las proteínas del sobrenadante (Figura 7). Asimismo, la presencia de los ácidos orgánicos en la mezcla no provocó cambios en el área e intensidad de difusión comparados con el control (BSA-T_{3.5}). No obstante, un aumento significativo de la intensidad de tinción se produjo con concentraciones bajas de los ácidos (0,2 y 0,4 mg mL⁻¹) (Cuadro 7).

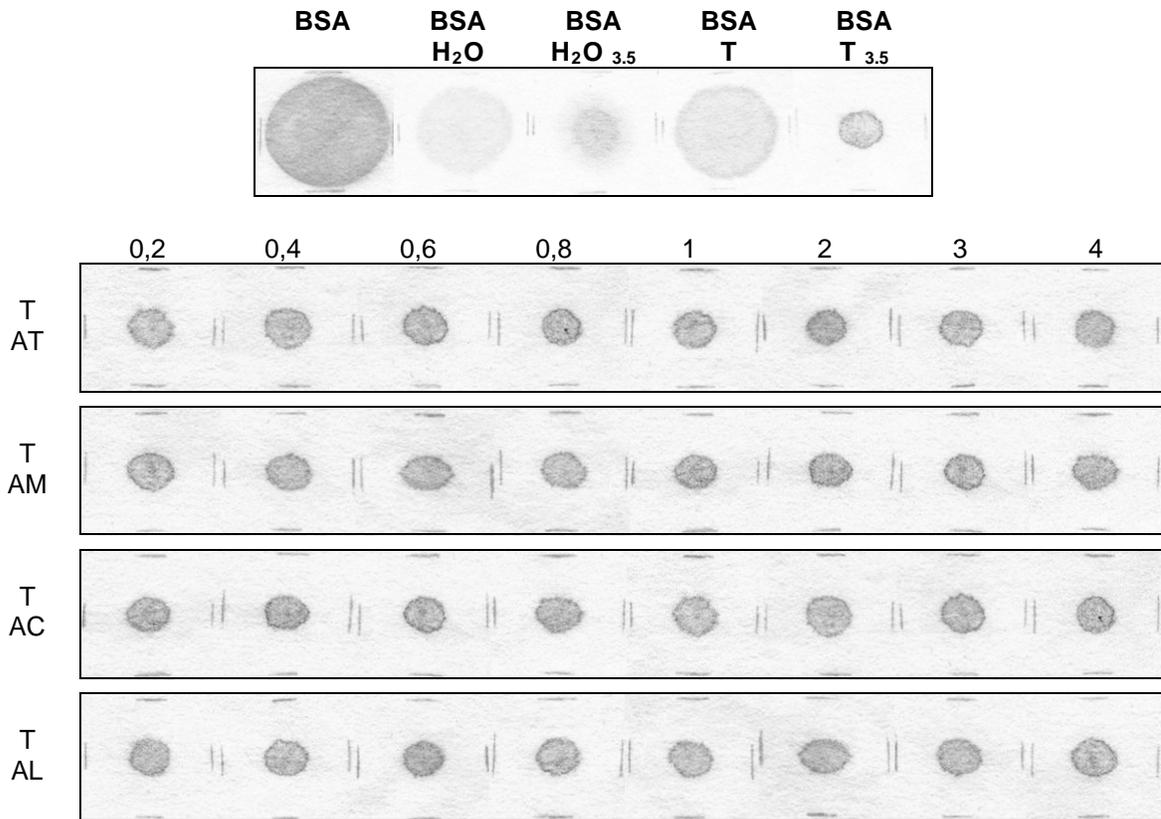


Figura 6. Prueba de difusión de BSA en presencia de proantocianidinas-ácido orgánico. Ochocientos μL de la solución ácido orgánico-proantocianidinas fueron mezclados con $100 \mu\text{L}$ de seroalbúmina bovina. AT, ácido tartárico; AM, ácido málico; AC, ácido cítrico y AL, ácido láctico en distintas concentraciones ($0,2 - 4,0 \text{ mg ml}^{-1}$). BSA- H_2O , proteína diluida en agua destilada a pH 6.4. BSA- $\text{H}_2\text{O}_{3.5}$, proteína con agua destilada a pH 3.5. BSA-T proteína mezclada con proantocianidinas, BSA-T_{3.5}, seroalbúmina bovina mezclada con proantocianidinas a pH 3.5 en ausencia de ácido orgánico.

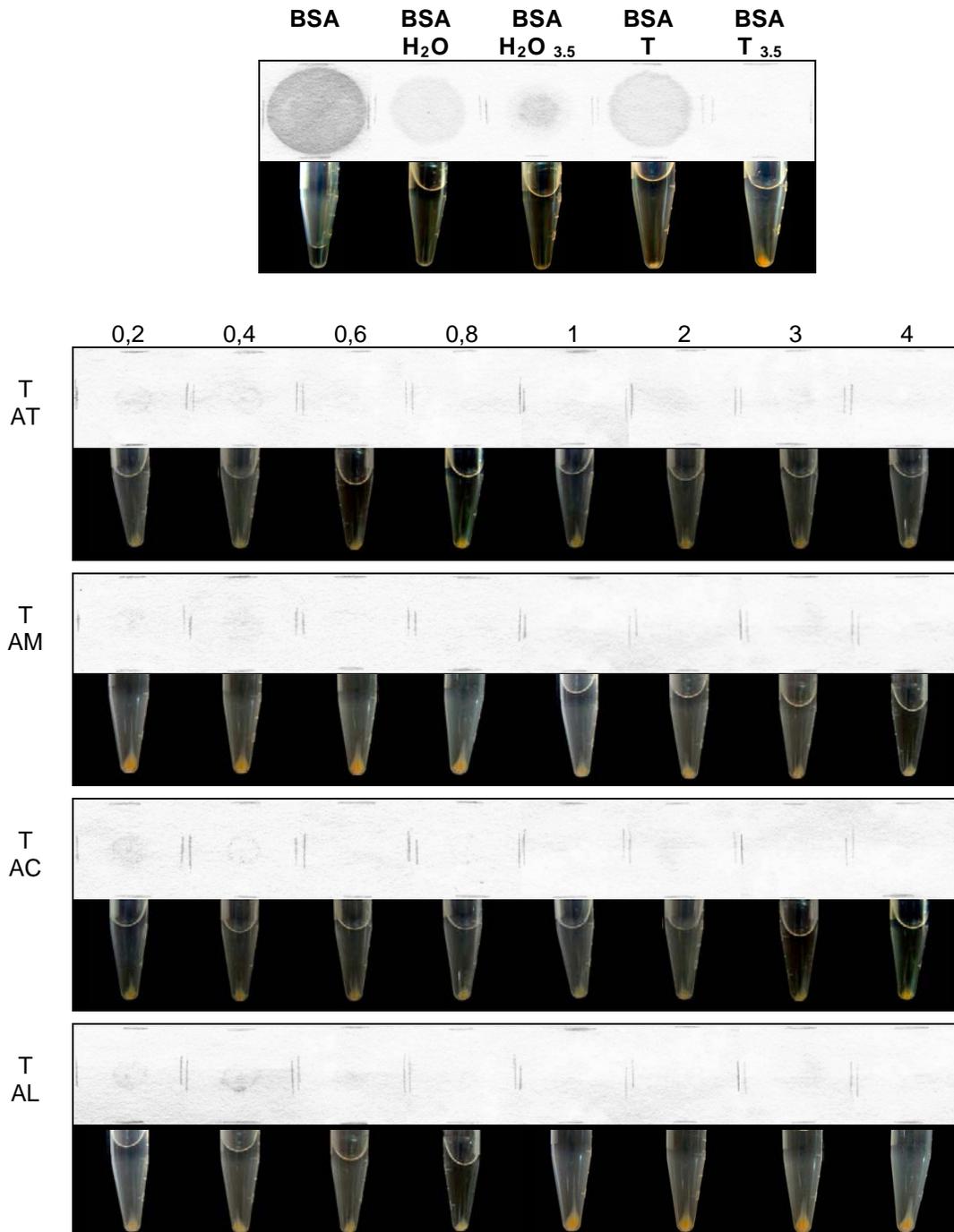


Figura 7. Prueba de precipitación de BSA en presencia de proantocianidinas-ácido orgánico. Ochocientos μL de la solución ácido orgánico-proantocianidinas fueron mezclados con 100 μL de seroalbúmina bovina. BSA-H₂O, proteína diluida en agua destilada. BSA-H₂O_{3.5}, proteína mezclada con agua destilada a pH 3.5. BSA-T, proteína mezclada con proantocianidinas. BSA-T_{3.5}, seroalbúmina bovina mezclada con proantocianidinas a pH 3.5 en ausencia de ácido orgánico.

Cuadro 7. Áreas e Intensidades de tinción de BSA en presencia de ácido orgánico-proantocianidinas (Figura 6 y 7)

Área de Difusión (cm²)				
mg mL⁻¹	BSA-AT-T	BSA-AM-T	BSA-AC-T	BSA-AL-T
0	0,3 ± 0,0 Aa			
0,2	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,4 ± 0,1 Aab	0,3 ± 0,0 Aa
0,4	0,3 ± 0,1 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,1 Aa	0,3 ± 0,1 Aa
0,6	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,1 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa
0,8	0,4 ± 0,1 Aa	0,3 ± 0,1 Aa	0,4 ± 0,1 Aa	0,4 ± 0,0 Aa
1	0,3 ± 0,1 Aa	0,3 ± 0,1 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa
2	0,3 ± 0,1 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa
3	0,3 ± 0,1 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa
4	0,3 ± 0,0 Aa			
Intensidad de Difusión (píxeles cm⁻²)				
mg mL⁻¹	BSA-AT-T	BSA-AM-T	BSA-AC-T	BSA-AL-T
0	20,6 ± 0,3 Aa			
0,2	21,9 ± 1,5 Aa	20,3 ± 1,0 Aa	20,1 ± 2,4 Aa	20,6 ± 1,4 Aa
0,4	20,9 ± 0,9 Aa	20,0 ± 1,0 Aab	19,5 ± 0,0 Aab	21,1 ± 0,6 Ab
0,6	22,8 ± 1,4 Aab	19,1 ± 0,5 Aa	19,6 ± 0,6 Aa	20,9 ± 0,4 Ab
0,8	20,4 ± 1,8 Aa	19,9 ± 1,2 Aa	21,0 ± 1,4 Aa	20,8 ± 2,1 Aa
1	22,5 ± 0,5 Aab	21,5 ± 0,6 Aab	19,2 ± 0,8 Aa	21,1 ± 1,5 Ab
2	21,4 ± 2,4 Aa	21,8 ± 0,6 Aa	21,1 ± 1,8 Aa	21,2 ± 3,4 Aa
3	21,9 ± 2,4 Aab	21,7 ± 1,4 Aab	19,7 ± 0,9 Aa	19,2 ± 1,3 Ab
4	22,4 ± 0,7 Aa	21,0 ± 1,0 Aa	21,0 ± 1,3 Aa	20,5 ± 2,3 Ab
Área de Precipitación (cm²)				
mg mL⁻¹	BSA-AT-T	BSA-AM-T	BSA-AC-T	BSA-AL-T
0	0,0 ± 0,0 Aa			
0,2	0,0 ± 0,0 Aa			
0,4	0,0 ± 0,0 Aa			
0,6	0,0 ± 0,0 Aa			
0,8	0,0 ± 0,0 Aa			
1	0,0 ± 0,0 Aa			
2	0,0 ± 0,0 Aa			
3	0,0 ± 0,0 Aa			
4	0,0 ± 0,0 Aa			
Intensidad de Precipitación (píxeles cm⁻²)				
mg mL⁻¹	BSA-AT-T	BSA-AM-T	BSA-AC-T	BSA-AL-T
0	0,0 ± 0,1 Aa			
0,2	0,2 ± 0,1 Ba			
0,4	0,2 ± 0,1 Ba	0,2 ± 0,1 Ba	0,2 ± 0,0 Ba	0,2 ± 0,1 Ba
0,6	0,1 ± 0,1 ABa			
0,8	0,1 ± 0,1 ABa	0,1 ± 0,0 ABa	0,1 ± 0,1 ABa	0,1 ± 0,1 ABa
1	0,0 ± 0,1 Aa			
2	0,0 ± 0,1 Aa			
3	0,0 ± 0,1 Aa	0,0 ± 0,1Aa	0,0 ± 0,1 Aa	0,0 ± 0,1 Aa
4	0,0 ± 0,1 Aa			

Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar. Letras mayúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas concentraciones de ácido. Letras minúsculas en las filas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tipos de ácido.

Difusión y precipitación de las proteínas salivales en presencia de ácido orgánico

En este ensayo, se observó que al depositar una alícuota de 15 μL en un punto de la membrana de celulosa, el fluido salival muestra la presencia de dos componentes (modo bifásico de difusión). La fracción que permaneció en el centro de la muestra correspondió a la fracción proteica no difusible (FND), mientras que el componente salival que difundió radialmente acompañando al agua salival correspondió a la fracción proteica difusible (FD) (STH, Figura 8A). Este modo bifásico de difusión se mantuvo al diluir la saliva en agua (1:8), aunque la intensidad de ambas fracciones disminuyó significativamente (STH-H₂O, Figura 8A). No obstante, al disminuir el pH de la mezcla a 3.5, la FD de la saliva desaparece, mientras que la FND se intensificó (STH-H₂O_{3.5}, Figura 8A) comparada con aquella a pH cercano a 7.0 (STH-H₂O, Figura 8A).

Por otro lado, al mezclar la saliva con agua acidificada con los distintos ácidos orgánicos, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la intensidad de tinción con respecto al control (Ensayo de difusión, Figura 8A). Sin embargo, las diferencias no fueron significativas al compararlas entre tipos y concentraciones de ácidos orgánicos (Figura 9, Cuadro 8).

Tras la centrifugación de las mezclas (Ensayo de precipitación, Figura 8B) se procedió a depositar 15 μL del sobrenadante sobre la membrana de celulosa. Primeramente, se observó un aumento de la intensidad de las muestras con respecto al control. Las muestras presentaron un área similar y una intensidad menor respecto a las muestras del ensayo de difusión (Figura 8A *versus* 8B). Asimismo, se presentaron sedimentos en el fondo de los tubos (datos no mostrados).

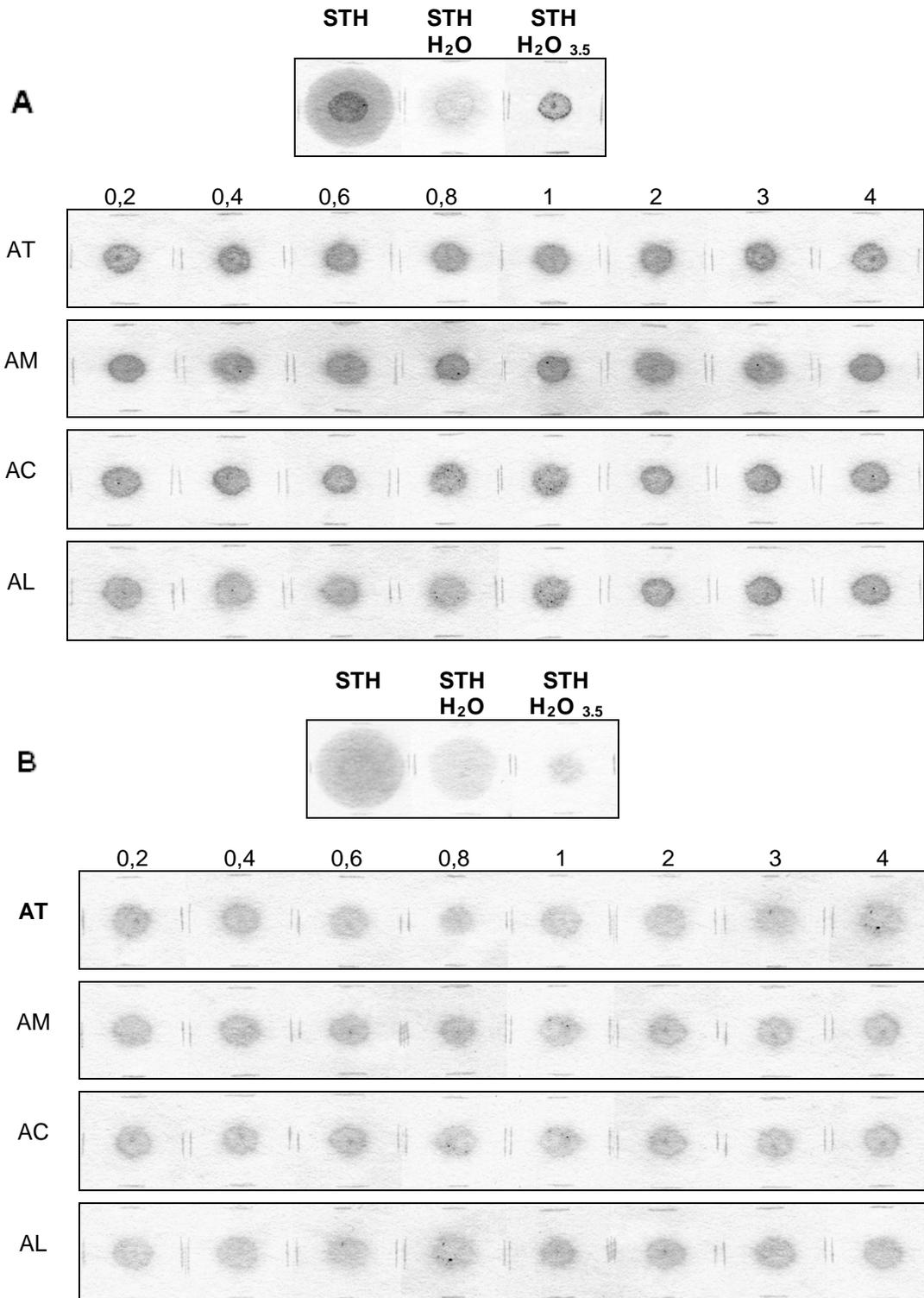


Figura 8. Difusión de STH en presencia de distintos ácidos orgánicos. Prueba de difusión (A) y precipitación (B). 800 μ L de los distintos ácidos orgánicos (AT, ácido tartárico; AM, ácido málico; AC, ácido cítrico; AL, ácido láctico) fueron mezclados con 100 μ L de saliva. STH- H₂O, saliva diluida en agua destilada. STH-H₂O_{3.5}, saliva mezclada con agua destilada a pH 3.5 y en ausencia de orgánico.

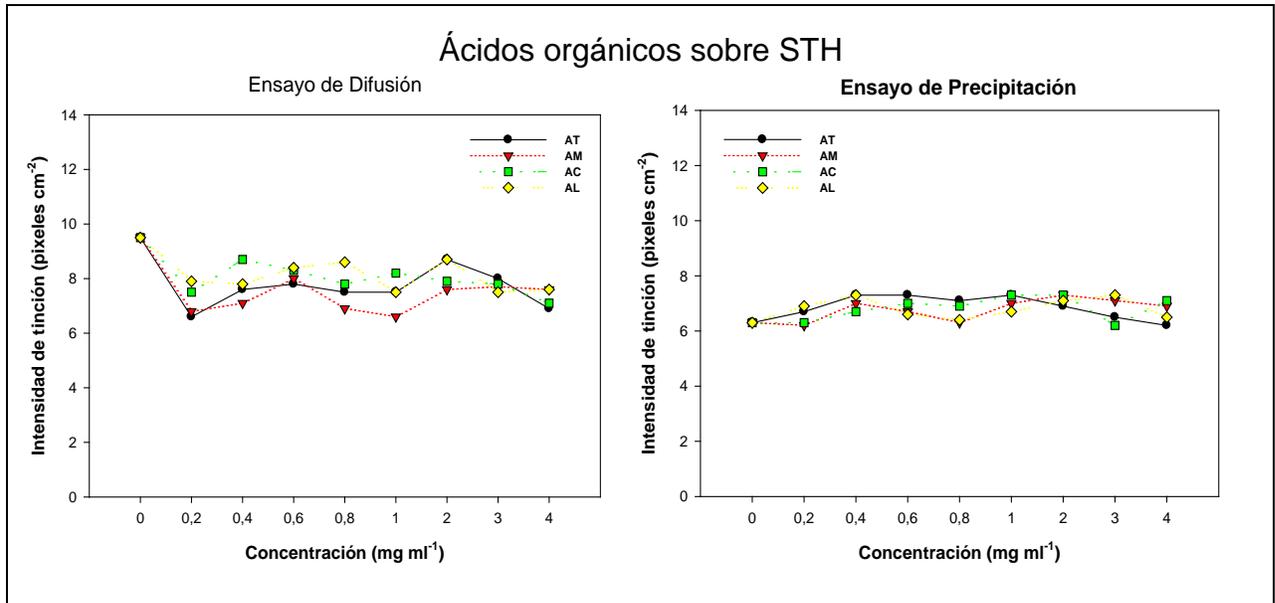


Figura 9. Análisis cuantitativo de la prueba de difusión y precipitación de las proteínas salivales en presencia de ácidos orgánicos. Los gráficos muestran intensidad de tinción (píxeles cm^{-2}) de la Figura 8A y 8B. Los valores presentados corresponden al promedio (por triplicado).

Cuadro 8. Intensidades de tinción de la proteína salival en presencia de ácido orgánico

Intensidad de Difusión (píxeles cm^{-2})				
mg mL^{-1}	AT-T	AM-T	AC-T	AL-T
0	9,5 ± 1,0 Ca	9,5 ± 1,0 Ba	9,5 ± 1,0 Ba	9,5 ± 1,0 Ba
0,2	6,6 ± 0,2 Aa	6,8 ± 0,6 Aa	7,5 ± 0,9 Aa	7,9 ± 0,6 Aa
0,4	7,6 ± 1,0 ABa	7,1 ± 0,5 Aa	8,7 ± 0,7 Aa	7,8 ± 1,5 Aa
0,6	7,8 ± 0,6 ABa	8,0 ± 0,5 Aa	8,3 ± 1,3 Aa	8,4 ± 0,8 Aa
0,8	7,5 ± 0,7 ABa	6,9 ± 0,4 Aa	7,8 ± 1,4 Aa	8,6 ± 0,6 Aa
1	7,5 ± 0,9 ABa	6,6 ± 0,2 Aa	8,2 ± 3,0 Aa	7,5 ± 0,9 Aa
2	8,7 ± 0,7 ABa	7,6 ± 1,0 Aa	7,9 ± 0,6 Aa	8,7 ± 0,7 Aa
3	8,0 ± 0,5 ABa	7,7 ± 0,3 Aa	7,8 ± 1,5 Aa	7,5 ± 0,2 Aa
4	6,9 ± 0,4 ABa	7,6 ± 1,0 Aa	7,1 ± 0,5 Aa	7,6 ± 1,0 Aa
Intensidad de Precipitación (píxeles cm^{-2})				
mg mL^{-1}	AT-T	AM-T	AC-T	AL-T
0	6,0 ± 0,2 Ba	6,0 ± 0,2 Ba	6,0 ± 0,2 Ba	6,0 ± 0,2 Ba
0,2	6,7 ± 0,0 Aa	6,4 ± 0,2 Aa	6,3 ± 0,8 Aa	6,9 ± 0,9 Aa
0,4	7,3 ± 0,7 Aa	7,0 ± 0,2 Aa	6,7 ± 1,5 Aa	7,3 ± 0,8 Aa
0,6	7,3 ± 0,8 Aa	6,7 ± 0,5 Aa	5,3 ± 0,3 Aa	6,6 ± 0,3 Aa
0,8	7,1 ± 0,2 Aa	6,4 ± 0,4 Aa	6,9 ± 0,3 Aa	6,4 ± 1,8 Aa
1	7,3 ± 0,8 Aa	7,0 ± 0,3 Aa	7,3 ± 0,7 Aa	6,7 ± 0,2 Aa
2	6,9 ± 0,9 Aa	7,3 ± 0,3 Aa	7,3 ± 0,8 Aa	7,1 ± 0,2 Aa
3	6,5 ± 0,3 Aab	7,1 ± 0,2 Aab	6,2 ± 0,4 Aa	7,3 ± 0,7 Ab
4	6,2 ± 0,4 Aa	6,9 ± 0,9 Aa	7,1 ± 0,2 Aa	6,5 ± 0,3 Aa

Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar. Letras mayúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas concentraciones de ácido. Letras minúsculas en las filas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tipos de ácido.

Difusión y precipitación del complejo proteínas salivales-proantocianidinas en presencia de ácido orgánico

En la Figura 10, se observa que al mezclar el extracto de semillas con saliva, la intensidad de las áreas de la FD y FND de la proteína se intensifican con respecto al control (STH-H₂O *versus* STH-T). Sin embargo, al disminuir el pH de la mezcla a 3.5, el área e intensidad de la FD y la intensidad de la FND disminuyen drásticamente (STH-T *versus* STH-T_{3.5}).

Asimismo, al colocar una alícuota de la mezcla del extracto de proantocianidinas y saliva en presencia de los distintos ácidos orgánicos sobre la membrana de celulosa (Figura 10), se observó que la intensidad del área de difusión de la FD y FND de la saliva disminuyó significativamente, con respecto a la mezcla saliva-proantocianidinas en ausencia de ácido orgánico (Figura 11 y 12, Cuadro 9). Asimismo, en la Figura 11 se observó que el área de la FD disminuye al aumentar la concentración del ácido orgánico (a partir de 0.8, 2.0, 3.0 y 2.0 mg mL⁻¹ de AT, AM, AC y AL, respectivamente).

Por otro lado, luego de la centrifugación de la saliva diluida en agua (1:8) y la mezcla saliva-proantocianidinas, se observó que las proteínas del sobrenadante difundieron monofásicamente en forma radial (STH-H₂O y STH-T, Figura 13). Asimismo, la disminución del pH a 3.5, provocó una disminución mayor de la intensidad y área de difusión (STH-H₂O_{3.5} y STH T_{3.5}, Figura 13).

Asimismo, al mezclar saliva con extracto de proantocianidinas en presencia de los distintos ácidos orgánicos, se observó una notoria disminución de las proteínas salivares del sobrenadante (Figura 13 y 14). Por otro lado, las mezclas saliva-proantocianidinas en presencia de los distintos ácidos orgánicos presentaron una intensidad significativamente menor que la mezcla saliva-proantocianidinas en ausencia del ácido (Cuadro 10). Comparativamente, el uso del AM en la mezcla saliva-proantocianidinas provocó una disminución significativa del área e intensidad de la difusión con respecto al resto de los ácidos (Cuadro 10).

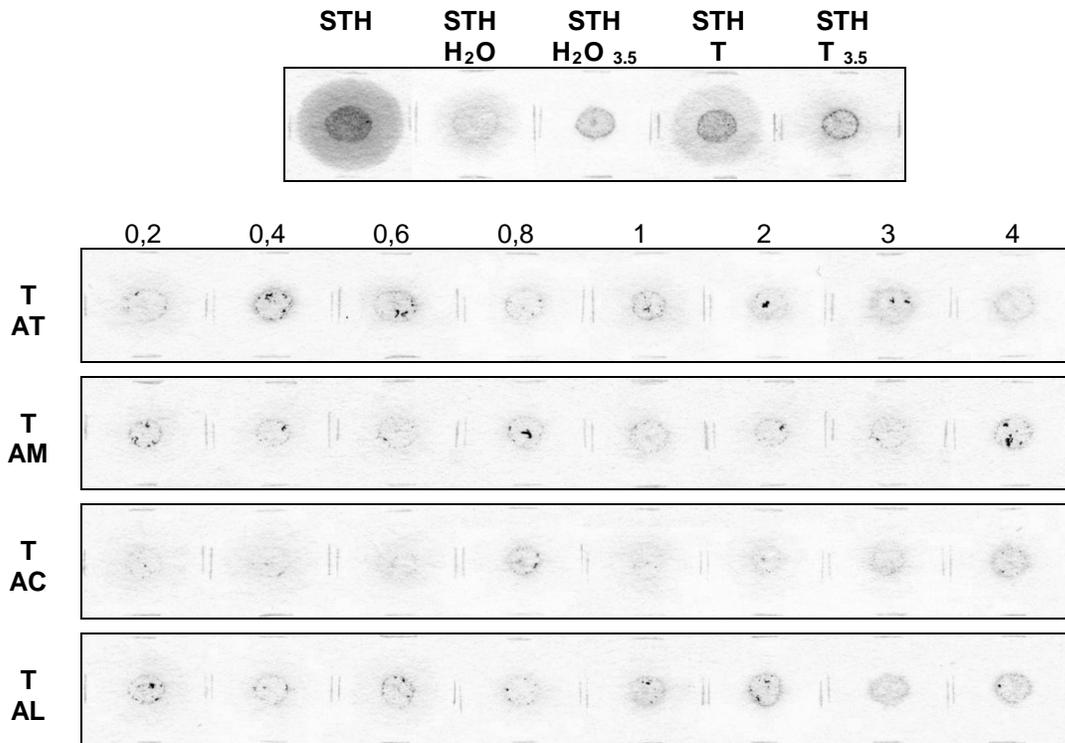


Figura 10. Prueba de difusión de STH en presencia de proantocianidinas-ácido orgánico. Ochocientos μL de la solución ácido orgánico-proantocianidinas fueron mezclados con $100 \mu\text{L}$ de saliva total humana. AT, ácido tartárico; AM, ácido málico; AC, ácido cítrico y AL, ácido láctico en distintas concentraciones ($0,2 - 4,0 \text{ mg ml}^{-1}$). STH- H_2O , proteína diluida en agua destilada. STH- $\text{H}_2\text{O}_{3,5}$, saliva mezclada con agua destilada a pH 3.5. STH-T proteína mezclada con proantocianidinas. STH- $\text{T}_{3,5}$, saliva mezclada con proantocianidinas a pH 3.5 en ausencia de ácido orgánico.

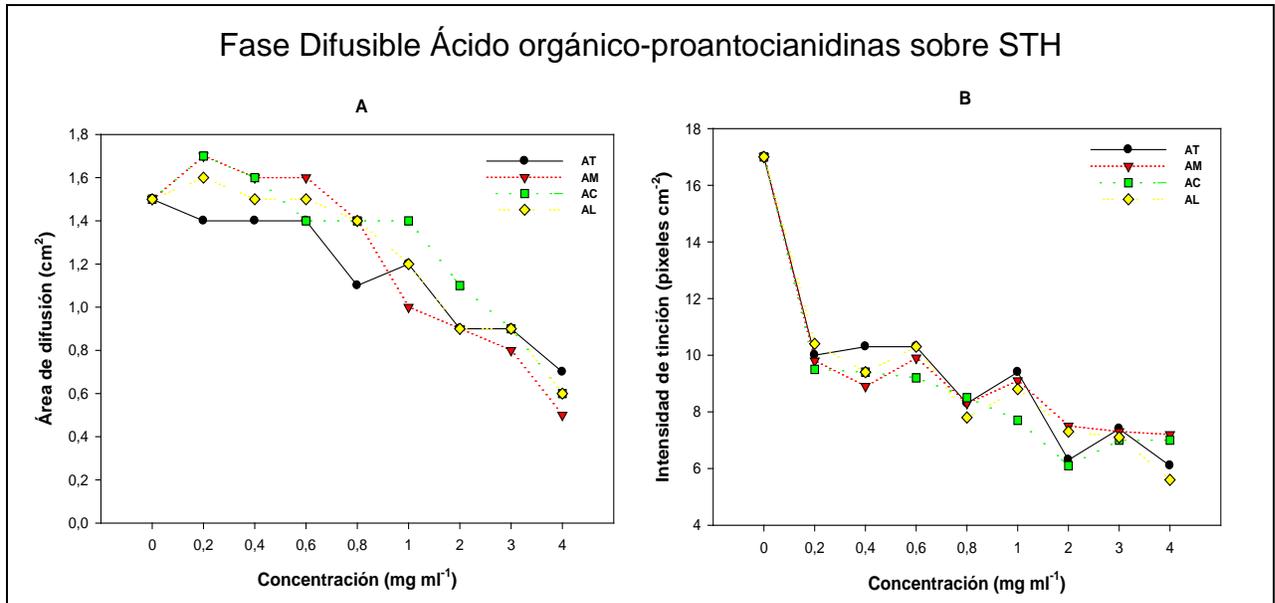


Figura 11. Análisis cuantitativo de la interacción de ácidos orgánicos-proantocianidinas con proteínas salivales mediante prueba de difusión. Gráficos elaborados a partir de la Figura 10.

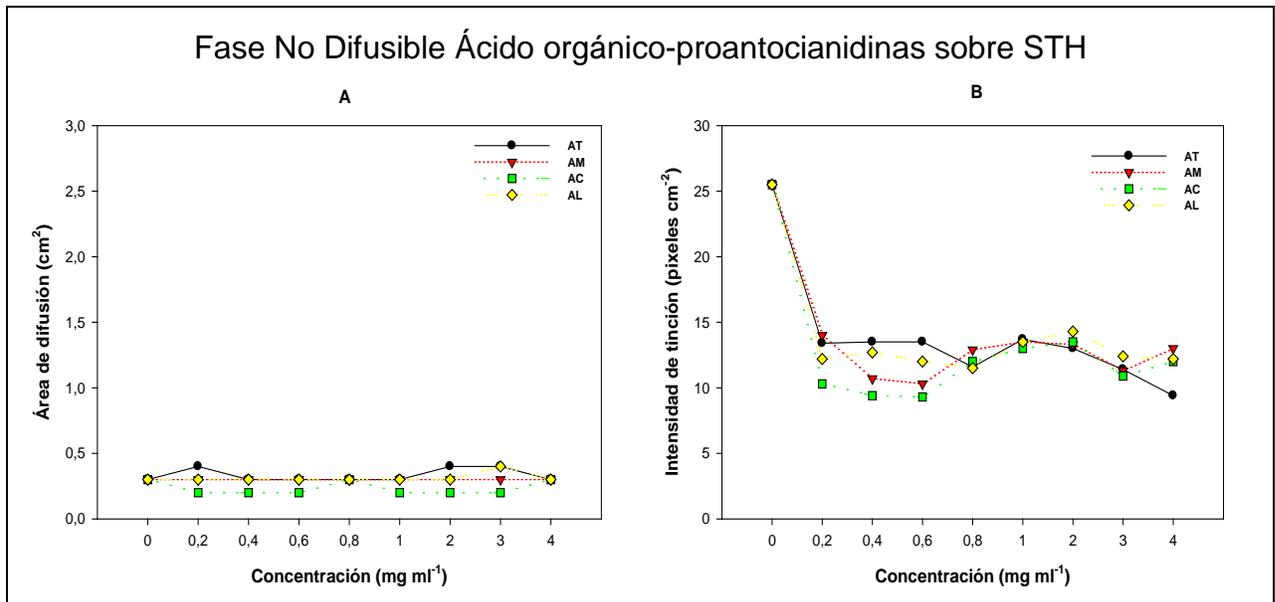


Figura 12. Análisis cuantitativo de la interacción de ácidos orgánicos-proantocianidinas con proteínas salivales mediante prueba de difusión. Gráficos elaborados a partir de la Figura 10.

Cuadro 9. Áreas e Intensidades de tinción de Difusión STH en presencia de ácido orgánico-proantocianidinas (Figura 10)

Área de Difusión de FD (cm²)				
mg mL⁻¹	STH-AT-T	STH-AM-T	STH-AC-T	STH-AL-T
0	1,5 ± 0,1 Da	1,5 ± 0,1 CEa	1,5 ± 0,1 CDa	1,5 ± 0,1 Da
0,2	1,4 ± 0,1 Da	1,7 ± 0,1 Db	1,7 ± 0,1 Dab	1,6 ± 0,1 Dab
0,4	1,4 ± 0,1 Da	1,6 ± 0,1 CDa	1,6 ± 0,1 Da	1,5 ± 0,1 Da
0,6	1,4 ± 0,0 Da	1,6 ± 0,1 CEB	1,4 ± 0,1 CDa	1,5 ± 0,1 Dab
0,8	1,1 ± 0,1 BCa	1,4 ± 0,2 CDa	1,4 ± 0,1 CDa	1,4 ± 0,2 CDa
1	1,2 ± 0,1 Cb	1,0 ± 0,1 BCa	1,4 ± 0,0 CDc	1,2 ± 0,0 BCDB
2	0,9 ± 0,1 ABa	0,9 ± 0,1 Ba	1,1 ± 0,2 BCa	1,1 ± 0,1 BCa
3	0,9 ± 0,1 Ba	0,8 ± 0,1 ABa	0,9 ± 0,2 ABa	0,9 ± 0,1 ABa
4	0,7 ± 0,1 Aa	0,5 ± 0,1 Aa	0,6 ± 0,3 Aa	0,6 ± 0,1 Aa
Intensidad de Difusión de FD (pixeles cm⁻²)				
mg mL⁻¹	STH-AT-T	STH-AM-T	STH-AC-T	STH-AL-T
0	17,0 ± 4,4 Ba	17,0 ± 4,4 Ba	17,0 ± 4,4 Ba	17,0 ± 4,4 Ca
0,2	10,0 ± 0,2 Aa	9,8 ± 1,5 Aa	9,5 ± 1,3 Aa	10,4 ± 0,6 Ba
0,4	10,3 ± 0,6 Aa	8,9 ± 0,5 Aa	9,4 ± 1,1 Aa	9,4 ± 0,6 ABa
0,6	10,3 ± 0,4 Aa	9,9 ± 0,8 Aa	9,2 ± 0,9 Aa	10,3 ± 1,0 Ba
0,8	8,3 ± 0,4 Aa	8,3 ± 0,6 Aa	8,5 ± 0,8 Aa	7,8 ± 0,4 ABa
1	9,4 ± 0,2 Ab	9,1 ± 0,9 Ab	7,7 ± 0,3 Aa	8,8 ± 0,5 ABab
2	6,3 ± 0,1 Aa	7,5 ± 0,6 Ab	6,1 ± 0,2 Aa	7,3 ± 0,2 ABb
3	7,4 ± 0,5 Aa	7,3 ± 0,4 Aa	7,0 ± 0,2 Aa	7,1 ± 0,3 ABa
4	6,1 ± 0,1 Aab	7,2 ± 0,3 Ab	7,0 ± 0,4 Ab	5,6 ± 0,1 Aa
Área de Difusión de FND (cm²)				
mg mL⁻¹	STH-AT-T	STH-AM-T	STH-AC-T	STH-AL-T
0	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Ba	0,3 ± 0,0 Aa
0,2	0,4 ± 0,0 Bc	0,3 ± 0,0 Ab	0,2 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Ab
0,4	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,2 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa
0,6	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,2 ± 0,0 Ba	0,3 ± 0,1 Aa
0,8	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Ba	0,3 ± 0,1 Aa
1	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,2 ± 0,1 ABa	0,3 ± 0,1 Aa
2	0,4 ± 0,0 Bb	0,3 ± 0,0 Aa	0,2 ± 0,1 ABa	0,3 ± 0,0 Aa
3	0,4 ± 0,0 Bb	0,3 ± 0,0 Aab	0,2 ± 0,1 ABa	0,4 ± 0,1 Ab
4	0,3 ± 0,1 Aa	0,3 ± 0,0 Aa	0,3 ± 0,0 Ba	0,3 ± 0,0 Aa
Intensidad de Difusión de FND (pixeles cm⁻²)				
mg mL⁻¹	STH-AT-T	STH-AM-T	STH-AC-T	STH-AL-T
0	25,5 ± 4,3 Ba			
0,2	13,3 ± 0,4 Aa	14,0 ± 1,2 Aa	10,3 ± 0,6 Aa	12,2 ± 0,6 Aa
0,4	13,5 ± 0,4 Aa	10,7 ± 0,3 Aa	9,4 ± 0,6 Aa	12,7 ± 1,6 Aa
0,6	13,5 ± 0,5 Aa	10,3 ± 0,8 Aa	9,3 ± 0,6 Aa	12,0 ± 0,5 Aa
0,8	11,6 ± 1,0 Aa	12,9 ± 2,0 Aa	12,0 ± 1,0 Aa	11,5 ± 1,2 Aa
1	13,7 ± 1,0 Aa	13,5 ± 0,8 Aa	13,0 ± 0,7 Aa	13,5 ± 2,7 Aa
2	13,0 ± 1,3 Aa	13,3 ± 2,5 Aa	13,5 ± 1,4 Aa	14,3 ± 1,1 Aa
3	11,4 ± 1,3 Aa	11,3 ± 0,9 Aa	10,9 ± 1,1 Aa	12,4 ± 1,1 Aa
4	9,4 ± 1,7 Aa	13,0 ± 1,0 Aa	12,0 ± 0,6 Aa	12,2 ± 1,4 Aa

Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar. Letras mayúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas concentraciones de ácido. Letras minúsculas en las filas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tipos de ácido.

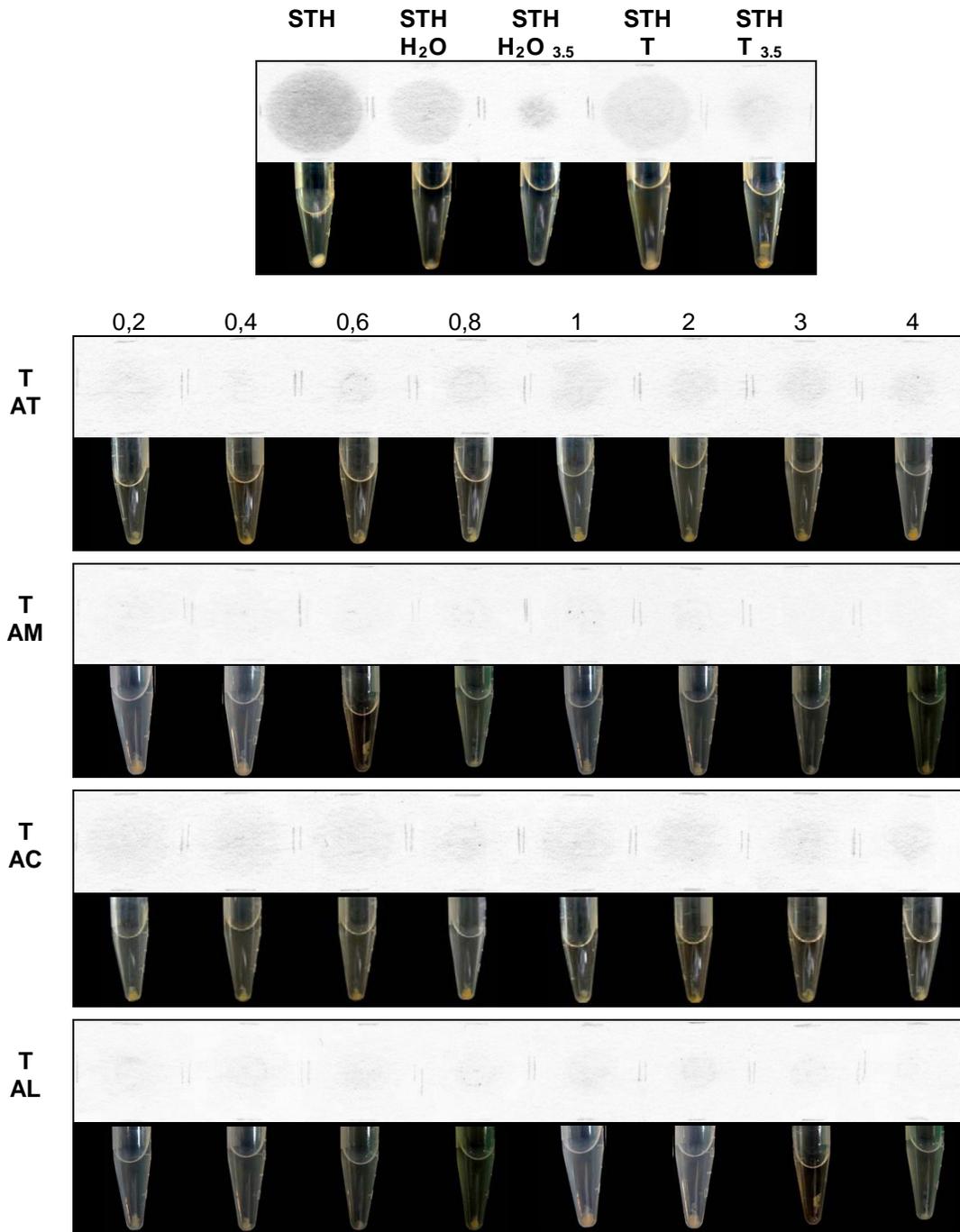


Figura 13. Prueba de precipitación de STH en presencia de proantocianidinas-ácido orgánico. Ochocientos μL de la solución ácido orgánico-proantocianidinas fueron mezclados con $100 \mu\text{L}$ de saliva. AT, ácido tartárico; AM, ácido málico; AC, ácido cítrico y AL, ácido láctico en distintas concentraciones ($0,2 - 4,0 \text{ mg mL}^{-1}$). STH-H₂O, proteína diluida en agua destilada. STH-H₂O_{3.5}, proteína mezclada con agua destilada a pH 3.5. STH-T, proteína mezclada con proantocianidinas. STH-T_{3.5}, saliva mezclada con proantocianidinas a pH 3.5 en ausencia de ácido orgánico.

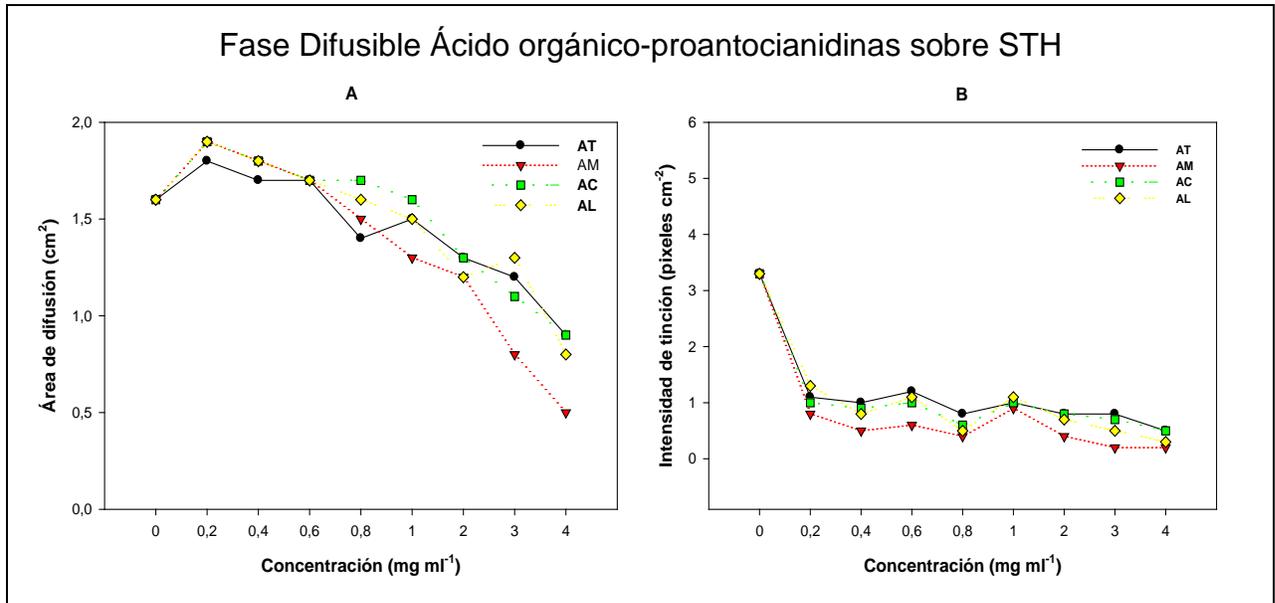


Figura 14. Análisis cuantitativo de la interacción de ácidos orgánicos-proantocianidinas con proteínas salivales mediante prueba de precipitación. Gráficos elaborados a partir de la Figura 13.

Cuadro 10. Áreas e Intensidades de tinción de Precipitación de STH en presencia de ácido orgánico-proantocianidinas (Figura 13)

Área de Precipitación de FD (cm²)				
mg mL⁻¹	STH-AT-T	STH-AM-T	STH-AC-T	STH-AL-T
0	1,6 ± 0,2 CDa	1,6 ± 0,2 DEa	1,6 ± 0,2 CDa	1,6 ± 0,2 DEa
0,2	1,8 ± 0,1 Da	1,9 ± 0,1 Eab	1,9 ± 0,1 Dab	1,9 ± 0,1 Eb
0,4	1,7 ± 0,1 CDa	1,8 ± 0,0 Ea	1,8 ± 0,1 Da	1,8 ± 0,2 DEa
0,6	1,7 ± 0,1 Da	1,7 ± 0,1 DEa	1,7 ± 0,1 Da	1,7 ± 0,1 DEa
0,8	1,4 ± 0,1 BCa	1,5 ± 0,1 CDa	1,7 ± 0,2 Db	1,6 ± 0,1 CDab
1	1,5 ± 0,1 BCDb	1,3 ± 0,1 BCa	1,6 ± 0,1 CDb	1,5 ± 0,1 BCDb
2	1,3 ± 0,1 Ba	1,2 ± 0,1 Ba	1,3 ± 0,1 BCa	1,2 ± 0,2 Ba
3	1,2 ± 0,1 Bb	0,8 ± 0,1 Aa	1,1 ± 0,1 ABb	1,3 ± 0,1 BCb
4	0,9 ± 0,1 Ab	0,5 ± 0,1 Aa	0,9 ± 0,1 Ab	0,8 ± 0,1 Ab
Intensidad de Precipitación de FD (píxeles cm⁻²)				
mg mL⁻¹	STH-AT-T	STH-AM-T	STH-AC-T	STH-AL-T
0	3,3 ± 0,8 Ba			
0,2	1,1 ± 0,1 Aab	0,8 ± 0,1 Aa	1,0 ± 1,2 Aab	1,3 ± 0,2 Ab
0,4	1,0 ± 0,1 Ab	0,5 ± 0,2 Aa	0,9 ± 0,1 Ab	0,8 ± 0,2 Aab
0,6	1,2 ± 0,1 Ab	0,6 ± 0,2 Aa	1,0 ± 0,2 Aab	1,1 ± 0,2 Ab
0,8	0,8 ± 0,1 Aa	0,4 ± 0,2 Aa	0,6 ± 0,1 Aa	0,5 ± 0,3 Aa
1	1,0 ± 0,1 Aa	0,9 ± 0,2 Aa	1,0 ± 0,1 Aa	1,1 ± 0,3 Aa
2	0,8 ± 0,1 Aa	0,4 ± 0,3 Aa	0,8 ± 0,1 Aa	0,7 ± 0,4 Aa
3	0,8 ± 0,1 Ab	0,2 ± 0,1 Aa	0,7 ± 0,2 Aab	0,5 ± 0,4 Aab
4	0,5 ± 0,1 Aa	0,2 ± 0,2 Aa	0,5 ± 0,2 Aa	0,3 ± 0,3 Aa

Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar. Letras mayúsculas en la misma columna indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las distintas concentraciones de ácido. Letras minúsculas en las filas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos tipos de ácido.

Evaluación Sensorial

La Figura 15, muestra los resultados del análisis sensorial realizado con los extractos de proantocianidinas acidificados con los distintos ácidos orgánicos. Es posible notar que la presencia de cualquier ácido orgánico en la solución de proantocianidinas, aumenta la percepción de la astringencia con respecto a la muestra control. No obstante, no se observaron diferencias estadísticamente significativa entre los tipos y concentraciones de los diferentes ácidos orgánicos, a excepción del AC, el cual presentó una mayor astringencia con concentraciones por sobre 1,0 mg mL⁻¹.

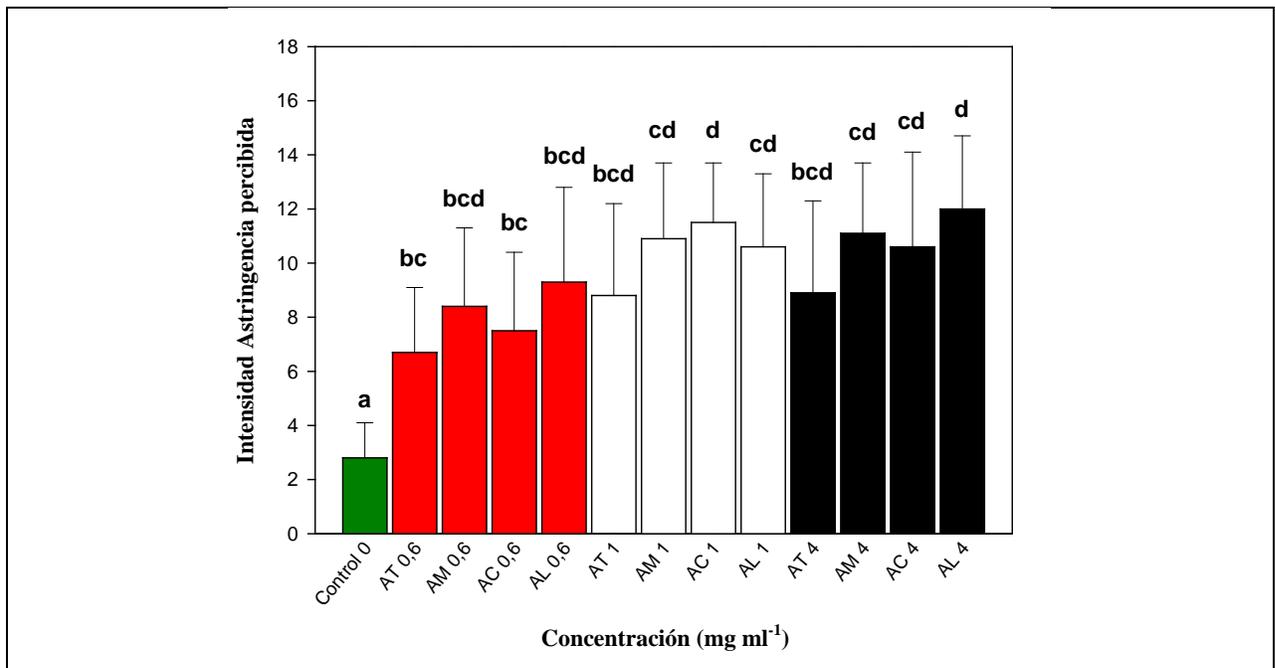


Figura 15. Intensidad de astringencia percibida al evaluar un extracto de proantocianidinas con ácido orgánico (AT, tartárico; AM, málico; AC, cítrico o AL, láctico) a distintas concentraciones (0,6, 1,0 o 4,0 mg mL⁻¹) a pH 3.5. La situación control (Control 0) corresponde al extracto de proantocianidinas a pH 3.5 en ausencia de ácido orgánico. Los valores presentados corresponden al promedio ± desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

DISCUSIÓN

La saliva es un fluido orgánico complejo producido por distintas glándulas salivales en la cavidad bucal, constituido por diversas familias de proteínas salivales, las cuales se han relacionado recurrentemente con la neutralización de polifenoles (Gawel, 1998; Nayak y Carpenter, 2008; Castro, 2009; Mc Rae y Kennedy, 2011) y consecuentemente con la sensación de astringencia (Prinz y Lucas, 2000; Bayec y Pickering, 2008). Se ha observado que diversos factores afectarían las interacciones entre los polifenoles (específicamente proantocianidinas) y las proteínas salivales lo que afectaría la percepción de la astringencia (Lawless *et al.*, 1996; Kallithraka *et al.*, 1997 y 2011; Guadalupe y Ayestarán, 2008). En el presente estudio, se evaluó el efecto de distintos ácidos orgánicos sobre la interacción y precipitación del complejo proantocianidinas-saliva o BSA. El uso de BSA se justifica por ser una proteína pura, homogénea y de alto uso en la investigación de la astringencia (Hatano *et al.*, 2003; Obreque-Slier *et al.*, 2010a; Noya, 2013). Para este objetivo, se analizó el efecto de un extracto de semillas de *Vitis vinifera* rico en proantocianidinas, en presencia de distintos tipos y concentraciones de ácidos orgánicos (ácido tartárico, málico, cítrico y láctico), sobre la difusibilidad y precipitabilidad de las proteínas salivares o BSA en una membrana de celulosa. Las condiciones de control de estos experimentos fueron la mezcla de proantocianidinas con saliva o BSA en ausencia de ácidos orgánicos.

Durante la degustación, los consumidores y/o evaluadores beben entre alrededor de 10 mL de vino (Obreque-Slier *et al.*, 2010a) y diversos estudios mencionan que el volumen promedio de saliva en boca es de alrededor 1,0 mL (Llena-Puy, 2006; Morales y Aldape, 2012; Cuenca y Baca, 2013). Estas dos condiciones fueron utilizadas para establecer las proporciones en las mezclas de fluido salival y el extracto de semillas, asemejando las condiciones de proporcionalidad que se producen en la boca durante la degustación (1:8).

Inicialmente, el extracto de semillas fue analizado y caracterizado mediante análisis espectrofotométricos y de HPLC-DAD, observándose que los contenidos de fenoles y taninos totales coinciden con lo observado en semillas de uva (Meza, 2012; Martínez, 2012; Muñoz-Ledo, 2013). Asimismo, las distintas fracciones de flavan-3-oles mostraron contenidos similares que los señalados en diferentes estudios (Peña Neira *et al.*, 2004; Obreque-Slier *et al.*, 2010a; Obreque-Slier *et al.*, 2010b). Por su parte, la composición y la concentración de fenoles de bajo peso molecular del extracto de semilla utilizado en este estudio coincide con lo observado previamente por diversos autores (Peña-Neira, 2004; Pastor del Rio and Kennedy, 2006; Obreque-Slier *et al.*, 2010b).

Por otro lado, el modo bifásico de difusión del fluido salival diluido en una solución acuosa ajustada a pH 3.5, sugiere la existencia de una alta organización de las proteínas no difusibles (FND) cuyo tamaño determinaría su retención sobre la superficie de la membrana. Por el contrario, el material difusible (FD) correspondería a proteínas más libres fácilmente arrastrables por el agua. Esta última observación representaría el modo de difusión de BSA en una solución acuosa.

Al mezclar el fluido salival con agua destilada acidificada con los distintos ácidos orgánicos, la intensidad de coloración de las proteínas salivares se vio fuertemente afectada. Esto podría deberse a que el pH afectaría el punto isoeléctrico específico de las proteínas salivares, tales como PRP ácidas ($pI \sim 4.0$) y mucinas (pI 2.0 a 3.0) (Hagerman y Butler, 1978), lo que podría generar alguna acción de los aniones de los ácidos orgánicos sobre las proteínas (Sowalsky y Noble, 1998). Por su parte, BSA mostró un comportamiento contrario al de la saliva, ya que ni su modo, área e intensidad de difusión se vio afectada por la presencia de los ácidos orgánicos, lo cual podría estar relacionado con el mayor punto isoeléctrico de BSA en comparación a las proteínas salivares (Hagerman y Butler, 1978).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente, es esperable que la interacción de este tipo de proteínas con los taninos proantocianidínicos, provoque una alteración de su difusión (Obreque-Slier *et al.*, 2010a, 2010c). Mediante el ensayo de difusión, se observó que la presencia de proantocianidinas a un pH 3.5, afectó significativamente el área e intensidad de tinción del fluido salival, lo que sugiere que la actividad de los taninos proantocianidínicos es pH dependiente, coincidente con lo observado por otros autores (Lawless *et al.*, 1996; Kallithraka *et al.*, 1997a y 1997b; Sowalsky y Noble, 1998; Fontoin *et al.*, 2008; Obreque-Slier *et al.*, 2011). No obstante, la incorporación de algún ácido orgánico en la mezcla proantocianidina-saliva, generó una disminución significativa del área de difusión de la fracción difusible. Más aún, este efecto sería dependiente de la concentración del ácido orgánico. Ambas observaciones reforzarían la hipótesis que el ácido orgánico posee una acción sobre la mezcla entre el extracto de semillas y la saliva, la cual se debería a un efecto del catión sobre la saliva y/o el complejo proantocianidina-saliva. Por el contrario, al mezclar BSA con extractos de semillas en presencia de los distintos ácidos orgánicos, se observó que ni el área ni la intensidad de difusión de BSA se vio afectada por el tipo y concentración de ácido orgánico, lo que implicaría que la interacción de BSA con las proantocianidinas de semillas no estaría relacionada con la presencia de estos ácidos.

Tras la centrifugación de las muestras utilizadas en la prueba de difusión, se observó que el área e intensidad de la FD y FND de la saliva diluida en agua disminuye significativamente. En presencia de proantocianidinas se observó una disminución de la coloración lo que sugiere que las fracciones de la saliva presentes en la prueba de difusibilidad, tienen una estructura que permite la precipitación en conjunto (Obreque-Slier *et al.*, 2011). Esto permite la disminución en el sobrenadante y por ende modificaciones en el área e intensidad de difusión. La desaparición del complejo proteínas-proantocianidinas del sobrenadante se vio amplificada en presencia de los distintos ácidos orgánicos. Nótese que el uso de ácido málico provocó una precipitación diferencial con respecto a los demás ácidos. Ambas observaciones indicarían que los ácidos orgánicos afectan la precipitación del complejo formado entre las proteínas salivares y las proantocianidinas de la semilla, y que la precipitación estaría estrechamente relacionada con el tipo y concentración del ácido orgánico.

Es importante destacar que al mezclar BSA con el extracto de semilla en presencia de los ácidos orgánicos, no se observó una precipitación diferencial con respecto al control, lo que indicaría que la precipitación del complejo BSA-proantocianidinas no está relacionado con la presencia de los ácidos orgánicos. Sin embargo, los resultados de este estudio proponen la existencia de una relación entre la precipitación del complejo de BSA-proantocianidinas con las concentraciones de los ácidos orgánicos.

Finalmente, al evaluar sensorialmente los extractos de semillas en presencia de distintos tipos y concentraciones de ácidos orgánicos, se observó que fueron percibidos como más astringentes que aquel extracto de semilla con ausencia de algún ácido orgánico. Esta observación confirmaría que la presencia del ácido orgánico afectaría las propiedades de la saliva y por ende en la percepción de astringencia. No obstante lo anterior, solo se observaron diferencias en la percepción de astringencia con las concentraciones crecientes de ácido cítrico, lo cual evidenciaría que la astringencia percibida por un panel es independiente del tipo y/o concentración de ácido orgánico. Probablemente el efecto de los ácidos orgánicos sobre la interacción entre proantocianidinas de semillas y proteínas salivares sería imperceptible por un panel de evaluadores, pero perceptible en los ensayos de difusión y precipitación.

CONCLUSIONES

Los ácidos orgánicos afectan la interacción y precipitación entre las proantocianidinas de un extracto de semillas y las proteínas salivales. Este efecto estaría estrechamente relacionado con el tipo y concentración del ácido orgánico. No obstante lo anterior, el efecto del tipo y concentración de ácido orgánico sobre la astringencia sería imperceptible por un panel de evaluadores.

BIBLIOGRAFÍA

Bate-Smith, E. C. 1973. Haemanalysis of tannins: the concept of relative astringency. *Phytochemistry* 12: 907–912.

Bayec, M. y G. Pickeing. 2008. Astringency: Mechanisms and perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 46:858-875.

Castro, L. 2009. Evolución de la composición fenólica de bayas de *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet sauvignon y cv. Carménère durante la maduración. Memoria de Título Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 69 p.

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

Contreras, H. 2002. Evaluación del comportamiento fermentativo de bacterias lácticas del género *Oenococcus* nativas de bodegas chilenas. Memoria de Título Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 20 p.

Cuenca-Sala, E. y P. Baca García. 2013. Odontología preventiva y comunitaria: principios, métodos y aplicaciones. Editorial Masson. Barcelona, España. 190 p.

Davies, G., E. Wantling and J. Stokes. 2009. The influence of beverages on the stimulation and viscoelasticity of saliva: relationship to mouthfeel? *Food Hydrocolloids* 23: 2261-2269.

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

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

Flanzy, C. 2000. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 783 p.

Fontoin, H., C.Saucier, P. Teissedre and Y. Glories. 2008. Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*. 19: 286-291.

Garcia-Barceló, J. 1990. *Técnicas analíticas para vinos*. GAB, Barcelona, España. 300p

Gawel, R., P.G. Iland and I.L. Francis. 2001. Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food and Quality and Preference*. 12: 83-94.

Golder, C. 2008. *Caracterización sensorial y fisicoquímica de vinos Chardonnay y Malbec de distintas regiones vitivinícolas argentinas*. Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Agrarias. 189 p.

Guadalupe, Z. and B. Ayestarán. 2008. Effect of commercial mannoprotein addition on polysaccharide, polyphenolic and color composition in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26: 9022-9029.

Hatano, T., M. Hori, R. Hemingway and T. Yoshida. 2003. Size exclusion chromatographic analysis of polyphenol-serum albumin complexes. *Phytochemistry* 63: 817-823.

Hangerman, A.E. and L. Butler. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26: 809-912.

Hartwing, P. and M. McDaniel. 1995. Flavor characteristics of lactic, malic, citric and acetic acids at various pH levels. *Journal of Food Science*. 60: 384-388.

Haslam, E. 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *Journal of Natural Products*. 59: 205-211.

Hidalgo, J. 2003. *Tratado de Enología*. Editorial Mundi-prensa. Madrid, España. 1423 p.

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

Jaramillo, L. 2002. *Química Orgánica General*. Departamento de Ciencias. Facultad de Ciencias Universidad del Valle. Vicerrectoría Académica. Santiago de Cali. 65 p.

Kallithraka, S., J. Bakker and M.N. Clifford. 1997a. Effect of pH on astringency in model solutions and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45 (6): 2211-2216.

Kallithraka, S., J. Bakker and M.N. Clifford. 1997b. Red wine and model wine astringency as affected by malic and lactic acid. *Journal of Food Science* 62 (2): 416-420.

Kallithraka, S.; D. Kim; A. Tsakiris; I. Paraskevopoulos and G. Soleas. 2011. Sensory assessment and chemical measurement of astringency of Greek wines: correlations with analytical polyphenolic composition. *Food Chemistry* 126: 1953-1958

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

Kennedy J., C. Saucier and Y. Glories. 2006. Grape and wine phenolic: History and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 239-248.

Lawless, H., J. Horne and P. Giasi. 1996. Astringency of organic acids is related to pH. *Food Quality and Preference*. 21: 397-403.

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

Llena-Puy, C. 2006. La saliva en el mantenimiento de la salud oral y como ayuda en el diagnóstico de algunas patologías. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal* 11: E449-55.

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

Lyman, B.J., B.G. Green. 1990. Oral astringency: effects of repeated exposure and interactions with sweeteners. *Chemical Senses* 15: 151-164.

Maicas, D., A. Natividad, S. Ferrer and I. Pardo. 2000. Malolactic fermentation in wine high densities of non-proliferating *Oenococcus oeni*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 16: 805-810.

Martinez, Mario 2012. Efecto de una pectina comercial sobre la interacción entre proantocianidinas de semilla de *Vitis vinifera* var. Carmenere y la proteína salival. Memoria de título Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 38 p.

Mateus, N., R. Pinto, P. Ruao and V. De Freitas. 2004. Influence of the addition of grape seed procyanidins to Port wines in the resulting reactivity with human salivary proteins. *Food Chemistry*. 84: 195-200.

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

Meza, M. 2012. Efecto de una manoproteína sobre la interacción tanino-proteína salival. Memoria de título Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 29 p.

Monagas, M., B. Bartolomé and C. Gómez-Cordovés. 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 85-118.

Morales-de la luz, R. y B. Aldape-Barrios. 2012. Flujo saliva y prevalencia de xerostomía en pacientes geriátricos. *Revista ADM*. 70 (1): 25-29.

Muñoz-Ledo, C. 2013. Influencia de goma arábiga y carboximetilcelulosa en la interacción tanino-proteína y su eventual efecto en la astringencia. Tesis para optar al grado de Magíster en Enología y Vitivinicultura. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 76 p.

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

Noya-Leal, F 2013. Evaluación de la interacción de polifenoles enológicos con la fracción proteica de la saliva total humana. Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Santiago, Chile. 59 p.

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

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

Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira, R. López-Solís, F. Zamora-Marín, J. 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: 3591-3599.

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

Ojeda, H., C. Andary, E. Creaba, A. Carbonneau and A. Deloire. 2002. Influence of pre and post veraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *Vitis vinifera* var. Shiraz. *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 261-267.

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.

Payne, C., P.K. Bowyer, M. Herderich, S.E.P. Bastian. 2009. Interaction of astringent grape seed procyanidins with oral epithelial cells. *Food Chemistry* 115: 551-557.

Peña. A. 1998. Contribución al conocimiento del origen de problemas sensoriales en vinos. Su relación con la composición fenólica y la presencia de compuestos organoclorados. Tesis Doctoral. E.T.S.I Agrónomos. Universidad Politécnica de Madrid. 227 p.

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.

Pérez Pastor, C. 2003. Análisis (químico) y control (digital) en la producción del vino. Disponible

en: http://redesformacion.iccm.es/aula_abierta/contenido/39/193/1522/vino.pdf. Leído el 20 de Enero de 2012.

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

Qiang He.; S. Bi, and Y. Kai. 2006. Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. *Food Chemistry* 95: 250 – 254.

Ribereau, G. and E. Peynaud. 1962. Análisis de vinos. Mundi-Prensa, Madrid. 604 p.

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.

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

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

Sowalsky, R. and A.C. Noble. 1998. Comparison of the effects of concentration, pH and anion species on astringency and sourness of organic acids. *Chemical Senses* 23: 343-349.

Sun, B; L. Conceicao; J. M. Ricardo-Da-Silva and L. Spranger.1998. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*.106: 536-544.

Tomás-Barberán, F. and J. Espín. 2001. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81: 853-876.

Vidal, S.; L. Francis; A. Noble; M. Kwiatkowski; V. Cheynier; E. Waters. 2004. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a win like medium. *Food Chemistry* 85 (4): 519-525.

Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Editorial Mundi-Prensa. Madrid, España. 225 p.

Zoecklein, B., K. Fugelsang, B. Gump y F. Nury, 2001. *Análisis y producción de vino*. Editorial Acrivia, S.A., Zaragoza, España. 613 p.

ANEXOS

ANEXO I Pauta Determinación de intensidad

NOMBRE:

FECHA:

Por favor, ordene las muestras de acuerdo a su intensidad de **MENOR** a **MAYOR**.....

N° de Muestras

Agua

Ácido Tartárico

Ácido Málico

Ácido Cítrico

Ácido Láctico

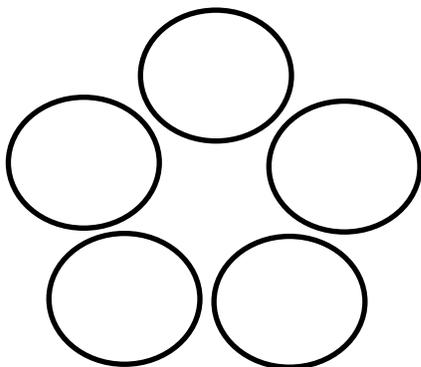
ANEXO II Pauta Test de Ranking. Medio agua

NOMBRE:

FECHA:

Por favor, ordene las muestras de acuerdo a su intensidad de menor a mayor

ÁCIDO TARTÁRICO



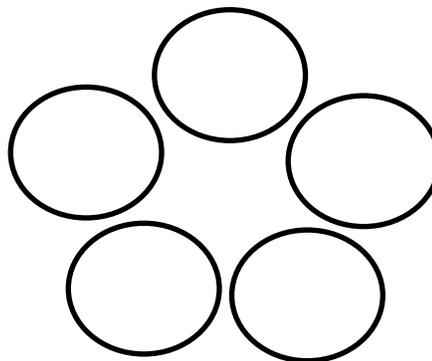
Orden:.....

Comentarios:.....

.....

.....

ÁCIDO MÁLICO



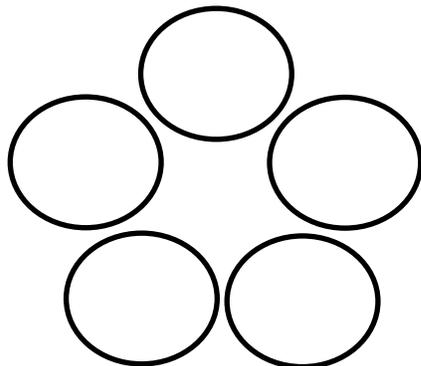
Orden:.....

Comentarios:.....

.....

.....

ÁCIDO CÍTRICO



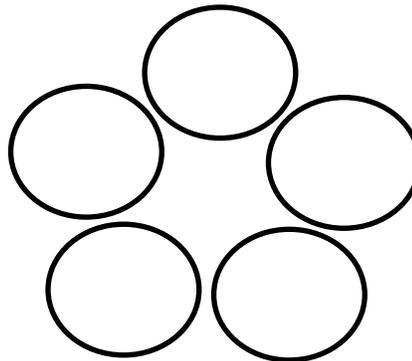
Orden:.....

Comentarios:.....

.....

.....

ÁCIDO LÁCTICO



Orden:.....

Comentarios:.....

.....

.....

IMPORTANTE: Espere 20 segundos entre cada muestra.

Deguste los 10 mL de una sola vez.

ANEXO III Pauta no estructurada para análisis sensorial descriptivo

Método descriptivo (Pauta no estructurada)	
Nombre:..... Fecha:.....	
Muestra:.....	
Instrucciones: por favor indique con una línea vertical sobre la horizontal, el punto que mejor describa el atributo de la muestra, basándose en el siguiente diagrama.	
Nula astringencia	Máxima astringencia

0	15

IMPORTANTE: Mantenga la muestra en la boca durante 10 segundos.
 Deguste los 8 mL de una sola vez.
 Entre cada muestra enjuagarse con 15 mL de pectina durante 20 segundos.