



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DEL pH SOBRE LA INTERACCIÓN PROANTOCIANIDINA-
PROTEINA SALIVAL Y SU RELACIÓN CON LA SENSACION DE
ASTRINGENCIA**

Tesis para optar al título profesional de ingeniero agrónomo y
al grado de magister en Enología y Vitivinicultura

CHRISTIAN JAVIER LIRA OLIVARES

Directores de Tesis

ELÍAS OBREQUE SLIER

REMIGIO LÓPEZ SOLIS

Profesores Consejeros

MARCELA MEDEL MARABOLÍ

CARLA JARA CAMPOS

SANTIAGO - CHILE

2014

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO DEL pH SOBRE LA INTERACCIÓN PROANTOCIANIDINA-PROTEINA
SALIVAL Y SU RELACIÓN CON LA SENSACION 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

CHRISTIAN JAVIER LIRA OLIVARES

Directores de tesis	Calificaciones (Memoria de titulo)	Calificaciones (Tesis de grado)
Elías Obreque Slier Ing. Agrónomo, Enólogo, Dr.	6.8	Aprobada
Remigio López Solís Bioquímico, Dr.	6.3	Aprobada
Profesores concejeros		
Marcela Medel Marabolí Ing. Agrónomo, Enólogo, Dra.	6.7	Aprobada
Carla Jara Campos Ing. Agrónomo, Enólogo, Dra.	6.8	Aprobada

SANTIAGO - CHILE

2014

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que me apoyaron e hicieron posible este proyecto:

- A mis profesores guías, Elías Obreque y Remigio López, por su buena disposición, orientación, acertadas correcciones y sobre todo por su conocimiento entregado durante todo el proceso.
- También agradezco a la profesora Marcela Medel por su colaboración brindada y conocimientos entregado
- Agradezco al Programa U-Inicia VID 2012 11/05 de la Universidad de Chile, al proyecto Fondecyt Iniciación 11121322 y al Proyecto Fondecyt 1110832 por entregarme las herramientas y materiales necesarios para la realización de éste proyecto
- A mi amigo Aarón por su ayuda brindada, buena voluntad y apoyo.
- A Katherine le agradezco toda la colaboración brindada en este proceso, además de su amor e incondicional apoyo.
- Finalmente agradezco a mi familia, por el apoyo y confianza que me han entregado siempre

INDICE

I. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	3
Compuestos fenólicos.....	3
Características y funciones de la saliva.....	6
La astringencia y su relación con la interacción tanino-proteína.....	9
Efecto del pH sobre la interacción tanino-proteína.....	10
Bibliografía.....	14
II. EFECTO DEL pH SOBRE LA INTERACCIÓN PROANTOCIANIDINA PROTEINA SALIVAL Y SU RELACIÓN CON LA SENSACION DE ASTRINGENCIA.....	22
RESÚMEN.....	23
Palabras clave.....	23
ABSTRACT.....	24
Key words.....	24
INTRODUCCIÓN.....	25
Hipótesis.....	27
Objetivos.....	27
1. Objetivo general.....	27
2. Objetivos Específicos.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
Lugar de Estudio.....	28
Materiales.....	28
Semillas.....	28
Saliva humana.....	28
Panel sensorial.....	28
Reactivos y Equipamientos.....	29
Métodos.....	30
Tratamientos y Diseño Experimental.....	30
Procedimiento.....	31
Preparación del extracto de semillas (ES).....	31

Obtención de la Saliva.....	31
Preparación de la solución de Seroalbúmina Bovina (BSA).....	31
Variables a medir.....	32
Fenoles totales.....	32
Taninos totales.....	32
Fenoles de bajo peso molecular.....	32
Fraccionamiento de proantocianidina.....	32
Ensayos de difusión y precipitación.....	33
Evaluación sensorial.....	34
Análisis Estadístico.....	35
RESULTADOS.....	36
Caracterización del extracto de semillas.....	36
pH y difusión de las proteínas en la membrana de celulosa.....	37
Efecto del pH sobre la precipitación entre proantocianidinas y proteínas..	43
Evaluación sensorial.....	49
DISCUSIÓN.....	50
CONCLUSIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55
ANEXO I.....	62

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Compuestos Fenólicos

Los compuestos fenólicos participan en diferentes propiedades sensoriales de los alimentos, tales como las uvas (pieles, semillas, pulpa y escobajos) y el vino. Así, los polifenoles han sido asociados al color, amargor, aromas y la astringencia de las bayas y vinos de *Vitis vinifera* L. (Monagas *et al.*, 2005, Garrido y Borges, 2011). Estos compuestos son formados a partir del aminoácido fenilalanina, a través de la ruta fenilpropanoide, y su síntesis depende principalmente de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL). La actividad de la PAL es termo y lumínico dependiente (Peña-Neira, 2006a) y origina en una primera instancia al ácido cinámico, base de gran parte de los compuestos fenólicos.

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos se caracterizan por presentar un núcleo aromático acompañado de uno o más grupos hidroxilos, siendo clasificados en compuestos no flavonoides encontrados principalmente en la pulpa y compuestos flavonoides localizados en la piel, semillas y escobajos. Entre los compuestos no-flavonoides se encuentran los ácidos fenólicos (ácido benzoico y ácido cinámico) y los estilbenos, mientras que en los compuestos flavonoides están constituidos por los compuestos flavonoles, antocianos y flavanoles (Flanzy, 2000; Zoecklein *et al.*, 2001; Zamora, 2003; Monagas *et al.*, 2005; Garrido y Borges, 2011).

Tanto en los compuestos no-flavonoides como en los flavonoides los taninos pueden presentarse de dos formas distintas: hidrolizables y condensados, los cuales son responsables de contribuir en la característica astringente de los vinos, como también el amargor y la estabilidad colorante de los vinos tintos (Monagas *et al.*, 2005; Peña-Neira, 2006a, Garrido y Borges, 2011).

A pesar que los taninos hidrolizables no se encuentran en *Vitis vinifera*, se pueden encontrar en otras frutas, como las frambuesas (Waterhouse, 2002). En vinos, es posible encontrarlos como resultado de la extracción desde las barricas o por la adición

de polvo de roble durante el proceso de vinificación (Adams *et al.*, 2004). Estos fenoles son compuestos de ácido gálico y ácido elágico, unidos a ésteres de glucosa o azúcares, siendo la unión éster la responsable que estos compuestos sean de carácter "hidrolizable". Entre ellos hay dos categorías, los galotaninos y los elagitaninos, que en su estructura contienen altos contenidos de ácido gálico o ácido elágico, respectivamente (Waterhouse, 2002).

Por su parte, los taninos condensados o flavanoles, son los compuestos más abundantes en la uva y el vino, estando presentes en las partes sólidas de las bayas, siendo mayoritariamente sintetizados en las semillas (Downey *et al.*, 2003). Estos compuestos son transferidos al vino durante las operaciones de vinificación, tales como prensado, maceración y fermentación (Monagas *et al.*, 2005; Garrido y Borges, 2011). Estos taninos están formados por diferentes unidades monoméricas (flavan-3-ol) y distinta configuración. Así, la (+)-catequina y la (+)-galocatequina presentan una configuración 2R:3S y la (-)-epicatequina y (-)-epigalocatequina una configuración 2R:3R (Figura 1). Del mismo modo, la unión de estos monómeros ocurre mediante enlaces C4-C8 o C4-C6 los cuales forman oligómeros (2 a 5 unidades) y polímeros (más de 5 unidades). La (-)-epicatequina puede estar esterificada por una molécula de ácido gálico en la posición del carbono 3 resultando en (-)-epicatequina-3-O-galato. Se ha observado que a mayor presencia de ácido gálico, es decir a mayor grado de galoilación, mayor astringencia y amargor presenta el tanino (Waterhouse, 2002; Zamora, 2003; Monagas *et al.*, 2005, Peña-Neira, 2006b).

La forma polimérica de los taninos condensados, se les denomina proantocianidinas o procianidinas, debido a que en medio fuertemente ácido se hidrolizan para dar lugar a las cianidinas. Las proantocianidinas están formadas por unidades de (+)-catequina y (-)-epicatequina las cuales están presentes en las semillas y pieles de las uvas. Por otro lado, los polímeros formados por unidades de (+)-galocatequina o (-)-epigalocatequina (prodelfinidinas), están presentes solo en pieles y en un medio fuertemente ácido dará origen a delfinidinas (Llaudy, 2006).

Flavan-3-ol	R1	C-2	C-3	
(+)-Catequina	H	R	S	
(+)-Galocatequina	OH	R	S	
(-)-Epicatequina	H	R	R	
(-)-Epigalocatequina	OH	R	R	
(-)-Epicatequina-3-O-galato				

Figura 1. Estructura química de los monómeros de flavanol, según Monagas *et al.*, 2005.

Características y funciones de la saliva

El término saliva es usado con la finalidad de describir la combinación de fluidos de la cavidad bucal, el que se compone principalmente de agua (99,5%), proteínas (0,3%) y sustancias inorgánicas (sodio, potasio, cloruro y bicarbonato) (0,2%) (Van Vliet *et al.*, 2009; De Almeida *et al.*, 2008; Schipper *et al.*, 2007). La saliva presenta un pH cercano al neutro (pH 6.2-7.4) y es mayormente secretada en la medida que su pH es mayor (Schipper *et al.*, 2007). Esta secreción proviene principalmente de la glándula submandibular (60%) ubicadas en el piso de la boca, las glándulas sublinguales (5%) ubicadas en la parte anterior y central del piso de boca, las glándulas parótidas (20%) ubicadas en las mejillas, y otras glándulas menores (15%) presentes en la mucosa de la lengua, labios y el paladar (De Almeida *et al.*, 2008; Schipper *et al.*, 2007; Walsh, 2007) (Figura 2).

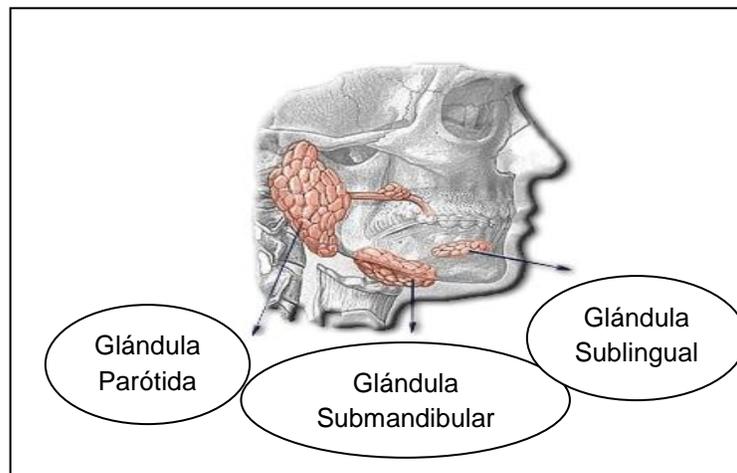


Figura 2.Ubicación de glándulas parótida, sublingual y submandibular

La cantidad y la composición de la saliva humana secretada depende de diversos factores, tales como, la hidratación en donde una reducción de un 8% del contenido de agua en el cuerpo reduce significativamente el fluido salival, mientras que la hiperhidratación provoca un aumento de la saliva. Se ha observado que la iluminación afecta la salivación, produciéndose una disminución de un 30% a un 40% en personas con los ojos vendados o en oscuridad (Edgar *et al.*, 2004).

El tabaquismo es otro factor que afecta la secreción, observándose que individuos que fuman presentan un aumento temporal del fluido salival (Axelsson *et al.*, 1998). El ritmo circadiano afecta la secreción salival durante el día, observándose que esta alcanza el máximo a finales de la tarde, disminuyendo significativamente durante el sueño (Humphrey y Williamson, 2001). Diversos medicamentos como antidepresivos, ansiolíticos, antipsicóticos, antihistamínicos y antihipertensivos, también reducen la salivación y alteran su composición (Edgar *et al.*, 2004). Además, ciertos estímulos como el pensar o mirar alimentos generan un aumento de la salivación (Edgar *et al.*, 2004). El ejercicio físico también puede alterar la secreción de la saliva induciendo a cambios en la concentración de α -amilasa y electrolitos en la saliva (Chicharro *et al.*, 1998). Por su parte, consumos altos de alcohol causa una disminución del flujo salival (Enberg *et al.*, 2001), mientras que personas entre 65 y 83 años de edad presentan una secreción menor de saliva no estimulada en comparación de individuos entre 18 y 35 años (Navazesh *et al.*, 1992). Asimismo, mujeres sanas y sin medicar presentan un menor flujo salival promedio de la glándula parótida, en comparación a los hombres (Percival *et al.*, 1994), mientras que deficiencias nutricionales también influirían en la función y composición de la saliva (Humphrey y Williamson, 2001).

Se ha descrito que la saliva posee diversas funciones, tales como, lubricar los tejidos orales, ayudar a la digestión mediante la síntesis de amilasa y lipasa, amortiguar los ácidos de la placa dental y controlar la microbiota oral (Walsh, 2007). Una de las propiedades de la saliva ampliamente estudiadas corresponde a la sensación de astringencia (Condelli *et al.*, 2006, Gambuti *et al.*, 2006; Charlton *et al.*, 2002). Se ha observado que diversas familias de proteínas están implicadas en esta sensación, entre las cuales destacan las Proteínas ricas en prolina (PRPs) (Lu y Bennick, 1998; De Freitas y Mateus, 2001). Existen tres tipos de PRPs: ácidas, básicas y glicosiladas. Las PRPs ácidas, participan en el control de los niveles de calcio libre en la saliva y las glicosiladas en la lubricación y aglutinamiento de bacterias orales. Las PRPs básicas han sido relacionadas específicamente a la unión de taninos de la dieta, como un posible mecanismo de defensa frente a su ingesta (Hagerman y Butler, 1981).

Otras proteínas salivales relacionadas con la sensación de astringencia son las mucinas, responsables de la viscosidad de la saliva (Condelli *et al.*, 2006); las α -

amilasas correspondiente a enzimas con actividad hidrolítica durante la masticación de alimentos que contienen almidón, además de su relevante acción anti-bacteriana (Gambuti *et al.*, 2006; De Freitas y Mateus, 2001); y las Histatinas las cuales presentan funciones anti-bacterianas y anti-fúngicas (Yan y Bennick, 1995).

Por otro lado, se ha estudiado que el consumo de taninos tiene diversas ventajas, aportando características antimicrobiales (Scalbert, 1991), antioxidante (Teissedre *et al.*, 1996) y actividad neuroprotectora (Sun *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2002; Simonyi *et al.*, 2002). Sin embargo, el consumo de taninos en exceso puede presentar un gran número de características anti-nutricionales, como inhibir la absorción del hierro (Disler *et al.*, 1975), generar cáncer hepático (Korpassy, 1961), desarrollar anomalías e inhibiciones mentales (Featherston y Rogler, 1975; Elkin *et al.*, 1978) y formar complejos irreversibles con enzimas digestivas y proteínas (Ahmed *et al.*, 1991).

La astringencia percibida en la cavidad bucal representa una señal de alerta hacia los animales para desalentar la ingesta de alimentos con alto contenido de taninos (Dinnella *et al.*, 2009). La astringencia se percibe como una sensación táctil (Adams *et al.*, 2004), descrita como un secado o arrugamiento en la boca (Kallithraka *et al.*, 1997). Esta sensación ha sido asociada con las interacciones entre algunos compuestos fenólicos (taninos hidrolizables y condensados) (Obreque *et al.*, 2012) y proteínas salivares (Bacon y Rhodes, 2000), principalmente con la familia de las proteínas salivares ricas en prolina (PRPs) (Hagerman y Butler, 1981).

La astringencia y su relación con la interacción tanino-proteína

Se ha sostenido que la astringencia se asociaría con la formación de enlaces de hidrógeno de los grupos -OH de los taninos y las proteínas de la saliva. Esta interacción provocaría una agregación o precipitación de las proteínas salivares, lo que finalmente desluciría la cavidad oral (Lawless *et al.*, 1996). En algunos casos, las interacciones hidrofóbicas también pueden ser la base para la formación de complejos entre los taninos y las proteínas salivares (Charlton *et al.*, 2002).

Jöbstl *et al.*, (2004), proponen un modelo de tres etapas para la unión y precipitación de las proteínas con los taninos (Figura 3). En un comienzo las proteínas estarían libres en una conformación enrollada. La etapa uno, consiste en que los polifenoles multidentados se unen a varios sitios de las proteínas lo que llevaría a un enrollamiento de la proteína alrededor de los taninos provocando que el tamaño físico disminuya y la estructura de la proteína sea más compacta y esférica. En la segunda etapa, las fracciones de taninos del complejo tanino-proteína se entrecruzan con otro complejo formando puentes de polifenoles, lo que crea dímeros de proteína. Finalmente en la etapa tres, se forman grandes complejos taninos-proteínas que precipitarán.

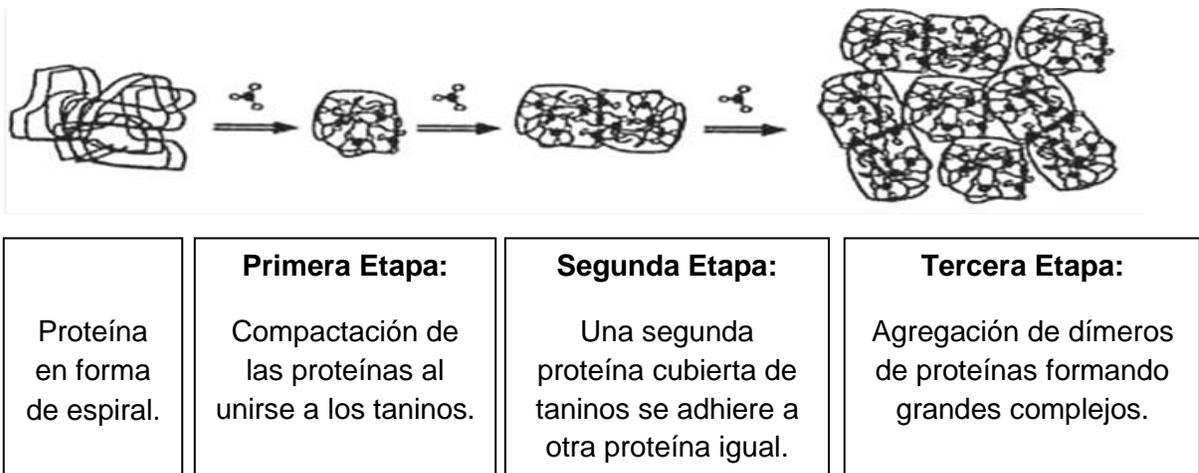


Figura 3. Precipitación proteína-polifenol según Jöbstl *et al.*, (2004).

Los taninos simples, de bajo tamaño, se unen débilmente a las proteínas. Sin embargo, cuanto mayor sea el grado de polimerización y peso molecular de un compuesto, mayor

será su capacidad para precipitar proteínas y, por ende, aumentar la percepción de astringencia (Bajec y Pickering, 2008).

Además de la composición de los taninos, existen otros factores que contribuyen en la interacción tanino-proteína y, por ende, en la percepción de astringencia. Así, se ha descrito que el contenido de etanol (De Miglio *et al.*, 2002; Obreque-Slier *et al.*, 2010b), las manoproteínas (Guadalupe y Ayestarán, 2008), el tipo de ácidos orgánicos e inorgánicos (Hartwig y McDaniel, 1995) y el pH (Sowalsky y Noble, 1998, Kallithraka *et al.*, 1997, Lawless *et al.*, 1996).

Efecto del pH sobre la interacción tanino-proteína

La concentración de iones hidrógeno (pH) desempeña un papel importante en diversos procesos del vino, influyendo en sus atributos físico-químicos, biológicos y sensoriales. La disociación de los ácidos tartárico, málico, cítrico, láctico y acético es la fuente principal de estos iones (Zoecklein *et al.*, 2001). Según diversos autores, el pH del vino está comprendido entre pH 2.8-4.0 (Flanzy, 2000; Waterhouse, 2002; Zamora, 2003; Aleixandre, 2006; Sierra Alonso *et al.*, 2007). La mayoría de los vinos tintos presenta un pH 3.5-4.0 (Zamora, 2003) mientras que los vinos blancos en promedio alcanzan pH 3.2-3.4 (De rosa, 1998).

En el vino, ciertos compuestos actúan de diferentes formas a diferentes pH, como es el caso del anhídrido sulfuroso. Así, el pH influye sobre la acción antioxidante, antiséptica y antioxidásica de este compuesto (Flanzy, 2000). También se ha visto que cambios en el pH afectan la estabilidad del hierro generando la quiebra del fosfato férrico (quiebra blanca) la cual se produce en el vino si la concentración de hierro está por sobre 7 mg/L y el pH esta en el rango 2.9-3.6 (Zoecklein *et al.*, 2001).

A nivel microbiológico, cambios en el pH afectan el crecimiento de las levaduras. Así, el pH durante la fermentación del vino y producción de alcohol está comprendido entre 3.8-4.2. Este intervalo de pH proporciona las condiciones para que *Saccharomyces cerevisiae* sea la especie dominante y para que al mismo tiempo algunas levaduras

silvestres sean inhibidas (Yalcin y Ozbas, 2008). Del mismo modo, el pH tiene un efecto selectivo sobre el crecimiento de los microorganismos que llevan a cabo la fermentación maloláctica, especialmente las bacterias lácticas ácidas, como es el caso de *Oenococcus oeni* la cual puede proliferar a un rango de pH 3.3-3.5 (Bartowsky y Henschke, 2004).

De la misma manera, se ha observado que el pH sería un facilitador en la precipitación del complejo tanino-proteína, ya que afectaría en el punto isoelectrico específico de cada proteína (Cuadro 1). En este punto, las proteínas no poseen carga eléctrica presentando un estado eléctricamente neutro, lo cual debilita su interacción lo que explicaría una mayor precipitación del complejo y percepción de astringencia (Hagerman y Butler, 1978).

Cuadro 1. Punto Isoeléctrico (pI) de distintas proteínas.

Proteína		pI	Referencias
Seroalbúmina bovina (BSA)		pH 4.7-4.9	Hughes <i>et al.</i> , 1995
Proteínas ricas en prolina (PRP)	Ácidas	pH~ 4	Siebert y Chassy 2003
	Básicas	pH >10	
	Glicosiladas	pH>9	
Mucina		pH 2.0-3.0	Bansil y Turner, 2006
Proteínas ricas en histatinas	Histatina 3	pH 9.5	Peters y Azen, 1977
	Histatina 5		
α -amilasas		pH 6.5	Takeuchi <i>et al.</i> , 1975
Lactoferrina		pH 8.7	Ferenc y Viljoen, 1995

A nivel sensorial, diversos estudios han indicado que cambios en el pH afectarían directamente la sensación de astringencia percibida. Es así como Fischer *et al.*, (1994), utilizando un vino blanco desalcoholizado, observaron que a pH 3.0 el vino era más astringente que a pH 3.6. Similar tendencia fue observada por De Miglio *et al.* (2002), los cuales utilizando vino tinto desalcoholizado a valores de pH de 3.2, 3.4, 3.6 y 3.8 comprobaron que se incrementaba la percepción de astringencia a valores decrecientes de pH.

Otros autores utilizando 3 ácidos orgánicos a diferentes pH (3, 5 y 7), observaron que al aumentar el pH, la intensidad de la sensación de astringencia disminuía (Lawless *et al.*, 1996). De igual forma, Kallithraka *et al.*, (1997) evaluaron la astringencia generada por una solución de ácido málico a distintos pHs entre 3.8 a 3.2 observando que a menor pH la intensidad máxima y la duración total de la percepción de astringencia se incrementaba. Sowalsky y Noble, (1998) utilizando distintos ácidos orgánicos a pH 2.8, 3.4 y 4.0 determinaron que para cada ácido, se producía una disminución en la intensidad de la astringencia a medida que se elevaba el pH. Esta observación fue reforzada por los trabajos realizados por Fontoin *et al.*, (2008) y Siebert y Euzen (2008) quienes demostrando que al aumentar el pH de una solución (vino o té, respectivamente), la intensidad de la astringencia era menor.

Los estudios anteriormente descritos estuvieron basados en evaluaciones mediante un panel entrenado en astringencia. Esta observación no descartaría que la relación inversa entre pH y astringencia pueda deberse a la reducción de la viscosidad salival (Nordbo *et al.*, 1984b; Luck *et al.*, 1994) debido a la alteración que sufren las proteínas salivares por el bajo pH presente (Nordbo *et al.*, 1984a), provocando con ello una disminución de la lubricación bucal, aumentando la sensación de astringencia (Sowalsky y Noble, 1998).

En la actualidad, experimentos orientados al estudio de la interacción proantocianidina-proteína realizados por Obreque *et al.*, (2010a), (2010c), evaluaron el comportamiento de proteínas modelo (Seroalbúmina bovina) y de proteínas complejas (Saliva) en ensayos de difusión y precipitación en membranas de celulosa. En estos estudios se observó la influencia del etanol (Obreque *et al.*, 2010b) y el pH (Obreque *et al.*, 2012)

sobre la interacción proantocianidina-proteína salival. En este último estudio, se utilizaron extractos ricos en proantocianidinas a un pH 3.5 y 7.0, observándose que a un menor pH se producía una mayor precipitación de las proantocianidinas con las proteínas, y que esto se relacionaba con una mayor astringencia percibida por un panel sensorial.

Recientemente, Rinaldi *et al.*, (2012) utilizando un vino Merlot, evaluó el efecto del pH (2.9, 3.0 y 3.6) sobre la precipitación del complejo formado entre polifenoles con proteínas salivares. Mediante electroforesis, se observó que a un menor pH existía una mayor precipitación lo cual se correlacionó con una mayor percepción astringente percibida por un panel sensorial

A partir de lo expuesto anteriormente, es posible señalar que la astringencia está fuertemente asociada a la interacción proantocianidina-proteína y que el pH es un factor altamente influyente. Sin embargo, los estudios realizados actualmente se han basado mayoritariamente en una evaluación sensorial, la cual utiliza un panel entrenado, lo que podría estar sujeto a cierta subjetividad (Valentova *et al.*, 2002).

BIBLIOGRAFÍA

Adams, D.; J. Harbertson and S. Matthew. 2004. Quantitative and qualitative differences in red wine astringency. Department of Viticulture & Enology, University of California.

Ahmed, A.; R. Smithard and M. Ellis. 1991. Activities of enzymes of the pancreas, and the lumen and mucosa of the small intestine in growing broiler cockerels fed on tannin-containing diets. *British Journal of Nutrition*. 65: 189-197.

Aleixandre, j. 2006. *La Cultura del vino: cata y degustación*. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. España. 345p.

Axelsson, P.; J. Paulander and J. Lindhe. 1998. Relationship between smoking and dental status in 35, 50, 65 and 75 year-old individuals. *Journal of Clinical Periodontology*. 25: 297-305.

Bacon, J. and M. Rhodes. 2000. Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins derived from It. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48 (3): 838–843.

Bajec, M. and G. Pickering. 2008. Astringency: mechanisms and perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48 (9): 858-875.

Bansil, R. and B. Turner. 2006. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 11(2-3): 164-170.

Bartowsky, E. and P. Henschke. 2004. The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology*. 96: 235–252.

Charlton, A.; N. Baxter; M. Khan; A. Moir; E. Haslam; A. Davies and M. Williamson. 2002. Polyphenol / peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (6): 1593–1601.

Chicharro, J.; A. Lucia; M. Perez; A. Vaquero and R. Urena. 1998. Saliva composition and exercise. *Sports Medicine*. 26 (1): 17-27.

Condelli, N.; C. Dinnella; A. Cerone; E. Monteleone and M. Bertuccioli. 2006. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Quality and Preference*. 17 (1-2): 96-107.

De Almeida, P.; A. Grégio; M. Machado; A. de Lima and L. Azevedo. 2008. Saliva Composition and Functions: A Comprehensive Review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 3 (9):72-80.

De Freitas, V. and N. Mateus. 2001. Nephelometric study of salivary protein-tannin aggregates. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 82:113–119.

De Miglio, P.; G. Pickering and A. Reynolds. 2002. Astringent subqualities elicited by red wine: the role of ethanol and pH. In: Cullen, C. W.; Pickering, G. J. and Phillips, R., Eds. *Proceedings of the international bacchus to the future conference, St Catharines, ON, May 23rd –25th, 2002*. St. Catharines, ON: Brock University Press.

De Rosa, T. 1998. *Tecnología de los vinos blancos*. Editorial Mundi-Prensa. España. 527p.

Dinnella, C.; A. Recchia; G. Fia; M. Bertuccioli and E. Monteleone. 2009. Saliva characteristics and individual sensitivity to phenolic astringent stimuli. *Chemical Senses*. 34 (4): 295-304.

Disler, P.; S. Lynch; R. Charlton; J. Torrance; T. Bothwell; R. Walker and F. Mayet. 1975. The effect of tea on iron absorption. *Gut Journal*. 16: 193-200.

Downey, M.; J. Harvey and S. Robinson. 2003. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal Grape Wine Research*. 9: 15-27.

Edgar, M.; C. Dawes and D. O'Mullane. 2004. *Saliva and oral health*. 3rd ed. London: BDJ Books. 146p.

Elkin, R.; W. Featherston and J. Rogler. 1978. Investigations of leg abnormalities in chicks consuming high tannin sorghum grain diets. *Poultry Science*. 57: 757-762.

Enberg, N.; H. Alho; V. Loimaranta and M. Lenander-Lumikari. 2001. Saliva flow rate, amylase activity, and protein and electrolyte concentrations in saliva after acute alcohol consumption. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 92 (3): 292-298.

Featherston, W. and J. Rogler. 1975. Influence of tannins on the utilization of sorghum grain by rats and chicks. *Nutrition Reports International*. 11: 491-497.

Ferenc, P. and M. Viljoen. 1995. Lactoferrin : A general review. *Haematologica*. 80: 252-267.

Fischer, U.; R. Boulton and A. Noble. 1994. Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Quality and Preference*. 5: 55-64.

Flanzy, C. 2000. *Fundamentos científicos y técnicos*. 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 (3): 286-291.

Garrido, j. and F. Borges. 2011. Wine and grape polyphenols- A chemical perspective. Food Research International.

Gambutì, A.; A. Rinaldi; R. Pessina and L. Moio. 2006. Evaluation of aglianico grape skin and seed polyphenol astringency by SDS-PAGE electrophoresis of salivary proteins after the binding reaction. Food chemistry. 97 (4): 614–620.

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.

Hagerman, A. and L. Butler. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 26: 809-812.

Hagerman, A. and L. Butler. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. The Journal of Biological Chemistry. 256: 4494-4497.

Hartwig, 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.

Hughes, D.; R. Hall and G. Embery. 1995. Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite. Biomaterials. 16: 697-702.

Humphrey, S. and R. Williamson. 2001. A review of saliva: normal composition, flow, and function. The Journal of Prosthetic Dentistry. 85 (2): 162-169.

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

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

Korpassy, B. 1961. Tannins as hepatic carcinogens. *Progress in experimental tumor research*.2: 245-290.

Lawless, H.; J. Home and P. Giasi. 1996. Astringency of organic acids is related to pH. *Chemical Senses*. 21 (4): 397-403.

Llaudy, M. 2006. Contribución al estudio de los factores que afectan la astringencia del vino tinto, Tesis doctoral. [Tarragona]: Universidad Rovira i Virgili. 205 p.

Lu, Y. and A. Bennick. 1998. Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology*. 43 (9): 717-728.

Luck, G.; H. Liao; N. Murray; H. Grimmer; E. Warminski; M. Williamson; T. Lilley and E. Haslam. 1994. Polyphenols, astringency, and proline-rich proteins. *Phytochemistry*. 37: 357-371.

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 (2): 85-118.

Navazesh, M.; R. Mulligan; V. Kipnis; P. Denny and P. Denny. 1992. Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentrations in healthy Caucasian young and aged adults. *Journal of Dental Research*. 71: 1275-1278.

Nordbo, H.; S. Darwish and R. Bhatnagar. 1984a. Rate of viscosity changes in five salivary protein fractions following pH alterations. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 92: 302-305.

Nordbo, H.; S. Darwish and R. S. Bhatnagar. 1984b. Salivary viscosity and lubrication: influence of pH and calcium. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 92: 306-314.

Obreque-Slier, E.; C. Mateluna; A. Peña-Neira and R. López-Solís. 2010a. Quantitative determination of interactions between tannic acid and a model protein using diffusion

and precipitation assays on cellulose membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (14): 8375-8379.

Obreque-Slier, E.; A. Peña-Neira and R. López-Solís. 2010b. Enhancement of both salivary protein–enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (6): 3729–3735.

Obreque-Slier, E.; A. Peña-Neira; R. López-Solís; F. Zamora-Marin; 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.; A. Peña-Neira and R. López-Solís. 2012. Interactions of enological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *Food Science and Technology*. 45 (1):88-93.

Peña-Neira, A. 2006a. Cambios composicionales de la baya durante el proceso de maduración y su importancia en la calidad de la uva y el vino. Disponible en: <http://www.gie.uchile.cl/publicaciones/index.html>. Leído el 14 de Agosto de 2013

Peña-Neira, A. 2006b. En la calidad de uvas y vino los taninos y su importancia. *Revista Vendimia*, Abril 2006: 18-20.

Percival, R.; S. Challacombe and P. Marsh. 1994. Flow rates of resting whole and stimulated parotid saliva in relation to age and gender. *Journal of Dental Research*. 73: 1416-1420.

Peters, E. and E. Azen. 1977. Isolation and partial characterization of human parotid basic proteins. *Biochemical Genetics*.15: 925–946.

Rinaldi, A.; A. Gambuti and L. Moio. 2012. Precipitation of salivary proteins after the interaction with wine: the effect of ethanol, pH, fructose, and mannoproteins. *Journal of Food Science*. 77 (4): 485–490.

Schipper, R.; E. Silletti and M. Vingerhoeds. 2007. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology*. 52 (12): 1114-1135.

Scalbert, A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*. 30: 3875-3883.

Siebert, K. and C. Euzen. 2008. The relationship between expectorant pH and astringency perception. *Journal of Sensory Studies*. 23: 222-233.

Siebert, K. and A. Chassy. 2003. An alternate mechanism for the astringent sensation of acids. *Food Quality and Preference*. 15: 13-18.

Sierra Alonso, I.; S. Morante Zarcero y D. Pérez Quintanilla. 2007. *Experimentación en química analítica*. Editorial Dykinson, Madrid, España, 161p.

Simonyi, A.; D. Woods; A. Sun and G. Y. Sun. 2002. Grape polyphenols inhibit chronic ethanol-induced COX-2 mRNA expression in rat brain. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. 26: 352-357.

Sowalsky, C. and A. Noble. 1998. Comparison of the effects of concentration, pH and anion species on astringency and sourness of organic acids. *Chemical Sense*. 23 (3): 343-349.

Sun, X.; B. Draczynska-Lusiak; A. Simonyi and A. Sun. 1999. Grape polyphenols protect neurodegenerative changes induced by chronic ethanol administration. *Neuroreport*. 10: 93-96.

Sun, A.; A. Simonyi and G. Sun. 2002. The "french paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radical Biology and Medicine*. 32: 314-318.

Takeuchi, T.; T. Matsushima and T. Sugimura. 1975. Separation of human α -amylase isozymes by electro-focusing and their immunological properties. *Clinica Chimica Acta*. 60 (2): 207-213.

Teissedre, P.; E. Frankel; A. Waterhouse; H. Peleg and J. German. 1996. Inhibition of in vitro human LDL oxidation by phenolic antioxidants from grapes and wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 70: 55-61.

Valentova, H.; S. Skrovánková; Z. Panovská and J. Pokorný. 2002. Time-intensity studies of astringent taste. *Food Chemistry*. 78: 29–37.

Van Vliet, T.; G. Van Aken; H. De Jongh and R. Hamer. 2009. Colloidal aspects of texture perception. *Advances in Colloid and Interface Science*. 150: 27–40.

Walsh, L. 2007. Aspectos clínicos de biología salival para el clínico dental. *International Dentistry South Africa*. 9: 22-41.

Waterhouse, A. 2002. Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 957: 21–36.

Yalcin, S. and Z. Ozbas. 2008. Effect of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*. 39: 325-332.

Yan, Q. and A. Bennick. 1995. Identification of histatins as tannin-binding proteins in human saliva. *Biochemical Journal*. 311:341–347.

Zamora, F. 2003. Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. Editorial Mundi-prensa. España. 225p.

Zoecklein, B.; K. Fungelsang; B. Gump and F Nury. 2001. Análisis y producción de vino. Editorial Acribia. España. 613p.

**II. EFECTO DEL pH SOBRE LA INTERACCIÓN PROANTOCIANIDINA-PROTEINA
SALIVAL Y SU RELACIÓN CON LA SENSACION DE ASTRINGENCIA**

RESUMEN

La astringencia es una sensación táctil provocada al consumir algunos alimentos como frutas o algunas bebidas, como el vino, asociados a la presencia de polifenoles en su composición. Estas moléculas pueden interactuar con las proteínas de la saliva para producir agregados insolubles. Como consecuencia de esto, la lubricación de la cavidad bucal se pierde generando una sensación que se percibe en la boca como de sequedad o arrugamiento. Un número de diferentes factores pueden afectar aquellas interacciones, tales como la composición y contenido de polifenoles, el alcohol, polisacáridos, ácidos orgánicos, entre otros. Sin embargo, varios informes han señalado al pH como el factor principal que afecta esas interacciones. En el presente estudio se evaluó el efecto del pH en el rango en el que se encuentran los vinos (2.8-4.0) sobre la interacción entre las proteínas salivares y las proantocianidinas de semillas de Carménère, mediante ensayos de difusión y precipitación en membranas de celulosa. Ambos ensayos fueron relacionados con la percepción de astringencia determinada por un panel sensorial. Los ensayos se realizaron a los pH que normalmente se producen los vinos (2.8, 3.2, 3.6, 4.0), junto con un control a pH 7.0. Los resultados indican que cambios de pH dentro de ese rango podrían cambiar significativamente el modo de difusión y la solubilidad de las proteínas salivares, es decir, a pH más bajos existe una interacción mayor entre proantocianidinas y proteínas salivares, lo que llevaría a una mayor percepción de astringencia.

Palabras claves

Interacción proantocianidina-proteína

Astringencia

Proantocianidinas

Proteínas salivares

pH

ABSTRACT

Astringency is a tactile sensation elicited by some foods, like fruits, and some drinks, like wine, associated to the presence of polyphenols in their composition. These molecules can interact with the salivary proteins to produce insoluble aggregates. As a consequence of this, lubrication of the oral cavity is lost and a sensation of dryness and wrinkling mouth feel is perceived. A number of different factors may affect those interactions, such as the composition and concentration of polyphenols, alcohol, polysaccharides and organic acids, among others. Several reports have pointed to pH as a main factor affecting those interactions. In the present study the effect of changes within a narrow range of wine pH (2.8-4.0) on the interactions between salivary proteins and proanthocyanidins of Carménère seeds was assessed by diffusion and precipitation assays on cellulose membranes. Both assays were contrasted against astringency perception as determined by a sensory panel. Trials were conducted at pH usually occurring in wines (2.8, 3.2, 3.6, 4.0), together with a control condition at pH 7.0. We observed that changes within that range of pH could change significantly the mode of diffusion and solubility of the salivary protein, that is, at lower pH there is a higher interaction between proanthocyanidin and salivary proteins, which would lead to a greater sensation of astringency.

KEYWORDS

Proanthocyanidin-proteins interaction

Astringency

Proanthocyanidins

Salivary proteins

pH

INTRODUCCIÓN

Los polifenoles son metabolitos secundarios que se asocian con diversas propiedades del vino y los alimentos, tales como, el color, el aroma, el amargor y la astringencia (Monagas *et al.*, 2005). La astringencia abarca un complejo grupo de sensaciones que van desde una sequedad y aspereza de la cavidad bucal hasta un arrugamiento o fruncimiento de la mucosa y músculos alrededor de la boca (Lee y Lawless, 1991). Esta sensación ha sido asociada con las interacciones y/o precipitación de complejos formados por los polifenoles (taninos condensados o proantocianidinas) con las proteínas salivares (Prinz y Lucas, 2000; Charlton *et al.*, 2002; Jöbstl *et al.*, 2004).

Diversos estudios han demostrado que la astringencia es altamente dependiente de diversos factores, tales como manejos agrícolas y enológicos, maceraciones pre y post fermentativas y estados de maduración de la uva (Canals *et al.*, 2005), contenido de alcohol (De Miglio *et al.*, 2002; Obreque-Slier *et al.*, 2010b), caudal y composición de la saliva (Dinnella *et al.* 2009), concentración y tamaño de la proantocianidina (Sarni-Manchado *et al.*, 1999), polisacáridos y manoproteínas (Guadalupe y Ayestarán, 2008), ácidos orgánicos y el pH (Fontoin *et al.*, 2008; Kallithraka *et al.*, 1997; Sowalsky y Noble, 1998; Lawless *et al.*, 1996).

El efecto del pH sobre la interacción proantocianidina-proteína ha sido ampliamente estudiado (Fischer *et al.*, 1994; Lawless *et al.*, 1996; Kallithraka *et al.*, 1997; Sowalsky y Noble, 1998; De Miglio *et al.*, 2002; Mateus *et al.*, 2004; Fontoin *et al.*, 2008; Siebert y Euzen, 2008; Obreque-Slier *et al.*, 2012a; Rinaldi *et al.*, 2012). Así, Fischer *et al.*, (1994) y De Miglio *et al.*, (2002), observaron que valores decrecientes de pH provocaron un incremento de la astringencia de vinos desalcoholizados. Estos resultados son similares a los observados por Lawless *et al.*, (1996) y Sowalsky y Noble, (1998) quienes al utilizar distintos ácidos orgánicos y diferentes niveles de pH (2.8-7.0) observaron que se producía una disminución de la intensidad de la astringencia a medida que se elevaba el pH. Paralelamente, estudios realizados por Kallithraka *et al.*, (1997) observaron que al disminuir el pH de 3.8 a 3.2 de un extracto de semilla, se producía un incremento en la intensidad y duración de la percepción de astringencia. Asimismo, Fontoin *et al.*,

(2008) observaron que al aumentar el pH de un extracto de tanino de semilla de uva de 2.5 a 4.0, disminuía la intensidad de la astringencia. Actualmente, Obreque-Slier *et al.*, (2012a) evaluaron el efecto del pH (3.5 y 7.0) sobre la interacción entre proantocianidinas de semillas y proteínas de la saliva, observando que el extracto a pH 3.5 produce un aumento en la interacción y precipitación del complejo, lo que se relacionaría con una mayor percepción de astringencia. Estos resultados fueron confirmados por Rinaldi *et al.*, (2012), los cuales indican que un vino tinto a un pH 2.9 provoca una mayor precipitación de proteínas salivares y consecuentemente una mayor astringencia que el mismo vino a un pH 3.6.

Aunque diversos estudios han evaluado el impacto del pH sobre la astringencia, frecuentemente aquellos utilizan metodologías basadas en la evaluación sensorial (Lee y Lawless, 1991; Lawless *et al.*, 1996, Kallithraka *et al.*, 1997, Peleg *et al.*, 1998, Sowalsky y Noble, 1998, De Miglio *et al.*, 2002, Mateus *et al.*, 2004, Fontoin *et al.*, 2008, Siebert y Euzen, 2008, Gawel *et al.*, 2013), la que al utilizar a un grupo de evaluadores, podría estar sujeto a cierta subjetividad (Valentova *et al.*, 2002).

Actualmente, los ensayos de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa han sido ampliamente utilizados (Obreque-Slier *et al.*, 2010a, 2010b, 2012a). Esta técnica permite la evaluación expedita, rápida y simple de la interacción tanino-proteína y además la utilización de sustratos proteicos puros, tales como BSA (Obreque-Slier *et al.*, 2010a) y mezclas proteicas de alta complejidad como la saliva (Depix, 2011). Es por esto que se propone la siguiente hipótesis, para evaluar el efecto del pH sobre la interacción entre proantocianidina de la semilla y proteínas salivares mediante el uso de membranas de celulosa.

HIPÓTESIS

A medida que disminuye el pH, la interacción entre las proantocianidinas de semillas con las proteínas salivares aumenta, lo cual se relaciona con un aumento en la sensación de astringencia.

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Evaluar el efecto del pH de un extracto de proantocianidinas de semillas de uva Carménère, sobre el comportamiento de las proteínas salivares y su relación con la sensación de astringencia.

2. Objetivos Específicos

Evaluar la capacidad de difusión y precipitación de las proteínas salivares sobre membranas de celulosa, al interactuar con proantocianidinas de semillas de uva Carménère ajustadas al rango de pH presente en los vinos.

Evaluar sensorialmente el efecto del pH en presencia de taninos proantocianidínicos de un extracto de semillas de uva Carménère sobre la percepción de astringencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

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

Materiales

Semillas

Las semillas de bayas del cultivar Carménère fueron cosechadas el 31 de mayo del 2013. Estas fueron obtenidas de plantas de 10 años de edad de la región del Maule ($35^{\circ} 8,94' S$ y $71^{\circ} 20,73' O$), cultivadas en sistema de conducción de espaldera, orientadas norte-sur y con una producción anual aproximada de 8000 kilos/hectárea (Castro, 2009). Las semillas fueron extraídas de las bayas de forma manual y posteriormente fueron almacenadas a $-4^{\circ}C$, hasta su uso.

Saliva Humana

La saliva se obtuvo de un individuo sano de 26 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 constituido por 12 evaluadores entrenados en astringencia, perteneciente a la Facultad de Ciencias Agronómicas (Centeno, 2006).

Reactivos y Equipamientos

Para los análisis se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) la cual se adquirió en Sigma Aldrich (San Louis, Missouri, EEUU). Las membranas de celulosa Whatman N° 1 en pliegos fueron adquiridos en Whatman Ltda., Maidstone, Inglaterra. El ácido tartárico, hidróxido de sodio, ácido tricloroacético (TCA), Coomassie blue R-250, reactivos grados pro-análisis y HPLC, y las soluciones tampones a pH 4,0 y 7,0 fueron adquiridas en Merck S.A., Chile.

Los equipos a utilizados fueron un pH-metro marca Jenway modelo 3510 con un electrodo 35805-12 marca Oakton, una centrífuga 75008151 Labofuge Heraeus 400, una bomba de vacío Thomas modelo N° 2522C-D2, un sistema de filtración por membrana de 0,45 μm Millipore, un agitador marca Barnstead Lab-line, un rotavapor Buchi R-210, un espectrofotómetro *UV-1700* Pharma Spec, una microcentrífuga Sorvall modelo MC-12V y un agitador Vortex-Genie modelo K-550.

Para el análisis de fraccionamiento de flavan-3-oles se utilizaron cartuchos Waters Sep-Pak C18 y para los 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 diámetro interno x 300 mm).

Métodos

Tratamiento y diseño de experimentos

Se realizaron 3 ensayos independientes. En los dos primeros se utilizó una mezcla de 1000 μL de extracto de semilla ajustado a diferentes pH, con 100 μL de BSA (Ensayo 1) y el otro con 100 μL de saliva (Ensayo 2). Cada ensayo constó de cinco tratamientos, cuatro de ellos a pH en el que se encuentra el vino (2.8; 3.2; 3.6 y 4.0) y los controles que corresponden a las mezclas de extracto de proantocianidina con saliva o BSA a pH 7.0 (Cuadro 1). Cada tratamiento se evaluó por triplicado. Para ambos ensayos el diseño experimental se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Finalmente, el tercer ensayo consistió en evaluar sensorialmente cada tratamiento, cuyo diseño experimental será en bloque completamente aleatorizado, siendo cada bloque un evaluador.

Cuadro 1. Tratamiento y volúmenes utilizados en los ensayos de difusión y precipitación

Tratamiento	Extracto de semilla	BSA/Saliva
T0	1000 μL ajustado a pH 7.0	100 μL
T1	1000 μL ajustado a pH 4.0	100 μL
T2	1000 μL ajustado a pH 3.6	100 μL
T3	1000 μL ajustado a pH 3.2	100 μL
T4	1000 μL ajustado a pH 2.8	100 μL

Para el primer ensayo la unidad muestral fue la mezcla de BSA y proantocianidinas a los diferentes pH. Para el segundo ensayo la unidad muestral fue la mezcla de saliva y proantocianidinas a los diferentes pH. Para la evaluación sensorial, la unidad muestral fueron los extractos de semilla a distintos pH.

Procedimiento

Preparación del extracto de semillas. Las semillas se separaron de las bayas, se lavaron con agua destilada y se secaron con papel absorbente. 10 g 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. Luego, la mezcla fue centrifugada a 3500 rpm durante 30 minutos y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0,45 μm . El extracto de semillas se diluyó en agua (1:6) para evitar el efecto mordiente de las proantocianidinas en la membrana de celulosa (Obreque-Slier *et al.*, 2010a). Así, el extracto de semillas fue ajustado a los distintos pH mediante el uso de ácido tartárico o hidróxido de sodio (Obreque *et al.*, 2012a).

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

Preparación de la solución de seroalbúmina bovina (BSA). Para preparar 1mg/mL de BSA, 100 mg de BSA se disolvieron en 500 mL de agua destilada a 35-40 °C con agitación constante durante 24 horas. La solución resultante se centrifugó a 2000 rpm por 5 minutos y se filtró a través de una membrana de 0,45 μm . La absorbancia a 280 nm de la solución final se ajustó a 0,70 con agua destilada (Obreque-Slier *et al.*, 2010a).

Variables a medir

Fenoles totales. Se tomó 1 ml del extracto y se diluyó con 20 ml agua destilada. Luego, se midió a una longitud de onda de 280 nm. Para su cuantificación se utilizó una curva de calibración con estándar de ácido gálico. El resultado fue expresado en mg equivalente de ácido gálico (EAG) por g de semilla (García-Barceló, 1990).

Taninos totales. En un tubo centrífuga de 10 ml se colocó 1 ml de extracto de semilla y 3 ml de solución de metilcelulosa disuelta en agua destilada (0,04% p/v). Luego de agitar y dejar reposar el tubo durante 2 a 3 minutos, se aplicaron 2 ml de una solución saturada de sulfato de amonio (43.47 gr/100 mL de agua destilada) y 4 mL de agua destilada. Así, los 10 mL se agitaron y se dejaron reposar 10 minutos a 20 °C. Para la muestra control se preparó una solución similar, pero sin la agregación de la solución de metilcelulosa. Ambas muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3500 rpm. Finalmente, se midió la absorbancia de ambos tubos a una longitud de onda de 280 nm. y ambos valores fueron restados. Este valor fue contrarrestado con una curva de calibración, para finalmente obtener la concentración de taninos en el extracto (mg equivalentes de catequina/g de semilla) (Mercurio *et al.*, 2007).

Fenoles de bajo peso molecular. 50 ml de extracto de semillas fueron extraídos con 20 ml de éter (3 veces) y con 20 ml de acetato de etilo (3 veces más). Al extracto obtenido se le agregaron 2 g de sulfato de sodio anhidro y se dejó reposar por 30 minutos. Posteriormente, el extracto fue secado bajo vacío a una temperatura menor a 35° C. La muestra se redisolvió en 2 ml de una mezcla de etanol: agua (50:50 vol:vol), se filtró en una membrana de 0,45 µm y fue analizado por HPLC-DAD (Bengochea *et al.*, 1995 y modificado por Peña-Neira *et al.*, 2007). La cuantificación de los polifenoles se realizó mediante la comparación del espectro UV y tiempo de retención de los respectivos estándares (Obreque-Slier *et al.*, 2009).

Fraccionamiento de proantocianidinas. 10 ml de extracto de semillas fueron secados a vacío (temperatura < 30°C). Luego, se redisolvió la muestra con 20 ml de solución buffer fosfato pH 7, se filtró y se colocó en los cartuchos C-18 y tC-18, previamente acondicionados con: 10 ml de metanol, 20 ml de agua destilada y 10 ml de buffer

fosfato pH 7. Posteriormente, se percolaron por los cartuchos, 10 ml de buffer fosfato diluido en agua (1:8). Los cartuchos fueron secados durante 2 horas con nitrógeno gaseoso. Las fracciones monomérica (F-I) + oligomérica (F-II) fueron eluidas agregando 25 ml de acetato de etilo, y posteriormente la fracción polimérica (F-III) fue eluida con 15 ml de metanol. Las fracciones F-I + F-II fueron secadas bajo vacío (temperatura < 30° C), redisueltas con 10 ml de solución buffer fosfato pH 7 y colocadas nuevamente en los cartuchos (previamente reacondicionados), los cuales fueron secados con nitrógeno gaseoso. Posteriormente, F-I fue eluido con 25 ml de éter y F-II con 15 ml de metanol. El eluido de cada fracción fue secado en un rotavapor a 30°C (Sun *et al.*, 1998).

Para la cuantificación de las fracciones flavánicas, se realizó el ensayo de la vainillina. F-I y F-II se redisolviéron con 3 ml de metanol y F-III con 3 ml de metanol:agua (1:10). En dos tubos de ensayo se agregó 1 ml de muestra redisuelta y 2,5 ml de ácido sulfúrico al 25% en metanol (v/v). A un tubo se le agregaron 2,5 ml de vainillina al 1% en metanol y al otro tubo 2,5 ml de metanol (control). Cada tubo fue medido a una longitud de onda de 500 nm. Para F-I la medición fue realizada inmediatamente tras una exposición de 15 minutos en baño María a temperatura < 30° C. La fracciones F-II fue medida una vez transcurrido 1800 segundos y 5000 segundos para F-III (Sun *et al.* 1998).

Evaluación de la interacción tanino-proteína mediante ensayos de difusión y precipitación del complejo. La interacción tanino-proteína fue evaluada mediante ensayos de difusión y precipitación sobre membranas de celulosa (Whatman 1) de acuerdo a lo propuesto por Obreque-Slier *et al.*, (2010 a, 2010b y 2012a) (Figura 1). Previo a la evaluación, se midió el pH de la mezcla de BSA/saliva con el extracto de semilla. Una vez realizados los ensayos, se cuantificó el área (cm²) e intensidad (píxeles/cm²) de las zonas de difusión de la proteína sobre la membrana de celulosa mediante la digitalización de las imágenes y aplicación de morfometría a través del programa Image J (Meza, 2012).

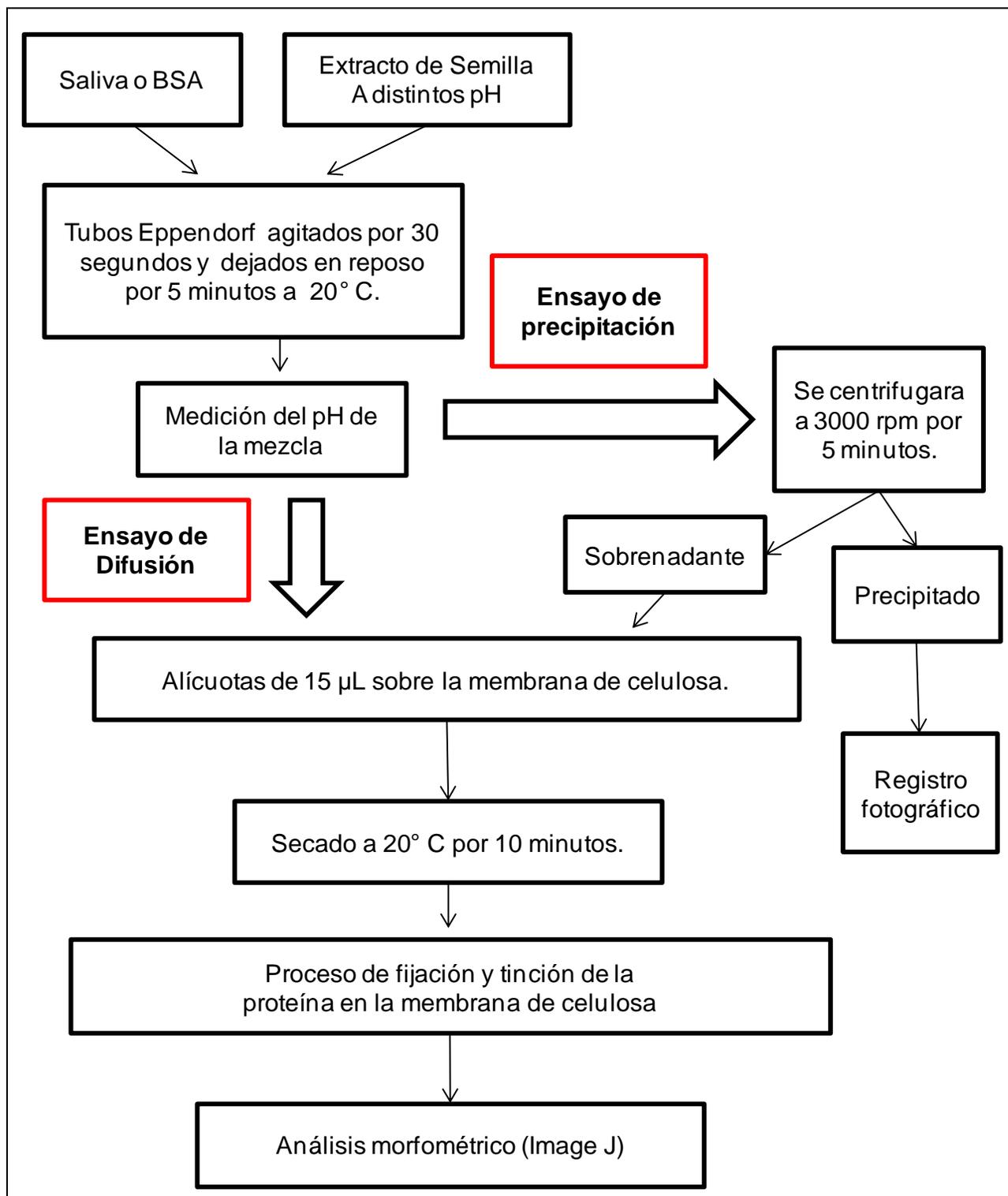


Figura 1. Ensayos de difusión y precipitación para la evaluación de la formación de complejos tanino-proteína a distintos pH.

Evaluación sensorial. Una alícuota de 10 mL de una solución de extracto de semilla a distintos pH fue evaluada por 12 panelistas entrenados (7 hombres y 5 mujeres) entre 23 y 26 años. Los evaluadores realizaron una sesión de diagnóstico, mediante un test de ranking con la finalidad de homogenizar el panel y determinar el nivel de discriminación de los evaluadores. En una segunda sesión, se realizaron las evaluaciones de los tratamientos, utilizando un test descriptivo para medir la intensidad de la astringencia en una escala no estructurada de 0-15 cm, donde cero indicó la ausencia del atributo y 15 la máxima intensidad del atributo (Anexo I).

Las muestras fueron entregadas en forma randomizada, en vasos de vidrio a una temperatura ambiente ($20,0 \pm 2,0$ °C). Todas las evaluaciones se llevaron a cabo en cabinas aisladas bajo una luz roja. Para la evaluación, los panelistas mantuvieron la muestra en la boca durante aproximadamente 6 segundos, para luego eliminarla. Entre cada muestra los panelistas enjuagaron su boca con 1 g/L de solución de pectina en agua destilada (Obreque *et al.*, 2010b, 2012a).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados estadísticamente, mediante análisis de varianza (ANDEVA), a un nivel de significancia del 5% utilizando el programa estadístico Minitab 16.1. En el caso de existir diferencias significativas entre los tratamientos se utilizó la prueba de rangos múltiples de Tukey. De la misma forma fueron analizados estadísticamente los resultados obtenidos en la evaluación sensorial, este último se realizó mediante un diseño en bloque, donde cada bloque es un panelista.

RESULTADOS

Caracterización del extracto de semilla

El Cuadro 2, muestra la composición fenólica del extracto de semilla de *Vitis vinifera* variedad Carménère. Los fenoles de bajo peso molecular determinados por HPLC-DAD fueron: dos monómeros [(+)-catequina (C) y (-)-epicatequina (EC)], proantocianidinas diméricas (B1, B2, B3 y B4), diversas proantocianidinas (P) y galatos de proantocianidinas (GP). El ácido gálico (AG) fue el único compuesto no flavonoide identificado (Figura 2). Se observó que la (+)-catequina y (-)-epicatequina fueron los polifenoles de bajo peso molecular más abundantes, mientras que las proantocianidinas B3 y B4 las que presentaron las menores concentraciones. Asimismo, la fracción polimérica de flavanoles fue más abundante que las fracciones mono y oligoméricas.

Cuadro 2. Composición fenólica del extracto de semilla *Vitis vinifera* var. Carménère.

Compuestos fenólicos	Concentración (mg/g)
Fenoles totales ^a	18,39
Taninos totales ^b	21,68
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
Galato de proantocianidinas ^c	0,023
Fracción monomérica ^f	0,473
Fracción oligomérica ^f	2,436
Fracción polimérica ^f	5,126

^a mg de ácido gálico/g de semilla; ^bmg de catequina/g de semilla; ^cmg de ácido gálico /g de semilla medido por HPLC; ^dmg de catequina/g de semilla; ^emg de epicatequina/g de semilla; ^f mg de fracción/g de semilla.

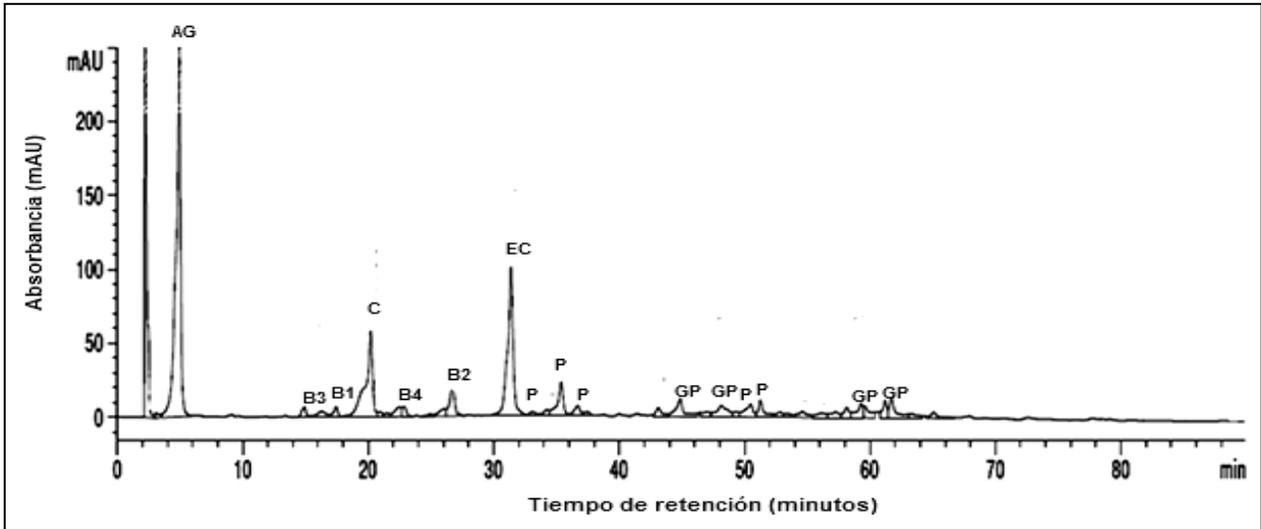


Figura 2. Cromatograma (280 nm) de compuestos fenólicos de bajo peso molecular del extracto de semilla de la variedad Carménère.

pH y difusión de las proteínas en la membrana de celulosa

En la Figura 3, se muestra una alícuota de saliva y BSA (1 mg/mL) con sus respectivos pH (6.99 y 6.14, respectivamente). Además, se observa que al depositar una alícuota de 15 μ l de cada fluido proteico en un punto de la membrana de celulosa la suspensión de la BSA, muestra una difusión en forma radial humectando una superficie de forma aproximadamente circular, con un desplazamiento homogéneo del fluido junto al agua (modo monofásico de difusión). Por su parte, 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).

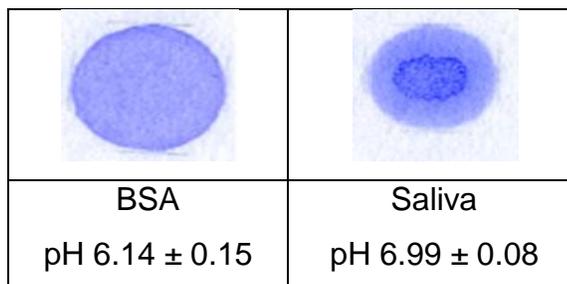


Figura 3. Modos de difusión de proteínas sobre membrana de celulosa.

En la Figura 4A, se observa que una alícuota de 15 μ l del extracto de semilla a pH neutro, es débilmente detectado. Asimismo, el área teñida del extracto de semilla disminuye sutilmente a medida que disminuye el pH de 4.0 a 2.8, aunque la intensidad de tinción permanece inalterable (Figura 5).

Por otro lado, una disminución del pH de la suspensión de BSA en agua de 6.61 a 2.85, provocó una desaparición paulatina del área de la fracción difusible (FD) (Figura 6 A). Esta última presentó una disminución significativa de la intensidad de tinción (Figura 6 B).

Por otro lado, al colocar una alícuota de la mezcla del extracto de proantocianidinas y BSA a pH 6.61 sobre la membrana de celulosa (Figura 4 C), se observó que la difusión de la proteína permaneció inalterada al igual que su control en agua (Figura 4 B). Sin embargo, al disminuir el pH de la mezcla a 4.23, se observó una disminución significativa de la difusión y un aumento de la intensidad (Figuras 6 C y D).

En el caso de la saliva, se observó que al diluirla en agua (1:10, pH 6.99) (Figura 4 D) presentó una difusión bifásica. No obstante, al disminuir el pH de la mezcla (5.99 a 2.95), se observó una disminución del área de ambas fracciones y un leve aumento de la intensidad de la FND de la saliva (Figura 7 A y B). Asimismo, al mezclar el extracto de proantocianidinas con saliva (Figura 4 E), se observó que a medida que disminuyó el pH decreció significativamente el área e intensidad de la FD de la saliva, mientras que el área e intensidad de la FND no presentó variación (Figura 7 C y D).

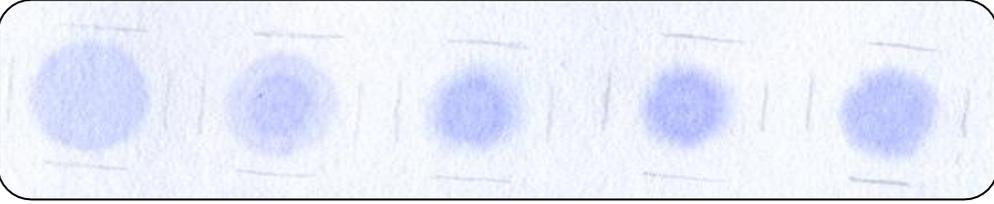
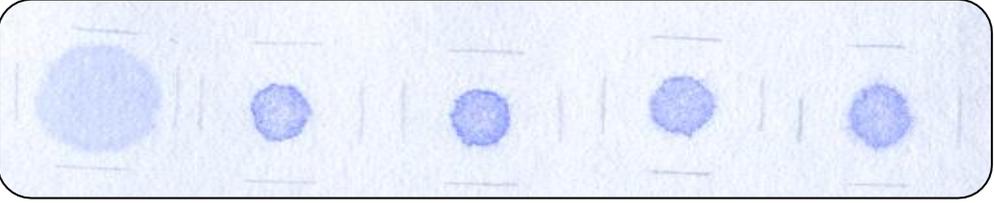
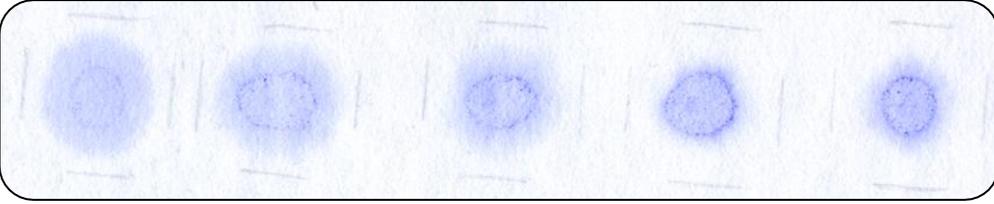
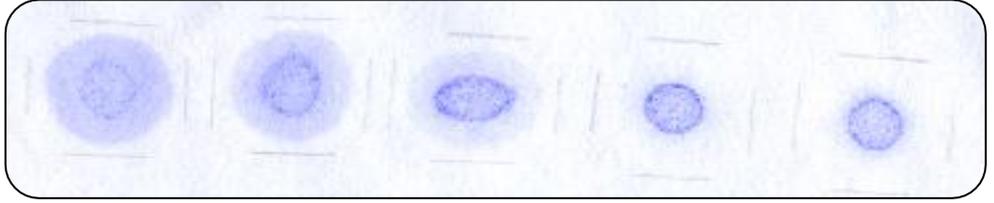
A	pH 7.0	pH 4.0	pH 3.6	pH 3.2	pH 2.8
Extracto					
B	pH 6.61	pH 4.23	pH 3.79	pH 3.28	pH 2.85
BSA en agua					
C	pH 6.61	pH 4.23	pH 3.79	pH 3.28	pH 2.85
BSA en Extracto					
D	pH 6.99	pH 5.99	pH 4.84	pH 3.73	pH 2.95
Saliva en agua					
E	pH 6.99	pH 5.99	pH 4.84	pH 3.73	pH 2.95
Saliva en Extracto					

Figura 4. Efecto del pH del extracto de semilla sobre la difusión de proteínas. (A) difusión del extracto de semilla a distintos pHs; (B) difusión de BSA diluída en agua destilada a distintos pHs, (C) difusión de la mezcla de BSA con las proantocianidinas del extracto de semillas a distintos pHs; (D) difusión de la saliva diluída en agua destilada a distintos pHs y (E) difusión de la mezcla de saliva con las proantocianidinas del extracto de semillas a distintos pHs. Los pH corresponden a la mezcla del extracto de semillas y la correspondiente proteína.

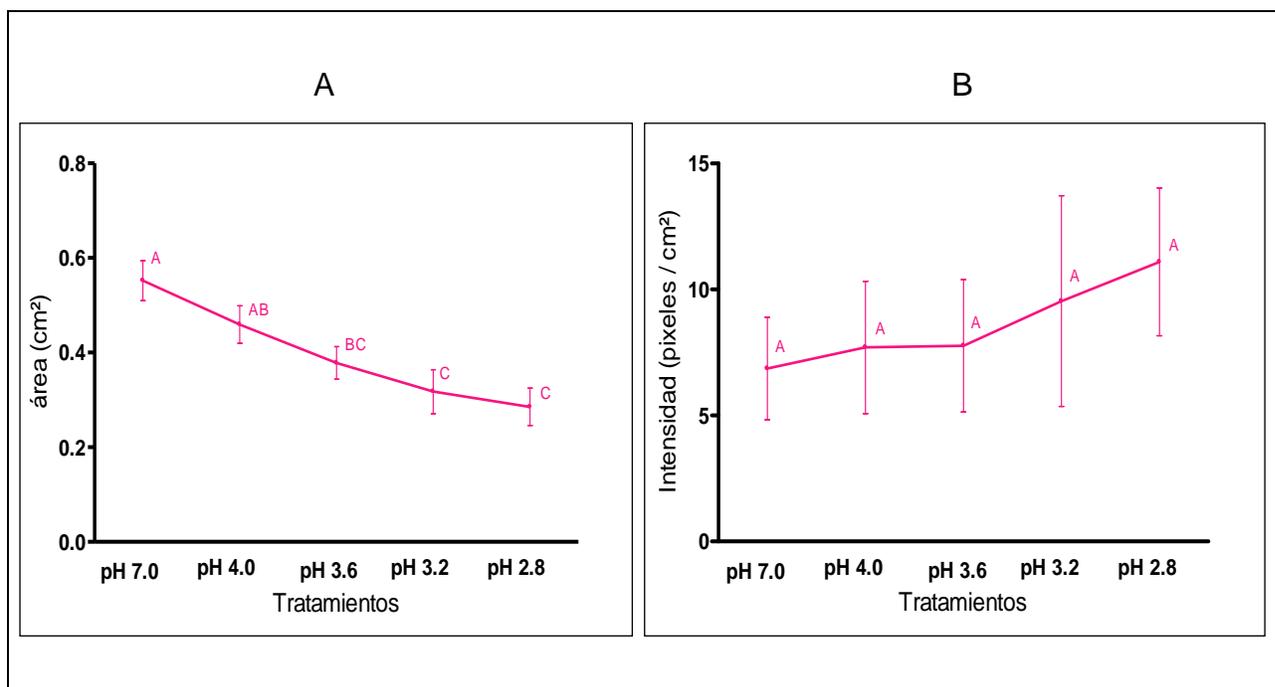


Figura 5. Área (cm²) (A) e intensidad (píxeles/cm²) (B) de la difusión de las proantocianidinas de semilla descritas en la Figura 4 A. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

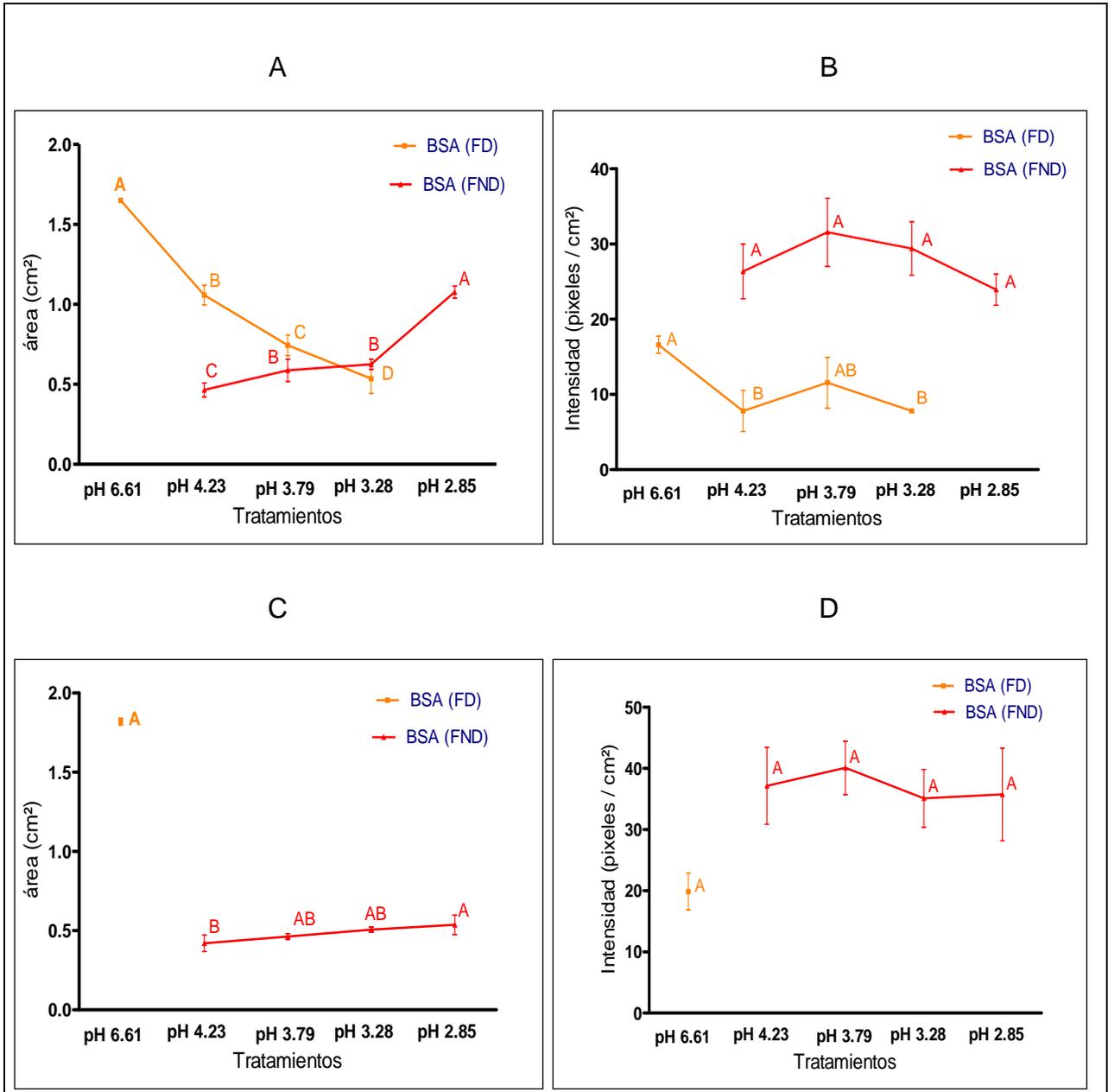


Figura 6. Área (cm²) (C) e intensidad (píxeles/cm²) (D) corresponden a la difusión de la mezcla de BSA con proantocianidinas de semilla a distintos niveles de pH. Los controles corresponden a BSA diluida en agua destilada a los distintos niveles de pH (A y B). Los gráficos fueron elaborados a partir de las Figuras 4 B y C. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

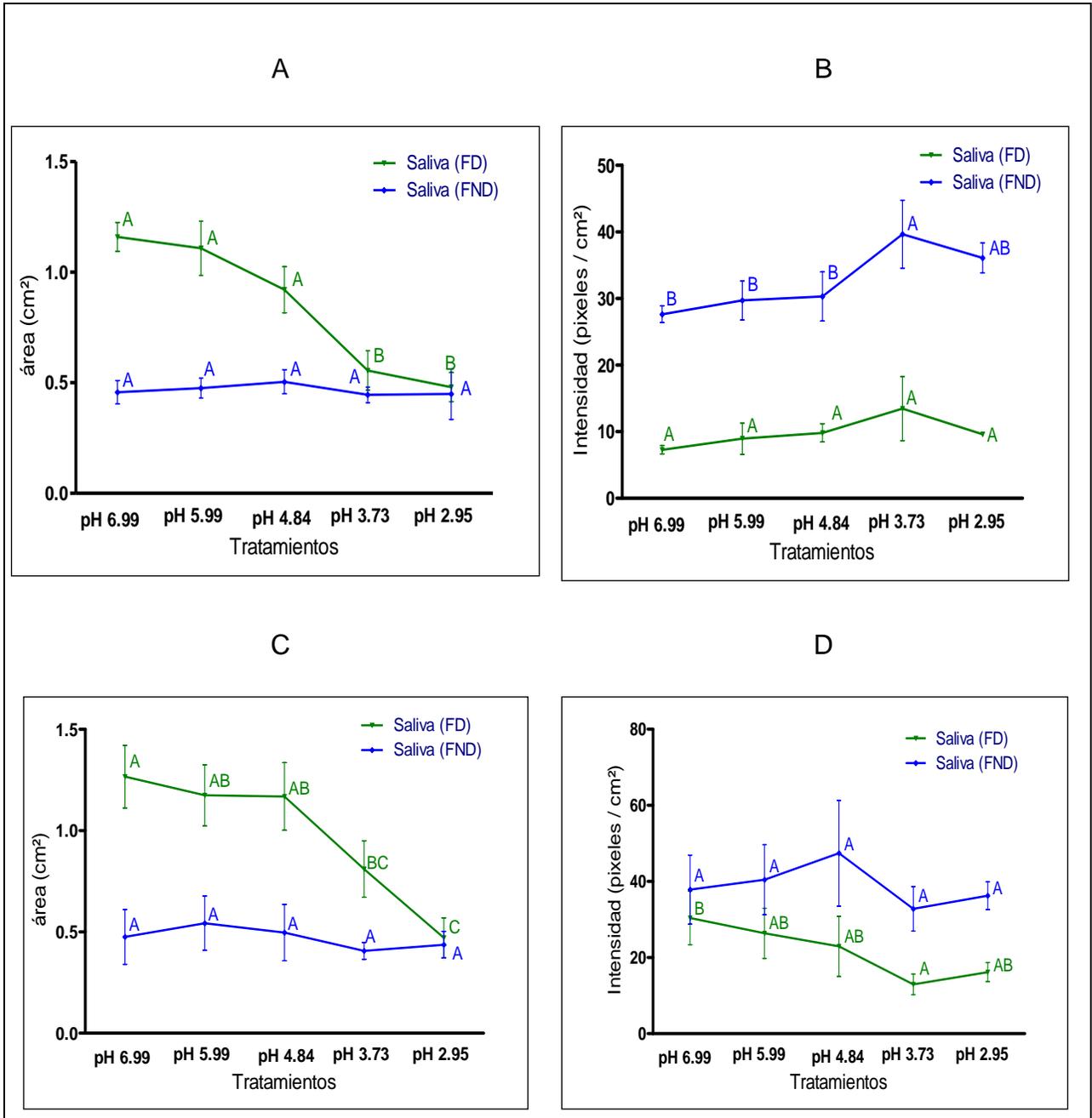


Figura 7. Área (cm²) (C) e intensidad (píxeles/cm²) (D) corresponden a la difusión de la mezcla de saliva con proantocianidinas de semilla a distintos niveles de pH. Los controles corresponden a saliva diluida en agua destilada a los distintos niveles de pH (A y B). Los gráficos fueron elaborados a partir de las Figuras 4 D y E. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Efecto del pH sobre la precipitación entre proantocianidinas y proteínas

Las muestras utilizadas en las pruebas de difusión, fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 minutos y del sobrenadante se extrajeron 15 μ L, los cuales fueron depositados sobre la membrana de celulosa y procesadas según lo mencionado en la sección de Materiales y Métodos. Al colocar una alícuota del sobrenadante del extracto de semillas, se observó una leve detección en la membrana de celulosa (Figura 8 A), no presentando diferencias significativas en las áreas e intensidades de tinción de los distintos tratamientos (Figura 10). De la misma manera, se observó un limitado precipitado en el fondo de los tubos Eppendorf (Figura 9 A).

Por otra parte, la suspensión de BSA en agua, presentó un modo monofásico de difusión a un pH neutro (Figura 8 B). Sin embargo, a medida que disminuyó el pH se observó la aparición de una FND y una desaparición gradual de la FD (Figura 11 A). De la misma manera, la intensidad y el área de difusión de ambas fracciones fueron modificadas a medida que disminuyó el pH (Figura 11 B). Asimismo, luego de mezclar BSA con el extracto de proantocianidina (pH 6.61) (Figura 8 C) no se observó un cambio significativo con respecto al control (Figura 8 B). No obstante, la disminución del pH (entre 4.23 y 3.28) provocó una desaparición completa de la proteína del sobrenadante, mientras que bajo las condiciones de pH 2.85, se observó la aparición de un halo de intensa y significativa tinción (Figura 11 D). Complementariamente, la Figura 9 C muestra la aparición de precipitados en el fondo de los tubos Eppendorf.

Por otro lado, luego de la centrifugación de la saliva diluída en agua (1:10) (pH mezcla 6.99), se observó que las proteínas difundieron monofásicamente en forma radial (Figura 8 D). Así, en la medida que disminuyó el pH de la suspensión, aumentó el área e intensidad de la FND. Contrariamente, el área e intensidad de la FD disminuyó gradualmente en la medida que el pH fue menor (Figura 12 A y B). Asimismo, al mezclar saliva con extracto de semilla a distintos pHs (6.99 a 2.95) (Figura 8 E), se observó una disminución del área e intensidad de la FD de la saliva. Contrariamente, el área de la FND de la saliva aumento significativamente cuando el pH de la mezcla disminuyo de 6.99 y 5.99 (Figura 12 C y D). Complementariamente, la Figura 9 D y E muestran la aparición de precipitado en el fondo de los tubos Eppendorf.

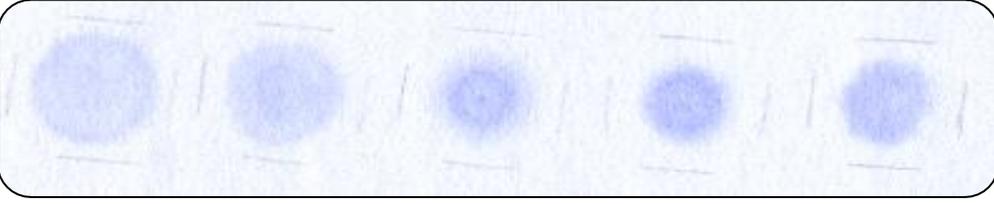
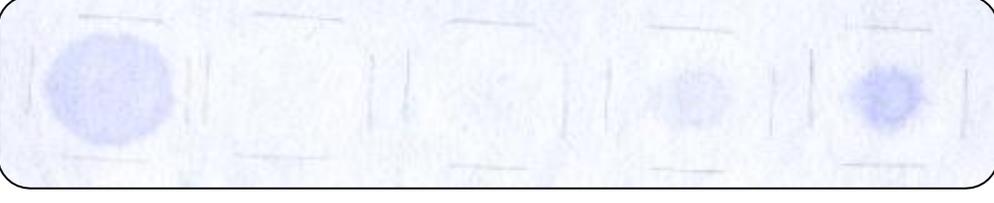
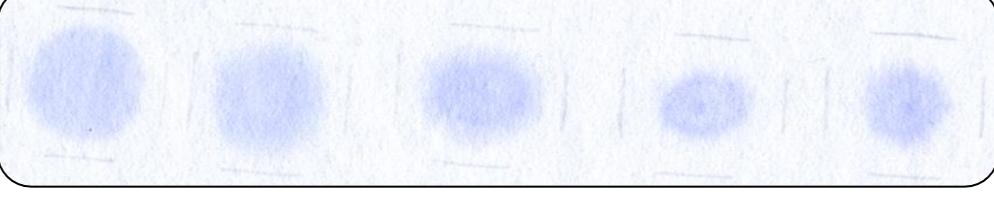
A	pH 7.0	pH 4.0	pH 3.6	pH 3.2	pH 2.8
Extracto					
B	pH 6.61	pH 4.23	pH 3.79	pH 3.28	pH 2.85
BSA					
C	pH 6.61	pH 4.23	pH 3.79	pH 3.28	pH 2.85
BSA en Extracto					
D	pH 6.99	pH 5.99	pH 4.84	pH 3.73	pH 2.95
Saliva					
E	pH 6.99	pH 5.99	pH 4.84	pH 3.73	pH 2.95
Saliva en Extracto					

Figura 8. Efecto del pH del extracto de semilla sobre la precipitación de proteínas. (A) precipitación del extracto de semilla a distintos pHs; (B) precipitación de BSA diluída en agua destilada a distintos pHs, (C) precipitación de la mezcla de BSA con las proantocianidinas del extracto de semillas a distintos pHs; (D) precipitación de la saliva diluída en agua destilada a distintos pHs y (E) precipitación de la mezcla de saliva con las proantocianidinas del extracto de semillas a distintos pHs. Los pH corresponden a la mezcla del extracto de semillas y la correspondiente proteína.

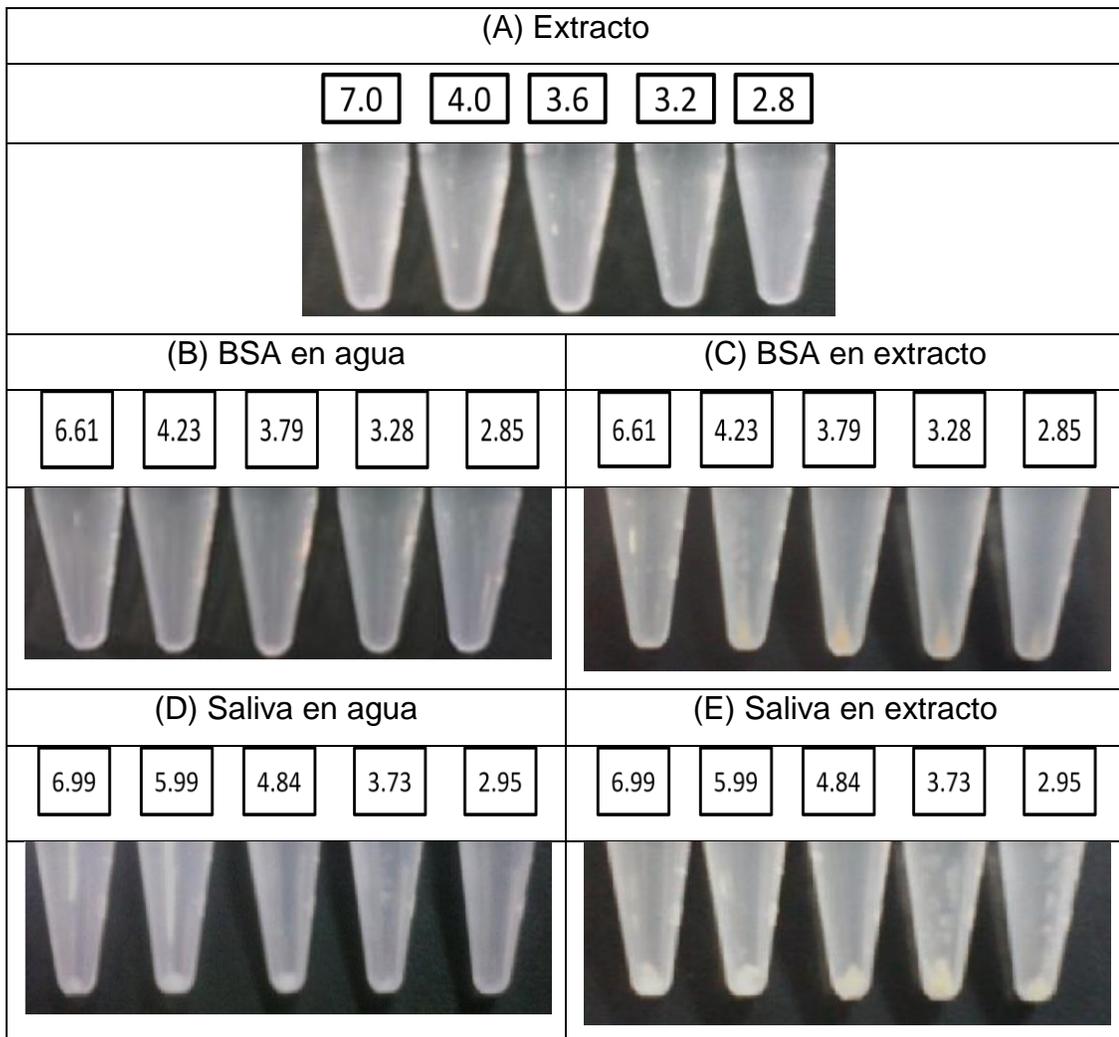


Figura 9. Efecto del pH del extracto de semilla sobre la precipitación de proteínas. Ver leyenda Figura 8.

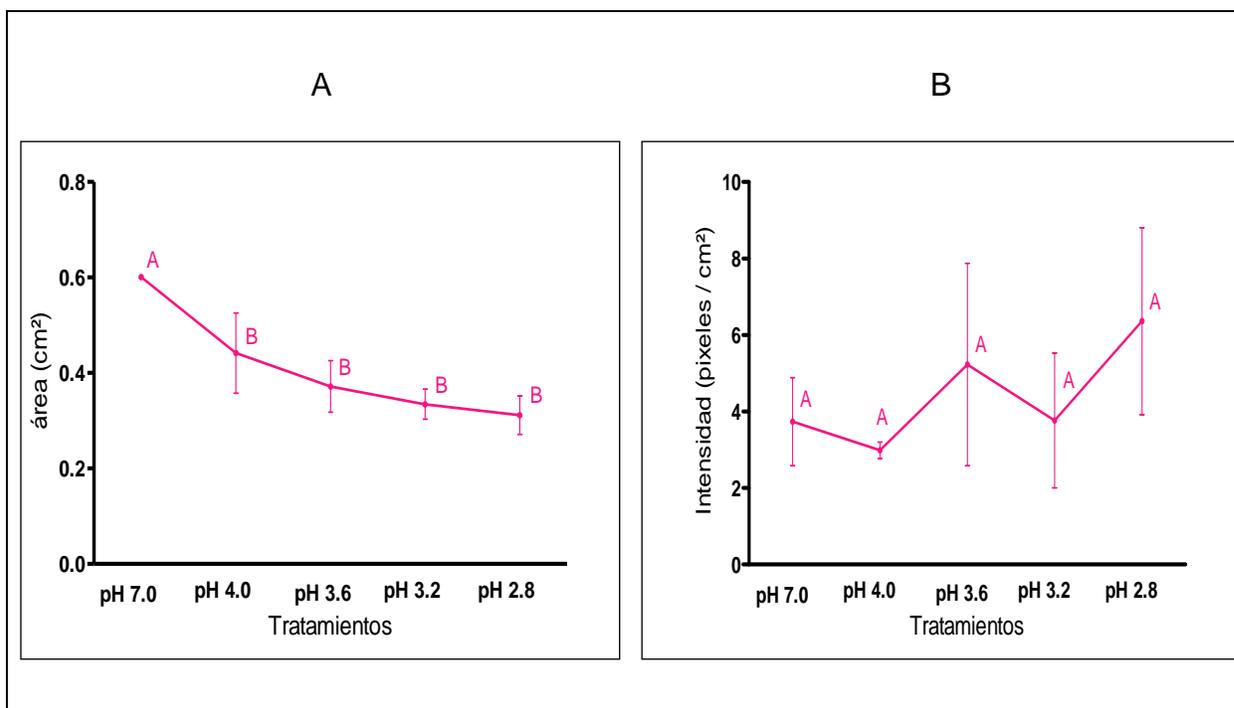


Figura 10. Área (cm²) (A) e intensidad (píxeles/cm²) (B) de la precipitación de las proantocianidinas de semilla descritas en la Figura 7 A. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

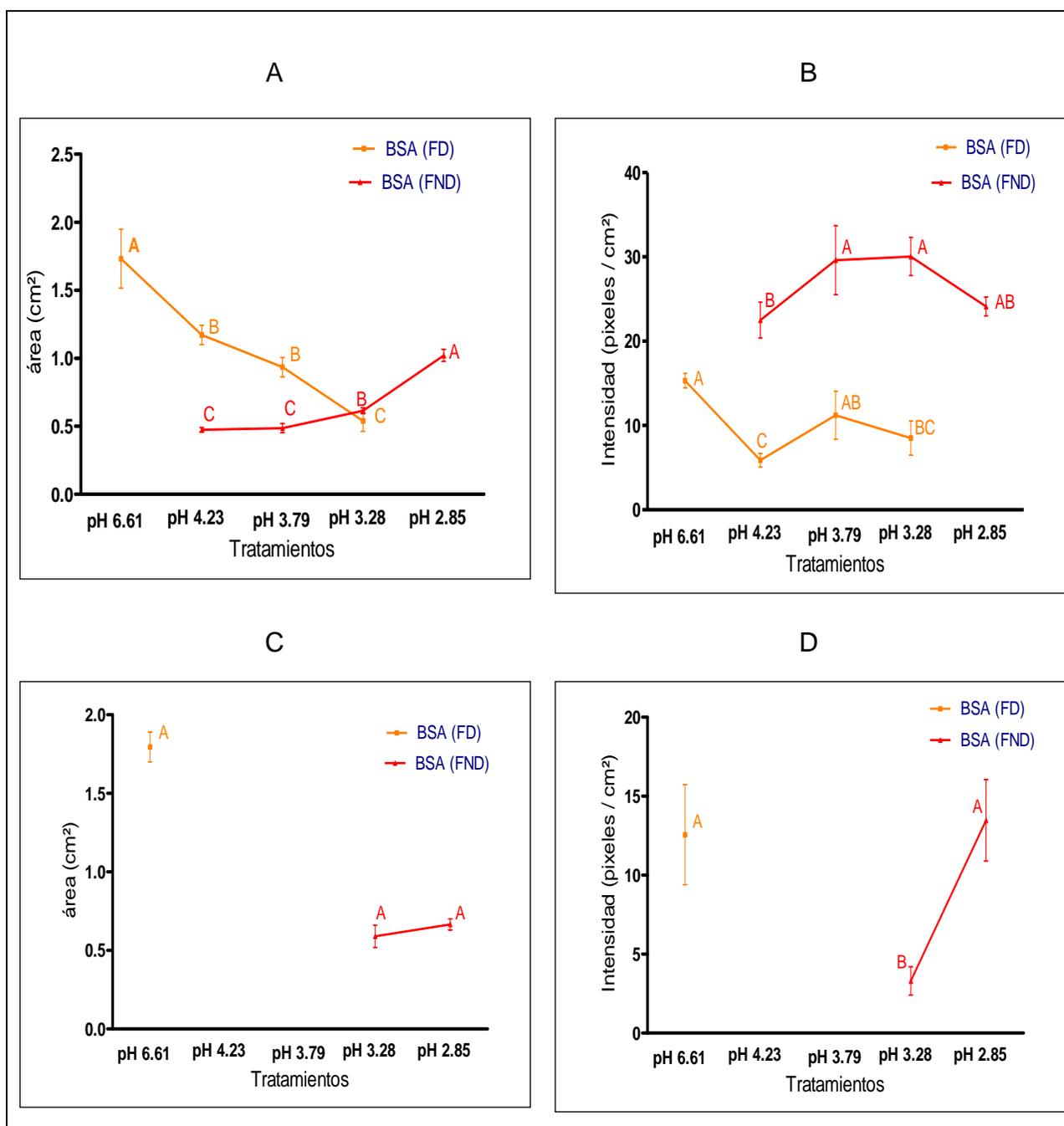


Figura 11. Área (cm²) (C) e intensidad (píxeles/cm²) (D) corresponden a la difusión de la mezcla de BSA con proantocianidinas de semilla a distintos niveles de pH. Los controles corresponden a BSA diluida en agua destilada a los distintos niveles de pH (A y B). Los gráficos fueron elaborados a partir de las Figuras 8 B y C. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

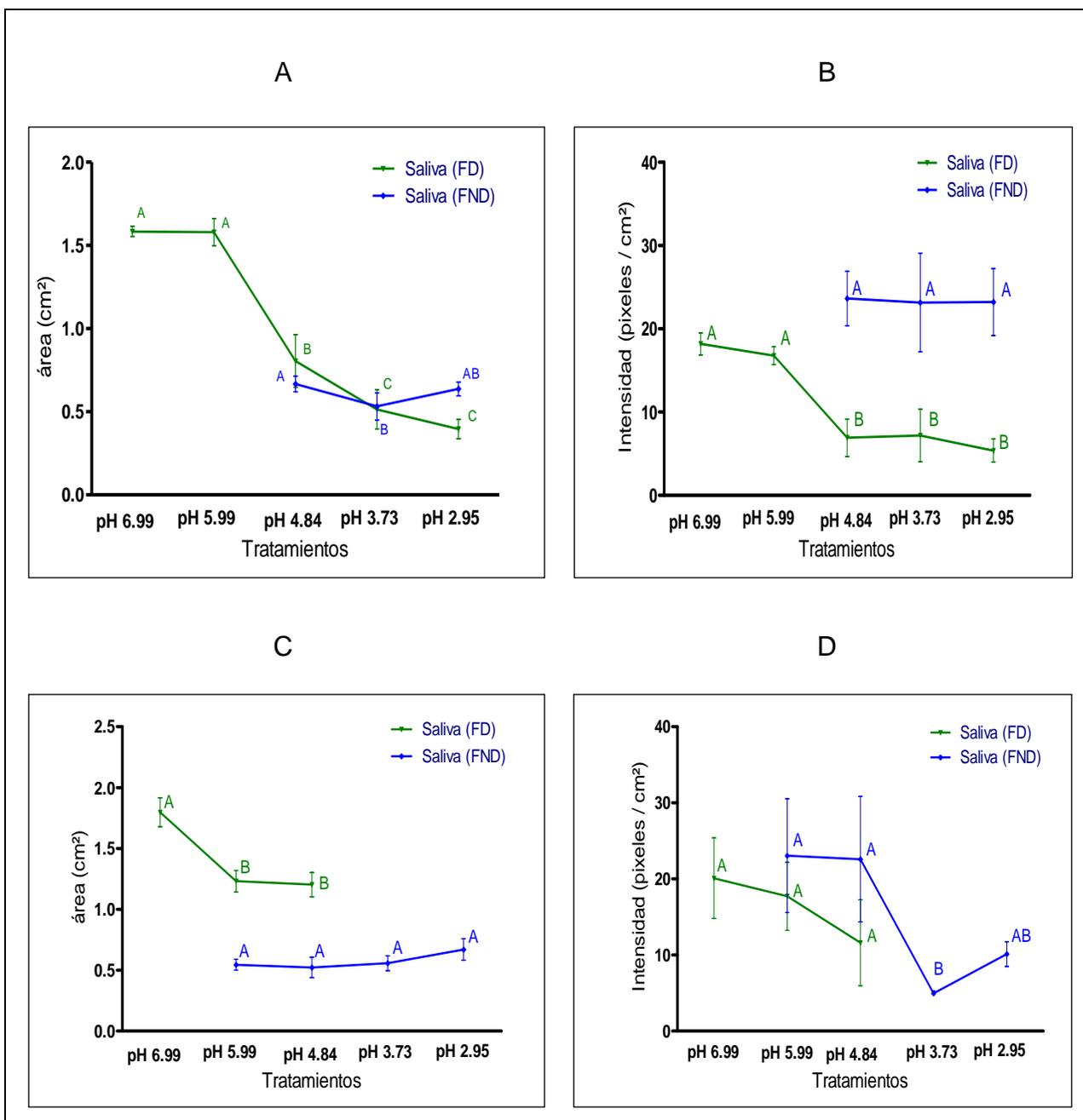


Figura 12. Área (cm²) (C) e intensidad (píxeles/cm²) (D) corresponden a la difusión de la mezcla de saliva con proantocianidinas de semilla a distintos niveles de pH. Los controles corresponden a saliva diluida en agua destilada a los distintos niveles de pH (A y B). Los gráficos fueron elaborados a partir de las Figuras 8 D y E. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar (por triplicado). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos.

Evaluación sensorial

En el Cuadro 3 se muestran los resultados del análisis sensorial del extracto de semillas a distintos pHs. Se observó que a pH más bajos (2.8 y 3.2) la percepción astringente por parte del panel fue significativamente mayor que a pH más altos (4.0 y 7.0).

Cuadro 3. Intensidad de la percepción de astringencia en función del pH.

	pH 7.0	pH 4.0	pH 3.6	pH 3.2	pH 2.8
Extracto de semilla	3,0 ± 1,2 D	4,4 ± 1,6CD	5,7 ± 1,6 BC	7,0 ± 1,5AB	8,7 ± 1,8A

Los valores corresponden al promedio ± desviación estándar de los evaluadores a distinto pH. Cada letra mayúscula diferente en la columna representa diferencia estadísticamente significativa entre los pH (test de Tuckey , $\alpha=0,05$).

DISCUSIÓN

La saliva corresponde a un fluido exocrino constituido por diversas familias de proteínas salivares, tales como, proteínas ricas en histidina y proteínas ricas en prolina, las cuales se han relacionado recurrentemente con la neutralización de polifenoles (Naurato *et al.*, 1999; Lu y Bennick, 1998). Aunque, la interacción de los polifenoles con otras proteínas salivares no ha sido descartada (Gambutu *et al.*, 2006; Condelli *et al.*, 2006), todas esas interacciones serían la base de la percepción de astringencia (Bajec y Pickering, 2008). Se ha observado, que las condiciones locales en la boca durante la degustación pueden afectar las interacciones de los polifenoles (tanino) lo que jugaría una gran influencia en la percepción de la astringencia (De Miglio *et al.*, 2002; Sowalsky y Noble, 1998; Kallithraka *et al.*, 1997; Peleg *et al.*, 1998, Siebert y Euzan, 2008; Fontoin *et al.*, 2008). En el presente estudio, se evaluó el efecto de las proantocianidinas de semillas disueltas en diferentes niveles de pH, para interactuar y precipitar las proteínas del fluido salival y BSA. El uso de BSA se justifica por ser una proteína pura, homogénea y de alto uso en la investigación de la astringencia (Obreque-Slier *et al.*, 2010a; Mateus *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2004; De Freitas y Mateus, 2001). Para este objetivo, se evaluó si un extracto de semillas rico en proantocianidinas, afecta de una manera dependiente del pH la difusibilidad de las proteínas salivares o BSA en una membrana de celulosa y en un ensayo complementario más convencional, si ese extracto de proantocianidinas afecta también de una manera dependiente del pH la solubilidad de las fracciones de proteína salival o BSA. Las condiciones de control de estos experimentos fue la dilución de la saliva o BSA en agua destilada a los distintos pH.

Inicialmente, el extracto de semillas fue analizado y caracterizado mediante análisis espectrofotométrico y de HPLC-DAD, observándose que los contenidos de fenoles y taninos totales coinciden con lo observado en semillas de uva (Obreque-Slier *et al.*, 2010c, Obreque-Slier *et al.*, 2012b). Asimismo, las distintas fracciones de flavan-3-oles mostraron contenidos similares que los señalados en estos mismos estudios. Por su parte, la composición y 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 *et al.*, 2004; Obreque-Slier *et al.*, 2010a; Obreque-Slier *et al.*, 2010b; Obreque-Slier *et al.*, 2012b).

Durante la degustación, los consumidores y/o evaluadores degustan entre alrededor de 10 a 15 mL de vino (Jackson, 2009) y diversos estudios mencionan que el flujo salival de un individuo en las condiciones descritas en este ensayo corresponde a 1mL/minuto (Lagerlöf y Dawes, 1984; Weatherell *et al.*, 1992; Müller *et al.*, 2010). Estas dos condiciones fueron utilizadas en este estudio para establecer las proporciones en las mezclas de fluido salival y el extracto de semillas, para así asemejar las condiciones de proporcionalidad que se producen en la boca durante la degustación.

El modo bifásico de difusión del fluido salival diluido en una solución acuosa a pH 6.99, sugiere la existencia de una organización compleja de las proteínas no difusibles cuyo tamaño determinaría su retención sobre la superficie de la membrana. Por el contrario, el material difusible correspondería a proteínas más libres fácilmente arrastrables por el agua. Esta última observación, representaría el modo de difusión de BSA en una solución acuosa a pH 6.61.

Al mezclar el fluido salival con agua destilada ajustada a pH menor a 3.73, la superficie total e intensidad de coloración se vio fuertemente afectada. Esto podría deberse a que una disminución del pH produjo una alteración de las propiedades reológicas de la saliva modificando su viscosidad (Nordbo *et al.*, 1984; Kallithraka *et al.*, 1997), haciendo que las proteínas de la FD se vieran fuertemente disminuidas en su capacidad de difundir, mientras que la intensidad de la FND se mantiene constante. Por su parte, BSA, mostró un comportamiento similar al de la saliva, transformando su modo de difusión monofásico (pH 6.61) a bifásico bajo una condición de pH 4.23.

De acuerdo al comportamiento de difusión observado por las proteínas salivares y BSA, es esperable que la interacción de este tipo de proteínas con compuestos afines por ella, como los polifenoles (taninos), provoque una alteración de su difusión (Obreque-Slier *et al.*, 2010a, 2010c). Así, se pudo observar mediante el ensayo de difusión que la presencia de proantocianidinas en un pH neutro, no afectó significativamente la tinción total del fluido salival. Esta observación, sugeriría que la actividad de los taninos

dependería de los factores que afecten el medio en que se encuentren, entre ellos el pH, y que las proantocianidinas por si solas no afectarían significativamente en la percepción de astringencia (Obreque-Slier *et al.*, 2012a). Esta observación fue doblemente corroborada, pues las proteínas salivares mezcladas con el extracto de proantocianidinas a un pH menor a 4.84 disminuyeron fuertemente el área e intensidad de la FD. Por otro lado, los panelistas evaluaron el extracto de semillas de un pH menor a 3.6, como más astringentes comparados con su control a pH 7.0. Estas observaciones concuerdan con lo observado por otros autores que utilizaron similares condiciones de pH (Fontoin *et al.*, 2008; De Miglio *et al.*, 2002; Sowalsky y Noble, 1998; Kallithraka *et al.*, 1997) y con otros autores que avalan la hipótesis del efecto aumentado de la percepción de astringencia cuando se disminuye el pH (Siebert y Euzen, 2008; Mateus *et al.*, 2004; Lawless *et al.*, 1996). Comparativamente, al mezclar BSA con extractos de semillas a distintos pHs se observó que el modo, área e intensidad de difusión de BSA se vio fuertemente afectada con un nivel de pH menor a 4.0, lo que implicaría que la interacción de BSA con las proantocianidinas estaría estrechamente relacionada con las condiciones de pH en el medio (Adamczyk *et al.*, 2012).

En la prueba de precipitabilidad, se observó que, el área e intensidad de la FD de la mezcla de fluido salival con agua destilada (observable en la prueba de difusibilidad) disminuye significativamente, contrario a lo observado en la FND, la cual aparece a partir del pH 4.84. Los efectos descritos se verían amplificadas con la presencia de proantocianidinas, ya que con un pH 5.99 se observan similares tendencias. Estas observaciones, sugerirían que la FD y FND, observadas en la prueba de difusibilidad, tienen una estructura que permite la precipitación en conjunto (Obreque-Slier *et al.*, 2012a) permitiendo la disminución en el sobrenadante, lo que modificaría el área e intensidad de difusión. Sumado a lo anterior, el punto isoeléctrico de algunas proteínas de la saliva, tales como PRP ácidas (pI ~ 4.0) y mucinas (pI 2.0 a 3.0) (Siebert y Chassy, 2003; Bansil y Turner, 2006), facilitarían la precipitación del complejo proantocianidina-proteínas salivares (Hagerman y Butler, 1978). Similar tendencia se observó al mezclar BSA con el extracto de semilla. Así, una disminución del pH de 6.61 a 4.23, provocó una desaparición de la proteína del sobrenadante, lo cual podría

relacionarse con el pI de BSA (4.7-4.9) que fomentaría la precipitación del complejo (Hughes *et al.*, 1995).

Cuando los extractos de semillas a diferente pH (2.8-7.0) fueron evaluados por un panel en astringencia, aquellos disueltos en el pH más ácido (2.8 y 3.2) fueron percibidos como más astringentes. Esta observación, podría confirmar el efecto de un pH ácido sobre las propiedades de la saliva y, por ende, en la percepción de astringencia. Además, en el rango de pH del vino (2.8-4.0) (Flanzy, 2000; Waterhouse, 2002; Zamora, 2003; Aleixandre, 2006; Sierra Alonso *et al.*, 2007), valores de 0.8 puntos de pH serían importantes para generar un cambio en la percepción de astringencia. Comparativamente, la percepción diferencial de la astringencia de los extractos de semillas observada por el panel coincide con los modos diferenciales de difusión de la proteína salival a pH bajos. Asimismo, la evaluación de los extractos de semillas a los distintos pHs “enológicos” (4.0-2.8), respaldaron la hipótesis que la interacción proantocianidinas-proteína salival y la astringencia son fuertemente dependientes del pH (Obreque-slier *et al.*, 2012a; Rinaldi *et al.*, 2012).

CONCLUSIONES

Los cambios en el pH afectan la interacción y precipitación de la mezcla entre las proantocianidinas de un extracto de semillas y las proteínas salivares. Así, un bajo pH provoca un cambio en el modo de difusión y precipitación de las proteínas salivares y/o un aumento de la interacción proantocianidina-proteína salival, lo que se asocia a una mayor percepción de astringencia.

BIBLIOGRAFÍA

Adamczyk, B.; J. Salminen, A. Smolander and V. Kitunen. 2012. Precipitation of proteins by tannins: effects of concentration, protein/tannin ratio and pH. *International Journal of Food Science & Technology*. 47 (4): 875-878.

Aleixandre, j. 2006. *La Cultura del vino: cata y degustación*. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. España. 345p.

Bajec, M. and G. Pickering. 2008. Astringency: mechanisms and perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 48 (9): 858-875.

Bansil, R. and B. Turner. 2006. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 11(2-3): 164-170.

Canals, R.; M. Llaudy, J. Valls and F. Zamora. 2005. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4019-4025.

Carvalho, E.; N. Mateus and V. de Freitas. 2004. Flow nephelometric analysis of protein-tannin interactions. *Analytica Chimica Acta* 513: 97-101.

Charlton, A.; N. Baxter; M. Khan; A. Moir; E. Haslam; A. Davies and M. Williamson. 2002. Polyphenol/peptide binding and precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50 (6): 1593-1601.

Condelli, N.; C. Dinnella; A. Cerone; E. Monteleone and M. Bertuccioli. 2006. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Quality and Preference*. 17 (1-2): 96-107.

De Miglio, P.; G. Pickering and A. Reynolds. 2002. Astringent subqualities elicited by red wine: the role of ethanol and pH. In: Cullen, C. W., Pickering, G. J., and Phillips, R., Eds. Proceedings of the International Bacchus to The Future Conference, St Catharines, ON, May 23rd –25th, 2002. St. Catharines, ON: Brock University Press.

Depix, F. 2011. Interacción diferencial de extractos de taninos enológicos comerciales mediante saliva humana. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile.

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.

Fischer, U.; R. Boulton and A. Noble. 1994. Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Quality and Preference*. 5: 55–64.

Flanzy, C. 2000. Fundamentos científicos y técnicos. 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.

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

Gambutì, A.; A. Rinaldi; R. Pessina and L. Moio. 2006. Evaluation of aglianico grape skin and seed polyphenol astringency by SDS-PAGE electrophoresis of salivary proteins after the binding reaction. *Food Chemistry*. 97 (4): 614–620.

Gawel, R.; S. Van Sluyter; P. Smith and E. Waters. 2013. Effect of pH and alcohol on perception of phenolic character in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 64: 425-429.

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.

Hagerman, A. and L. Butler. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 26: 809-812.

He, Q.; B. Shi and K. Yao. 2006. Interactions of gallotannins with proteins, amino acids, phospholipids and sugars. *Food Chemistry*. 95: 250-254.

Hughes, D.; R. Hall and G. Embery. 1995. Adsorption of bovine serum albumin onto hydroxyapatite. *Biomaterials*. 16: 697-702.

Jackson, R. 2009. *Wine tasting: a professional handbook*. Elsevier/ Academic press, Amsterdam. 512p.

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

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

Lagerlöf, F. and C. Dawes. 1984. The volume of saliva in the mouth before and after swallowing. *Journal of Dental Research*. 63: 618-621.

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

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

Lu, Y. and A. Bennick. 1998. Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology*. 43 (9): 717-728.

Mateus, N.; R. Pinto; P. Ruão and V. 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.

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

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 (2): 85-118.

Müller, K.; C. Figueroa; C. Martínez; M. Medel; E. Obreque; A. Peña-Neira; I. Morales-Bozo; H. Toledo and R. López-Solis. 2010. Measurement of saliva volume in the mouth of members of a trained sensory panel using a beetroot (*Beta vulgaris*) extract. *Food Quality and Preference*. 21: 569-574.

Naurato, N.; P. Wong; Y. Lu; K. Wroblewski and A. Bennick. 1999. Interaction of tannin with human salivary histatins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47 (6): 2229-2234.

Nordbo, H.; S. Darwish and R. Bhatnagar. 1984. Salivary viscosity and lubrication: influence of pH and calcium. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 92: 306-314.

Obreque-Slier, E.; C. Mateluna; A. Peña-Neira and R. López-Solís. 2010a. Quantitative determination of interactions between tannic acid and a model protein using diffusion

and precipitation assays on cellulose membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (14): 8375-8379.

Obreque-Sl er, E.; A. Peña-Neira and R. López-Solís. 2010b. Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (6): 3729-3735.

Obreque-Sl er, E.; A. Peña-Neira; R. López-Solís; F. Zamora-Marín; J. Ricardo-da Silva and O. Laureano. 2010c. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from Carménère and Cabernet Sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58 (6): 3591-3599.

Obreque-Sl er, E.; A. Peña-Neira; R. López-Solís. 2012a. Interactions of enological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *Food Science and Technology*. 45 (1): 88-93.

Obreque-Sl er, E.; R. López-Solís; L. Castro-Ulloa; C. Romero-Díaz;  . Peña-Neira. 2012b. Phenolic composition and physicochemical parameters of Carménère, Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc grape seeds (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Food Science and Technology*. 48 (1): 134–141.

Peleg, H.; K. Bodine and A. Noble. 1998. The influence of acid on astringency of alum and phenolic compounds. *Chemical Senses*. 23: 371-378.

Peña-Neira, A. ; A. C ceres and C. Pastenes. 2007. Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skin from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo valley (Chile): Effect of cluster thinning and vineyard yield. *Food Science and Technology International*. 13 (2): 153-158.

Peña-Neira, A.; M. Due as; 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 (2): 51-57.

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

Rinaldi, A.; A. Gambuti and L. Moio. 2012. Precipitation of salivary proteins after the Interaction with wine: The effect of ethanol, pH, fructose, and mannoproteins. *Journal of Food Science*. 77 (4): 485–490.

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

Siebert, K. and C. Euzen. 2008. The relationship between expectorant pH and astringency perception. *Journal of Sensory Studies*. 23: 222-233.

Siebert, K. and A. Chassy. 2003. An alternate mechanism for the astringent sensation of acids. *Food Quality and Preference*. 15: 13-18.

Sierra Alonso, I.; S. Morante Zarcero y D. Pérez Quintanilla. 2007. *Experimentación en química analítica*. Editorial Dykinson, Madrid, España, 161p.

Sowalsky, R. and A. 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.; J. M. Ricardo Da Silva and I. Spranger. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 4267-4274.

Valentova, H.; S. Skrovánková; Z. Panovská and J. Pokorný. 2002. Time-intensity studies of astringent taste. *Food Chemistry*. 78: 29–37.

Waterhouse, A. 2002. Wine phenolics. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 957: 21–36.

Weatherell, A.; M. Strong; C. Robinson; B. Nattress; H. Nakagaki and D. Main. 1992. Determination of volumes of fluid in the mouth by fluoride dilution. *Caries Research*. 26: 94-97.

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

ANEXO I

Test descriptivo	
(Pauta no estructurada)	
Nombre:.....Fecha:.....	
Muestra:.....	
Instrucciones: por favor indicar 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

Pauta no estructurada para análisis sensorial descriptivo.