

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**INTERACCIÓN ENTRE ÁCIDOS FENÓLICOS Y LA FRACCIÓN PROTEICA DE LA
SALIVA**

FRANCISCA ORELLANA RODRÍGUEZ

SANTIAGO, CHILE
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

MEMORIA DE TÍTULO

**INTERACCIÓN ENTRE ÁCIDOS FENÓLICOS Y LA FRACCIÓN PROTEICA DE LA
SALIVA**

**INTERACTION BETWEEN PHENOLIC ACIDS AND THE PROTEIN FRACTION OF
SALIVA**

FRANCISCA ORELLANA RODRÍGUEZ

SANTIAGO, CHILE
2016

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

INTERACCIÓN ENTRE ÁCIDOS FENÓLICOS Y LA FRACCIÓN PROTEICA DE LA SALIVA

Memoria para optar al título profesional de:
Ingeniero Agrónomo

FRANCISCA ORELLANA RODRÍGUEZ

Profesores Guías	Calificación
Sr. Elías Obreque Slier Ingeniero Agrónomo-Enólogo, Dr.	7,0
Sr. Remigio López Solís Bioquímico, Dr.	7,0
Profesores Evaluadores	
Sr. Eduardo Loyola Madariaga Ingeniero Agrónomo-Enólogo, Dr.	6,5
Sra. Susana Muñoz Mimiza Ingeniera Agrónoma Mg. Sc.	6,0

SANTIAGO, CHILE
2016

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a:

Mi profesor guía Elías Obrequé por estar conmigo desde el comienzo de este proyecto, en donde me ayudó a realizar cada paso de mi Memoria de Título.

Mi profesor guía Remigio López, por todo su cariño, dedicación y conocimientos que me entregó en el desarrollo de mi Memoria.

Mis padres, a mi madre por su amor incondicional, comprensión y constante apoyo desde siempre. A mi padre por su amor, preocupación y por heredarme su interés al área de la enología. Y a ambos por darme la oportunidad de estudiar en la Universidad.

Mis hermanas Pía y Bárbara por sus sabios consejos, por su amor, por su empatía y principalmente por ser mis amigas y compañeras de vida.

Mi novio Dante por ser mi soporte estando conmigo siempre, brindándome tranquilidad, armonía y cariño.

Mis familiares y amigos por su afecto y palabras de ánimo.

Finalmente, quiero agradecer al proyecto Fondecyt regular 1150240 por hacer posible este estudio.

ÍNDICE

RESUMEN	1
Palabras Clave	1
ABSTRACT	2
Key Words	2
INTRODUCCIÓN	3
Objetivo	6
MATERIALES Y MÉTODOS	7
Lugar de estudio	7
Materiales	7
Métodos	8
RESULTADOS	12
Efecto de AF sobre la difusión de la proteína albúmina en membrana de celulosa	12
Efecto de los AF sobre las proteínas salivales	15
Efecto de las mezclas binarias de AF/ácido gálico y AF/ácido tánico sobre la proteína albúmina	20
Efecto de mezclas binarias de AF/ácido gálico sobre las proteínas salivales	22
Efecto de mezclas binarias de AF/ácido tánico sobre las proteínas salivales	25
DISCUSIÓN	28
CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33
ANEXOS	36

RESUMEN

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que se encuentran en algunos alimentos, tales como el vino. Están conformados por dos grandes grupos: Flavonoides y no flavonoides. Los ácidos fenólicos (AF) forman parte del grupo de compuestos fenólicos no flavonoides. Estos AF son de bajo peso molecular y se subagrupan en ácidos benzoicos y ácidos cinámicos. En el subgrupo de los ácidos benzoicos destacan los ácidos gálico (G), vainillínico (V) y protocatéquico (P) y en el subgrupo de los ácidos cinámicos destacan los ácidos ferúlico (F), *p*-cumárico (CU) y cafeico (CA). Otro ácido fenólico de gran interés enológico es el ácido tánico (T). Los polifenoles afectan las características organolépticas de la uva y el vino, como color, aroma y astringencia. La astringencia se ha descrito como sensación de sequedad provocada por la interacción de los polifenoles con las proteínas salivales. En este estudio se evaluó la interacción de los AF de interés enológico con una proteína modelo (albúmina sérica bovina) y con la fracción proteica de la saliva. Para ello se estudió el efecto que tienen los AF sobre la difusión de tales proteínas sobre una membrana de celulosa y sobre su solubilidad (no sedimentación durante centrifugación). La restricción de la difusión de las proteínas en presencia de los AF y/o la aparente desaparición de las proteínas desde los sobrenadantes de las mezclas AF/proteína fueron indicadores de interacción entre las proteínas y los AF. Los resultados del estudio mostraron que la difusión de la proteína salival fue restringida por la presencia de los AF de bajo peso molecular (efecto antidifusor). Por el contrario, T no generó alteración en la difusión de las proteínas salivales. En la prueba de precipitación, los AF de bajo peso molecular no generaron la precipitación de la proteína salival. En contraste, T generó la precipitación de proteínas salivales. Por otra parte, mezclas binarias (mezclas de dos componentes) de los distintos AF y G (AF/G) mostraron una restricción de la difusión de la proteína salival, comparable a la producida por los AF de bajo peso molecular en forma individual. En las condiciones experimentales usadas, tanto las mezclas AF/T como T solo no afectaron la difusión de las proteínas salivales pero sí provocaron su precipitación. Se concluye que los AF de bajo peso molecular interactúan con la fracción proteica de la saliva, aspecto que sugiere que estos compuestos del vino también serían contribuyentes a la sensación de astringencia.

Palabras clave: Ácidos fenólicos, saliva, interacción polifenol/proteína, ensayo de difusión, ensayo de precipitación, astringencia.

ABSTRACT

Phenolic compounds are secondary metabolites found in some foods, such as wine. They comprise two main groups: Flavonoids and non flavonoids. Phenolic acids (AF) are low molecular weight non flavonoid compounds that are usually grouped into benzoic acids and cinnamic acids. Members of the benzoic acid group are gallic (G), vanillic (V) and protocatechic (P) acids whereas ferulic (F), *p*-coumaric (CU) and caffeic (CA) acids are members of the cinnamic acid group. Another phenolic acid of major enological interest is tannic acid (T). Polyphenols affect the organoleptic characteristics of grapes and wines, such as color, aroma and astringency. Astringency has been described as dryness caused by the interaction of polyphenols with salivary proteins. In this study we assessed the interaction of AF of enological interest with a model protein (bovine serum albumin) and with the protein fraction of saliva. To this end, the effect of AF on protein diffusion on a cellulose membrane and protein solubility (non-sedimentation by low-speed centrifugation) were studied. Decrease in protein diffusion in the presence of AF and/or apparent disappearance of proteins from the supernatants of the AF/protein mixtures were taken as indicators of interaction between proteins and the AF. These studies showed that diffusion of the salivary protein was restricted by the presence of low molecular weight AF (anti-diffusive effect). By contrast, T did not alter diffusion of the salivary protein. On the other hand, low molecular weight AF did not provoke precipitation of the salivary protein. Contrarily, T produced precipitation of salivary proteins. In addition, binary mixtures (mixtures of two components) of various AF and G (AF/G) restricted salivary protein diffusion, to a similar extent to the one produced by the corresponding individual low molecular weight AF. By contrast, binary mixtures of various AF and T (AF/T), as well T alone, did not affect diffusion of the salivary proteins but they did precipitate them. It is concluded that low molecular weight AF may interact with the salivary protein fraction, thus suggesting that these wine compounds can also contribute to the sensation of astringency.

Key words: Phenolic acids, saliva, polyphenol/protein interaction, diffusion test, precipitation test, astringency.

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos corresponden a una compleja familia de metabolitos secundarios presentes en bebidas y alimentos de origen vegetal. Habitualmente se les subagrupa en compuestos flavonoides y no flavonoides. En la uva vinífera y el vino, los flavonoides están representados mayoritariamente por flavonoles, antocianos y flavanoles, mientras que los no flavonoides están constituidos por estilbenos y ácidos fenólicos (AF) (Llaudy, 2006). Los AF se encuentran tanto en forma libre como esterificados con el ácido tartárico u otro componente del vino. Estos compuestos no afectan directamente el color en el vino tinto, aunque sí pueden participar mediante fenómenos de copigmentación. Desde el punto de vista organoléptico no parecen tener impacto sobre el sabor del vino tinto. Sin embargo, la degradación de estos ácidos da lugar a fenoles volátiles que pueden provocar defectos en el vino a nivel olfativo (Zamora, 2003). Los AF de bajo peso molecular comprenden los ácidos benzoicos y cinámicos (Figura 1). Los ácidos benzoicos (C₆-C₁) están compuestos por un núcleo bencénico y tienen al menos un grupo hidroxilo en su estructura química. En el vino los más comunes son los ácidos vainillínico (pKa 4,16), protocatéquico (pKa 4.48), y gálico (pKa 4.0) (Figura 2). Los ácidos cinámicos (C₆-C₃) están compuestos por un núcleo bencénico con una cadena lateral insaturada y presentan al menos un grupo hidroxilo. Están habitualmente presentes en el vino los ácidos ferúlico (pKa 4.58), *p*-cumárico (pKa 4.64) y cafeico (pKa 4.62) (Figura 2) (Cámara *et al.*, 2013; Llaudy, 2006). El contenido de estos AF de bajo peso molecular en el vino alcanzaría en promedio a 150 mg/L (Vivas *et al.*, 2003). En uva vinífera, la concentración de estos compuestos estaría en los rangos 20 a 170 mg/kg de baya en pulpa y 50 a 200 mg/kg de baya en hollejo (Souquet *et al.*, 2000). Otro compuesto fenólico que forma parte del grupo de los AF es el ácido tánico (pKa: 4,4) (Bedran *et al.*, 2009). El ácido tánico es un polifenol compuesto de ácido gálico o ácido elágico (producido por la condensación del ácido gálico), esterificado a uno o varios grupos hidroxilo de la glucosa (Figura 2). Aún cuando no está presente en el vino, se le ha estudiado ampliamente en relación a aspectos de interés enológico (Hagerman y Butler, 1978; Mehansho *et al.*, 1987; Obreque *et al.*, 2010c).

Los polifenoles han sido asociados con importantes propiedades sensoriales del vino y la uva, tales como color, aroma y astringencia (Zamora, 2003). La astringencia ha sido descrita como un grupo complejo de sensaciones que comprenden sequedad, arrugamiento y reducción de la superficie oral (Gawel, 1998). Esta percepción es provocada por la ingestión de algunos alimentos ricos en polifenoles. Algunos autores han descrito que la sensación de astringencia estaría estrechamente relacionada con la interacción entre los flavanoles con algunas proteínas salivales particulares en la boca (Sarni *et al.*, 2008), interacción que generaría una precipitación del complejo polifenol/proteína en la cavidad bucal (Soares *et al.*, 2011). Esta interacción resulta de la unión entre los grupos hidroxilo de los polifenoles y los grupos carbonilo de las proteínas, mediante enlaces de hidrógeno (Hagerman y Butler, 1980, 1981). Variados estudios han evaluado el efecto de distintos factores sobre la interacción polifenol/proteína. Entre los factores destacan ácidos orgánicos, tales como ácidos tartárico, málico, láctico y cítrico (Sowalsky y Noble, 1998; Lawless *et al.*, 1996), etanol (Obreque *et al.*, 2010a; Serafíni *et al.*, 1997), contenido de azúcar (Mateus *et al.*, 2004), presencia de polisacáridos (Doco *et al.*, 2007), concentración, grado de

galoilación y tamaño de los polifenoles (Obreque *et al.*, 2010b) y pH (Fontoin *et al.*, 2008, Kallithraka *et al.*, 1997).

Se ha demostrado que el pH del vino afecta tanto en la intensidad como la duración de la percepción de astringencia (Fontoin, *et al.*, 2008; Kallithraka *et al.*, 1997). Obreque *et al.* estudiaron el efecto del pH sobre la astringencia inducida por la interacción tanino/proteínas salivales (2012). En dicho estudio, los autores utilizaron taninos enológicos condensados e hidrolizables en matrices vínicas a pH 3,5 y 7,0. Las muestras fueron evaluadas a nivel sensorial y mediante los reconocidos ensayos de difusión sobre membranas de celulosa y precipitación de las proteínas salivales. Los resultados indicaron que ambos taninos enológicos fueron percibidos más astringentes a pH 3,5, característica que se correlacionó con la exacerbación de las propiedades de difusión y precipitación de las proteínas salivales a este mismo pH.

Distintos autores también han descrito que el tipo de polifenol afecta la interacción polifenol/proteína (Bacon y Rhodes, 2000; Obreque *et al.*, 2010b). Así, Bacon y Rhodes evaluaron 14 tipos de compuestos fenólicos y su afinidad con las proteínas salivales. En este estudio se observó que el ácido tánico, polifenol de bajo grado de galoilación, tiene una alta afinidad con las proteínas salivales (2000). Por el contrario, Baxter *et al.* describieron que los polifenoles más complejos interactúan más fuertemente con las proteínas salivales (1997). Recientemente, se describió que un extracto rico en taninos hidrolizables presentó una mayor reactividad con las proteínas salivales en comparación con un extracto rico en taninos proantocianidínicos. Esta observación se relacionó estrechamente con la percepción de astringencia de ambos tipos de polifenoles por parte de un panel sensorial entrenado (Obreque *et al.*, 2010b).

Por otra parte, se ha señalado también que los polifenoles tienen distintas afinidades por diferentes tipos de proteínas, debido a la composición de éstas (Llaudy, 2006). Una de las proteínas modelo que más se ha utilizado en estudios recientes sobre la interacción polifenol/proteína es la albúmina de suero de bovino. Esta proteína pura es de amplia disponibilidad en el mercado, es fácilmente soluble en agua o solventes hidrofílicos y se caracteriza por tener una afinidad alta por los polifenoles (De Freitas *et al.*, 2003; Mateus *et al.*, 2004). Por ello, por su carácter de proteína modelo, en el presente estudio sobre interacción AF/proteína se incluyó con fines de comparación el uso de albúmina.

A partir de lo anteriormente descrito, se demuestra que la interacción polifenol/proteína, y su eventual relación con la sensación de astringencia, han sido ampliamente documentadas por distintos autores. Estos estudios se han basado principalmente en el uso de compuestos flavanoles y sustratos proteicos. Como los flavanoles presentan una estructura química semejante a los AF, en cuanto ambos son compuestos orgánicos que poseen al menos un anillo aromático al que se encuentra unido al menos un grupo hidroxilo, y dado que existe escasa información acerca de eventuales interacciones entre los AF y las proteínas salivales, el presente estudio se orientó a estudiar tales interacciones.

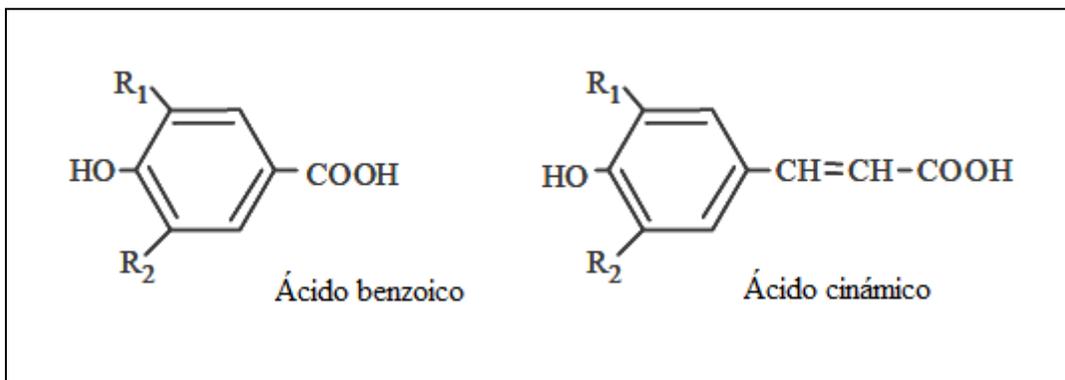


Figura 1. Estructura química de los AF: ácido benzoico y ácido cinámico (extraído de Llaudy, 2006).

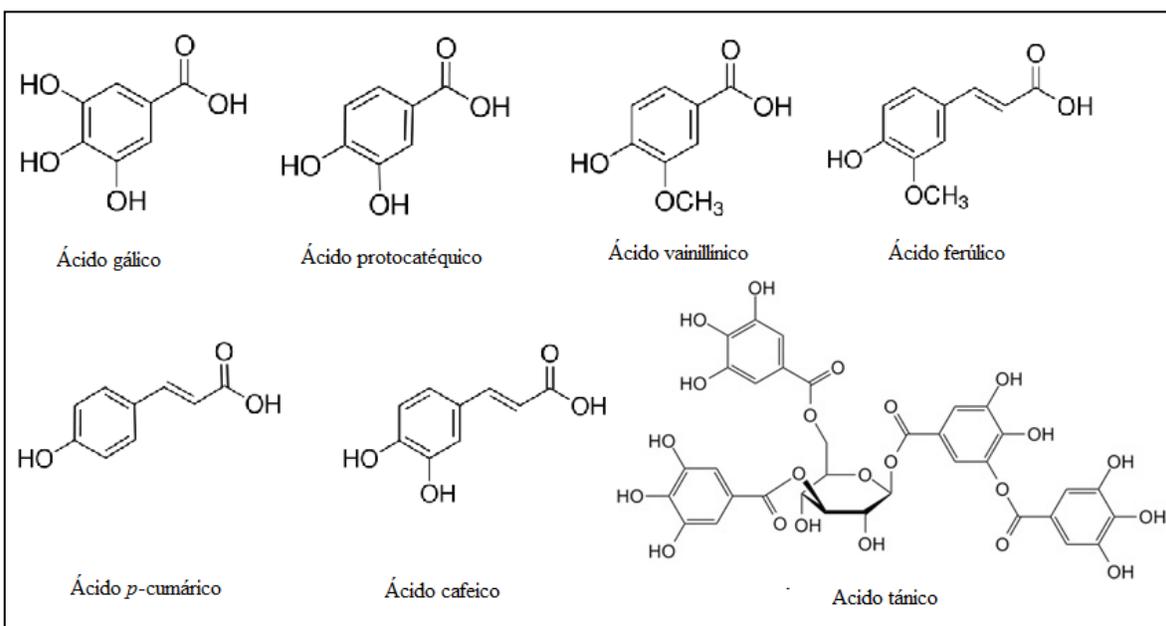


Figura 2. Estructura química de los AF, específicamente, ácidos gálico, protocatéquico, vainillínico, ferúlico, *p*-cumárico, cafeico y tánico (elaboración propia, imágenes extraídas del catálogo 2016 de Sigma Aldrich).

Objetivo

Evaluar el efecto de distintos AF de interés enológico sobre dos propiedades fisicoquímicas de la fracción proteica de la saliva: difusión sobre membranas de celulosa y solubilidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología Supramolecular del Programa de Biología Celular y Molecular-ICBM de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Materiales

Compuestos Químicos

Los ácidos fenólicos (ácidos vainillínico, protocatéquico, ferúlico, gálico, *p*-cumárico, cafeico y tánico) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Saint Louis, EE.UU). Los productos específicos correspondieron a las siguientes especificaciones del catálogo respectivo: ácido gálico (G7384-100G), ácido protocatéquico (03930590-50MG), ácido ferúlico (1270311-25MG), ácido vainillínico (W310700-SAMPLE-K), ácido cafeico (C0625-2G) y ácido *p*-cumárico (C9008-1G). La adquisición de ácido tánico (403040-50G) y albúmina de suero bovino (A2153-10G) se hizo a través del mismo proveedor.

Saliva Humana

La saliva humana fresca fue recolectada regularmente a partir de una mujer de 24 años de edad, sana, no fumadora y con un flujo de saliva total superior a 1 mL/min (Obreque *et al.*, 2010a).

Materiales y equipos

Las membranas de celulosa Whatman N°1 en pliegos fueron adquiridas en Whatman Ltda. (Maidstone, Inglaterra). Las membranas Millipore de tamaño de poro 0,45 μ m, fueron adquiridas en Merck S.A. (Santiago, Chile). Los filtros de acetato de celulosa de tamaño de poro 0,2 μ m fueron adquiridos en Pall Life Sciences (Nueva York, EE.UU). Ácido tricloroacético, Coomassie blue, etanol, ácido acético y los solventes grado pro-análisis fueron adquiridos en Merck S.A. (Santiago, Chile). Además, se utilizó una centrífuga Labofuge Heraeus 400, agitador marca Barmstead/Lab-line, agitador electromecánico Vortex-Genie modelo K-550, microcentrífuga Sorvall modelo MC-12V, balanza analítica E. Mettler Zürich, espectrofotómetro Shimadzu UV1700, autoclave Memmert, destilador de agua, set de micropipetas automáticas Gilson, sistema de captura de imágenes digitales basado en escáner Epson Perfection 4490 Photo y computador HP Pavilion Slimline provisto de software Image J 1.45.

Métodos

Tratamiento y Diseño experimental

El estudio comprendió 4 ensayos independientes diseñados de forma completamente aleatorizada. En los Ensayos 1 y 2 se evaluó el efecto de los distintos AF sobre la difusibilidad en matrices de celulosa de una proteína pura (albúmina) y de la saliva humana, respectivamente (pruebas de difusión y precipitación). Cada ensayo constó de 12 tratamientos, correspondientes a las distintas concentraciones (rango 0-3 mg/mL) de cada uno de siete ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido protocatéquico, ácido ferúlico, ácido vainillínico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico y ácido tánico). Paralelamente, se comparó el efecto de los distintos AF en cada una de las concentraciones estudiadas.

Posteriormente, se evaluó el efecto de mezclas binarias de cada uno de los AF estudiados con ácido gálico o ácido tánico sobre la difusión en matrices de celulosa y precipitación de albúmina (Ensayo 3) y proteínas salivales (Ensayo 4). En estos dos ensayos se efectuaron 3 tratamientos correspondientes a los ácidos gálico o tánico (controles), los distintos AF (T1) y las mezclas de ambos (T2) para las concentraciones de 0.5, 1.0 y 2 mg/mL. La unidad experimental correspondió a cada una de las mezclas de compuestos fenólicos con albúmina o saliva (300 μ L), mientras que la unidad muestral correspondió a 20 μ L de muestra colocada sobre la membrana de celulosa. Todos los tratamientos comprendieron 4 repeticiones.

Procedimientos:

Preparación de soluciones de polifenoles. Se preparó una solución madre de los AF a una concentración de 5 mg/mL en una solución hidroalcohólica al 30% v/v de etanol. Al momento de realizar cada experimento, las soluciones fueron diluidas hasta obtener las concentraciones utilizadas en el estudio.

Preparación de BSA en solución. Se disolvieron 100 mg de BSA en aproximadamente 80 mL de agua destilada a 35-40° C, con agitación constante durante 24 horas. La solución resultante fue centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos y el sobrenadante fue filtrado a través de una membrana de porosidad 0,45 μ m. La absorbancia a 280 nm de la solución final se ajustó a 0,70 U.A. (Unidades de Absorbancia) con agua destilada, condición correspondiente a una concentración de 1 mg/mL (Obreque *et al.*, 2010c).

Recolección de saliva. La saliva acumulada en la boca durante 1 minuto fue expectorada en un tubo Falcon esterilizado y colocada en hielo hasta la preparación de las muestras (Obreque *et al.*, 2010a). La saliva fue recolectada inmediatamente antes de cada experimento, entre 9:00 y 11:00 h AM con el propósito de aminorar la influencia de eventuales variaciones circadianas de la composición salival.

Preparación de la solución de tinción de proteínas (Coomassie blue R-250 0,25%). 1,25 g de CB-R250 fueron disueltos en 250 mL de isopropanol, con agitación mecánica durante 12 horas. A la solución azul se agregó 200 mL de agua destilada y con agitación durante 5 minutos y 50 mL de ácido acético 100%, también bajo agitación mecánica constante durante al menos 5 minutos. Finalmente, la solución fue filtrada a vacío a través de papel filtro Whatman N°1.

Interacción de los AF con BSA o proteínas salivales. Para la prueba de difusión, se mezcló un volumen de 150 μL de cada solución de ácido fenólico (concentraciones 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2 y 3 mg/mL) con 150 μL de solución de albúmina o saliva. Cada una de las mezclas fue agitada por 15 segundos (vortex) y una alícuota de 20 μL fue colocada en un punto de la lámina de celulosa. Una vez que las muestras difundieron radialmente sobre el papel se las dejó secar espontáneamente a temperatura ambiente. Los papeles fueron procesados (fijados, teñidos y lavados) de acuerdo a lo descrito en publicaciones anteriores (Obreque *et al.*, 2010a; Obreque *et al.*, 2010c). Cada zona teñida de azul en el sitio de colocación de cada una de las muestras representa el área de distribución de BSA o de la proteína salival. En cada caso el área de difusión fue medida según se describe en estudio previos (Obreque *et al.*, 2010c). Para la prueba de precipitación, las mezclas utilizadas en la prueba de difusión fueron centrifugadas a 5000 rpm por 3 minutos y desde cada sobrenadante se tomaron alícuotas de 20 μL para ser depositadas sobre la membrana de celulosa. Esta fue procesada de acuerdo al mismo procedimiento seguido en la prueba de difusión (Figura 3).

Interacción de las mezclas binarias de AF/ácido gálico y AF/ácido tánico con BSA o proteínas salivales. Distintas soluciones de AF fueron mezcladas con ácido gálico (G) o ácido tánico (T) en una razón 1:1 v/v, obteniendo concentraciones finales de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/mL . 150 μL las mezclas (AF/G y AF/T) y de distintos AF fueron mezcladas con 150 μL de solución de BSA o saliva. Los controles correspondieron a las soluciones de ácido gálico o ácido tánico sin mezclar. Un volumen de 20 μL de los AF y de las mezclas de las soluciones de AF/G o AF/T con BSA y saliva, fueron colocadas en un punto del papel de celulosa, el cual fue dejado secar espontáneamente, fijado, teñido y lavado de acuerdo a lo señalado antes en los ensayos de difusión y precipitación (Figura 3).

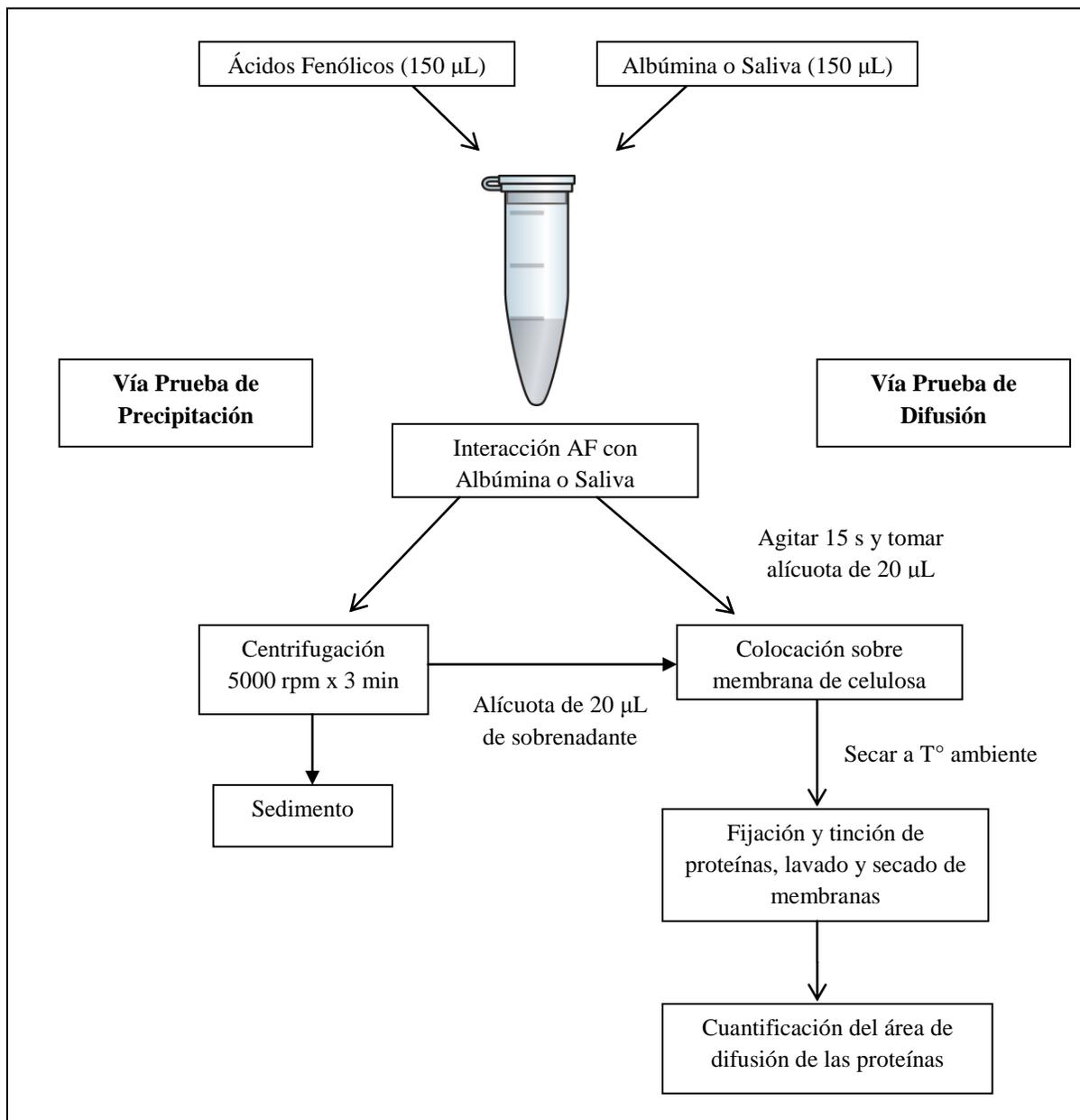


Figura 3. Evaluación de la interacción de los AF con albúmina o proteínas salivales en membrana de celulosa: ensayos de difusión y precipitación.

Variable a medir

Área de difusión. El área de difusión (cm^2) de la fracción de proteínas en la membrana de celulosa fue medida sobre imágenes digitalizadas de la membrana mediante el uso del programa Image J 1.45.

Análisis estadístico

Se aplicó análisis estadístico a las diferencias observadas entre los efectos producidos por distintas concentraciones de un mismo compuesto AF y por distintos compuestos AF. Los datos obtenidos fueron analizados mediante ANDEVA con un nivel de confianza de 95% a través del programa estadístico INFOSTAT, versión libre 2013. En caso de existir diferencias significativas se utilizó el test de rango múltiple de Tukey, con un nivel de significancia de 5% (ver Anexos).

RESULTADOS

Efecto de los AF sobre la difusión de la proteína albúmina en membranas de celulosa.

Un volumen de una solución de BSA fue mezclado con un volumen equivalente de cada una de una serie de soluciones de AF de diferentes concentraciones (rango 0-3 mg/mL). Luego de agitación en un mezclador vortex, se colocaron 20 μ L de cada mezcla sobre puntos de una membrana de celulosa suspendida horizontalmente. Una vez que todas las muestras depositadas difundieron radialmente y se secaron en condiciones ambientales, la membrana de celulosa fue procesada de acuerdo a lo señalado en la sección Materiales y Métodos. Las áreas ocupadas por las fracciones difusible (FD) y no difusible (FND) de cada mezcla AF/albumina fueron reveladas por tinción con el colorante selectivo de proteínas Coomassie blue R-250. Estas fueron medidas y las áreas fueron graficadas (Figura 4). En ausencia de cualquier AF, la solución de albúmina difundió homogéneamente hasta ocupar un área aproximadamente circular sobre el papel de celulosa (Figura 4, 0 mg/mL de AF). De este modo, en este estudio sólo se pudo apreciar la existencia de una fracción difusible (FD). Por el contrario, la adición de cualquiera de los AF, aún en las concentraciones más bajas usadas en el estudio (0.2 mg/mL), generó la aparición de una fracción más intensamente coloreada, cerca del centro del círculo de difusión de la albúmina, es decir, en la zona de colocación de la muestra (fracción no difusible, FND). El aumento de la concentración de cada uno de los AF en las mezclas con albúmina, provocó la disminución del área y de la intensidad de la FD y un aumento en la intensidad de la FND (Figura 4). Entre los distintos AF de bajo peso molecular ensayados hubo diferencias cuantitativas menores en los efectos descritos. El efecto más notable se observó con el ácido tánico (T). Así, la adición de 0.4 mg/mL produjo una reducción casi completa de la FD de albúmina y con 1.4 mg/mL de este ácido no se observó FD. En estas últimas condiciones la FND ocupó también un área mínima. Con estas concentraciones de los demás AF la albúmina se distribuyó tanto en fracciones FD y FND, es decir, el efecto de estos AF de bajo peso molecular fue parcial en comparación con lo observado con T.

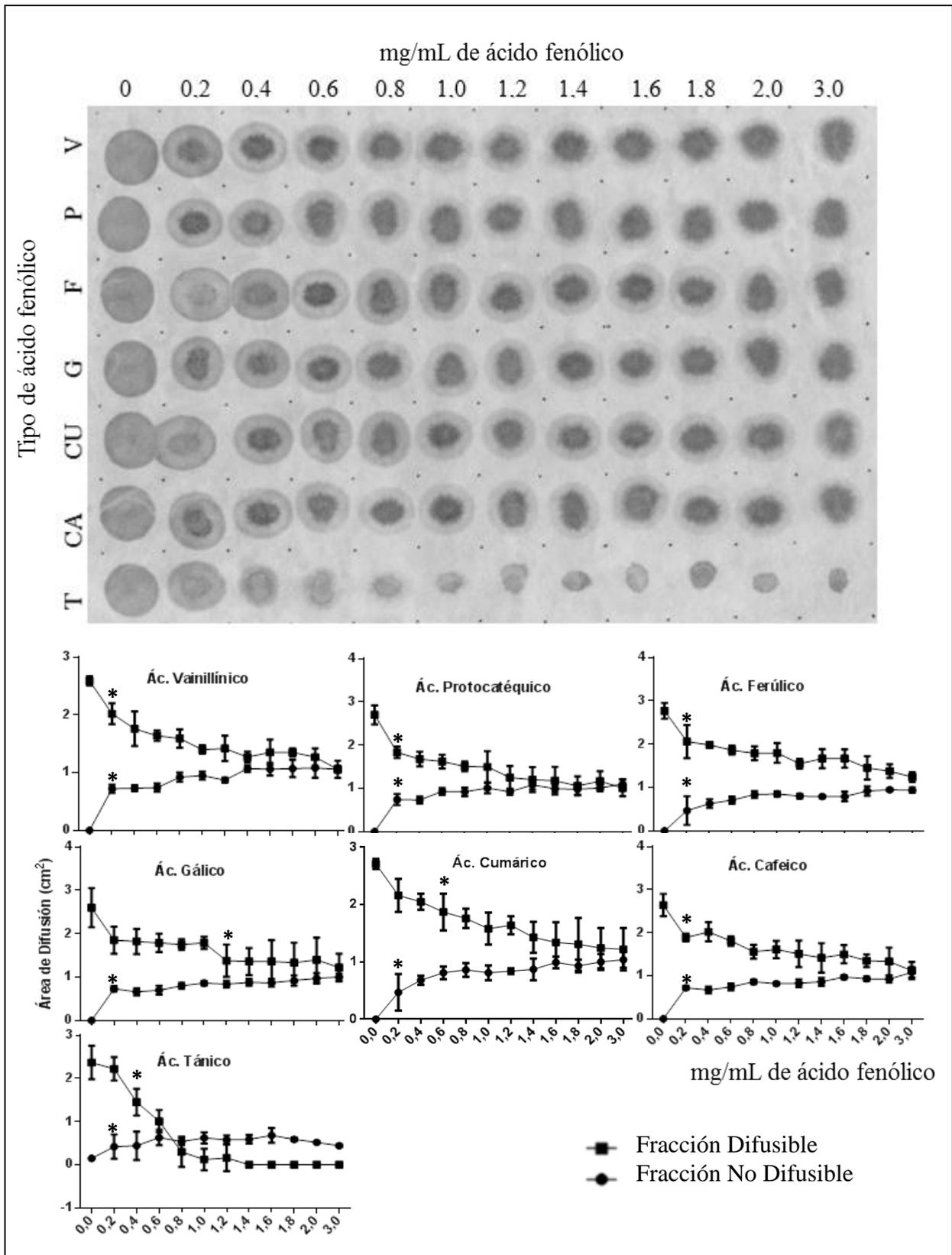


Figura 4. Efecto de concentraciones crecientes de distintos AF (0-3 mg/mL) sobre la difusión de albúmina (BSA) (1 mg/mL) en membranas de celulosa. V: ác. vainillínico, P: ác. protocatéquico, F: ác. ferúlico, G: ác. gálico, CU: ác. *p*-cumárico, CA: ác. cafeico y T: ác. tánico. En los gráficos de la parte inferior de la figura se muestra el área de difusión de las fracciones FD y FND en presencia de concentraciones crecientes de AF (0-3 mg/mL). Las curvas representan promedios \pm desviación estándar para cada condición experimental. En la parte superior de la imagen y en la parte inferior de los gráficos se señalan las concentraciones de las soluciones de los AF que fueron mezcladas en razón 1:1 (v/v) con BSA.*Concentración mínima de AF que genera diferencia significativa respecto del control (ausencia de AF).

Efecto de los AF sobre las proteínas salivales. a) Ensayo de difusión. En la Figura 5 se muestra el efecto de distintos AF sobre la difusión de la fracción proteica de la saliva en membranas de celulosa. Las soluciones de los distintos AF (varias concentraciones) fueron mezcladas con saliva. A partir de cada mezcla se obtuvo una alícuota de 20 μ L para ser depositada sobre la membrana de celulosa. Esta fue procesada según lo señalado previamente. La alícuota de saliva sola (0 mg/mL de AF) depositada sobre la membrana de celulosa mostró dos fracciones claramente diferenciadas: FND, ubicada en el centro del círculo de difusión y teñida con más intensidad y FD, una banda alrededor de la FND y con menos intensidad de tinción. Cuando se mezcló una alícuota de saliva con concentraciones crecientes de los distintos AF de bajo peso molecular se observó una disminución progresiva y significativa de la FD de la saliva (efecto antidifusor) (test Tukey, $p < 0.5$). Por contraste, en este experimento la FND de la saliva no mostró cambios en el área de difusión al mezclarse con los diversos AF (Figura 5). El efecto observado con las distintas concentraciones de los distintos AF de bajo peso molecular sobre la difusión de la proteína salival fue similar entre sí, observándose presencia de la FD hasta alrededor de 1.0-1.2 mg/mL de AF y su desaparición casi total en todas las concentraciones mayores ensayadas con un aumento concomitante en la intensidad de la FND (probablemente en relación a un efecto particular sobre esta fracción de la saliva). Por el contrario, en las concentraciones de AF ensayadas, T no mostró un efecto antidifusor sobre la FD de la saliva, aunque sí una fracción FND teñida ligeramente más intensa con concentraciones más altas de T (Figura 5). **b) Ensayo de precipitación.** Ensayo orientado a evaluar la interacción de los AF con la saliva mediante la observación de la eventual precipitación de las proteínas salivales en presencia de AF. Luego de mezclar ambos componentes (AF y saliva), se centrifugó la mezcla y se depositó una alícuota del sobrenadante sobre la lámina de celulosa. En este estudio se observó que al aumentar gradualmente la concentración de los distintos AF de bajo peso molecular, la FD de los sobrenadantes de las mezclas AF/saliva disminuyó significativamente (test Tukey, $p < 0.5$) hasta 1.0-1.2 mg/mL. A partir de esa concentración, la desaparición de la FD del sobrenadante fue casi total, mientras que la FND de las proteínas salivales permanece inalterablemente presente en el sobrenadante (Figura 6). En este estudio, el efecto de los distintos AF de bajo peso molecular fue semejante. En notable contraste, T provocó una precipitación total de la FND de la saliva en concentraciones superiores a 1.2 mg/mL. A partir de esa concentración, sólo se observó un material difusible en el sobrenadante de las mezclas T/saliva (Figura 6).

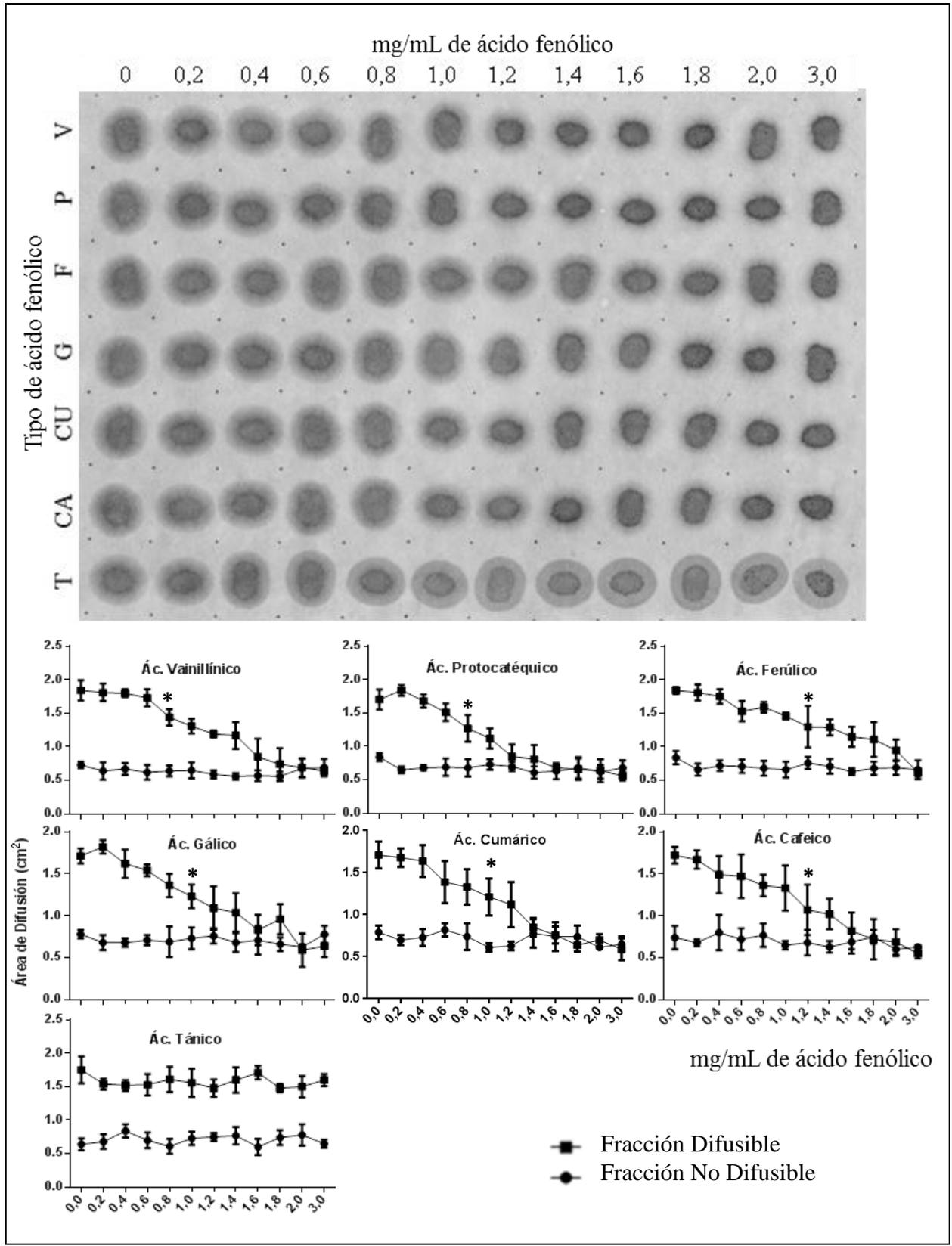


Figura 5. Efecto de concentraciones crecientes de distintos AF (0-3 mg/mL) sobre la difusión de las proteínas salivales en membranas de celulosa. V: ác. vainillínico, P: ác. protocatéquico, F: ác. ferúlico, G: ác. gálico, CU: ác. *p*-cumárico, CA: ác. cafeico y T: ác. tánico. En los gráficos de la parte inferior de la figura se muestra el área de difusión de las fracciones FD y FND en presencia de concentraciones crecientes de AF (0-3 mg/mL). Las curvas representan promedios \pm desviación estándar para cada condición experimental. En la parte superior de la imagen y en la parte inferior de los gráficos se señalan las concentraciones de las soluciones de los AF que fueron mezcladas en razón 1:1 (v/v) con saliva. *Concentración mínima de AF que genera diferencia significativa respecto del control (ausencia de AF).

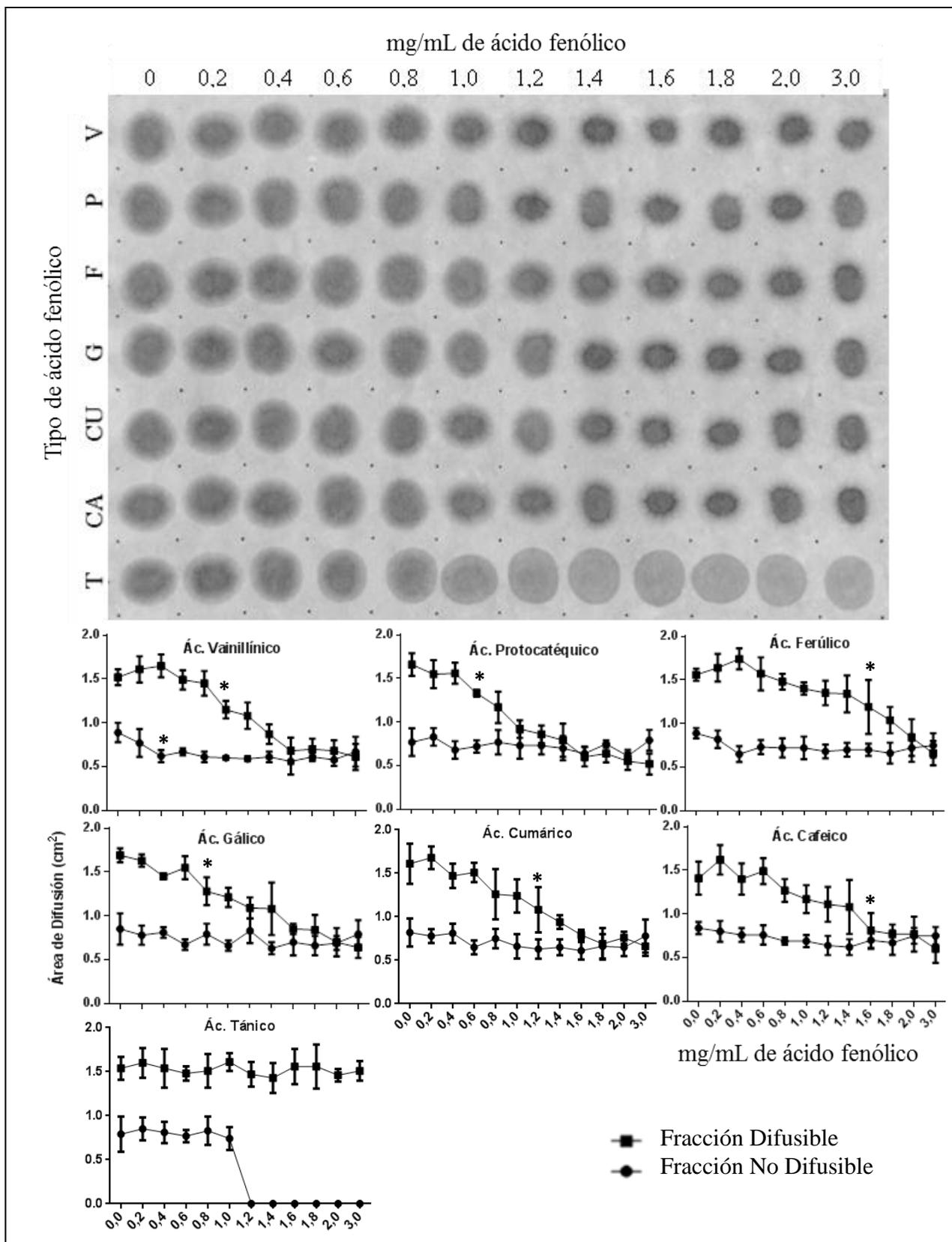


Figura 6. Efecto de concentraciones crecientes de distintos AF (0-3 mg/mL), sobre la precipitación de las proteínas salivales en membranas de celulosa. V: ác. vainillínico, P: ác. protocatéquico, F: ác. ferúlico, G: ác. gálico, CU: ác. *p*-cumárico, CA: ác. cafeico y T: ác. tánico. En los gráficos de la parte inferior de la figura se muestra el área de difusión de las fracciones FD y FND en presencia de concentraciones crecientes de AF (0-3 mg/mL). Las curvas representan promedios \pm desviación estándar para cada condición experimental. En la parte superior de la imagen y en la parte inferior de los gráficos se señalan las concentraciones de las soluciones de los AF que fueron mezcladas en razón 1:1 (v/v) con saliva.*Concentración mínima de AF que genera diferencia significativa respecto del control (ausencia de AF).

Efecto de mezclas binarias de AF/ácido gálico y AF/ácido tánico sobre la proteína albúmina. Los AF en forma individual muestran efectos sobre la difusión y/o precipitación de la albúmina. Como una forma de aproximarse a establecer si tales efectos ocurren por mecanismos semejantes y pueden ser efectos sumatorios, se estudió si en los ensayos de difusión y de precipitación eran comparables los efectos producidos por concentraciones semejantes de un AF versus los efectos producidos por mezclas binarias de AF. Con esta finalidad, cada uno de los siete AF fue mezclado (1:1 v/v) con ácido gálico (G) o con ácido tánico (T) en concentraciones finales de 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL. Estas soluciones de AF únicos o de mezclas de AF fueron mezcladas en una razón 1:1 v/v con BSA. La Figura 7 es una figura representativa del total de los AF del presente estudio. En ella se muestra sólo el efecto de las mezclas de ácido tánico (T), ácido gálico (G) y ácido protocatéquico (P), por ser éstos dos últimos los más abundantes en el vino. Los demás AF presentaron un comportamiento similar al del ácido protocatéquico mezclado con ácido gálico o con ácido tánico. En la Figura 7 se muestra que la mezcla G/P en concentraciones totales de 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL (S-U en la figura) afectó la difusión de BSA de manera semejante a lo observado con iguales concentraciones de G solo (E-H en la figura) y P solo (I-L en la figura). Por contraste, cuando el experimento se realizó con T *versus* G y T *versus* P, en concentraciones totales de 0.5, 1.0, 2.0 mg/mL de cada uno, se observó un marcado efecto antidifusor de T solo sobre BSA (A-D en la figura), el cual fue predominante respecto del efecto observado con G solo (E-H en la figura) y P solo (I-L en la figura), ambos con un efecto antidifusor parcial. Tanto G como P intensificaron notablemente el efecto antidifusor de T sobre BSA (M-R en la figura). En el caso de la prueba de precipitación (Figura 7, V-P'), se observó que T solo en concentraciones totales de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/mL (V-Y en la figura) tuvo un efecto antidifusor de BSA y que, además, generó la precipitación de la proteína, específicamente en las concentraciones de 0.5 y 1.0 mg/mL (W y X en la figura), ya que hubo una disminución de la intensidad de tinción de la FND de los sobrenadantes. En las mezclas T/G y T/P, a iguales concentraciones (H'-J' y K'-M', en la figura) se observó el efecto antidifusor de T, pero no el efecto precipitante, ya que presentaron una mayor intensidad de tinción de la FND. Por otro lado, se observó que la mezcla G/P (0.5, 1.0, 2.0 mg/mL) con BSA (N'-P', en la figura) no generó diferencias en lo referente a las fracciones FD y FND con respecto a lo observado en las mezclas de BSA con G solo (Z-C') o P solo (D'-G'), en concentraciones totales equivalentes y no precipitaron la proteína BSA.

Efecto de mezclas binarias de AF/ácido gálico sobre las proteínas salivales. En este experimento se observa el efecto que tienen los AF en forma individual y los AF mezclados con G, sobre la saliva. Se realizaron las mezclas AF/G con el propósito de ver si son comparables los efectos de concentraciones semejantes de los AF solos y AF/G sobre las proteínas salivales. Los distintos AF se mezclaron con G en una relación 1:1 v/v, en concentraciones finales de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/mL. Posteriormente, tanto los AF solos como las mezclas AF/G fueron mezclados con la saliva (1:1 v/v). En la Figura 8, se observa (prueba de difusión) que en concentraciones finales de 0, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/mL, los AF solos [ácidos vainillínico (V), protocatéquico (P), ferúlico (F), gálico (G), *p*-cumárico (CU) y cafeico (CA)] y las mezclas AF/G tuvieron un efecto similar en cuanto a que ambos produjeron una disminución del área de difusión de FD. Así, en concentraciones de 2 mg/mL la difusión de la proteína salival fue casi nula en presencia de AF o AF/G. Por el contrario, T solo, en sus distintas concentraciones (0.5, 1.0 y 2 mg/mL), no alteró la difusión de las proteínas salivales pues no afectó el área de difusión de las fracciones FD y FND con respecto al control (0 mg/mL de T) (test Tukey, $p > 0.5$) (Figura 8). Igualmente notable fue la observación que la mezcla de T con G, en sus distintas concentraciones (0.5, 1.0 y 2 mg/mL), no tuvo el efecto antidifusor observado con idénticas concentraciones de G solo. Aún más, el efecto observado con estas mezclas sobre la difusión de la proteína salival fue idéntico al efecto producido por T solo (Figura 8). En la prueba de precipitación, se observó que los AF solos y las mezclas AF/G no generaron la precipitación de las proteínas salivales en ninguna de sus concentraciones. En cambio, T solo o T mezclado con G (T/G) en la concentración 2 mg/mL generó una precipitación importante de la FND, aún cuando no afectó la difusión total de la proteína salival (Figura 8). Igualmente interesante fue el contraste entre el efecto precipitador de la fracción FND por parte de la mezcla G/T *versus* la ausencia de este efecto por parte de G solo.

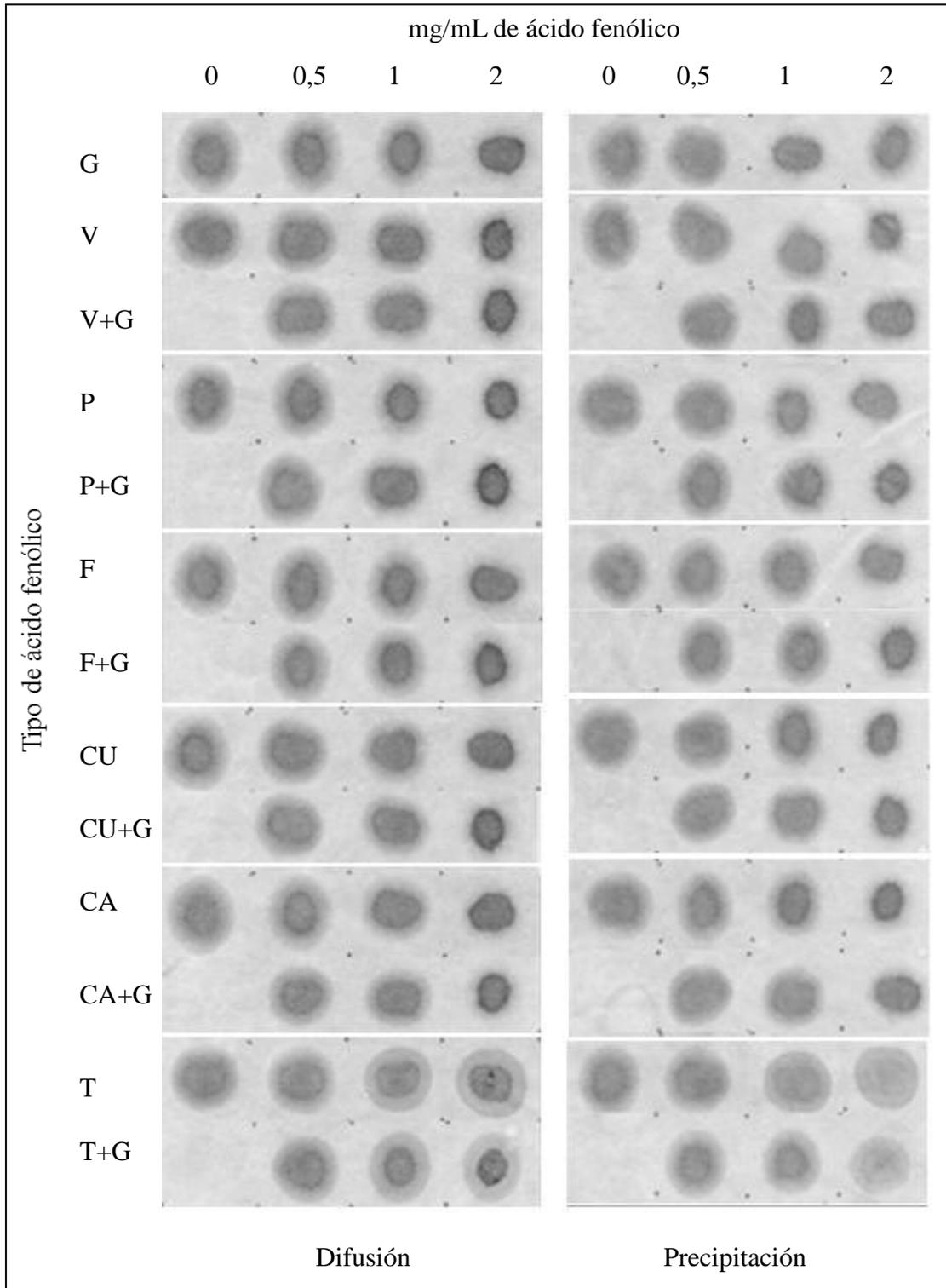


Figura 8. Resultados de la difusión y precipitación de proteínas salivales mediante AF y mezclas de éstos con ácido gálico en membranas de celulosa. G: ácido gálico, V: ácido vainillínico, V+G: ácido vainillínico + ácido gálico, P: ácido protocatéquico, P+G: ácido protocatéquico + ácido gálico, F:

ác. ferúlico, F+G: ác. ferúlico + ác. gálico, CU: ác. *p*-cumárico, CU+G: ác. *p*-cumárico + ác. gálico, CA: ác. cafeico, CA+G: ác. cafeico + ác. gálico, T: ác. tánico, T+G: ác. tánico + ác. gálico. En la parte superior de ambos paneles se señalan las concentraciones de las soluciones de los AF que fueron mezcladas en razón 1:1 (v/v) con saliva. Cada panel corresponde al alineamiento de imágenes obtenidas desde una misma membrana de celulosa.

Efecto de mezclas binarias de AF/ácido tánico sobre las proteínas salivales. Se comparó el efecto de los AF solos o mezclados con T sobre la fracción proteica salival. Las mezclas AF con T (1:1 v/v), alcanzaron concentraciones finales de 0.5, 1.0 y 2.0 mg/mL. Los AF y las mezclas AF/T fueron mezcladas con saliva en una relación 1:1 v/v. En la Figura 9, en la prueba de difusión, se muestra que los AF solos [ácidos vainillínico (V), protocatéquico (P), ferúlico (F), gálico (G), *p*-cumárico (CU) y cafeico (CA)] en concentraciones crecientes de 0.5, 1.0 y 2 mg/mL, provocaron una disminución del área de difusión de la FD de la saliva. Sin embargo, en iguales concentraciones, las mezclas de AF/T no generaron alteración en la difusión de las proteínas salivales, ya que las FD y las FND se mantuvieron inalteradas incluso con las concentraciones más altas de las mezclas AF/T (2 mg/mL), comparable con el efecto producido por T solo en las mismas concentraciones. Cabe destacar que los AF mezclados con T no tuvieron el efecto antidifusor producido por iguales concentraciones de AF solos (Figura 9). En el caso de la prueba de precipitación, los AF solos en sus distintas concentraciones (0.5, 1.0 y 2.0 mg/mL), no precipitaron las proteínas de la saliva. Por el contrario, tanto T solo como las mezclas AF/T precipitaron la fracción FND de la saliva en la concentración 2 mg/mL, fenómeno objetivado por una notable disminución en la intensidad de tinción de FND en los sobrenadantes correspondientes (Figura 9).

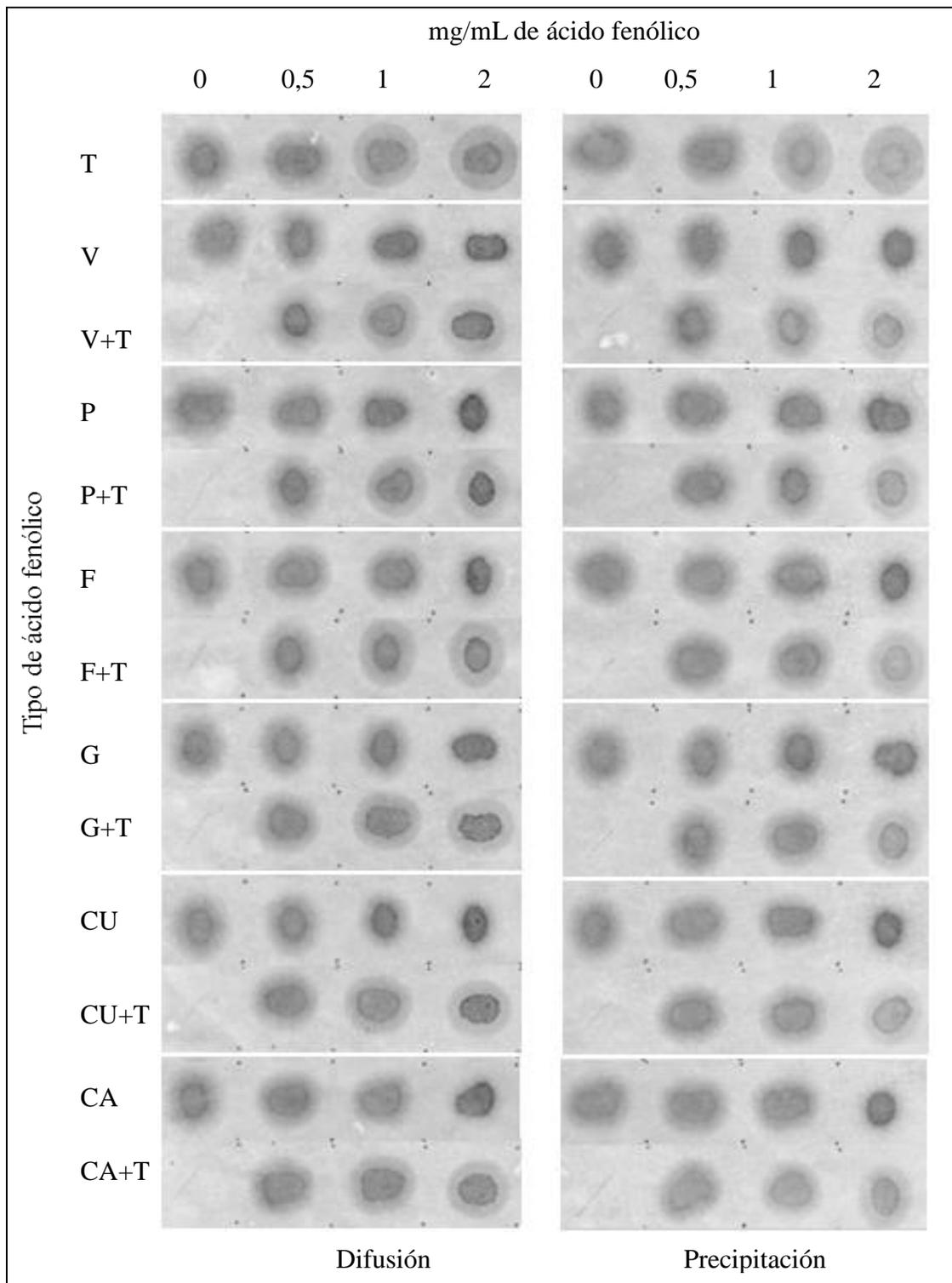


Figura 9. Resultados de la difusión y precipitación de proteínas salivales mediante AF y mezclas de éstos con ác. tánico en membranas de celulosa. T: ác. tánico, V: ác. vainillínico, V+T: ác. vainillínico + ác. tánico, P: ác. protocatéquico, P+T: ác. protocatéquico + ác. tánico, F:

ác. ferúlico, F+T: ác. ferúlico + ác. tánico, G: ác. gálico, G+T: ác. gálico + ác. tánico, CU: ác. *p*-cumárico, CU+T: ác. *p*-cumárico + ác. tánico, CA: ác. cafeico, CA+T: ác. cafeico + ác. tánico. En la parte superior de ambos paneles se señalan las concentraciones de las soluciones de los AF que fueron mezcladas en razón 1:1 (v/v) con saliva. Cada panel corresponde al alineamiento de imágenes obtenidas desde una misma membrana de celulosa.

DISCUSIÓN

En este estudio se analizó la interacción de un grupo de AF de interés enológico con la fracción proteica de la saliva y con una proteína modelo (BSA). Para ello, se estudió el eventual efecto de cada uno de un grupo de AF sobre dos propiedades fisicoquímicas de proteínas: a) difusión sobre una lámina de celulosa dispuesta horizontalmente y b) solubilidad en un medio acuoso. La alteración en cualquiera de ambas propiedades fisicoquímicas fue considerada como indicador de interacción. El ensayo de difusión sobre una membrana de celulosa, así como el ensayo de precipitación, permiten la detección, evaluación selectiva y cuantitativa de la fracción proteica presente en la saliva humana (López *et al.*, 2007). La detección de las proteínas sobre la membrana de celulosa se hizo mediante su tinción con el colorante Coomassie blue R-250. Este colorante selectivo para proteínas reacciona, adicionalmente, con excesos de polifenoles. La afinidad que presenta este colorante por los polifenoles es de carácter inespecífico y correspondería al conocido “efecto mordiente”, el que consiste en la facilitación de la fijación de colorantes sobre la fibra por parte de los polifenoles (Obreque *et al.*, 2010c).

Se empleó como estrategia de análisis de la interacción entre AF con las proteínas el comportamiento de las suspensiones de las proteínas mezcladas con AF sobre la membrana de celulosa. De este modo, en el ensayo de difusión, la disminución del área de difusión de las proteínas en presencia de AF, comparativamente con la difusión de las proteínas en ausencia de AF (control), sería un indicativo de interacción. Un criterio complementario usado para identificar la ocurrencia de interacción fue evaluar la precipitación de las proteínas a consecuencia de la presencia de AF. Este análisis consistió en observar la desaparición de las proteínas desde los sobrenadantes de las mezclas (AF/proteína), depositadas en la membrana de celulosa. Ambos procedimientos analíticos han sido empleados en múltiples publicaciones recientes (López *et al.*, 2007; Obreque *et al.*, 2010a; Obreque *et al.*, 2010b; Obreque *et al.*, 2010c; Obreque *et al.*, 2012).

El estudio fue realizado usando dos tipos de proteínas, ya que diferentes proteínas pueden presentar distintas interacciones con los AF debido a su composición (Llaudy, 2006). Por una parte, se utilizó una proteína pura, altamente hidrofílica y de tamaño intermedio, la albúmina de suero de bovino (BSA) y, por otra parte, se utilizó una matriz proteica compleja representada por la saliva humana. La albúmina fue elegida para ser usada como proteína modelo para llegar a comprender las interacciones AF/proteína. Esta proteína presenta una significativa afinidad por los polifenoles. La saliva, en cambio, fue elegida por tener una importante función en la sensorialidad bucal, asociada a su interacción con los componentes de la dieta humana, como el vino, que es rico en polifenoles. Los polifenoles exhiben una alta afinidad por las proteínas presentes en la saliva, formando complejos altamente estables (Hagerman y Butler, 1981; Prinz y Lucas, 2000). La formación de estos complejos puede tener un papel importante en la promoción de la sensación de astringencia (Bacon y Rhodes, 2000).

Los AF de bajo peso molecular elegidos para hacer el estudio fueron aquellos de interés enológico, ya que debido a sus importantes concentraciones en el vino (promedio 150 mg/L, según Vivas *et al.*, 2003) tienen un impacto en las características organolépticas de este, tales como color, aroma, sabor y astringencia, todas ellas propiedades fundamentales que definen la

calidad de un vino (Zamora, 2003). Así, los AF influyen en el color del vino, ya que al oxidarse, sea por vía enzimática o química, generan pardeamiento. Además, los AF modulan el color del vino al actuar como copigmentos (Zamora, 2013). También juegan un rol como antioxidantes ya que debido a su estructura química pueden neutralizar radicales libres, a través de la donación del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo del anillo aromático (Flanzy, 2003; Pannala *et al.*; 2001). Los AF también juegan un rol importante en el aroma y sabor de los vinos, pues al ser degradados por distintos microorganismos (levaduras y bacterias), son convertidos en fenoles volátiles que afectan negativamente el aroma y sabor de los vinos (Landete, 2007). Sin embargo, el presente estudio se enfocó en evaluar su eventual participación en la sensación de astringencia de los vinos. Es bien sabido que los compuestos fenólicos forman complejos, a través de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas, con las proteínas presentes en la saliva (Hagerman y Butler, 1980). Este aspecto estaría estrechamente relacionado con la astringencia. Sin embargo, hay escasa información bibliográfica que relacione la astringencia con los AF. Hasta ahora no hay estudios concluyentes que señalen que los AF en forma individual interactúen con las proteínas salivales, aspecto que, de ser observado, vincularía directamente los AF con la sensación de astringencia.

Junto con los AF de bajo peso molecular, en este estudio también se empleó ácido tánico para evaluar la interacción AF/proteínas. El ácido tánico está compuesto por glucosas y ácidos fenólicos (ácido gálico). El ácido tánico no se encuentra presente en el vino. Sin embargo, este AF fue incluido en el estudio por ser un polifenol y por su conocida propiedad de precipitar proteínas (Hagerman y Butler, 1978 y 1980; Siebert y Chassy, 2003).

Los resultados obtenidos en los ensayos realizados con los AF y la proteína BSA mostraron que estos ejercen un marcado efecto antidifusor. Sin embargo, se observó dos subconjuntos claramente diferenciables de AF. Uno de ellos, representado por T, y el otro por el resto de los AF del estudio. T mostró un efecto antidifusor marcadamente mayor que el de los AF de bajo peso molecular. Así, en concentraciones de 1.4 mg/mL, T suprimió por completo la difusión de la proteína BSA, mientras que los demás AF, en concentraciones mayores que la concentración de T (3 mg/mL) produjeron un efecto antidifusor, aunque menor. Por lo tanto, este experimento sugirió que los AF interactúan con la proteína albúmina.

Los experimentos realizados con BSA también fueron realizados con saliva humana. Este se caracteriza por ser un fluido corporal acuoso (>95% de agua), constituido por una mezcla compleja de proteínas y mucinas y un pH de aproximadamente 7.0. Al igual que con BSA, en la prueba de difusión con saliva se observó dos subconjuntos de AF marcadamente diferenciados: los AF de bajo peso molecular y T. Los AF de bajo peso molecular generaron un fuerte efecto antidifusor sobre las proteínas salivales, mientras que T no generó dicha alteración. Estas observaciones son indicativas de interacción de los AF de bajo peso molecular sobre la fracción proteica difusible de la saliva. Sin embargo, la falta de efecto de T sobre la fracción difusible no necesariamente es sugerente de falta de interacción de este polifenol con la saliva. En efecto, la inspección visual cuidadosa del modo de difusión de la saliva puesta en contacto con T muestra una mayor intensidad de tinción de la fracción FND (efecto mordiente) y un modo de difusión más heterogéneo. De acuerdo a ello, T tendría más afinidad que los AF de bajo peso molecular por la fracción FND de la saliva. Esta fracción FND contiene gran parte de las mucinas de la

saliva de alto peso molecular y no difusibles sobre membranas de celulosa. De esta manera, en concentraciones bajas de T la interacción con la saliva, no visibilizada por el test de difusión, sería a través de la fracción salival no difusible. Sólo con el incremento de la concentración de T y una vez saturada la capacidad de interacción con la fracción FND quedaría T disponible para interactuar con las proteínas presentes en la fracción salival difusible. Estas observaciones son consistentes con lo observado en la prueba de precipitación. En efecto, en esta prueba, T generó la precipitación de la FND de la saliva, no así los demás AF. Así, los AF de bajo peso molecular habrían formado complejos solubles y provocado un efecto antidifusor sobre la fracción difusible (FD) de la saliva. Tomados en conjunto, los resultados de este estudio también sugieren que los AF interactúan con las macromoléculas salivales y coinciden con otros estudios respecto de la capacidad de T para precipitar proteínas (Hagerman y Butler, 1978 y 1980; Siebert y Chassy, 2003). Además, estos resultados sugirieron propiedades de interacción de T con la proteína BSA y de la saliva que son distintas a las de todo el resto de los AF en el estudio. Posiblemente, el tamaño molecular marcadamente mayor de T (respecto de los otros AF) y su alta densidad de grupos OH (numerosos residuos de G en su estructura) pueden ser aspectos contribuyentes a esta mayor reactividad con las proteínas. Cabe mencionar que la precipitación de un complejo polifenol/proteína es facilitado por un pH similar al del punto isoeléctrico (pI) de la proteína. Sin embargo, el pI es un parámetro específico para cada proteína y la saliva está conformada por una red o entramado complejo de proteínas, sobre el cual T, pero no los AF de bajo peso molecular, ejercería su efecto precipitante.

Diversos autores han propuesto que la interacción polifenol/proteína es pH dependiente (Hagerman y Butler, 1978, 1981; Llaudy 2006, Obreque *et al.*, 2012; Kallithraka *et al.*, 1997, Siebert y Euzen, 2008). Así, la interacción AF/proteínas que hemos observado podría resultar de la unión entre los protones liberados por los AF y la proteína BSA o de la saliva. Los pKs de los AF del estudio se encuentran en el estrecho rango desde 4.0 a 4.64 (Bedran *et al.*, 2009; Câmara *et al.*, 2013). Si el único modo de interacción de los AF con las proteínas fuese a través de los protones liberados, y considerando la semejanza entre los pKs de todos ellos, entonces la interacción de los AF con las proteínas sería semejante. Sin embargo, los resultados que hemos observado en nuestro estudio más bien apuntan a que distintos AF presentan diferencias en su capacidad de interactuar con las proteínas, lo que sugeriría que los AF mismos, o los aniones derivados por la liberación de protones, participarían de tales interacciones.

El vino es una mezcla química compleja en cuya matriz coexisten distintos AF. Por esto, además del análisis de la eventual interacción de AF individuales con las proteínas, se estudió si mezclas de AF tenían efectos iguales o distintos a los de AF individuales. Para ello se estudió el efecto de mezclas binarias de AF sobre la difusión y la precipitación de BSA y de la proteína salival. Las mezclas consideradas para estos ensayos correspondieron a cada uno de los AF mezclados con G o T (AF/G y AF/T). En el ensayo de difusión las mezclas AF/G tuvieron un efecto antidifusor comparable al de los AF individuales frente a la proteína de BSA. Por contraste, las mezclas AF/T tuvieron un efecto antidifusor mayor que el de los AF de bajo peso molecular individuales, comparable a T solo frente a BSA, observándose además una mayor intensidad de tinción de las proteínas. Por otra parte, en la prueba de precipitación, los AF individuales y tanto las mezclas AF/G como AF/T no precipitaron las proteínas salivales, en contraste con T solo que sí precipitó la fracción proteica de la saliva. En el experimento homólogo realizado con saliva, en la prueba

de difusión, los AF individuales y las mezclas AF/G tuvieron un efecto antidifusor similar. Por el contrario, T solo y las mezclas AF/T no alteraron el área de difusión de las proteínas salivales. Como se comentó antes, una aparente alta afinidad de T por la fracción no difusible de la saliva podría explicar su falta de disponibilidad para interactuar con la fracción difusible de proteínas salivales. En cuanto a la prueba de precipitación, los AF individuales y las mezclas AF/G no precipitaron las proteínas salivales, mientras que T solo y las mezclas AF/T en concentraciones de 2 mg/mL precipitaron la FND de la saliva.

Tomado en conjunto, el estudio realizado con las mezclas binarias AF/G mostró que no ocurre un efecto aditivo o sinérgico entre los AF de bajo peso molecular ya que AF/G ejerció el mismo efecto que los AF y G sin mezclar, observación válida tanto para la interacción con la albúmina como con la fracción proteica salival. Esta observación sugiere que los distintos AF de bajo peso molecular tendrían el mismo mecanismo de interacción con las proteínas. Por otra parte, en los resultados de las mezclas binarias AF/T predominó el efecto de T sobre el de los otros AF, tanto en la prueba de difusión como en la de precipitación, lo que sugiere que T tendría, en comparación a los AF del estudio, una mayor afinidad por las proteínas BSA y de la saliva. Según se comentó antes, este fenómeno podría deberse a la gran cantidad de grupos OH que tiene T, derivado del alto número de residuos G en su estructura.

Finalmente, la capacidad de interacción de los polifenoles con proteínas, que en varios estudios ha sido asociada estrechamente con la capacidad de los polifenoles para interferir con la difusión sobre membranas de celulosa (López *et al.*, 2007; Obreque *et al.*, 2010a; Obreque *et al.*, 2010b; Obreque *et al.*, 2010c; Obreque *et al.*, 2012) se ha interpretado como un predictor de la sensación de astringencia que producen algunos alimentos y bebidas, como el vino. Sobre esta base, y a la luz de las interacciones fisicoquímicas entre los AF y las proteínas que hemos observado en este estudio, con particular énfasis con la fracción proteica de la saliva, sería posible afirmar que los AF también influyen directamente sobre la sensación de astringencia.

CONCLUSIONES

1. Los ácidos fenólicos interactúan con las proteínas salivales.
2. Al interactuar con las proteínas salivales, los ácidos fenólicos afectan algunas de sus propiedades fisicoquímicas, tales como su capacidad de difundir sobre membranas de celulosa.
3. Existen diferencias en los efectos producidos por distintos ácidos fenólicos sobre la proteína salival, destacando dos subconjuntos de ácidos fenólicos: los ácidos fenólicos de bajo peso molecular y el ácido tánico. Experimentalmente, los primeros tienen un efecto antidifusor de las proteínas salivales y el segundo tiene un efecto precipitante.
4. La similitud de los efectos observados con los ácidos fenólicos de bajo peso molecular sugiere que ellos tienen un mecanismo semejante de interacción con la proteína salival.
5. Tomadas en conjunto, estas observaciones sugieren que los ácidos fenólicos también jugarían un rol importante en la sensación de astringencia.

BIBLIOGRAFÍA

- Bacon, J. and Rhodes, M. 2000. Binding affinity of hydrolyzable tannins to parotid saliva and to proline-rich proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 838-843.
- Baxter, N.; Lilley, T.; Haslam, E. and Williamson, M. 1997. Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat in complexation and precipitation. *Biochemistry* 36: 5566-5577.
- Bedran, A.; Yoo, K.; Ema, K. and Pashley D. 2009. Mechanical properties of tannic-acid-treated dentin matrix. *Journal of Dental Research* 88: 807-811.
- Câmara, C.; Bortoloti, J.; Scarminio, I.; Ballus, C.; Meinhart, A.; Godoyd, H. and Bruns, R. 2013. Optimization of electrophoretic separations of thirteen phenolic compounds using single peak responses and an interactive computer technique. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 24: 1744-1753.
- De Freitas, V.; Carvalho, E. and Mateus, N. 2003. Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry* 81: 503-509.
- Doco, T.; Williams, P. and Cheynier, V. 2007. Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 6643-6649.
- Flanzy, C. 2003. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos. Segunda Edición. Madrid. Ediciones mundi- prensa. 797p.*
- Fontoin, H.; Saucier, C.; Teissedre, P. and Glories Y. 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.
- Gawel, R. 1998. Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 4: 74-95.
- Hagerman, A and Butler, L. 1978. Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 26: 809-812.
- Hagerman, A and Butler, L. 1980. Determination of protein in tannin-protein precipitates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 28: 944-947.
- Hagerman, A and Butler, L. 1981. The specificity of proanthocyanidin-protein interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 256: 4494-4497.
- Kallithraka, S.; Bakker J. and Clifford M. N. 1997. Effect of pH on astringency in model solutions and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 2211-2216.

- Landete, J; Rodríguez, H.; De Las Rivas, B. and Muñoz R. 2007. Degradación de compuestos fenólicos presentes en vino mediante cepas de *Lactobacillus plantarum*. En: Avances en ciencias y técnicas enológicas. España. Junta de Extremadura. 49-51p.
- Lawless, H.; Horne, J. and Giasi, P. 1996. Astringency of organic acids is related to pH. *Chemical Senses* 21: 397-403.
- Llaudy, M. 2006. Contribución al estudio de los factores que afectan la astringencia del vino tinto. Tesis doctoral. Tarragona, España. Universidad Rovira I Virgili. 178p.
- López, J.; Castillo, J.; Traipe, L. and López R. 2007. A protein dye-binding assay on cellulose membranes for tear protein quantification. *Cornea* 26: 970-976.
- Mateus, N.; Carvalho, E.; Luís C. and De Freitas V. 2004. Influence of tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein-tannin aggregates. *Analytica Chimica Acta* 513: 135-140.
- Mehansho, H.; Butler, L. and Carlson, D. 1987. Dietary tannins and salivary proline-rich proteins: interactions, induction, and defense mechanisms. *Annual Reviews Nutrition* 7: 423-440.
- Obreque, E.; Peña, A.; López, R. and Zamora, F. 2010a. Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 3729–3735.
- Obreque, E.; Peña, A.; López, R. and Zamora, F. 2010b. Tannin–protein interaction is more closely associated with astringency than tannin–protein precipitation: experience with two enological tannins and a gelatin. *International Journal of Food Science and Technology* 45: 2629–2636.
- Obreque, E.; Mateluna, C.; Peña, A. and López, R. 2010c. Quantitative determination of interactions between tannic acid and a model protein using diffusion and precipitation assays on cellulose membranes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 8375–8379.
- Obreque, E.; Peña, A and López, R. 2012. Interactions of enological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *Food Science and Technology* 45: 88-93.
- Pannala, A.; Chan, T.; O'Brien, P. and Rice, C. 2001. Flavonoid B-Ring chemistry and antioxidant activity fast reaction kinetics. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 282: 1161–1168.
- Prinz, J. and Lucas, P. 2000. Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation* 27: 991-994.
- Sarni, P.; Canals, J.; Mazerolles, G. and Cheynier V. 2008. Influence of the glycosylation of human salivary proline-rich proteins on their interactions with condensed tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 9563-9569.

- Serafini, M.; Maiani G. and Ferro, A. 1997. Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 3148-3151.
- Siebert, K and Chassy, A. 2003. An alternate mechanism for the astringent sensation of acids. *Food Quality and Preference* 15: 13-18.
- Siebert, K. and Euzen, C. 2008. The relationship between expectorant pH and astringency perception. *Journal of Sensory Studies* 23: 222-233.
- Soares, S.; Sousa, A.; Mateus, N. and De Freitas, V. 2011. Effect of condensed tannins addition on the astringency of red wines. *Chemical Senses* 37: 191-198.
- Souquet, J.; Labarbe, B.; Le Guernevé, C.; Cheynier, V. and Moutounet, M. 2000. Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1076-1080.
- Sowalsky, R. and Noble, A. 1998. Comparison of the effects of concentration, pH and anion species on astringency and sourness of organic acids. *Chemical Senses* 23: 343-349.
- Vivas, N. and Nonier, M. 2003. Sur l'estimation et le quantification des composés phenoliques des vins. *Bulletin de la Office International de la Vigne et du Vin*. 76: 281-303.
- Zamora, F. 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. Madrid. Ediciones Mundi Prensa. 225p.
- Zamora, F. 2013. La química del color del vino. *ACE: Revista de enología* 140: 1697-4123.

ANEXOS

Cuadro 1. Efecto de concentraciones crecientes de distintos AF (0-3 mg/mL) sobre la difusión de la fracción FD de albúmina (BSA) (1 mg/mL) en membranas de celulosa. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar del área de difusión (cm²) correspondiente a la Figura 4.

		Ensayo de Difusión						
		Fracción Difusible						
	Vainillínico	Protocatéquico	Ferúlico	Gálico	Cumárico	Cafeico	Tánico	
0	2,59 \pm 0,08 A a	2,70 \pm 0,22 A a	2,77 \pm 0,18 A a	2,60 \pm 0,45 A a	2,71 \pm 0,09 A a	2,64 \pm 0,26 A a	2,37 \pm 0,39 A a	
0,2	2,02 \pm 0,18 B a	1,83 \pm 0,13 B a	2,06 \pm 0,38 B a	1,85 \pm 0,31 AB a	2,16 \pm 0,29 AB a	1,89 \pm 0,09 BC a	2,22 \pm 0,27 A a	
0,4	1,76 \pm 0,30 BC ab	1,68 \pm 0,17 BC ab	1,98 \pm 0,06 BC ab	1,82 \pm 0,29 AB ab	2,05 \pm 0,14 ABC a	2,02 \pm 0,22 B a	1,45 \pm 0,31 B b	
0,6	1,64 \pm 0,09 BCD a	1,62 \pm 0,16 BCD a	1,86 \pm 0,10 BCD a	1,79 \pm 0,21 AB a	1,87 \pm 0,32 BCD a	1,81 \pm 0,11 BC a	1,01 \pm 0,26 B b	
0,8	1,59 \pm 0,16 CD a	1,51 \pm 0,11 BCDE a	1,79 \pm 0,16 BCD a	1,75 \pm 0,12 AB a	1,76 \pm 0,17 BCD a	1,56 \pm 0,16 BCD a	0,30 \pm 0,35 C b	
1	1,40 \pm 0,07 CDE a	1,50 \pm 0,36 BCDE a	1,80 \pm 0,23 BCD a	1,79 \pm 0,14 AB a	1,58 \pm 0,28 BCD a	1,61 \pm 0,20 BCD a	0,12 \pm 0,25 C b	
1,2	1,42 \pm 0,22 CDE a	1,25 \pm 0,27 CDE a	1,55 \pm 0,11 CDE a	1,38 \pm 0,37 B a	1,64 \pm 0,16 BCD a	1,51 \pm 0,31 BCD a	0,16 \pm 0,31 C b	
1,4	1,27 \pm 0,09 DE a	1,20 \pm 0,29 CDE a	1,67 \pm 0,22 BCDE a	1,36 \pm 0,31 B a	1,43 \pm 0,27 CD a	1,42 \pm 0,34 CD a	0C b	
1,6	1,35 \pm 0,22 DE a	1,18 \pm 0,32 CDE a	1,67 \pm 0,21 BCDE a	1,36 \pm 0,49 B a	1,34 \pm 0,35 CD a	1,50 \pm 0,21 BCD a	0C b	
1,8	1,35 \pm 0,07 CDE a	1,06 \pm 0,22 DE a	1,45 \pm 0,27 DE a	1,33 \pm 0,46 B a	1,31 \pm 0,46 D a	1,35 \pm 0,15 CD a	0C b	
2	1,27 \pm 0,15 DE a	1,17 \pm 0,23 CDE a	1,38 \pm 0,16 DE a	1,40 \pm 0,51 B a	1,24 \pm 0,35 D a	1,33 \pm 0,32 CD a	0C b	
3	1,06 \pm 0,15 E a	1,01 \pm 0,19 E a	1,24 \pm 0,11 E a	1,22 \pm 0,32 B a	1,22 \pm 0,37 D a	1,12 \pm 0,20 D a	0C b	

* Las columnas muestran el análisis estadístico entre las concentraciones crecientes del mismo AF (significancia con letra mayúscula) y las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF (significancia con letra minúscula). Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Cuadro 2. Efecto de concentraciones crecientes de distintos AF (0-3 mg/mL) sobre la difusión de la fracción FND de albúmina (BSA) (1 mg/mL) en membranas de celulosa. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar del área de difusión (cm²) correspondiente a la Figura 4.

Ensayo de Difusión						
Fracción No Difusible						
Vainillínico 0C	Protocatéquico 0C	Ferúlico 0D	Gálico 0E	Cumárico 0C	Cafeico 0F	Tánico 0B
0,72 \pm 0,07 B a	0,74 \pm 0,13 B a	0,47 \pm 0,33 Ca	0,73 \pm 0,06 BCD a	0,47 \pm 0,32 B a	0,72 \pm 0,04 DE a	0,42 \pm 0,28 A a
0,73 \pm 0,05 B a	0,73 \pm 0,08 B a	0,63 \pm 0,10 BCa	0,66 \pm 0,08 D a	0,68 \pm 0,08 AB a	0,67 \pm 0,08 E a	0,44 \pm 0,33 A a
0,74 \pm 0,07 B ab	0,93 \pm 0,08 AB a	0,71 \pm 0,08 ABC ab	0,70 \pm 0,10 CD ab	0,81 \pm 0,11 AB ab	0,74 \pm 0,08 CDE ab	0,63 \pm 0,18 A b
0,92 \pm 0,08 AB a	0,92 \pm 0,10 AB a	0,84 \pm 0,08 AB a	0,80 \pm 0,07 ABCD a	0,86 \pm 0,12 A a	0,86 \pm 0,05 BCD a	0,54 \pm 0,08 A b
0,95 \pm 0,07 A a	1,01 \pm 0,12 A a	0,85 \pm 0,06 AB a	0,86 \pm 0,05 ABCD a	0,81 \pm 0,13 AB ab	0,82 \pm 0,03 BCDE ab	0,62 \pm 0,13 A b
0,87 \pm 0,04 AB a	0,92 \pm 0,07 AB a	0,80 \pm 0,05 AB a	0,84 \pm 0,08 ABCD a	0,84 \pm 0,05 A a	0,83 \pm 0,09 BCDE a	0,58 \pm 0,10 A b
1,07 \pm 0,06 A a	1,08 \pm 0,11 A a	0,79 \pm 0,03 AB bc	0,88 \pm 0,08 ABC ab	0,87 \pm 0,19 A ab	0,86 \pm 0,09 BCD ab	0,59 \pm 0,10 A c
1,06 \pm 0,11 A a	0,99 \pm 0,08 A ab	0,79 \pm 0,11 AB bc	0,87 \pm 0,09 ABC abc	0,99 \pm 0,10 A ab	0,97 \pm 0,05 AB ab	0,68 \pm 0,17 A c
1,07 \pm 0,15 A a	0,98 \pm 0,13 A a	0,92 \pm 0,11 AB a	0,92 \pm 0,12 AB a	0,93 \pm 0,11 A a	0,93 \pm 0,05 AB a	0,59 \pm 0,04 A b
1,08 \pm 0,17 A a	1,01 \pm 0,05 A a	0,95 \pm 0,03 A a	0,97 \pm 0,12 A a	1,00 \pm 0,14 A a	0,92 \pm 0,08 ABC a	0,52 \pm 0,02 A b
1,06 \pm 0,06 A a	1,10 \pm 0,11 A a	0,94 \pm 0,06 A a	1,00 \pm 0,08 A a	1,04 \pm 0,14 A a	1,08 \pm 0,12 A a	0,44 \pm 0,03 A b

* Las columnas muestran el análisis estadístico entre las concentraciones crecientes del mismo AF (significancia con letra mayúscula) y las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF (significancia con letra minúscula). Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Cuadro 3. Efecto de concentraciones crecientes de distintos AF (0-3 mg/mL) sobre la difusión de la fracción FD de la saliva en membranas de celulosa. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar del área de difusión (cm²) correspondiente a la Figura 5.

		Ensayo de Difusión					
		Fracción Difusible					
	Vainillínico	Protocatéquico	Ferúlico	Gálico	Cumárico	Cafeico	Tánico
0	1,84 \pm 0,15 A a	1,70 \pm 0,15 A a	1,84 \pm 0,05 A a	1,71 \pm 0,09 AB a	1,71 \pm 0,16 A a	1,72 \pm 0,10 A a	1,75 \pm 0,20 A a
0,2	1,81 \pm 0,13 AB a	1,84 \pm 0,08 A a	1,81 \pm 0,12 A a	1,82 \pm 0,08 A a	1,68 \pm 0,11 A ab	1,67 \pm 0,11 A ab	1,54 \pm 0,08 A b
0,4	1,80 \pm 0,06 AB a	1,68 \pm 0,10 A ab	1,75 \pm 0,11 A ab	1,62 \pm 0,17 ABC ab	1,64 \pm 0,19 A ab	1,49 \pm 0,22 AB b	1,52 \pm 0,08 A ab
0,6	1,73 \pm 0,13 AB a	1,51 \pm 0,13 AB a	1,53 \pm 0,15 ABC a	1,54 \pm 0,07 ABC a	1,39 \pm 0,25 AB a	1,47 \pm 0,26 AB a	1,53 \pm 0,16 A a
0,8	1,44 \pm 0,12 BC a	1,27 \pm 0,20 BC a	1,59 \pm 0,08 AB a	1,36 \pm 0,14 BCD a	1,33 \pm 0,21 AB a	1,36 \pm 0,13 AB a	1,61 \pm 0,19 A a
1	1,31 \pm 0,11 C ab	1,12 \pm 0,15 CD b	1,46 \pm 0,05 ABCD ab	1,23 \pm 0,14 CDE ab	1,21 \pm 0,22 BC ab	1,33 \pm 0,27 AB ab	1,56 \pm 0,21 A a
1,2	1,19 \pm 0,05 CD ab	0,85 \pm 0,18 DE b	1,30 \pm 0,31 BCDE ab	1,09 \pm 0,26 DE ab	1,12 \pm 0,27 BCD ab	1,07 \pm 0,30 BC ab	1,48 \pm 0,13 A a
1,4	1,17 \pm 0,10 CD bc	0,81 \pm 0,21 DE c	1,29 \pm 0,12 BCDE ab	1,04 \pm 0,23 DEF bc	0,85 \pm 0,11 CDE c	1,02 \pm 0,18 BCD bc	1,60 \pm 0,19 A a
1,6	0,85 \pm 0,27 DE bc	0,68 \pm 0,04 E c	1,15 \pm 0,15 CDE b	0,83 \pm 0,18 EFG bc	0,76 \pm 0,10 DE c	0,82 \pm 0,22 CD bc	1,71 \pm 0,10 A a
1,8	0,74 \pm 0,24 E bc	0,66 \pm 0,16 E c	1,11 \pm 0,26 DE ab	0,96 \pm 0,18 DEFG bc	0,64 \pm 0,08 E c	0,72 \pm 0,24 CD bc	1,48 \pm 0,06 A a
2	0,69 \pm 0,14 E bc	0,64 \pm 0,17 E bc	0,95 \pm 0,16 EF b	0,59 \pm 0,20 G c	0,70 \pm 0,07 DE bc	0,69 \pm 0,15 CD bc	1,50 \pm 0,16 A a
3	0,64 \pm 0,07 E b	0,56 \pm 0,07 E b	0,62 \pm 0,06 F b	0,64 \pm 0,13 FG b	0,59 \pm 0,13 E b	0,55 \pm 0,06 E b	1,60 \pm 0,09 A a

* Las columnas muestran el análisis estadístico entre las concentraciones crecientes del mismo AF (significancia con letra mayúscula) y las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF (significancia con letra minúscula). Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Cuadro 4. Efecto de concentraciones crecientes de distintos AF (0-3 mg/mL) sobre la difusión de la fracción FND de la saliva en membranas de celulosa. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar del área de difusión (cm²) correspondiente a la Figura 5.

		Ensayo de Difusión						
		Fracción No Difusible						
	Vainillínico	Protocatéquico	Ferúlico	Gálico	Cumárico	Cafeico	Tánico	
0	0,73 \pm 0,05 A ab	0,84 \pm 0,06 A a	0,84 \pm 0,10 A ab	0,78 \pm 0,05 A ab	0,79 \pm 0,08 A ab	0,74 \pm 0,14 A ab	0,64 \pm 0,09 A b	
0,2	0,64 \pm 0,13 A a	0,65 \pm 0,05 A a	0,66 \pm 0,09 A a	0,68 \pm 0,09 A a	0,70 \pm 0,06 A a	0,68 \pm 0,04 A a	0,68 \pm 0,11 A a	
0,4	0,67 \pm 0,09 A a	0,68 \pm 0,04 A a	0,72 \pm 0,08 A a	0,68 \pm 0,05 A a	0,73 \pm 0,10 A a	0,80 \pm 0,21 A a	0,84 \pm 0,10 A a	
0,6	0,62 \pm 0,11 A a	0,69 \pm 0,13 A a	0,71 \pm 0,10 A a	0,71 \pm 0,06 A a	0,82 \pm 0,08 A a	0,72 \pm 0,13 A a	0,70 \pm 0,12 A a	
0,8	0,64 \pm 0,08 A a	0,68 \pm 0,13 A a	0,68 \pm 0,11 A a	0,69 \pm 0,18 A a	0,74 \pm 0,16 A a	0,77 \pm 0,14 A a	0,61 \pm 0,11 A a	
1	0,65 \pm 0,12 A a	0,73 \pm 0,08 A a	0,66 \pm 0,12 A a	0,73 \pm 0,13 A a	0,61 \pm 0,05 A a	0,65 \pm 0,05 A a	0,73 \pm 0,10 A a	
1,2	0,59 \pm 0,06 A a	0,70 \pm 0,07 A a	0,76 \pm 0,09 A a	0,76 \pm 0,09 A a	0,63 \pm 0,05 A a	0,68 \pm 0,15 A a	0,75 \pm 0,06 A a	
1,4	0,56 \pm 0,05 A a	0,61 \pm 0,09 A a	0,71 \pm 0,11 A a	0,68 \pm 0,11 A a	0,78 \pm 0,17 A a	0,63 \pm 0,07 A a	0,77 \pm 0,13 A a	
1,6	0,57 \pm 0,08 A a	0,63 \pm 0,12 A a	0,63 \pm 0,05 A a	0,71 \pm 0,17 A a	0,74 \pm 0,17 A a	0,69 \pm 0,14 A a	0,60 \pm 0,12 A a	
1,8	0,56 \pm 0,07 A a	0,68 \pm 0,16 A a	0,68 \pm 0,10 A a	0,66 \pm 0,08 A a	0,74 \pm 0,13 A a	0,75 \pm 0,08 A a	0,74 \pm 0,11 A a	
2	0,68 \pm 0,14 A a	0,62 \pm 0,10 A a	0,69 \pm 0,11 A a	0,63 \pm 0,03 A a	0,61 \pm 0,01 A a	0,60 \pm 0,08 A a	0,78 \pm 0,16 A a	
3	0,69 \pm 0,13 A a	0,68 \pm 0,11 A a	0,66 \pm 0,14 A a	0,78 \pm 0,10 A a	0,65 \pm 0,09 A a	0,63 \pm 0,02 A a	0,65 \pm 0,06 A a	

* Las columnas muestran el análisis estadístico entre las concentraciones crecientes del mismo AF (significancia con letra mayúscula) y las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF (significancia con letra minúscula). Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Cuadro 5. Efecto de concentraciones crecientes de distintos AF (0-3 mg/mL) sobre la precipitación de la fracción FD de la saliva en membranas de celulosa. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar del área de difusión (cm²) correspondiente a la Figura 6.

		Ensayo de Precipitación						
		Fracción Difusible						
	Vainillínico	Protocatéquico	Ferúlico	Gálico	Cumárico	Cafeico	Tánico	
0	1,52 \pm 0,09 A a	1,66 \pm 0,13 A a	1,56 \pm 0,07 AB a	1,69 \pm 0,08 A a	1,61 \pm 0,23 AB a	1,41 \pm 0,19 AB a	1,54 \pm 0,13 A a	
0,2	1,61 \pm 0,15 A a	1,55 \pm 0,16 AB a	1,64 \pm 0,16 A a	1,63 \pm 0,07 AB a	1,68 \pm 0,13 A a	1,62 \pm 0,17 A a	1,60 \pm 0,17 A a	
0,4	1,65 \pm 0,13 A ab	1,56 \pm 0,12 AB ab	1,74 \pm 0,12 A a	1,45 \pm 0,03 ABC ab	1,47 \pm 0,14 ABC ab	1,40 \pm 0,18 AB b	1,54 \pm 0,22 A ab	
0,6	1,49 \pm 0,11 A a	1,33 \pm 0,04 BC a	1,57 \pm 0,19 AB a	1,55 \pm 0,13 ABC a	1,51 \pm 0,11 AB a	1,49 \pm 0,15 AB a	1,48 \pm 0,08 A a	
0,8	1,45 \pm 0,14 AB a	1,17 \pm 0,18 CD a	1,48 \pm 0,09 AB a	1,28 \pm 0,16 BCD a	1,26 \pm 0,29 ABCD a	1,27 \pm 0,13 ABC a	1,51 \pm 0,19 A a	
1	1,15 \pm 0,10 BC cd	0,92 \pm 0,10 DE d	1,40 \pm 0,07 ABC ab	1,21 \pm 0,11 CD bc	1,24 \pm 0,19 BCD bc	1,17 \pm 0,16 ABCD bcd	1,61 \pm 0,10 A a	
1,2	1,08 \pm 0,15 C abc	0,86 \pm 0,10 DEF c	1,35 \pm 0,14 ABC ab	1,09 \pm 0,12 DE abc	1,08 \pm 0,26 CDE bc	1,11 \pm 0,20 BCD abc	1,47 \pm 0,14 A a	
1,4	0,87 \pm 0,11 CD bc	0,79 \pm 0,19 EFG c	1,34 \pm 0,21 ABC ab	1,08 \pm 0,30 DE abc	0,94 \pm 0,08 DE bc	1,08 \pm 0,31 BCD abc	1,43 \pm 0,17 A a	
1,6	0,68 \pm 0,15 D c	0,60 \pm 0,11 FG c	1,19 \pm 0,31 BCD ab	0,85 \pm 0,06 EF bc	0,79 \pm 0,06 E bc	0,81 \pm 0,20 CDE bc	1,56 \pm 0,20 A a	
1,8	0,70 \pm 0,12 D bc	0,64 \pm 0,10 EFG c	1,04 \pm 0,15 CD Eb	0,84 \pm 0,17 EF bc	0,69 \pm 0,18 E bc	0,77 \pm 0,11 DE bc	1,56 \pm 0,25 A a	
2	0,68 \pm 0,12 D b	0,55 \pm 0,10 FG b	0,84 \pm 0,21 DE b	0,70 \pm 0,16 F b	0,76 \pm 0,07 E b	0,77 \pm 0,20 D Eb	1,46 \pm 0,07 A a	
3	0,61 \pm 0,15 D b	0,52 \pm 0,12 G b	0,66 \pm 0,14 E b	0,64 \pm 0,12 F b	0,66 \pm 0,11 E b	0,60 \pm 0,16 E b	1,51 \pm 0,11 A a	

* Las columnas muestran el análisis estadístico entre las concentraciones crecientes del mismo AF (significancia con letra mayúscula) y las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF (significancia con letra minúscula). Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Cuadro 6. Efecto de concentraciones crecientes de distintos AF (0-3 mg/mL) sobre la precipitación de la fracción FND de la saliva en membranas de celulosa. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar del área de difusión (cm²) correspondiente a la Figura 6.

		Ensayo de Precipitación					
		Fracción No Difusible					
	Vainillínico	Protocatéquico	Ferúlico	Gálico	Cumárico	Cafeico	Tánico
0	0,89 \pm 0,11 A a	0,77 \pm 0,16 A a	0,89 \pm 0,06 A a	0,85 \pm 0,18 A a	0,82 \pm 0,16 A a	0,84 \pm 0,07 A a	0,79 \pm 0,20 A a
0,2	0,77 \pm 0,16 AB a	0,83 \pm 0,10 A a	0,82 \pm 0,10 A a	0,78 \pm 0,11 A a	0,78 \pm 0,08 A a	0,80 \pm 0,12 A a	0,85 \pm 0,13 A a
0,4	0,62 \pm 0,07 B a	0,68 \pm 0,10 A a	0,65 \pm 0,09 A a	0,81 \pm 0,06 A a	0,81 \pm 0,11 A a	0,76 \pm 0,08 A a	0,81 \pm 0,12 A a
0,6	0,67 \pm 0,04 AB a	0,72 \pm 0,07 A a	0,73 \pm 0,08 A a	0,67 \pm 0,06 A a	0,65 \pm 0,08 A a	0,76 \pm 0,11 A a	0,77 \pm 0,07 A a
0,8	0,61 \pm 0,06 B a	0,77 \pm 0,14 A a	0,72 \pm 0,11 A a	0,79 \pm 0,12 A a	0,75 \pm 0,11 A a	0,69 \pm 0,04 A a	0,83 \pm 0,16 A a
1	0,60 \pm 0,02 B a	0,73 \pm 0,15 A a	0,72 \pm 0,13 A a	0,66 \pm 0,06 A a	0,66 \pm 0,14 A a	0,69 \pm 0,07 A a	0,74 \pm 0,13 A a
1,2	0,59 \pm 0,03 B a	0,73 \pm 0,10 A a	0,68 \pm 0,08 A a	0,83 \pm 0,14 A a	0,63 \pm 0,11 A a	0,64 \pm 0,11 A a	0 B b
1,4	0,61 \pm 0,06 B a	0,70 \pm 0,14 A a	0,70 \pm 0,08 A a	0,63 \pm 0,07 A a	0,65 \pm 0,09 A a	0,62 \pm 0,09 A a	0 B b
1,6	0,56 \pm 0,15 B a	0,64 \pm 0,08 A a	0,70 \pm 0,07 A a	0,70 \pm 0,15 A a	0,61 \pm 0,10 A a	0,70 \pm 0,10 A a	0 B b
1,8	0,61 \pm 0,05 B a	0,75 \pm 0,04 A a	0,66 \pm 0,12 A a	0,66 \pm 0,11 A a	0,66 \pm 0,14 A a	0,67 \pm 0,14 A a	0 B b
2	0,58 \pm 0,07 B a	0,61 \pm 0,07 A a	0,72 \pm 0,16 A a	0,69 \pm 0,08 A a	0,65 \pm 0,10 A a	0,75 \pm 0,09 A a	0 B b
3	0,67 \pm 0,17 AB a	0,79 \pm 0,12 A a	0,75 \pm 0,14 A a	0,79 \pm 0,16 A a	0,78 \pm 0,19 A a	0,75 \pm 0,10 A a	0 B b

* Las columnas muestran el análisis estadístico entre las concentraciones crecientes del mismo AF (significancia con letra mayúscula) y las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF (significancia con letra minúscula). Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Cuadro 7. Resumen de los ensayos de difusión y precipitación de las mezclas de distintos AF (ácidos protocatéquico, gálico y tánico) con BSA en membranas de celulosa. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar del área de difusión (cm^2) correspondiente a la Figura 7.

Prueba de Difusión						
Fracción Difusible						
mg/mL	Tánico (T)	Gálico (G)	Protocatéquico (P)	T/G	T/P	G/P
0,5	1,27 \pm 0,21 A	1,74 \pm 0,15 A	1,64 \pm 0,11 A	1,31 \pm 0,38 A	1,48 \pm 0,28 A	1,65 \pm 0,20 A
1	0 B	1,55 \pm 0,08 A	1,47 \pm 0,05 A	0 B	0 B	1,58 \pm 0,37 A
2	0 B	1,32 \pm 0,18 A	1,14 \pm 0,14 A	0 B	0 B	1,14 \pm 0,29 A
Fracción No Difusible						
mg/mL	Tánico (T)	Gálico (G)	Protocatéquico (P)	T/G	T/P	G/P
0,5	0,67 \pm 0,13 A	0,88 \pm 0,13 A	0,90 \pm 0,08 A	0,70 \pm 0,14 A	0,70 \pm 0,07 A	0,94 \pm 0,13 A
1	0,75 \pm 0,02 B	0,97 \pm 0,10 AB	1,10 \pm 0,09 A	0,94 \pm 0,19 AB	0,86 \pm 0,03 AB	1,04 \pm 0,13 AB
2	0,61 \pm 0,16 B	1,07 \pm 0,12 A	1,10 \pm 0,14 A	0,92 \pm 0,14 AB	0,77 \pm 0,20 AB	1,15 \pm 0,19 A
Prueba de Precipitación						
Fracción Difusible						
mg/mL	Tánico (T)	Gálico (G)	Protocatéquico (P)	T/G	T/P	G/P
0,5	0 C	1,84 \pm 0,38 A	1,76 \pm 0,24 AB	0,84 \pm 0,73 BC	1,39 \pm 0,04 AB	1,63 \pm 0,22 AB
1	0 B	1,58 \pm 0,28 A	1,41 \pm 0,23 A	0 B	0 B	1,41 \pm 0,18 A
2	0 B	1,15 \pm 0,13 A	1,26 \pm 0,12 A	0 B	0 B	1,15 \pm 0,27 A
Fracción No Difusible						
mg/mL	Tánico (T)	Gálico (G)	Protocatéquico (P)	T/G	T/P	G/P
0,5	0 B	0,80 \pm 0,08 A	0,94 \pm 0,08 A	0,77 \pm 0,17 A	0,67 \pm 0,10 A	0,83 \pm 0,10 A
1	0 B	0,89 \pm 0,17 A	1,03 \pm 0,05 A	0,92 \pm 0,05 A	0,81 \pm 0,05 A	0,97 \pm 0,13 A
2	0,75 \pm 0,23 A	1,05 \pm 0,12 A	1,10 \pm 0,17 A	0,97 \pm 0,20 A	0,68 \pm 0,13 A	1,05 \pm 0,09 A

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido protocatéquico con ácido gálico o ácido tánico. Letras diferentes indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Cuadro 8. Ensayos de difusión y precipitación de proteínas salivales mediante AF y mezclas de éstos con ácido gálico en membranas de celulosa. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar del área de difusión (cm²) correspondiente a la Figura 8.

Ácido vainillínico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Vainillínico (V)	Gálico (G)	V/G	mg/mL	Vainillínico (V)	Gálico (G)	V/G
0,5	1,5 \pm 0,30 A	1,63 \pm 0,25 A	1,41 \pm 0,06 A	0,5	0,71 \pm 0,13 A	0,64 \pm 0,11 A	0,60 \pm 0,14 A
1	1,27 \pm 0,12 A	1,21 \pm 0,23 A	1,2 \pm 0,25 A	1	0,73 \pm 0,18 A	0,68 \pm 0,04 A	0,74 \pm 0,15 A
2	0,84 \pm 0,06 A	0,74 \pm 0,10 A	0,81 \pm 0,24 A	2	0,64 \pm 0,13 A	0,74 \pm 0,14 A	0,72 \pm 0,06 A
Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Vainillínico (V)	Gálico (G)	V/G	mg/mL	Vainillínico (V)	Gálico (G)	V/G
0,5	1,44 \pm 0,21 A	1,52 \pm 0,07 A	1,35 \pm 0,10 A	0,5	0,74 \pm 0,03 A	0,76 \pm 0,12 A	0,69 \pm 0,08 A
1	1,03 \pm 0,17 A	1,07 \pm 0,32 A	1,00 \pm 0,19 A	1	0,77 \pm 0,15 A	0,82 \pm 0,17 A	0,62 \pm 0,12 A
2	0,72 \pm 0,08 A	0,93 \pm 0,23 A	0,9 \pm 0,18 A	2	0,62 \pm 0,12 A	0,87 \pm 0,07 A	0,63 \pm 0,18 A

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido vainillínico con ácido gálico. Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Continuación

Ácido protocatéquico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Protocatéquico (P)	Gálico (G)	P/G	mg/mL	Protocatéquico (P)	Gálico (G)	P/G
0,5	1,49±0,40 A	1,63±0,25 A	1,56±0,12 A	0,5	0,67±0,16 A	0,64±0,11 A	0,64±0,15 A
1	1,10±0,47 A	1,21±0,23 A	1,13±0,05 A	1	0,65±0,14 A	0,68±0,04 A	0,75±0,08 A
2	0,50±0,07 B	0,74±0,10 A	0,84±0,08 A	2	0,57±0,11 A	0,74±0,14 A	0,65±0,11 A

Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Protocatéquico (P)	Gálico (G)	P/G	mg/mL	Protocatéquico (P)	Gálico (G)	P/G
0,5	1,38±0,16 A	1,52±0,07 A	1,52±0,11 A	0,5	0,71±0,11 A	0,76±0,12 A	0,61±0,09 A
1	1,21±0,16 A	1,07±0,32 A	1,13±0,16 A	1	0,57±0,09 A	0,82±0,17 A	0,73±0,04 A
2	0,64±0,08 A	0,93±0,23 A	0,77±0,12 A	2	0,76±0,25 A	0,87±0,07 A	0,58±0,07 A

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido protocatéquico con ácido gálico. Letras diferentes indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Continuación

Ácido ferúlico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Ferúlico (F)	Gálico (G)	F/G	mg/mL	Ferúlico (F)	Gálico (G)	F/G
0,5	1,82±0,13 A	1,63±0,25 A	1,55±0,21 A	0,5	0,65±0,12 A	0,64±0,11 A	0,55±0,07 A
1	1,38±0,21 A	1,21±0,23 A	1,30±0,15 A	1	0,66±0,11 A	0,68±0,04 A	0,73±0,09 A
2	0,96±0,21 A	0,74±0,10 A	0,86±0,15 A	2	0,69±0,06 A	0,74±0,14 A	0,61±0,05 A

Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Ferúlico (F)	Gálico (G)	F/G	mg/mL	Ferúlico (F)	Gálico (G)	F/G
0,5	1,69±0,17 A	1,52±0,07 A	1,40±0,12 A	0,5	0,67±0,04 A	0,76±0,12 A	0,68±0,07 A
1	1,57±0,07 A	1,07±0,32 A	1,34±0,12 A	1	0,63±0,05 A	0,82±0,17 A	0,59±0,04 A
2	0,95±0,09 A	0,93±0,23 A	0,96±0,22 A	2	0,69±0,06 B	0,87±0,07 A	0,58±0,07 B

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido ferúlico con ácido gálico. Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Continuación

Ácido cumárico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Cumárico (CU)	Gálico (G)	CU/G	mg/mL	Cumárico (CU)	Gálico (G)	CU/G
0,5	1,50±0,24 A	1,63±0,25 A	1,34±0,31 A	0,5	0,77±0,20 A	0,64±0,11 A	0,76±0,09 A
1	1,36±0,11 A	1,21±0,23 A	1,25±0,13 A	1	0,68±0,13 A	0,68±0,04 A	0,74±0,10 A
2	0,83±0,22 A	0,74±0,10 A	0,74±0,26 A	2	0,73±0,10 A	0,74±0,14 A	0,64±0,11 A
Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Cumárico (CU)	Gálico (G)	CU/G	mg/mL	Cumárico (CU)	Gálico (G)	CU/G
0,5	1,38±0,20 A	1,52±0,07 A	1,31±0,05 A	0,5	0,79±0,07 A	0,76±0,12 A	0,85±0,09 A
1	1,23±0,21 A	1,07±0,32 A	1,00±0,15 A	1	0,71±0,12 A	0,82±0,17 A	0,75±0,19 A
2	0,66±0,03 A	0,93±0,23 A	0,95±0,28 A	2	0,58±0,02 B	0,87±0,07 A	0,61±0,06 B

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido *p*-cumárico con ácido gálico. Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Continuación

Ácido cafeico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Cafeico (CA)	Gálico (G)	CA/G	mg/mL	Cafeico (CA)	Gálico (G)	CA/G
0,5	1,62±0,15 A	1,63±0,25 A	1,32±0,17 A	0,5	0,66±0,15 A	0,64±0,11 A	0,69±0,05 A
1	1,31±0,16 A	1,21±0,23 A	1,24±0,27 A	1	0,69±0,15 A	0,68±0,04 A	0,68±0,09 A
2	0,80±0,17 A	0,74±0,10 A	0,99±0,29 A	2	0,61±0,08 A	0,74±0,14 A	0,60±0,01 A

Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Cafeico (CA)	Gálico (G)	CA/G	mg/mL	Cafeico (CA)	Gálico (G)	CA/G
0,5	1,46±0,13 A	1,52±0,07 A	1,39±0,08 A	0,5	0,66±0,11 A	0,76±0,12 A	0,73±0,10 A
1	1,23±0,11 A	1,07±0,32 A	1,35±0,17 A	1	0,65±0,11 A	0,82±0,17 A	0,66±0,02 A
2	0,73±0,14 A	0,93±0,23 A	0,80±0,22 A	2	0,69±0,13 A	0,87±0,07 A	0,71±0,07 A

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido cafeico con ácido gálico. Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Continuación

Ácido tánico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Tánico (T)	Gálico (G)	T/G	mg/mL	Tánico (T)	Gálico (G)	T/G
0,5	1,67±0,09 A	1,63±0,25 A	1,54±0,05 A	0,5	0,70±0,15 A	0,64±0,11 A	0,66±0,19 A
1	1,62±0,27 A	1,21±0,23 A	1,52±0,17 A	1	0,80±0,10 A	0,68±0,04 AB	0,60±0,08 B
2	1,66±0,17 A	0,74±0,10 C	1,32±0,07 B	2	0,67±0,11 A	0,74±0,14 A	0,57±0,04 A

Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Tánico (T)	Gálico (G)	T/G	mg/mL	Tánico (T)	Gálico (G)	T/G
0,5	1,83±0,15 A	1,52±0,07 B	1,62±0,07 AB	0,5	0,68±0,06 A	0,76±0,12 A	0,60±0,08 A
1	1,66±0,14 A	1,07±0,32 B	1,43±0,10 AB	1	0,77±0,17 A	0,82±0,17 A	0,67±0,05 A
2	1,67±0,23 A	0,93±0,23 B	1,24±0,26 AB	2	0 B	0,87±0,07 A	0 B

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido tánico con ácido gálico. Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Cuadro 9. Ensayos de difusión y precipitación de proteínas salivales mediante AF y mezclas de éstos con ácido tánico en membranas de celulosa. Los valores presentados corresponden al promedio \pm desviación estándar del área de difusión (cm²) correspondiente a la Figura 9.

Ácido vainillínico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Vainillínico (V)	Tánico (T)	V/T	mg/mL	Vainillínico (V)	Tánico (T)	V/T
0,5	1,39 \pm 0,15 A	1,61 \pm 0,16 A	1,29 \pm 0,26 A	0,5	0,57 \pm 0,07 AB	0,68 \pm 0,06 A	0,51 \pm 0,06 B
1	0,92 \pm 0,10 B	1,65 \pm 0,07 A	1,42 \pm 0,18 A	1	0,68 \pm 0,05 A	0,64 \pm 0,15 A	0,65 \pm 0,12 A
2	0,71 \pm 0,06 C	1,55 \pm 0,06 A	1,18 \pm 0,06 B	2	0,66 \pm 0,08 A	0,71 \pm 0,03 A	0,57 \pm 0,14 A
Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Vainillínico (V)	Tánico (T)	V/T	mg/mL	Vainillínico (V)	Tánico (T)	V/T
0,5	1,26 \pm 0,22 A	1,58 \pm 0,18 A	1,58 \pm 0,06 A	0,5	0,67 \pm 0,17 A	0,56 \pm 0,11 A	0,44 \pm 0,06 A
1	1,06 \pm 0,15 B	1,68 \pm 0,06 A	1,43 \pm 0,05 A	1	0,61 \pm 0,12 A	0,55 \pm 0,03 A	0,57 \pm 0,05 A
2	0,80 \pm 0,15 B	1,79 \pm 0,08 A	1,07 \pm 0,21 B	2	0,59 \pm 0,12 A	0 B	0 B

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido vainillínico con ácido tánico. Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Continuación

Ácido protocatéquico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Protocatéquico (P)	Tánico (T)	P/T	mg/mL	Protocatéquico (P)	Tánico (T)	P/T
0,5	1,36±0,05 A	1,61±0,16 A	1,42±0,22 A	0,5	0,50±0,14 A	0,68±0,06 A	0,54±0,13 A
1	0,92±0,23 B	1,65±0,07 A	1,41±0,14 A	1	0,56±0,11 A	0,64±0,15 A	0,53±0,09 A
2	0,82±0,10 B	1,55±0,06 A	1,31±0,25 A	2	0,44±0,04 B	0,71±0,03 A	0,51±0,08 B

Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Protocatéquico (P)	Tánico (T)	P/T	mg/mL	Protocatéquico (P)	Tánico (T)	P/T
0,5	1,10±0,12 B	1,58±0,18 A	1,48±0,11 AB	0,5	0,66±0,06 A	0,56±0,11 A	0,53±0,04 A
1	0,87±0,04 B	1,68±0,06 A	1,30±0,25 A	1	0,57±0,10 A	0,55±0,03 A	0,56±0,05 A
2	0,74±0,13 C	1,79±0,08 A	1,16±0,10 B	2	0,63±0,08 A	0 B	0 B

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido protocatéquico con ácido tánico. Letras diferentes indican diferencia estadística ($p < 0.05$).

Continuación

Ácido ferúlico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Ferúlico (F)	Tánico (T)	F/T	mg/mL	Ferúlico (F)	Tánico (T)	F/T
0,5	1,21±0,15 B	1,61±0,16 A	1,40±0,08 AB	0,5	0,62±0,08 A	0,68±0,06 A	0,58±0,05 A
1	1,06±0,12 B	1,65±0,07 A	1,47±0,05 A	1	0,51±0,12 A	0,64±0,15 A	0,55±0,04 A
2	0,73±0,13 B	1,55±0,06 A	1,58±0,17 A	2	0,54±0,09 B	0,71±0,03 A	0,51±0,04 B

Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Ferúlico (F)	Tánico (T)	F/T	mg/mL	Ferúlico (F)	Tánico (T)	F/T
0,5	1,56±0,07 A	1,58±0,18 A	1,43±0,22 A	0,5	0,51±0,06 A	0,56±0,11 A	0,62±0,12 A
1	1,30±0,25 A	1,68±0,06 A	1,41±0,02 A	1	0,62±0,03 A	0,55±0,03 A	0,59±0,10 A
2	0,65±0,07 C	1,79±0,08 A	1,19±0,22 B	2	0,49±0,03 A	0 B	0 B

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido ferúlico con ácido tánico. Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Continuación

Ácido gálico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Gálico (G)	Tánico (T)	G/T	mg/mL	Gálico (G)	Tánico (T)	G/T
0,5	1,26±0,07 A	1,61±0,16 A	1,39±0,28 A	0,5	0,62±0,14 A	0,68±0,06 A	0,65±0,08 A
1	1,11±0,16 B	1,65±0,07 A	1,53±0,15 A	1	0,58±0,09 A	0,64±0,15 A	0,54±0,07 A
2	0,78±0,08 B	1,55±0,06 A	1,32±0,24 A	2	0,60±0,14 A	0,71±0,03 A	0,58±0,07 A

Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Gálico (G)	Tánico (T)	G/T	mg/mL	Gálico (G)	Tánico (T)	G/T
0,5	1,22±0,21 A	1,58±0,18 A	1,31±0,27 A	0,5	0,63±0,12 A	0,56±0,11 A	0,53±0,04 A
1	1,04±0,08 B	1,68±0,06 A	1,13±0,20 B	1	0,55±0,06 A	0,55±0,03 A	0,60±0,07 A
2	0,67±0,08 C	1,79±0,08 A	1,14±0,08 B	2	0,58±0,03 A	0 B	0 B

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido gálico con ácido tánico. Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Continuación

Ácido cumárico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Cumárico (CU)	Tánico (T)	CU/T	mg/mL	Cumárico (CU)	Tánico (T)	CU/T
0,5	1,40±0,18 A	1,48±0,16 A	1,56±0,09 A	0,5	0,57±0,15 A	0,68±0,06 A	0,56±0,08 A
1	0,97±0,03 A	1,41±0,07 A	1,41±0,17 A	1	0,56±0,12 A	0,64±0,15 A	0,65±0,17 A
2	0,64±0,03 A	1,23±0,06 A	1,27±0,03 A	2	0,48±0,07 B	0,71±0,03 A	0,69±0,03 A

Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Cumárico (CU)	Tánico (T)	CU/T	mg/mL	Cumárico (CU)	Tánico (T)	CU/T
0,5	1,33±0,24 A	1,58±0,18 A	1,33±0,14 A	0,5	0,64±0,13 A	0,56±0,11 A	0,60±0,05 A
1	1,08±0,06 B	1,68±0,06 A	1,22±0,22 B	1	0,57±0,11 A	0,55±0,03 A	0,62±0,13 A
2	0,70±0,06 C	1,79±0,08 A	1,14±0,25 B	2	0,53±0,04 A	0 B	0 B

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido *p*-cumárico con ácido tánico. Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).

Continuación

Ácido cafeico:

Prueba de Difusión							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Cafeico (CA)	Tánico (T)	CA/T	mg/mL	Cafeico (CA)	Tánico (T)	CA/T
0,5	1,20±0,08 A	1,41±0,16 A	1,25±0,08 A	0,5	0,64±0,10 A	0,68±0,06 A	0,63±0,12 A
1	1,06±0,11 A	1,44±0,07 A	1,37±0,11 A	1	0,54±0,14 A	0,64±0,15 A	0,65±0,12 A
2	0,75±0,14 A	1,26±0,06 A	1,33±0,06 A	2	0,63±0,03 A	0,71±0,03 A	0,68±0,10 A

Prueba de Precipitación							
Fracción Difusible				Fracción No Difusible			
mg/mL	Cafeico (CA)	Tánico (T)	CA/T	mg/mL	Cafeico (CA)	Tánico (T)	CA/T
0,5	1,16±0,05 B	1,58±0,18 A	1,38±0,11 AB	0,5	0,68±0,07 A	0,56±0,11 A	0,63±0,13 A
1	0,93±0,11 C	1,68±0,06 A	1,31±0,14 B	1	0,58±0,20 A	0,55±0,03 A	0,61±0,13 A
2	0,60±0,11 C	1,79±0,08 A	1,16±0,20 B	2	0,59±0,11 A	0 B	0 B

* Las filas muestran el análisis estadístico entre los distintos AF y las mezclas de ácido cafeico con ácido tánico. Letras diferentes indican diferencia estadística (p<0.05).