

Caracterización de Taninos

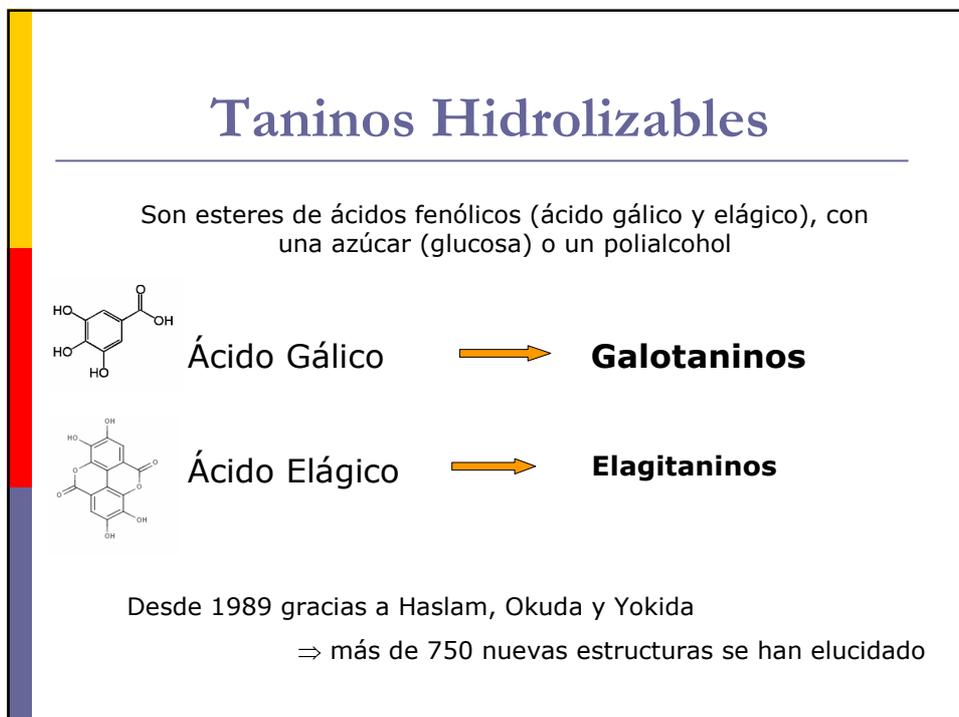
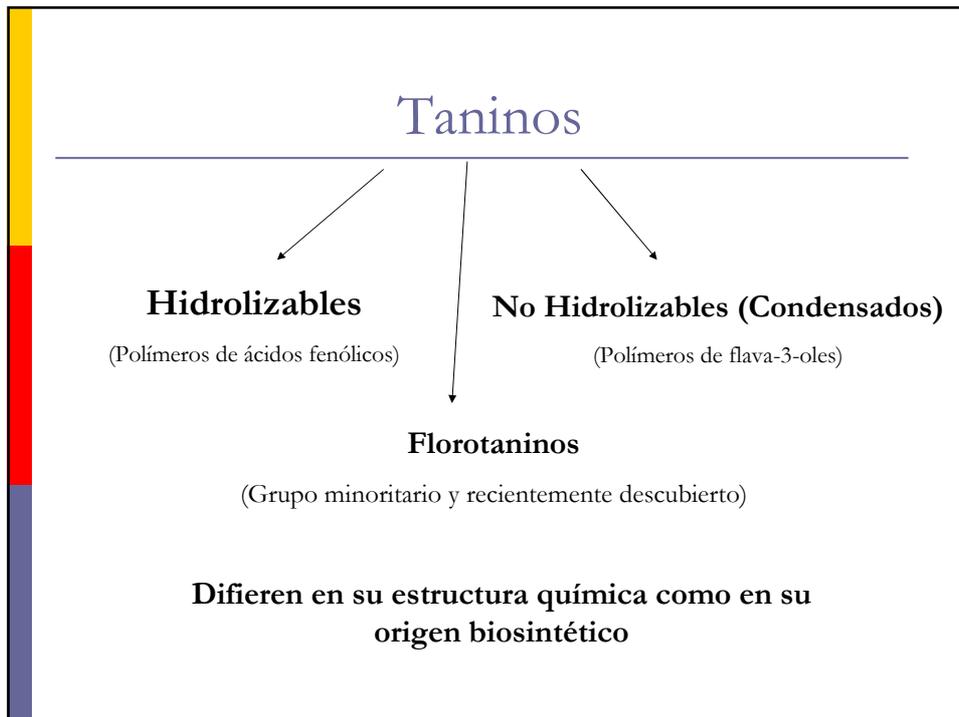


Katherina Fernández E.
Universidad de Concepción
Octubre 2007

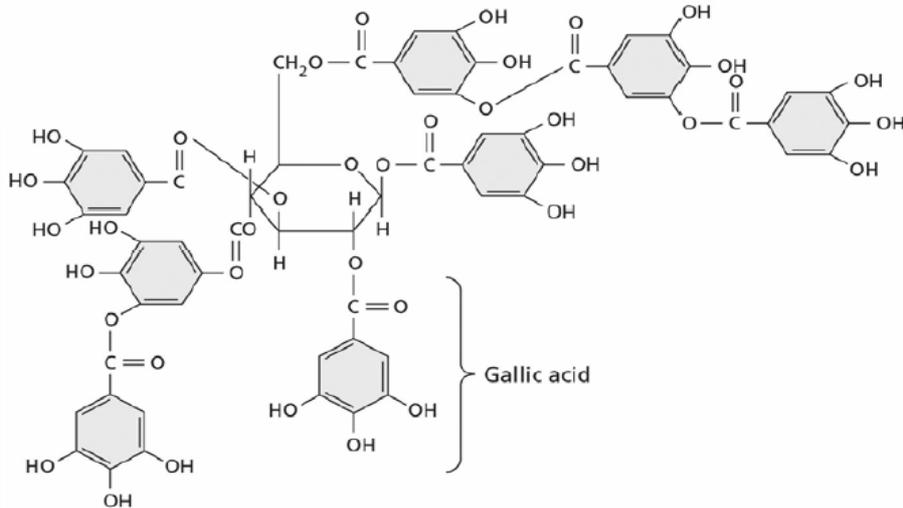
¿Qué son los Taninos?

“Son compuestos fenólicos solubles en agua, con pesos moleculares entre 500-3000, que además de dar las reacciones fenolicas usuales, poseen la habilidad de reaccionar y precipitar con alcaloides, gelatinas y otras proteínas”

Bate-Smith and Swain, 1962



Galotanino



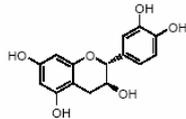
PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 13.15 (Part 2) © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Taninos Condensados

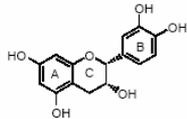
Unidad básica: flavan-3-ol

Catequinas

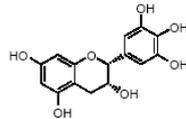
(+)-Catec hin



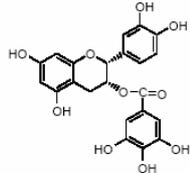
(-)-Epicatechin



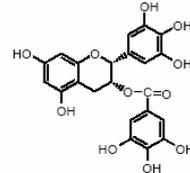
(-)-Epigallocatechin



(-)-Epicatechin gallate

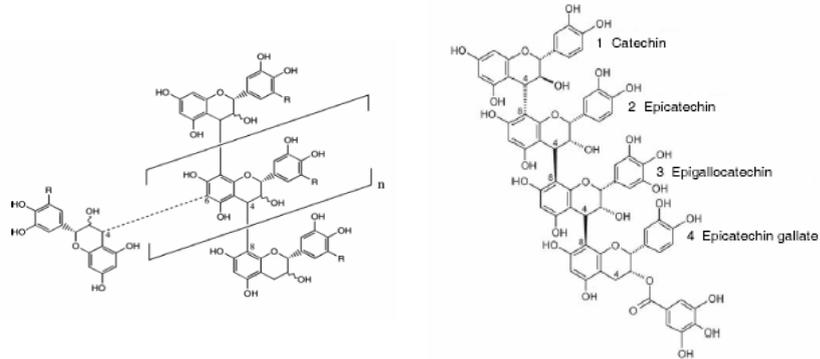


(-)-Epigallocatechin gallate



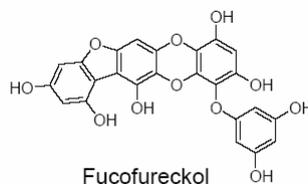
Proantocianidas: Polímeros de flavan-3-oles

Son unidades de flavan-3-ol unidas entre si por enlaces C-C en la posición 4→8 y 4→6



Florotaninos

- Son aislados desde varias especies de algas pardas
- Sus estructuras están constituidas de unidades de floriglucinol unidas por C-C o C-O



Aislado desde *Eisenia Arbórea*

Diversos Alimentos y Vegetales Poseen Taninos



Métodos para analizar taninos



Separación
(Cromatografía)



Identificación
(Espectroscopía/Espectrometría)

Cromatografía

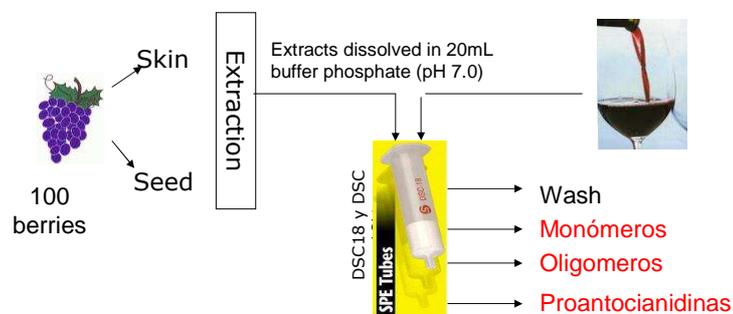
Un poco de historia.....

- Primera aplicación por Tswett 1906
Adsorción cromatográfica de pigmentos de hoja en una columna de carbonato de calcio
- Cromatografía de partición líquido-líquido (Martin and Synge, 1941)
- Cromatografía gaseosa (James and Martin, 1952)
- Cromatografía en papel (Bate Smith 1964)

High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) (1966) y la incorporación DAD (1982) y el desarrollo de materiales para nuevas columnas mejoró el la caracterización → **fenoles**

Cromatografía

Mejores resultados y actividades son obtenidos si los taninos son previamente purificados y/o concentrados



Cromatografía

Monómeros y oligómeros:

Fase Reversa (RP-HPLC)

- Separar componentes por polaridad
 - gradientes
 - solvente acuoso ⇒ a un solvente orgánico
- Columnas
 - Reversed-phase silica (C-18)
 - Polystyrene divinylbenzene (PS-DVB)

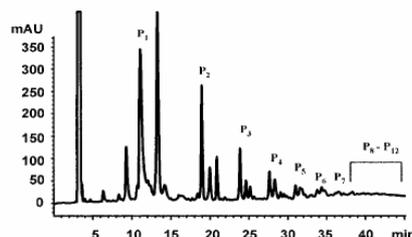


Figure 3. UV trace at 280 nm for a 10 µL injection of whole Red Delicious apple extract: P₁ = monomers; P₂ = dimers; P₃ = trimers; P₄ = tetramers; P₅ = pentamers; P₆ = hexamers; P₇ = heptamers; P₈ = octamers; P₉ = nonamers; P₁₀ = decamers; P₁₁ = undecamers; P₁₂ = dodecamers.

Extraído de Lazarus et al., 1999

Fase Normal (NP-HPLC)

Cromatografía

Proantocianidinas

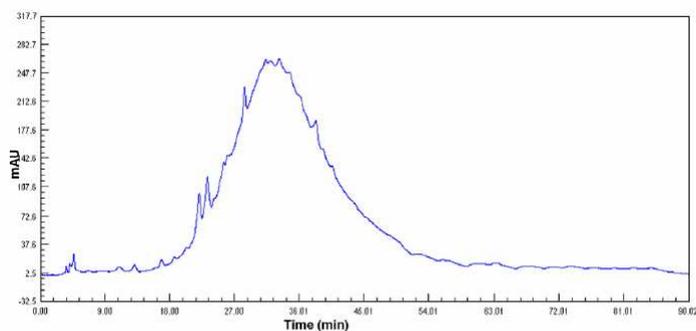


Fig. 1. Chromatogram of the aqueous fraction FA from *P. pinaster*.

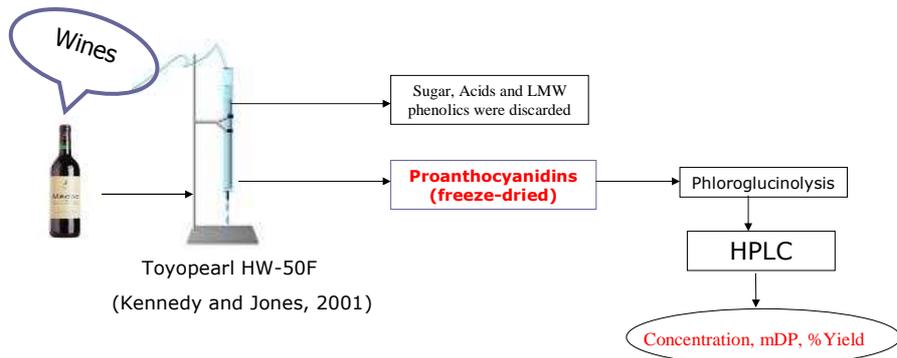
Extraído desde Jerez et al., 2006

Cromatografía

□ Proantocianidinas:

Caracterización Estructural

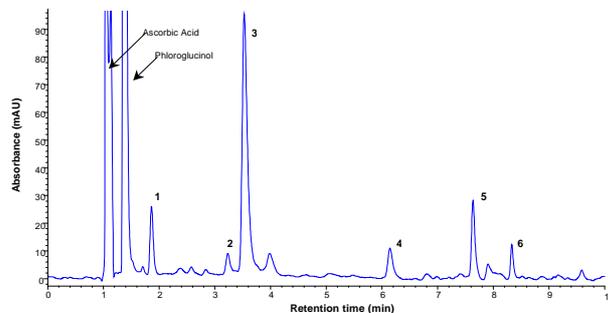
- Catálisis ácida en la presencia de un agente nucleofílico (Phloroglucinol, Tíol, Benzil mercaptano) seguido de detección en HPLC
- Cromatografía de permeación en gel (GPC)



Cromatografía

□ Proantocianidinas: Caracterización estructural por Phloroglucinólisis

Cromatograma HPLC (280 nm)



Extension units:

- 1, epigallocatechin-phloroglucinol (EGC);
- 2, catechin-phloroglucinol (C);
- 3 epicatechin-phloroglucinol (EC) and
- 5, epicatechin gallate-phloroglucinol (ECG).

Terminal units:

- 4, catechin (C) and
- 6, epicatechin (EC).

Espectrometría/Espectroscopía

UV-Visible Espectrometría

Espectro flavan-3-oles \Rightarrow Max: 270-290 nm \rightarrow A ring

Común a todos los flavonoides

No tiene utilidad para identificación **DE TANINOS**

Se necesita incorporar otros indicadores que den solo cuenta de los taninos

\Rightarrow **MEDICIONES INDIRECTAS**

Espectrometría/Espectroscopía

Ensayos Colorimétricos para Taninos

Tanino + químico = complejo o aducto coloreado



Desventajas:

- ✓ Falta de selectividad hacia los taninos
- ✓ Funcionan bien solo con muestras de taninos purificadas

Espectrometría/Espectroscopía

Ensayos colorimétricos para taninos

- **Butanol-HCl** (Butanólisis) (Porter et al, 1986) Depolimerización ácida, oxidación y detección. Es selectivo para taninos condensados, interferencias por agua y metales en la muestra
- **Prussian Blue o Folin Ciocalteu** (reacciones de oxido-reducción). Los fenoles se oxidan no selectivamente
- **Vainillina**. Influenciada por T, [], tiempo, entre otros (Sun et al., 1998)
- **DMACA** (4-dimetilaminocinamaldehído) (Treutter, 1989)
Detectan el producto coloreado de la reacción tanino- aldehído

Espectrometría/Espectroscopía

Métodos de Precipitación con Proteínas

Aprovechan la habilidad de los taninos para reaccionar con las proteínas

Esta habilidad va a depender de:

- ✓ Peso molecular de los taninos
- ✓ El número de sitios disponibles
- ✓ pH
- ✓ T
- ✓ Fuerza iónica
- ✓ Punto isoelectrico

Métodos de Precipitación con Proteínas

La eficiencia y el mecanismo de precipitación de proteínas es diferente para los diferentes clases de taninos (hidrolizables y condensados)

Proteínas empleadas:

- Haemoglobin (Bate-Smith, 1973)
- Bovine Serum Albumine (BSA), (Hagerman and Butler, 1978; Harbertson et al., 2003)
- Gelatina (Glories, 1984)
- Ovoalbumina, (Laudy et al., 2004)
- Saliva humana (α -amilasa) (Baxter, 1997)

Métodos de Precipitación con Proteínas

Detección de Taninos en forma Indirecta

Ejemplo de Aplicación de BSA

- ⇒ Precipitación
 - ⇒ Complejación con FeCl_3
 - ⇒ Detección colorimétrica a 510 nm
- } **Cuantificación en equivalentes de catequina (mg EC/L)**

Otros Métodos de Detección de indirecta de taninos

(modulación o inhibición de la actividad enzimática)

- Medición de la fosfatasa alcalina (Ittah, 1991)
- Inhibición de β -galactosidasa (Dick and Berne, 1998)
- Acción degradativa de trypsin en las proteínas (McNabb et al., 1998)

Espectrometría/Espectroscopía

Métodos de Precipitación con Otros Reactivos

- Polietilenglicol (PEG) (Jones, 1965; Makkar et al., 1995)
- Polivinilpirrolidona (PVP) y Polivinilpolipirrolidona (PVPP) (Makkar et al., 1993; Clifford, 1974)
- Acetato de Cobre (Yebara et al., 1995)
- Formaldehído (Singleton, 1974)
- Ion metálico Iterbio (Yb^{+3}) (Reed et al., 1985)
- Metilcelulosa (MCP) (Sarneckis et al., 2006)

Espectrometría/Espectroscopía

Espectrometría de masa (MS)

MS unida a LC para determinar la masa exacta de taninos

Un poco de historia....

- El primer espectrómetro de masa fue construido en 1940
 - Time of flight (TOF) MS (1946)
 - Ion cyclotron MS (1948)
 - Quadrapole filters and ion-trap detectors (1953)
 - Gas chromatography-TOF MS (1956)

 - Liquid secondary ion mass spectrometry (LSI-MS) (1978)
 - Fast atom bombardment mass spectrometry (FAB-MS) (1981)
- } Nueva era para la identificación estructural

Espectrometría/Espectroscopía

Espectrometría de masa (MS)

- ⇒ No se necesita una gran preparación de la muestra y la manipulación no es excesiva
- ⇒ Suave ionización → iones moleculares abundantes con mínima fragmentación
- ⇒ Se necesitan muestras relativamente puras
- Matrix-assisted laser desorption ionization (**MALDI**) MS (1987)
- **MALDI-TOF-MS** (2003) ⇒ es una poderosa herramienta de mapping
- Electrospray Ionization (**ESI-MS**) (2002)
- **HPLC-ESI-MS** (1993) → acoplar es una ventaja para el análisis
- Tandem mass spectrometry (**MS-MS**) (2004)

Espectrometría/Espectroscopía

Resonancia Magnética Nuclear (NMR)

- El primer equipo fue introducido en 1953 y se convirtió en una herramienta analítica con el Varian A-60 en 1961
- Con la introducción de la transformada de Fourier (FT-MNR) en 1966 se mejoró el desempeño y su aplicación a fenoles
- **LC-NMR** poderosa herramienta para separar y caracterizar compuestos (Wolfender et al., 2003)
- Electron paramagnetic resonance (**EPR**) también ha sido empleada para analizar fenoles (Hageman et al., 2003)

Espectrometría/Espectroscopía

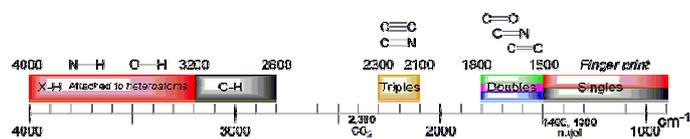
Espectrometría Infraroja (IR)

➤ Descubierta F. Wilhelm Herschel in 1800

➤ Región de interés del espectro IR :

Near Infrared (NIR): 14000-4000 cm^{-1} (700 to 2500 nm)

Mid-Infrared (MIR): 4000 to 400 cm^{-1} (2500 to $2.5 \cdot 10^4$ nm)



Espectrometría/Espectroscopía

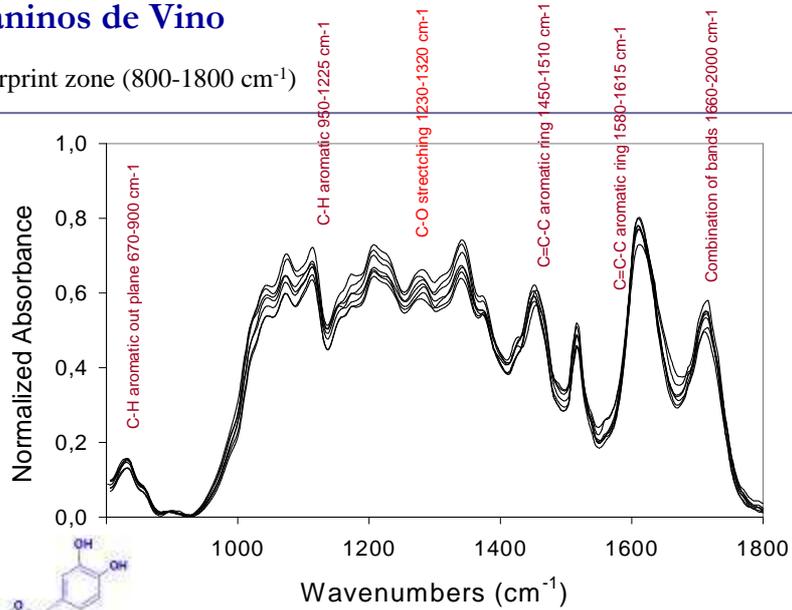
Espectrometría Infraroja (IR)

Ventajas

- No destructiva,
- de análisis rápido,
- multicomponente
- Mínima preparación de la muestras

Taninos de Vino

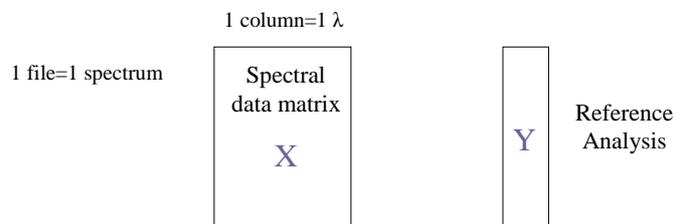
Fingerprint zone (800-1800 cm^{-1})



IR + Análisis Multivariado \longrightarrow Predecir

Modelamiento: "Application of Multivariate Techniques to Spectroscopy"

Partial Least Square (PLS) \Rightarrow Modeling that maximizes the covariance between X and Y

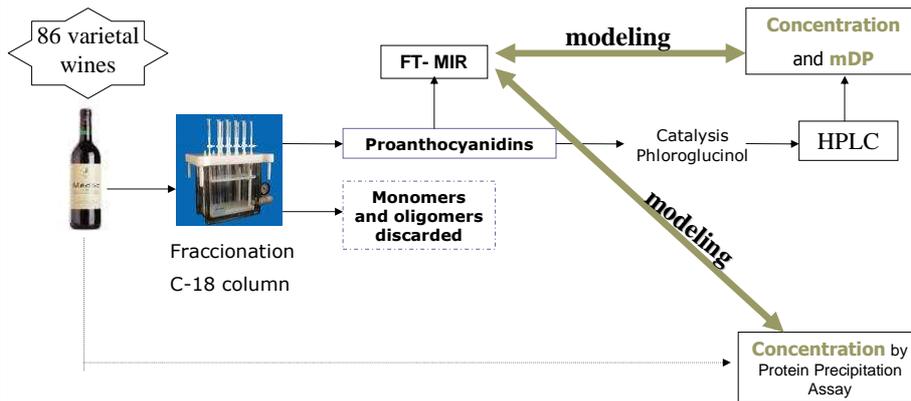


$$Y = X * b + e$$

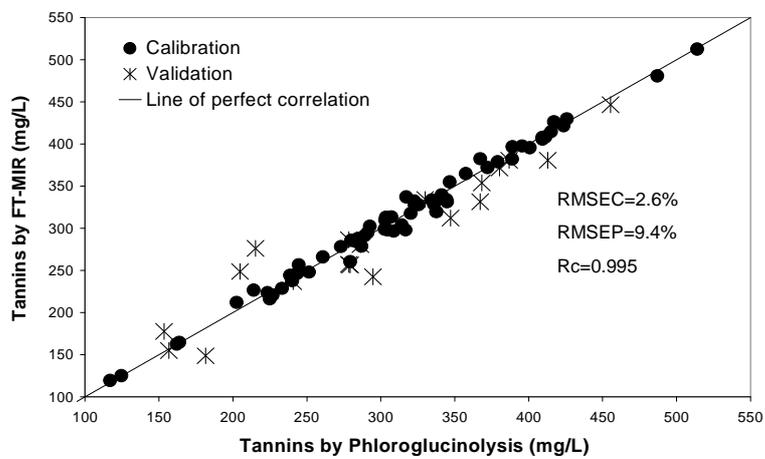
b. Regression Coefficient; e. residuals

“Quantitative Analysis of Red Wine Tannins Using Fourier Transform Mid-Infrared Spectrometry”

MODELING

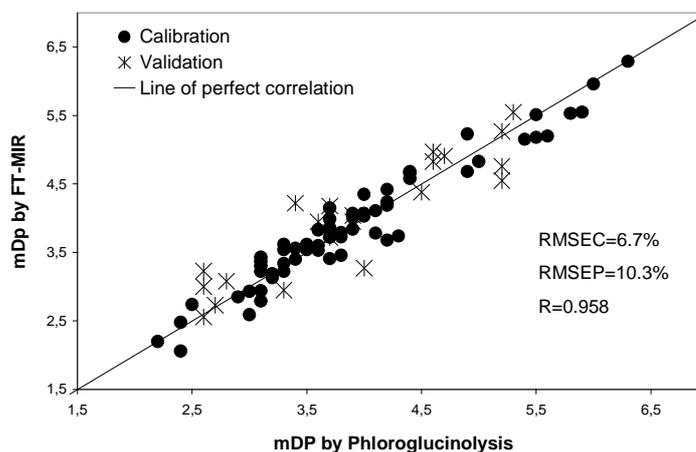


Best Model to Tannin Quantification (Calibration with Phloroglucinolysis)



Best Model for mDP determination

(data obtained from Phloroglucinolysis)



Conclusión

Un vasto número de técnicas pueden ser empleadas para el análisis de taninos

Es un extenso campo que aún está en desarrollo.....y en la caracterización de taninos **queda mucho aún por hacer**