

CIAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN



UAM
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTERÁSICA SALIVAR FRENTE A ÉSTERES ODORANTES DEL VINO E IMPACTO DE COMPONENTES DE LA MATRIZ VÍNICA

**Trabajo de Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
Instituto de investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC-UAM)**

CARLOS PÉREZ GARCÍA

Universidad Autónoma de Madrid (UAM)

JUNIO 2021

Tutores:

Dra. M^a Ángeles del Pozo Bayón (CIAL-CSIC)

María Pérez Jiménez (CIAL-CSIC)



**FACULTAD DE
CIENCIAS**

Índice de contenidos

ABSTRACT	3
RESUMEN.....	3
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Aroma retronasal	1
1.2. Saliva.....	2
1.2.1. Saliva estimulada y no estimulada.....	3
1.2.2. Mecanismos de acción de la saliva en el aroma.....	4
2. PLAN DE TRABAJO	6
3. MATERIALES Y MÉTODO.....	7
3.1. Recolección de saliva estimulada y no estimulada	7
3.2. Explicación del método de la determinación de actividad esterasa.....	7
3.3. Pruebas preliminares al experimento	10
3.4. Ensayos para determinar la especificidad de la actividad esterasa por el tipo de éster en la saliva estimulada y no estimulada.	10
3.5. Inhibición de la actividad esterásica por los compuestos fenólicos del vino tinto.....	11
3.8. Evaluación de datos y cálculo de la actividad esterásica	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1. Pruebas preliminares al experimento.....	15
4.2. Especificidad de la actividad esterásica por ésteres típicos del vino empleando saliva estimulada y no estimulada	18
4.3. Variación del pH tras la ingesta de vino.....	22
4.4. Efecto inhibitor de los polifenoles presentes en el vino tinto.....	23
4.5. Efecto inhibitor de los compuestos fenólicos del vino tinto en condiciones de consumo	
27	
5. CONCLUSIONES.....	31
6. BIBLIOGRAFÍA.....	32

ABSTRACT

Aroma plays an important role in quality wine, being one of the main determiners for consumer preferences and choices. There are two different entry channels for these compounds, either by the nasal cavity, directly reaching the olfactory receptors (orthonasal perception), or during the wine intake releasing them inside the oral cavity (retronasal perception). Volatile compounds, once they are in the oral cavity, are affected by the saliva's activity. This activity might react with some of the carboxylic esters, giving as a result carboxylic acid with mayor umbral perception and a different odor. However, there are no studies that evaluate the role of the salivary esterase activity with ethyl esters from fermented beverages such as wine. Therefore, the aim of this study was to evaluate the specificity and the inhibition of these enzymes for wine esters. Besides, it has been determined the impact of these aromatic compounds in similar conditions as the wine intake (in presence of ethanol and with an acid pH). This study has demonstrated the relevance of the salivary esterase activity under wine conditions, the polyphenols' inhibitory effect (inhibiting until 20% more than the others volatile compounds), how affects the length of the substratum's carbon chain (being the shorter ones, the compounds with more activity) and the sensitivity of these enzymes at pHs lower than 7 (under wine conditions).

Keywords: saliva, esterase activity, aroma, wine, pH

RESUMEN

El aroma cumple un papel de gran importancia en la calidad del vino, siendo uno de los principales determinantes en los gustos del consumidor. Cuando se habla de aroma, se pueden diferenciar dos vías de entrada de los compuestos aromáticos, bien sea a través de los orificios nasales, donde entran en contacto con los receptores olfativos (vía orthonasal), o bien a través de la ingestión del vino, liberándose en la cavidad oral (vía retronasal). Una vez en la cavidad oral, los compuestos responsables del aroma están sometidos a la acción de la saliva. En este caso, la actividad esterásica salivar podría actuar sobre algunos de ellos (esteres carboxílicos), provocando su hidrólisis y dando lugar a ácidos carboxílicos con un mayor umbral de percepción, y diferente olor. No obstante, no hay trabajos que evalúen el papel de la actividad esterásica salivar sobre esterés típicos del perfil aromático de bebidas fermentadas como el vino. El objetivo de este trabajo ha sido por un lado evaluar la especificidad de estas enzimas por esterés típicos del vino, así como su inhibición por polifenoles típicos de vinos tintos. Además, se ha determinado el impacto de este tipo de compuestos en condiciones similares a las del consumo de vino (presencia de etanol y pH ácido). En su conjunto, el presente estudio ha permitido demostrar que la actividad esterásica salivar es relevante en condiciones de consumo de vino, el efecto inhibitor de la catequina, inhibiendo hasta un 20% que otros compuestos fenólicos del vino; la importancia de la longitud de la cadena de

carbonos del sustrato (siendo los ésteres de menor cadena los que mayor actividad esterásica tienen) y la sensibilidad de estas enzimas a pHs inferiores a 7, es decir en condiciones de consumo de vino.

Palabras clave: saliva, actividad esterásica, aroma, vino, pH

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Aroma retronasal

El sentido del olfato forma parte de los cinco sentidos que posee el ser humano, siendo a su vez, uno de los dos quimiosentidos que conforman el sistema químico sensorial (Mizrahi and Vinograd, 2020). Este sistema permite la detección de aromas del medioambiente, desde la percepción de una fuga de gas hasta los diferentes aromas que desprende un alimento (Özay et al., 2019).

La percepción de los aromas, comienza con la estimulación del sentido del olfato cuando las moléculas odorantes son detectadas por los receptores olfativos mediante la respiración normal, enviando la información a través de las neuronas hasta llegar al cerebro, donde toda esa información se recoge y se interpreta dando como resultado un olor determinado (Slotnick, 2021). Esta vía de entrada se denomina vía ortonasal, y se produce cada vez que olemos un alimento. La segunda vía, denominada retronasal, se produce durante el consumo de este alimento. En el caso del vino, a la hora de su ingestión los compuestos del aroma se desprenden en la cavidad oral, donde se liberan o se adhieren a las mucosas orales y faríngeas (Figura 1). A través los flujos respiratorios (exhalación), estos compuestos adheridos a las mucosas, o diluidos en la saliva, son transportados a los receptores olfativos (Esteban-Fernández et al., 2016a).

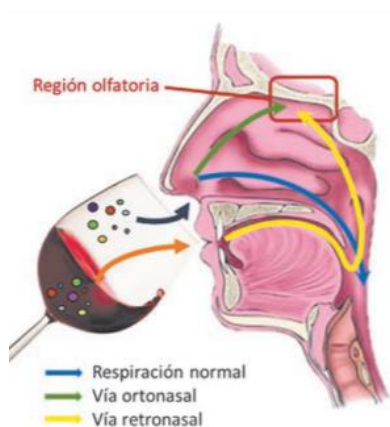


Figura 1. Representación de las vías de entrada de los compuestos del aroma en la ingestión de vino. (Esteban-Fernández et al., 2016a)

La unión de estas vías a la hora de ingerir los alimentos recopila una información en el cerebro que nos transmite esa sensación de ‘flavor’, a diferencia del ‘olor’ que solo aparece cuando utilizamos únicamente la vía orthonasal. El flavor incluye además del olor, la percepción del gusto que se produce cuando las moléculas sápidas interactúan con los receptores de la superficie de la lengua. También en el flavor intervienen las sensaciones trigeminales (tacto, calor, efervescencia, etc.). Este mecanismo de percepción e identificación de olores por ambas vías es de crucial importancia para evaluar la calidad de los vinos, ya que repercute directamente en las preferencias del consumidor, que determinará su elección o no por el producto (Pérez-Jiménez, 2015). Cabe destacar que a pesar de la gran cantidad de estudio sobre la composición del aroma del vino, apenas hay estudios que evalúen que ocurre con estos compuestos durante su procesamiento oral (Esteban-Fernández et al., 2016b).

1.2. Saliva

La saliva es el primer fluido que toma contacto directo y que transporta todos los compuestos aromáticos que se desprenden dentro de la cavidad oral durante la ingesta de vino, es por ello por lo que es una de las sustancias de mayor importancia en la percepción sensorial de los alimentos (Neyraud, 2014). El estudio de la saliva se ha acelerado exponencialmente durante los últimos 50 años, con la llegada de nuevas técnicas que han mostrado que las propiedades fisiológicas y bioquímicas de la saliva, desempeñan diversas funciones dentro del habla, lubricación, digestión de comida y mantenimiento de la salud oral y general (Schipper et al., 2007). No obstante, su papel sobre la percepción del aroma retronasal apenas ha sido investigado, lo que hace que se desconozca en gran parte como influye en la percepción sensorial del vino (Muñoz González, 2014).

La saliva es una mezcla compleja de fluidos segregados principalmente por las glándulas salivales mayores (sublingual, submandibular y parótida) y menores (distribuidas en diferentes localizaciones de la mucosa oral) (Humphrey and Williamson, 2001), por el fluido crevicular gingival, por microorganismos y por restos de comida (Neyraud, 2014). La composición y el flujo salival dependen de las condiciones fisiológicas (si se encuentran en reposo o si se encuentran estimuladas), que afectan a su vez a los fluidos secretados por las glándulas salivales. Estos fluidos son susceptibles de alteraciones en su composición por factores endógenos (ritmos circadianos, edad, género, y varios estados de enfermedad) o exógenos (fármacos y dietas) (Canon et al., 2018).

La saliva se compone principalmente por agua, una gran variedad de electrolitos (sodio, potasio, calcio, magnesio, bicarbonato y fosfatos), proteínas, y compuestos nitrogenados, como urea y amoníaco. La concentración de proteínas en saliva es de 1-2 mg/mL, constituidas principalmente

por glicoproteínas, enzimas (α -amilasa, anhidrasa carbónica), inmunoglobulinas, y un amplio rango de péptidos (cistatinas, histatinas, estaterinas, proteínas ricas en prolina) con actividad antimicrobiana (Schipper et al., 2007). Una alta proporción de proteínas encontradas en el plasma y/o en las lágrimas están también presentes en la saliva. Estas proteínas identificadas están implicadas en numerosos procesos moleculares desde funciones estructurales hasta actividades enzimáticas/catalíticas (Denny et al., 2008). La interacción entre estos compuestos se produce por diferentes causas: fosfatos, bicarbonatos y urea actúan para moderar el pH y la capacidad buffer de la saliva; las proteínas y las mucinas sirven para agregar, limpiar y/o captar microorganismos y contribuir al metabolismo de la placa dental, además están implicadas en mantener el estado de lubricación de la mucosa oral (esencial por ejemplo para poder hablar); proteínas, fosfato y calcio están implicados en la regulación y la desmineralización; e inmunoglobulinas, proteínas y enzimas actúan como antibacteriano (Humphrey and Williamson, 2001).

1.2.1. Saliva estimulada y no estimulada

Dependiendo de la manera que la saliva es recolectada podemos hablar de saliva estimulada o de saliva no estimulada. La saliva no estimulada se denomina a aquella que ha sido recolectada naturalmente sin ningún tipo de alteración, mientras que la saliva estimulada se denomina a aquella que ha sido recogida tras haber estimulado a las glándulas salivales, ya sea física (mediante el masticado) o químicamente (empleando sustancias ácidas como el ácido cítrico). La composición de ambos tipos de saliva va a ser diferente debido a la estimulación presente o inexistente de cada una de ellas (Gomar-Vercher et al., 2018). La mayoría de los parámetros salivales, como concentración de proteínas, lipólisis, lisozima, capacidad antioxidante total (TAS) y concentración de ácido úrico, y algunos otros, han sido encontrados en mayor concentración en saliva no estimulada, en contraposición se ha determinado una mayor proteólisis en la saliva estimulada (Neyraud et al., 2012).

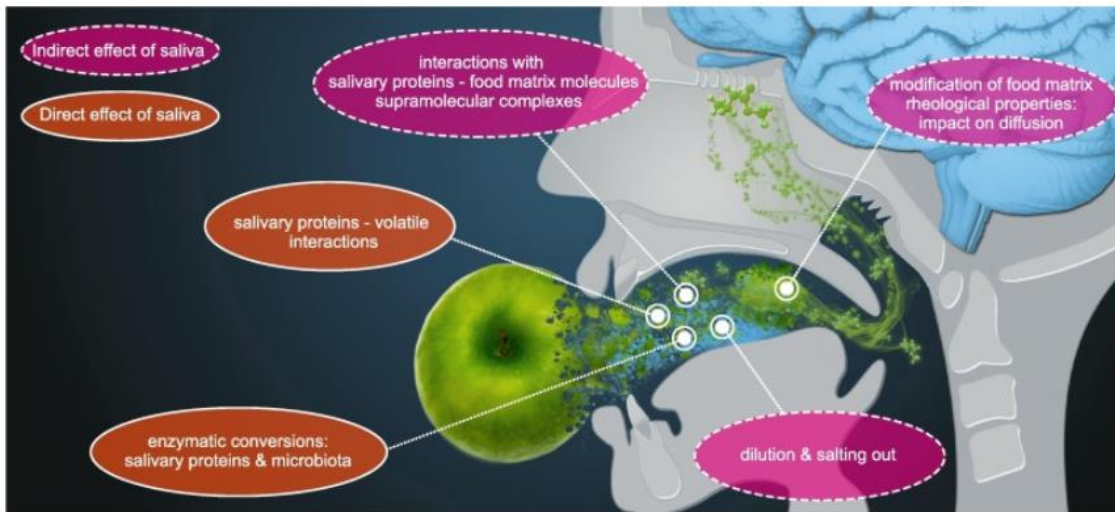


Figura 2. Mecanismos de la saliva envueltos en el desprendimiento del aroma (Ployon et al., 2017)

1.2.2. Mecanismos de acción de la saliva en el aroma

La liberación de compuestos volátiles orgánicos (VOCs) de la matriz alimentaria alcanza los receptores nasales provocando la percepción del aroma. Este proceso no solo depende de las características fisicoquímicas de estos compuestos volátiles (polaridad, punto de ebullición, etc.) y de la composición de la matriz alimentaria (contenido de lípidos, hidratos de carbono, proteínas, etc), sino que también depende de la fisiología humana. Se ha demostrado que la saliva tiene múltiples efectos sobre los VOCs, remarcando así su importancia sobre la percepción sensorial. La saliva afecta a la liberación del aroma durante la ingesta de alimentos principalmente a través de dos maneras: la interacción con proteínas salivales y a través del metabolismo de compuestos del aroma por enzimas salivales (Figura 2) (Ployon et al., 2017).

En la saliva se han determinado más de 1166 proteínas, siendo las de mayor abundancia las α -amilasa y las mucinas (Ployon et al., 2017). Se ha demostrado la capacidad de interacción de las proteínas salivales con los compuestos aromáticos y, por consiguiente, su impacto en la liberación del aroma y en la percepción (Guichard, 2006). Dichas interacciones proteína-aroma pueden deberse a un efecto hidrofóbico entre ellas, o por interacciones no covalentes como interacciones electrostáticas o fuerzas de Van der Waals (Lubbers et al., 1998).

Un gran número de estas proteínas salivales son enzimas, responsables de catalizar diferentes reacciones químicas, que afectan a los compuestos del aroma dependiendo de su estructura química. Estas enzimas son segregadas por las glándulas salivales, a través de los tejidos de la cavidad oral o por el microbiota residente. Varios estudios han demostrado que la presencia de saliva es responsable de la degradación enzimática de compuestos aromáticos (Ployon et al., 2017).

1.2.2.1.Esterasa enzimática

Existen diferentes enzimas salivales que contribuyen a la actividad total de esterasa salivar (TSEA), siendo la carboxilesterasa la principal enzima presente en la saliva y la anhidrasa carbónica IV la enzima que mayor contribución aporta a la actividad esterasa (Tecles et al., 2016). Un tipo específico de enzima salivar, que tienen gran relevancia en el metabolismo de compuestos aromáticos, son las enzimas esterases, pertenecientes a la familia de las carboxilesterasas.

Se puede concluir que la degradación enzimática producida por algunas enzimas salivares puede producir dos efectos principales: la disminución de la concentración de moléculas aromáticas, y la posible formación de nuevos compuestos volátiles que pueden tener diferente capacidad odorante (Ployon et al., 2017).

2. PLAN DE TRABAJO

Para realizar el estudio de una manera eficiente y llevarlo a cabo con éxito se elaboró un plan de trabajo como se muestra en la **Figura 3**.

Plan de trabajo

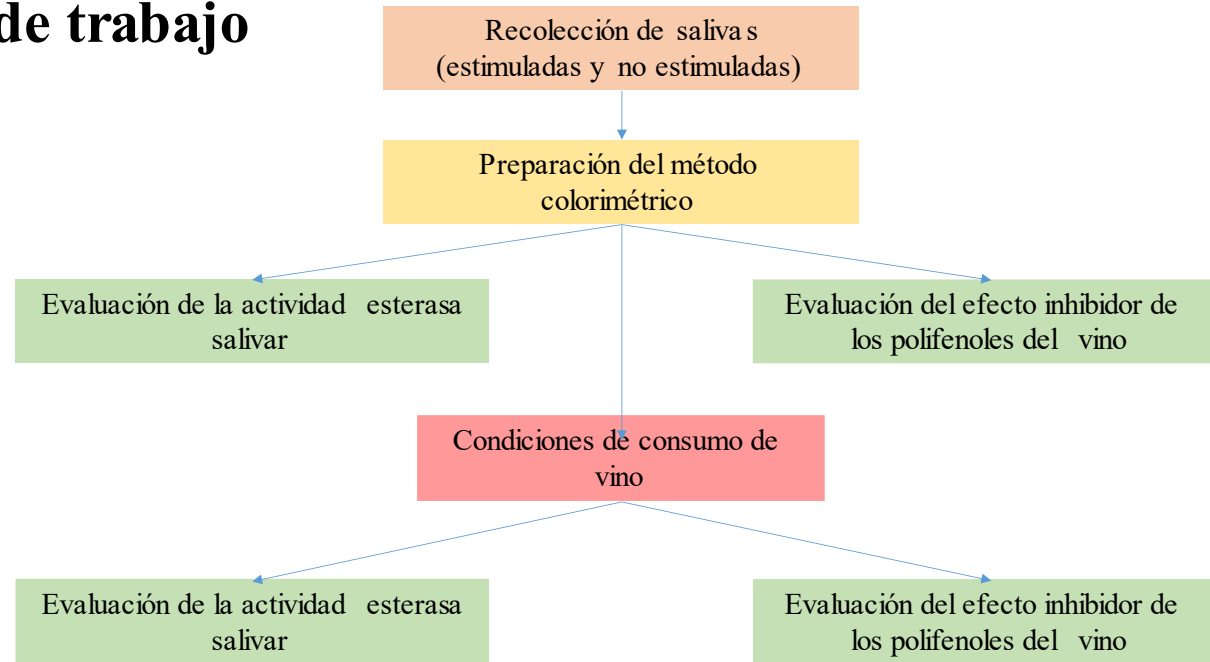


Figura 3. Esquema del plan de trabajo seguido durante los ensayos.

3. MATERIALES Y MÉTODO

3.1. Recolección de saliva estimulada y no estimulada

La saliva no estimulada y la saliva estimulada de 10 voluntarios (5 mujeres y 5 hombres) de una edad comprendida entre 25 y 67 años, fue recogida entre las 9 y las 11 de la mañana. La saliva no estimulada fue recolectada de forma natural (escupiendo directamente) en tubos de centrifugación de 15 mL (VWR, USA), mientras que la saliva estimulada fue recogida mientras que los voluntarios masticaban un trozo de Parafilm™ (Pérez Jiménez et al., 2019). Una vez realizado la recolecta, las muestras pasan a ser centrifugadas a 15000 g a 4°C durante 15 minutos (Muñoz-González et al., 2014). El sobrenadante formado tras la centrifugación de muestras de saliva estimulada y no estimulada se recolecta en dos tubos diferentes. El pH de la saliva estimulada y de la no estimulada fue de 7.7 y de 7.6, respectivamente. Después se prepararon alícuotas de 1.5 mL de saliva en tubos Eppendorf (VWR) y se congelaron (-80°C) hasta la realización de los ensayos, ya que se ha estudiado que no afecta a la actividad esterasa (Pérez Jiménez, et al., 2020)

Los voluntarios no presentaban ninguna enfermedad oral. Una hora antes de la recolección de saliva, a los participantes no se les estaba permitido beber ni comer, y todos fueron informados sobre el propósito del estudio y dieron su consentimiento para participar. Estos ensayos fueron autorizados por el Comité de Bioética del CSIC.

3.2. Explicación del método de la determinación de actividad esterasa

La determinación de la actividad esterásica salivar (AE) se realizó empleando un método colorimétrico desarrollado en el laboratorio (Pérez Jiménez, et al., 2020) (**Figura 4**), que se basa en la liberación de p-nitrofenol (coloreado) a partir del correspondiente éster derivado (éster de p-nitrofenol) en presencia de esterasas salivares, tal y como se muestra en la **Figura 5** (Bendicho et al., 2001).

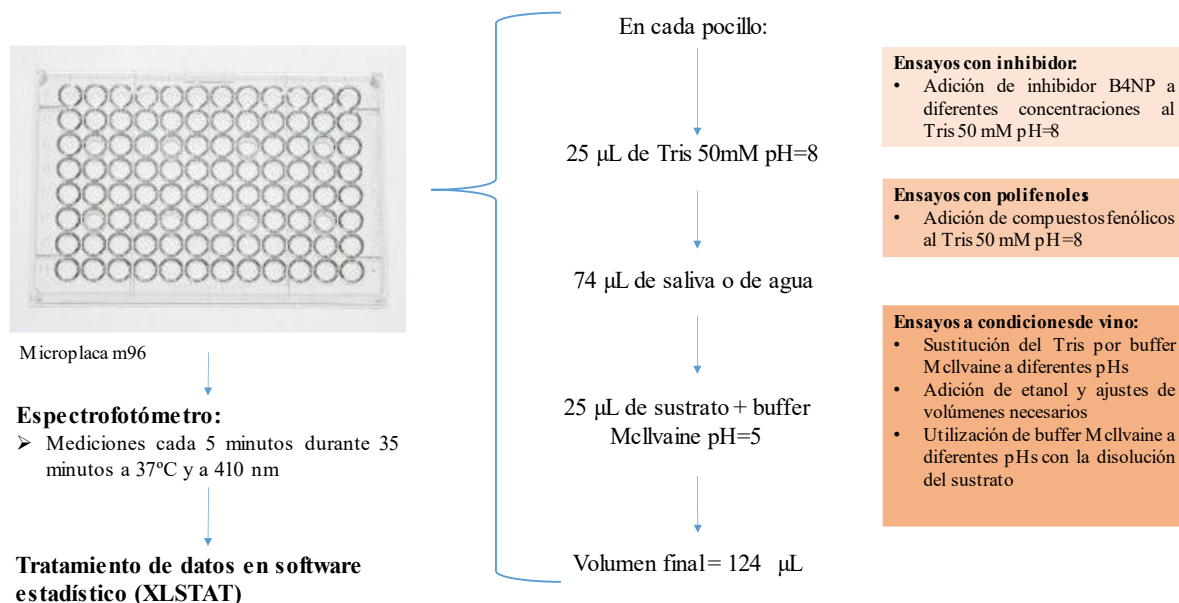


Figura 4. Esquema del método colorimétrico empleado durante los ensayos

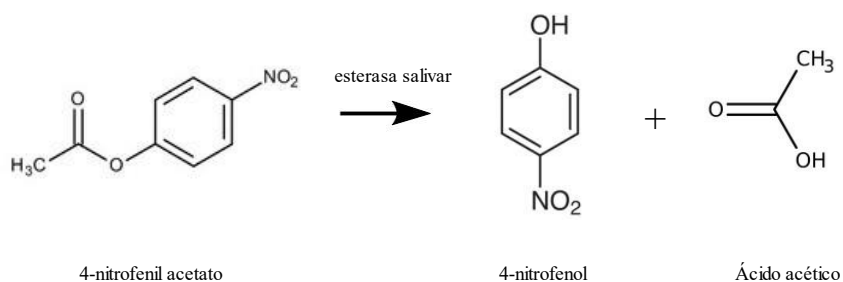


Figura 5. Método colorimétrico. Ejemplo de 4-nitrofenil acetato como sustrato.

La especificidad de las enzimas esterásicas se basó en la hidrólisis de diferentes sustratos (**Figura 6**) con diferente longitud de cadena de carbonos: 4-nitrofenil acetato (4-NPA), 4-nitrofenil butirato (4-NPB), 4-nitrofenil hexanoato (4-NPH), 4-nitrofenil octanoato (4-NPO), 4-nitrofenil decanoato (4-NPD) y 4-nitrofenil dodecanoato (4-NPDD). Todos ellos liberan 4-nitrofenol por la actividad de enzimas salivales con capacidad esterásica, que produce un cambio colorimétrico que puede cuantificarse para calcular la TSEA (Pérez Jiménez, et al., 2020).

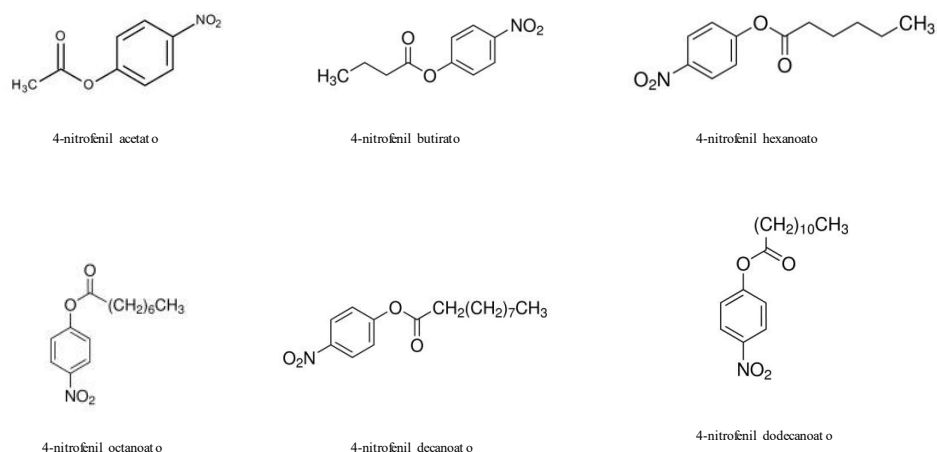


Figura 6. Ésteres de *p*-nitrofenol utilizados para los ensayos

Para los ensayos se preparó una solución Tris 50 mM a pH=8, a partir de la mezcla de 50mL de Tris 0.2 M (GE Healthcare Uppsala, Suecia) con 26.8 mL de HCl 0.2 M (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Esta mezcla se enrasó a 200 mL con agua miliQ. Además, se preparó un tampón McIlvaine a pH=5, con la mezcla de dos soluciones: 24.3 mL de ácido cítrico 0.1M y 25.7 mL de Na₂HPO₄*12H₂O 0.2M. De no obtener el pH deseado se ajustaría añadiendo la solución correspondiente. Después se enrasó a 100 mL con agua miliQ. Para la preparación de los cada uno de los sustratos se disolvió una cantidad determinada de cada éster de *p*-nitrofenol en 5 mL de etanol (**Tabla 1**), para después tomar 1 mL de esa mezcla y enrasarse a 10 mL con el tampón McIlvaine pH=5, respectivamente.

Tabla 1. Composición de sustratos en mg/5mL de etanol

Éster de <i>p</i> -nitrofenol	Longitud de cadena de carbonos	mg de éster en 5 mL de etanol
4-nitrofenil acetato (4-NPA)	C2	63.0
4-nitrofenil butirato (4-NPB)	C4	74.3
4-nitrofenil hexanoato (4-NPH)	C6	87.2
4-nitrofenil octanoato (4-NPO)	C8	97.5
4-nitrofenil decanoato (4-NPD)	C10	81.0
4-nitrofenil dodecanoato (4-NPDD)	C12	112.5

La medición de la AE se llevó a cabo en microplacas m96 (VWR, Pensilvania, EEUU). En cada uno de los pocillos que se utilizaron para el estudio contenía 25 µL de Tris 50mM a pH=8, 74 µL de

saliva (previamente descongelada) o de agua (en el caso de los blancos) y 25 μ L de la disolución sustrato + McIlvaine pH=5 (4-NPA, 4-NPB, 4-NPH, 4-NPO, 4-NPD o 4-NPDD). Las microplacas se introdujeron en un espectro fotómetro donde se medía el cambio colorimétrico cada 5 minutos durante 35 minutos a 410 nm y a 37°C. Se definió a una unidad de actividad esterasa (UI) como el cambio de absorbancia de 0.01 de densidad óptica. Se realizaron los cálculos necesarios para obtener la UI por minuto. Cabe recalcar, que se repitieron 3 veces cada muestra realizada, excepto los blancos que se realizaban 2 veces (Pérez Jiménez, et al., 2020).

3.3. Pruebas preliminares al experimento

En un principio, se realizaron ensayos preliminares con el Bis(4-Nitrophenil) Phosphate (B4NP) (Sterri et al., 1985), que es un inhibidor comercial de esterasas, con el fin de estudiar el poder inhibitorio que ejerce sobre la actividad esterásica de las diferentes salivas, tanto estimuladas como no estimuladas. Se realizó añadiendo una cantidad calculada de B4NP en el Tris 50mM pH=8 (**Tabla 2**). En los primeros ensayos se utilizó B4NP con una concentración de 0,1 mM, para después incorporar en los siguientes ensayos concentraciones de 0.05 mM, 0.2 mM, 0.4 mM y 0.8mM. En estos ensayos preliminares únicamente se utilizó el sustrato 4-NPA. (Pérez-Martín et al., 2013).

Tabla 2. Concentraciones de inhibidor utilizadas en los ensayos

Concentración de inhibidor B4NP en el pocillo	g de inhibidor B4NP en 50 mL de Tris 50mM pH=8
0.05 mM	4.7
0.1 mM	9.4
0.2 mM	18.8
0.4 mM	37.6
0.8 mM	75.2

Los pocillos de la microplaca llevarían una mezcla formada por 25 μ L de Tris 50mM pH=8 + B4NP, 74 μ L de saliva o agua y 25 μ L de disolución 4-NPA + McIlvaine pH=5. Se comprobó de esta forma si a mayor o menor concentración de B4NP aparece mayor o menor inhibición.

3.4. Ensayos para determinar la especificidad de la actividad esterasa por el tipo de éster en la saliva estimulada y no estimulada.

Las salivas estimuladas y no estimuladas se sometieron a un ensayo donde se estudió cuál de los dos tipos de saliva presentaba una mayor AE, si la longitud de cadena de carbonos de los sustratos influía en la AE, y si existía alguna diferencia del efecto inhibitorio del B4NP entre ellas.

Para ello se realizaron varios ensayos donde se utilizaron muestras de salivas estimuladas y salivas no estimuladas sin inhibidor B4NP, utilizando todos los sustratos mostrados en la **Tabla 1** (no solamente el 4-NPA), frente a muestras con las mismas salivas, utilizando los mismos sustratos, pero con la presencia del inhibidor B4NP.

3.5. Inhibición de la actividad esterásica por los compuestos fenólicos del vino tinto

Se evaluó la capacidad de inhibición de la actividad esterásica salivar por algunos de los principales compuestos del vino tinto: catequina, quercetina, kaempferol, miricetina y resveratrol (**Figura 7**). (Sánchez-Patán et al., 2012).

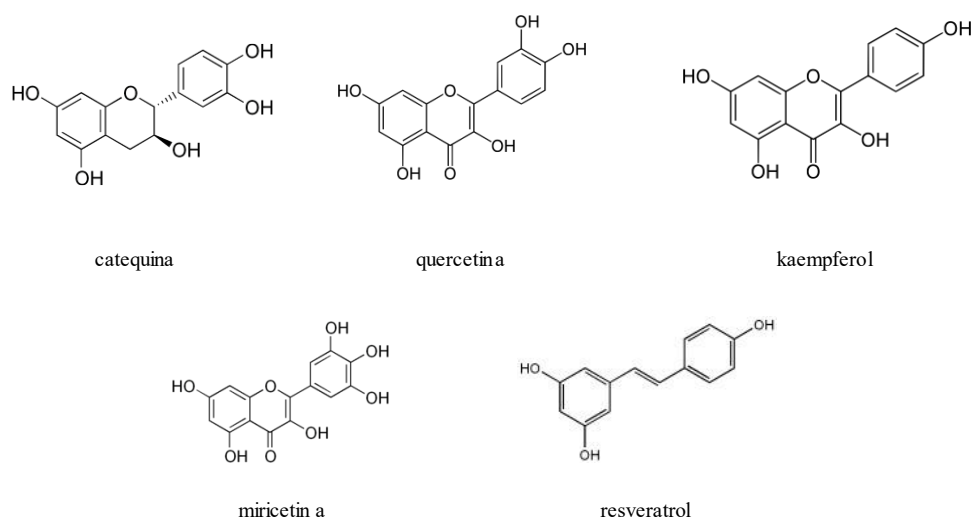


Figura 7. Compuestos fenólicos utilizados para los ensayos

Se diseñó un modelo de experimento que permitiera estudiar el efecto inhibitor de estos compuestos puros del vino (en la máxima concentración determinada en vinos tintos), para comprobar si influían en la actividad esterasa salivar cuando estuviera en contacto con los sustratos (ésteres) previamente mencionados en la **Figura 7**. En estos ensayos, se dejó de utilizar únicamente el 4-NPA como sustrato, para pasar a utilizar todos los demás sustratos. Las diferentes concentraciones utilizadas para los compuestos puros se recogen en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Concentraciones máximas de compuestos fenólicos presentes en el vino y sus pHs. (Fuente: Base de datos del contenido de polifenoles de los alimentos)

	Concentración máxima en vino tinto (mg/mL)	Concentración máxima en vino tinto (mg/25 mL de Tris)	pH
Catequina	0.39	48.36	8.44
Quercetina	0.0316	3.9184	8.41
Kaempferol	0.0036	0.4464	8.24
Miricetina	0.0179	2.2196	8.21
Resveratrol	0.0278	3.4472	8.21

De esta manera, los pocillos de la microplaca se rellenarían con 25 μ L de Tris 50mM pH=8 + polifenol (catequina, quercetina, kaempferol, miricetina o resveratrol), 74 μ L de saliva o agua y 25 μ L de la disolución sustrato + McIlvaine pH=5.

3.6. Variación de pH tras la ingesta de vino

Se realizó un estudio para observar si la ingesta de vino producía una variación en el pH de la saliva. Se eligieron a tres individuos al que se les midió el pH de su saliva antes de la ingesta, a tiempo 0, 30, 60, 90 y 120 segundos después.

De esta manera, se examinó el efecto que ejercía la ingesta de vino sobre el pH salivar y por tanto poder evaluar el efecto de los compuestos fenólicos en la AE a ese pH.

3.7. Inhibición de la actividad esterásica por los compuestos fenólicos en condiciones de consumo de vino

Tras haber realizado los ensayos a condiciones normales, a un pH=7 y un porcentaje alcohólico de 0% vol., se pasó a realizar los mismos ensayos, pero cambiando ciertos disolventes y ajustando volúmenes, pHs y graduación alcohólica; con el objetivo de representar con la mayor exactitud las condiciones que se dan en la cavidad oral tras la ingesta de vino. Estas características deberían cumplir aproximadamente un pH=5 y un grado alcohólico de 12% vol. De esta forma, se pudo comprobar si alguna de estas nuevas características inhibía la AE.

Para estos ensayos se utilizaron únicamente la catequina y el sustrato 4-NPB. En primer lugar, se decidió cambiar el Tris 50 mM de pH=8 por tampón McIlvaine pH=8, y comprobar si había diferencias. La razón de este cambio de disolvente inicial fue debido a la fácil preparación y al

amplio rango de pHs al que puede modificarse el tampón Mcllvaine. Se estudió el cambio de pH que se producía dentro del pocillo dependiendo del pH de las soluciones (**Tabla 4**) con las que se realizara el ensayo y se preparó una placa para poder comparar la actividad esterasa de la saliva sola, de la catequina y del inhibidor B4NP en condiciones de pH=7, frente a unas condiciones de pH=5 y un grado alcohólico de 12% vol. Para ello se preparó, Mcllvaine pH=8, Mcllvaine pH=8 + catequina, Mcllvaine pH=8 + B4NP, Mcllvaine pH=4.56, Mcllvaine pH=4.56 + catequina, Mcllvaine pH=4.56 + B4NP, la disolución 4-NPB + Mcllvaine pH=4.56 y etanol (%).

Tabla 4. Mediciones de pH de los pocillos, saliva y disoluciones

pH Mcllvaine + catequina	8.00	4.96	3.65	2.96
pH saliva	7	7	7	7
pH 4-NPB + Mcllvaine	4.96	4.96	3.65	2.96
pH pocillo	6.70	5.60	4.58	3.76

Tabla 5. Ensayos de inhibición de los compuestos fenólicos a distintos pHs.

Disolución	mg del compuesto	mL de Mcllvaine pH=4.56	mL de Mcllvaine pH=8
Mcllvaine pH 8 + catequina	8.40	0	50
Mcllvaine pH 8 + B4NP	48.50	0	25
Mcllvaine pH 4.56 + catequina	8.40	50	0
Mcllvaine pH 4.56 + B4NP	48.20	25	0
Mcllvaine 4.56 + 4NPB	71.30	10	0

Tabla 6. Disposición de las muestras con los diferentes compuestos

SE	SNE
SE-12%	SNE-12%
SE-B4NP	SNE-B4NP
SE-B4NP-12%	SNE-B4NP-12%
SE-B4NP-pH5	SNE-B4NP-pH5
SE-B4NP-pH5-12%	SNE-B4NP-pH5-12%
SE-C	SNE-C
SE-C-12%	SNE-C-12%
SE-C-pH5	SNE-C-pH5
SE-C-pH5-12%	SNE-C-pH5-12%
SE-pH5	SNE-pH5
SE-pH5-12%	SNE-pH5-12%

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; B4NP: Bis(4-Nitrophenil) Phosphate; C: catequina

Los pocillos de la microplaca (**Tabla 6**) se compondrían para el ensayo sin % vol. de alcohol de 25 μ L de McIlvaine pH=4.56 o pH=8 (con catequina o inhibidor), 74 μ L de saliva o agua y 25 μ L de la disolución 4-NPB+ McIlvaine pH=4.56; y para el ensayo con 12% vol. de alcohol de 21.3 μ L de McIlvaine pH=4.56 o pH=8 (con catequina o inhibidor), 67.4 μ L de saliva o agua, 21.3 de la disolución 4-NPB+ McIlvaine pH=4.56 y 14 μ L de etanol (%).

3.8. Evaluación de datos y cálculo de la actividad esterásica

Todos los ensayos realizados en este estudio siguieron el mismo tratamiento de datos para evaluar la actividad esterásica (**Tabla 7** y **Tabla 8**). Los datos brutos obtenidos de los ensayos se pasaban a tablas de datos, donde se tomaban como referencia los valores de absorbancia en el t=0 s y t=1800 s. Una vez apartado el resto de los datos, se realizaba la media de los blancos a t=0 s y a t=1800 s. Se calculaba la diferencia entre los valores de absorbancia de las muestras y sus blancos, denominándose resultados A, a los valores resultantes de la diferencia entre las muestras y los blancos a t= 0 s; y resultados B, a los valores resultantes de la diferencia entre las muestras y los blancos a t= 1800 s. Estos resultados A y B, se restarían entre ellos de manera de obtener la diferencia de absorbancia ocurrida desde el t=0 s y el t= 1800 s, que se denominó Incremento. Anteriormente, se definió a una unidad de actividad esterasa (UI) como el cambio de absorbancia de 0.01 de densidad óptica. Se dividió el Incremento obtenido entre 0.01 de densidad óptica, que dio como resultado la UI ocurrida durante esos 30 minutos, por lo que para obtener la UI por minuto de nuestros ensayos se dividió este resultado entre 30. De esta manera obtuvimos la AE de todas las muestras. Como se mencionó antes, en los ensayos se realizaron 3 muestras iguales de cada una de ellas, excepcionando los blancos que se realizaban 2. Obtenidos los resultados de la AE, se realizó la media, la desviación estándar y el coeficiente de varianza de cada uno de los tríos de muestras.

Tabla 7. Ejemplo de tratamiento de datos para calcular la actividad esterásica (I)

Muestra	t=0	t=1800	Media Blanco		Abs-Abs Blanco		Incremento B-A
			t=0	t=1800	t=0 (A)	t=1800 (B)	
B 1	0.042	0.044	0.041	0.043	X	X	X
B 2	0.040	0.043	X	X	X	X	X
SE 1	0.093	0.259	X	X	0.052	0.215	0.164
SE 2	0.088	0.251	X	X	0.047	0.207	0.160

SE 3	0.098	0.297	X	X	0.057	0.254	0.193
SNE 1	0.090	0.257	X	X	0.049	0.214	0.165
SNE 2	0.087	0.268	X	X	0.046	0.224	0.178
SNE 3	0.086	0.252	X	X	0.045	0.209	0.164

B: blanco; SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; Abs: Absorbancia.

Tabla 8. Ejemplo de tratamiento de datos para calcular la actividad esterásica (II)

Muestra	Incremento/0.01 UI	Actividad esterasa (UI/30 min)	Media	Desviación estándar	CV%
B 1	X	X	X	X	X
B 2	X	X	X	X	X
SE 1	16.4	0.546	0.579	0.068	11.70
SE 2	16.0	0.535	X	X	X
SE 3	19.3	0.657	X	X	X
SNE 1	16.5	0.549	0.563	0.027	4.79
SNE 2	17.8	0.595	X	X	X
SNE 3	16.40	0.546	X	X	X

B: blanco; SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; CV%: porcentaje de coeficiente de variación.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Pruebas preliminares al experimento

Se comprobó si a la hora de aumentar o disminuir la concentración del agente inhibidor Bis(4Nitrophenil) Phosphate (B4NP) en contacto con las salivas estimuladas y las no estimuladas, ejercía una mayor o menor inhibición en las muestras. Los resultados obtenidos correspondientes a estos ensayos se recogen en la **Tabla 9** y **10**, y en la **Figura 8** y **9**.

Tabla 9. Resultados del B4NP a distintas concentraciones en salivas estimuladas y salivas no estimuladas. Valores de la media de actividad esterásica, desviación estándar, porcentaje de actividad esterasa y porcentaje de inhibición. (Ensayo 1)

Muestra	Media AE	SD	% AE	% INHIB.
SE	0.305	0.004	100.00	0.00
SE 0.05	0.197	0.118	64.65	35.35

SE 0.1	0.082	0.083	27.01	72.99
SE 0.2	0.122	0.0037	40.07	59.93
SE 0.4	0.190	0.009	62.17	37.83
SE 0.8	0.207	0.004	67.93	32.07
SNE	0.244	0.016	100.00	0.00
SNE 0.05	0.086	0.004	35.22	64.78
SNE 0.1	0.097	0.003	39.71	60.29
SNE 0.2	0.085	0.002	35.00	65.00
SNE 0.4	0.157	0.007	64.34	35.66
SNE 0.8	0.146	0.005	59.97	40.03

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; AE: actividad esterásica; % AE: porcentaje de actividad esterásica; %INHIB: porcentaje de inhibición.

Tabla 10. Resultados del B4NP a distintas concentraciones en salivas estimuladas y salivas no estimuladas. Valores de la media de actividad esterásica, desviación estándar, porcentaje de actividad esterasa y porcentaje de inhibición. (Ensayo 2)

Muestra	Media AE	SD	% AE	% INHIB.
SE	0.418	0.022	100.00	0.00
SE 0.05	0.145	0.006	34.75	65.25
SE 0.1	0.152	0.004	36.45	63.55
SE 0.2	0.131	0.018	31.24	68.76
SE 0.4	0.232	0.014	55.55	44.45
SE 0.8	0.258	0.005	61.81	38.19
SNE	0.303	0.010	100.00	0.00
SNE 0.05	0.094	0.004	31.11	68.89
SNE 0.1	0.094	0.003	30.97	69.03
SNE 0.2	0.091	0.010	29.87	70.13
SNE 0.4	0.155	0.008	51.210121	48.789879
SNE 0.8	0.155	0.008	51.0084342	48.9915658

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; AE: actividad esterásica; % AE: porcentaje de actividad esterásica; %INHIB: porcentaje de inhibición.

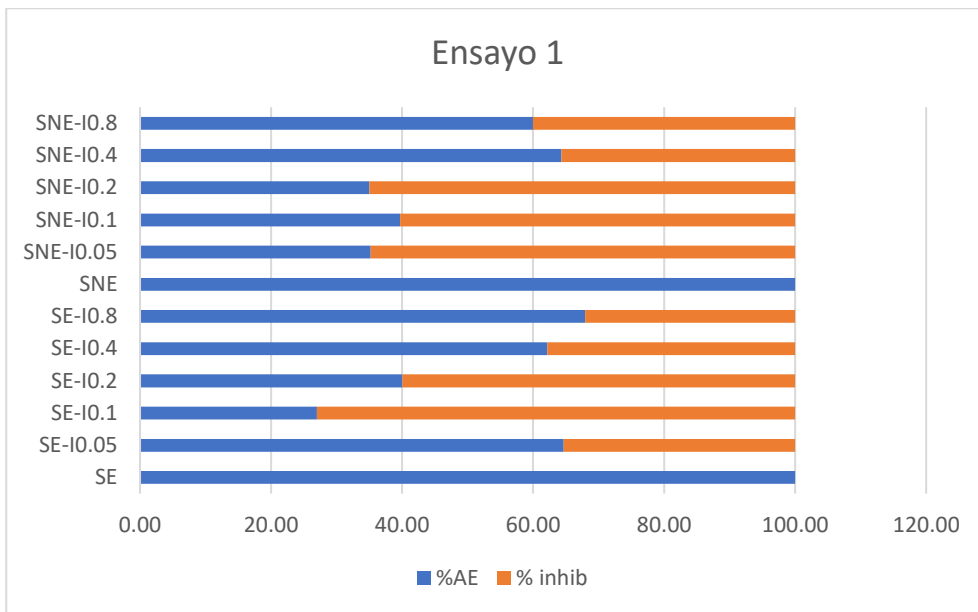


Figura 8. Gráfico comparativo del efecto inhibitor del B4NP en muestras de saliva estimulada y no estimulada en el Ensayo 1.

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; SE-I: saliva estimulada con inhibitor; SNE-I: saliva no estimulada con inhibitor; % AE: porcentaje de actividad esterásica; %INHIB: porcentaje de inhibición.

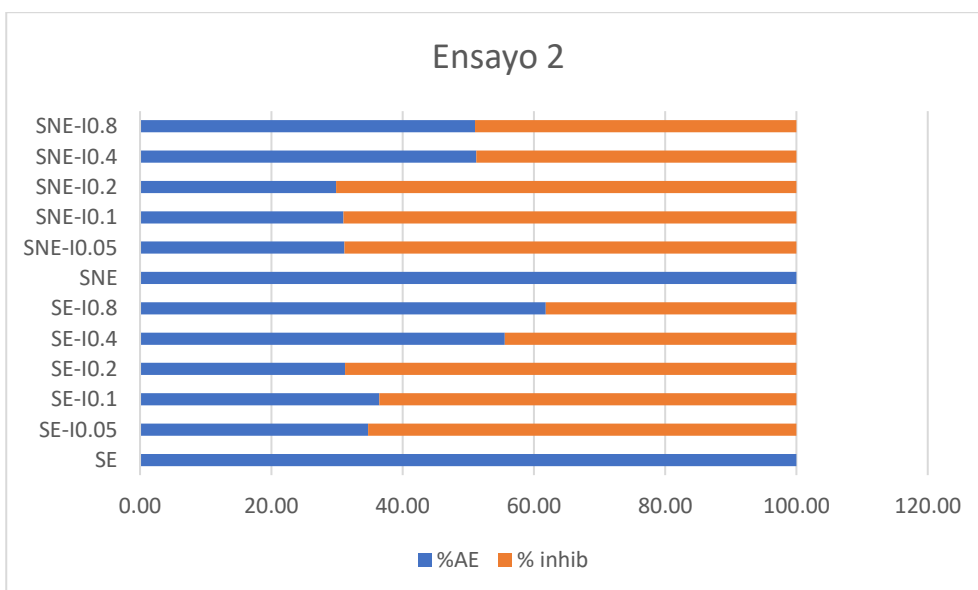


Figura 9. Gráfico comparativo del efecto inhibitor del B4NP en muestras de saliva estimulada y no estimulada en el Ensayo 2.

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; SE-I: saliva estimulada con inhibitor; SNE-I: saliva no estimulada con inhibitor; % AE: porcentaje de actividad esterásica; %INHIB: porcentaje de inhibición.

Como se observa en ambas tablas de datos y en la **Figura 8 y 9** se comparó el grado de inhibición que ejercían diferentes concentraciones de B4NP, siendo estas de 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM, 0.4 mM y 0.8 mM. Se tomaron de referencia las muestras sin adición de inhibidor como 100% de actividad esterasa. De esta manera se pudieron calcular los porcentajes de actividad esterasa, y por tanto de inhibición, y así poder comparar los resultados entre todas las muestras realizadas del ensayo. En ambos ensayos las muestras de saliva estimulada y no estimulada con concentración 0.05 mM , 0.1 mM y 0.2 mM de B4NP alcanzaron entre un 60-70% de inhibición de la AE, excepto en el primer ensayo que las muestras de concentración 0.05 mM presentaron un porcentaje del 35% de inhibición. Por otro lado, se puede apreciar que en los dos ensayos realizados, las muestras de saliva estimulada y no estimulada, con concentraciones de B4NP superiores a 0.2 mM no ejercían un porcentaje de inhibición mayor al 50%.

Los resultados demostraron que aumentar o disminuir la concentración de inhibidor no influye en un mayor o un menor grado de inhibición. Tras todo el tratamiento y estudio de los datos, se determinó utilizar la concentración de 0.1 mM de B4NP como control positivo en inhibición para la realización de los posteriores ensayos.

4.2. Especificidad de la actividad esterásica por ésteres típicos del vino empleando saliva estimulada y no estimulada

Este ensayo nos permitió establecer si la longitud de cadena de carbonos del sustrato (del éster) influía en la AE. Los resultados obtenidos del ensayo se muestran en la **Tabla 11** y en la **Figura 10**.

Tabla 11. Resultados del ensayo realizado para el estudio de la especificidad de la actividad esterasa en saliva estimulada y saliva no estimulada. Valores de media de la actividad esterasa y desviación estándar.

		Media AE (IU/min)	SD
4-NPA	SE	1.108	0.130
	SNE	0.984	0.257
4-NPB	SE	3.556	0.269
	SNE	2.590	0.180
4-NPH	SE	1.944	0.233
	SNE	1.225	0.101
4-NPO	SE	0.792	0.073

	SNE	0.457	0.029
4-NPD	SE	0.302	0.019
	SNE	0.179	0.020
4-NPDD	SE	0.119	0.013
	SNE	0.059	0.018

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; AE: actividad esterásica; SD: desviación estándar; 4-NPA: 4-nitrofenil acetato; 4-NPB:4-nitrofenil butirato; 4-NPH:4-nitrofenil hexanoato; 4-NPO: 4-nitrofenil octanoato; 4-NPD: 4-nitrofenil decanoato; 4-NPDD: 4-nitrofenil dodecanoato.

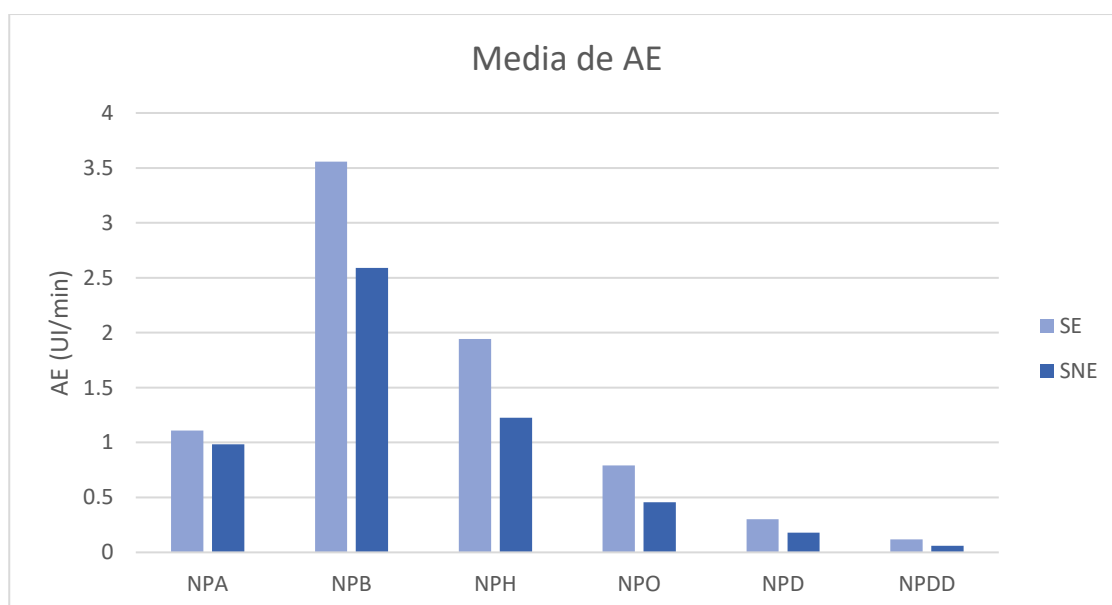


Figura 10. Valores de actividad esterasa (AE) de saliva estimulada y saliva no estimulada con los sustratos 4-NPA (C2), 4-NPB (C4), 4-NPH (C6), 4-NPO (C8), 4-NPD (C10) y 4-NPDD (C12).

Como se puede observar en la **Figura 10** las muestras de saliva estimulada muestran unos valores de actividad esterasa superiores a los obtenidos por las muestras de saliva no estimulada. Además, los resultados demuestran que a medida que la cadena de carbonos del sustrato va aumentando, se produce una disminución de la actividad esterasa salivar; a excepción de las muestras con el sustrato 4-NPA que presenta una menor de actividad esterasa que el sustrato 4-NPB y que el sustrato 4-NPH.

En cuanto al estudio del efecto inhibitor del B4NP 0.1 mM que ejerce sobre cada uno de los sustratos, se obtuvieron los resultados de las muestras de saliva estimulada en la **Tabla 12**, y los resultados de las muestras de saliva no estimulada en la **Tabla 13**, recogidos todos en la **Figura 11**.

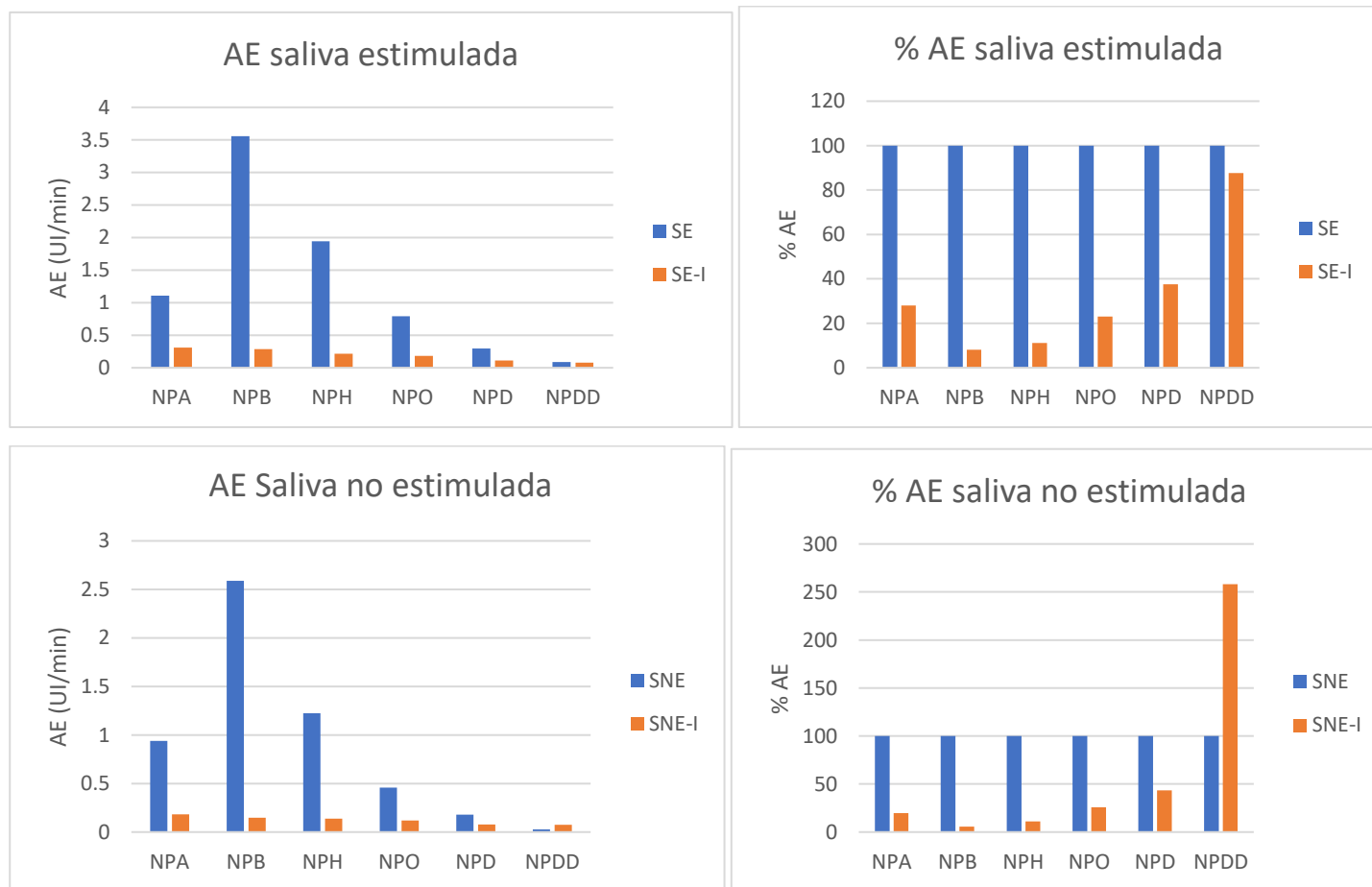


Figura 11. Valores y porcentajes de la actividad esterasa en salivas estimuladas y no estimuladas empleando todos los sustratos (ésteres de diferente longitud), en presencia y ausencia de inhibidor B4NP 0.1 mM.

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; SE-I: saliva estimulada con inhibidor; SNE-I: saliva no estimulada con inhibidor; AE: actividad esterásica; % AE: porcentaje de actividad esterásica.

Tabla 12. Resultados de los ensayos del estudio de saliva estimulada (SE) en todos los sustratos, en presencia y en presencia y ausencia de inhibidor B4NP 0.1 mM. Valores de la media de actividad esterásica (AE), desviación estándar (SD) y porcentaje de actividad esterásica (% AE)

Sustrato	Muestra	Media de AE	SD	% AE
NPA	SE	1.108	0.127	100
	SE-I	0.311	0.055	28.03
NPB	SE	3.556	0.337	100
	SE-I	0.287	0.017	8.08
NPH	SE	1.944	0.126	100
	SE-I	0.216	0.024	11.13
NPO	SE	0.792	0.011	100
	SE-I	0.182	0.015	23.03
NPD	SE	0.297	0.012	100
	SE-I	0.112	0.028	37.57
NPDD	SE	0.089	0.021	100
	SE-I	0.078	0.045	87.64

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; SE-I: saliva estimulada con inhibidor; SNE-I: saliva no estimulada con inhibidor; AE: actividad esterásica; SD: desviación estándar; %AE: porcentaje de actividad esterásica; 4-NPA: 4-nitrofenil acetato; 4-NPB:4-nitrofenil butirato; 4-NPH:4-nitrofenil hexanoato; 4-NPO: 4-nitrofenil octanoato; 4-NPD: 4-nitrofenil decanoato; 4-NPDD: 4-nitrofenil dodecanoato.

Tabla 13. Resultados de los ensayos del estudio de saliva no estimulada (SNE) en todos los sustratos, en presencia y en presencia y ausencia de inhibidor B4NP 0.1 mM. Valores de la media de actividad esterásica (AE), desviación estándar (SD) y porcentaje de actividad esterásica (% AE)

Sustrato	Muestra	Media de AE	SD	% AE
NPA	SNE	0.94	0.315	100
	SNE-I	0.184	0.024	19.60
NPB	SNE	2.590	0.226	100
	SNE-I	0.148	0.030	5.70
NPH	SNE	1.225	0.094	100
	SNE-I	0.137	0.037	11.19
NPO	SNE	0.457	0.009	100
	SNE-I	0.119	0.045	25.95

NPD	SNE	0.179	0.013	100
	SNE-I	0.078	0.004	43.27
NPDD	SNE	0.029	0.032	100
	SNE-I	0.074	0.077	258.03

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; SE-I: saliva estimulada con inhibidor; SNE-I: saliva no estimulada con inhibidor; AE: actividad esterásica; SD: desviación estándar; %AE: porcentaje de actividad esterásica; 4-NPA: 4-nitrofenil acetato; 4-NPB:4-nitrofenil butirato; 4-NPH:4-nitrofenil hexanoato; 4-NPO: 4-nitrofenil octanoato; 4-NPD: 4-nitrofenil decanoato; 4-NPDD: 4-nitrofenil dodecanoato.

Los resultados sobre saliva estimulada y no estimulada obtenidos en la **Tabla 12** y **13**, y su representación en la **Figura 11**, mostraron cómo a medida que aumentaba la cadena del sustrato, el poder inhibitor del B4NP 0.1 mM también aumentaba proporcionalmente, con excepción una vez más del sustrato 4-NPA.

4.3. Variación del pH tras la ingesta de vino

Los resultados del experimento sobre cómo afectaba la ingesta de vino sobre el pH salivar se muestran en la **Tabla 14** y **Figura 12**.

Tabla 14. Valores de pH de los tres individuos y de la media de pH tras la ingesta de vino a t=antes del enjuague, t=0, t=30, t=60, t=90 y t=120

Tiempo (s)	pH Ind#1	pH Ind#2	pH Ind#3	pH Media
Antes del enjuague	6.78	6.4	6.9	6.693
0	6.68	4.8	5.4	5.627
30	6.99	4.9	6.9	6.263
60	7.3	5.4	7.2	6.633
90	7.6	5.8	7.2	6.867
120	5.7	6	7.4	6.367

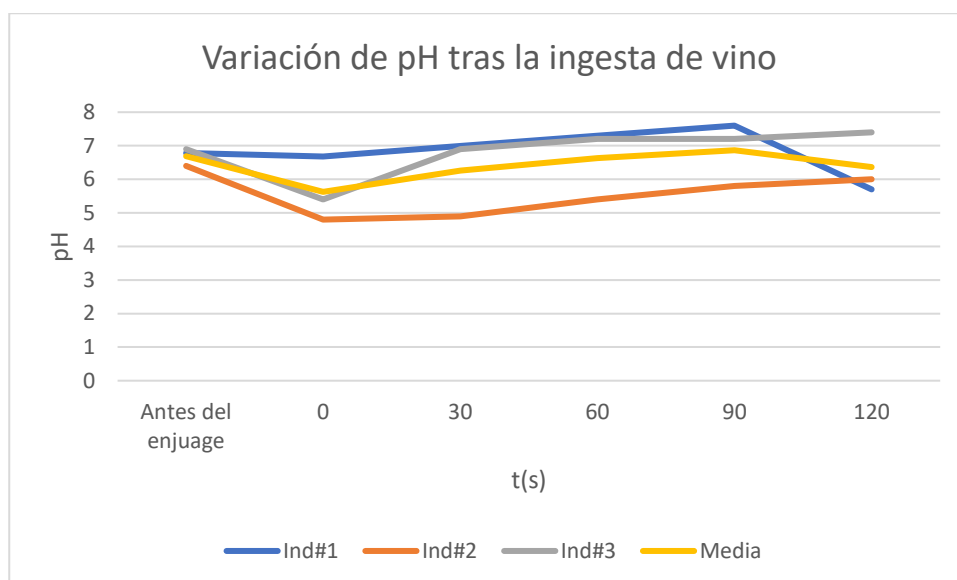


Figura 12. Gráfico de los valores de la variación del pH tras la ingesta de vino

En la **Tabla 14** y **Figura 12**, los resultados muestran que la ingesta de vino produce un descenso del pH hasta 5, y como su recuperación a valores basales se produce al cabo de 30-60 segundos. No obstante, la recuperación del pH de la saliva depende del individuo también.

4.4. Efecto inhibitor de los polifenoles presentes en el vino tinto

Tras la obtención de los resultados del efecto inhibitor del B4NP 0.1 mM (**Tabla 13**) sobre cada sustrato, se utilizó como control positivo de inhibición para los ensayos de inhibición con polifenoles (C: catequina, Q: quercetina, K: kaempferol, M: miricetina y R: resveratrol). De esta forma se podía comprobar el efecto inhibitor de estos polifenoles en relación al control positivo, que se ha confirmado en la literatura que es un inhibitor de enzimas esterásicas. Los resultados de este ensayo se muestran en la **Tabla 15** y la **Figura 13**.

Tabla 15. Resultados obtenidos de los ensayos de los polifenoles con inhibitor B4NP 0.1 Mm (I) y con cada sustrato (4- NPA, 4-NPB, 4-NPH, 4-NPO, 4-NPD, 4-NPDD) en muestras de saliva estimulada y saliva no estimulada. Valores de la media de actividad esterasa, desviación estándar y del porcentaje de activada esterasa

4-NPA							
Muestra	Media AE	SD	% AE	Muestra	Media AE	SD	% AE
SE	1.018	0.117	100	SNE	0.717	0.015	100
SE-I	0.272	0.031	26.70	SNE-I	0.168	0.014	23.37
SE-C	0.534	0.070	52.42	SNE-C	0.331	0.030	46.13
SE-Q	0.527	0.059	51.77	SNE-Q	0.319	0.029	44.46

SE-K	0.600	0.048	58.93	SNE-K	0.399	0.032	55.58
SE-M	0.610	0.022	59.88	SNE-M	0.452	0.070	62.98
SE-R	0.786	0.035	77.22	SNE-R	0.623	0.079	86.95
4-NPB							
Muestra	Media AE	SD	% AE	Muestra	Media AE	SD	% AE
SE	3.318	0.085	100	SNE	2.430	0.067	100
SE-I	0.300	0.012	9.03	SNE-I	0.169	0.008	6.94
SE-C	1.636	0.182	49.31	SNE-C	0.899	0.112	37.00
SE-Q	1.682	0.313	50.70	SNE-Q	1.180	0.144	48.53
SE-K	2.066	0.172	62.27	SNE-K	1.231	0.100	50.66
SE-M	2.220	0.250	66.90	SNE-M	1.394	0.033	57.37
SE-R	2.377	0.327	71.64	SNE-R	1.467	0.037	60.35
4-NPH							
Muestra	Media AE	SD	% AE	Muestra	Media AE	SD	% AE
SE	1.855	0.240	100	SNE	1.292	0.096	100
SE-I	0.200	0.033	10.76	SNE-I	0.111	0.015	8.58
SE-C	0.896	0.035	48.29	SNE-C	0.402	0.044	31.15
SE-Q	0.956	0.007	51.53	SNE-Q	0.520	0.011	40.23
SE-K	1.175	0.023	63.34	SNE-K	0.666	0.035	51.57
SE-M	1.507	0.197	81.23	SNE-M	0.764	0.024	59.19
SE-R	1.490	0.248	80.34	SNE-R	1.114	0.076	86.28
4-NPO							
Muestra	Media AE	SD	% AE	Muestra	Media AE	SD	% AE
SE	0.799	0.044	100	SNE	0.450	0.009	100
SE-I	0.172	0.004	21.51	SNE-I	0.087	0.011	19.29
SE-C	0.337	0.039	42.13	SNE-C	0.125	0.016	27.72
SE-Q	0.450	0.010	56.31	SNE-Q	0.213	0.012	47.33
SE-K	0.527	0.068	65.88	SNE-K	0.259	0.030	57.57
SE-M	0.583	0.026	72.89	SNE-M	0.303	0.020	67.33
SE-R	0.613	0.012	76.64	SNE-R	0.262	0.026	58.26
4-NPD							
Muestra	Media AE	SD	% AE	Muestra	Media AE	SD	% AE
SE	0.288	0.004	100	SNE	0.170	0.019	100
SE-I	0.092	0.006	31.74	SNE-I	0.075	0.008	43.74
SE-C	0.083	0.010	28.87	SNE-C	0.000	0.000	0.00
SE-Q	0.137	0.025	47.35	SNE-Q	0.095	0.000	55.97
SE-K	0.182	0.013	63.27	SNE-K	0.118	0.023	69.18
SE-M	0.209	0.011	72.38	SNE-M	0.127	0.004	74.56
SE-R	0.193	0.019	66.95	SNE-R	0.107	0.013	62.95
4-NPDD							

Muestra	Media AE	SD	% AE	Muestra	Media AE	SD	% AE
SE	0.104	0.016	100	SNE	0.006	0.003	100
SE-I	0.111	0.020	105.85	SNE-I	0.019	0.002	321.30
SE-C	0.046	0.002	43.59	SNE-C	0.000	0.000	0.00
SE-Q	0.133	0.009	127.83	SNE-Q	0.088	0.016	1466.67
SE-K	0.101	0.008	96.81	SNE-K	0.044	0.004	736.11
SE-M	0.080	0.014	76.64	SNE-M	0.017	0.008	277.78
SE-R	0.103	0.009	98.56	SNE-R	0.079	0.028	1312.50

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; SE-I: saliva estimulada con inhibidor; SNE-I: saliva no estimulada con inhibidor; C: catequina; Q: quercetina; K: kaempferol; M: miricetina; R: resveratrol AE: actividad esterásica; SD: desviación estándar; %AE: porcentaje de actividad esterásica; 4-NPA: 4-nitrofenil acetato; 4-NPB:4-nitrofenil butirato; 4-NPH:4-nitrofenil hexanoato; 4-NPO: 4-nitrofenil octanoato; 4-NPD: 4-nitrofenil decanoato; 4-NPDD: 4-nitrofenil dodecanoato.

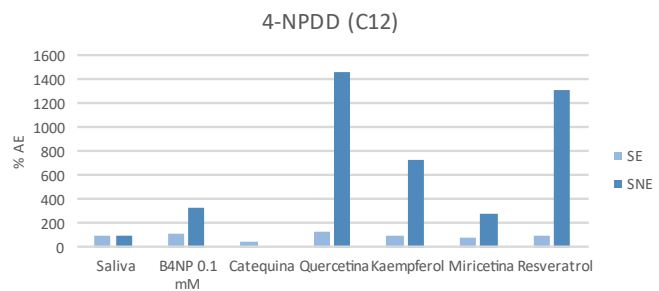
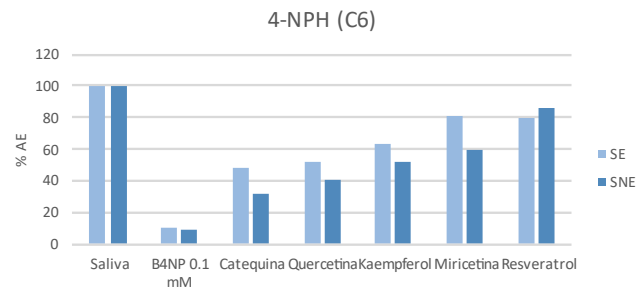
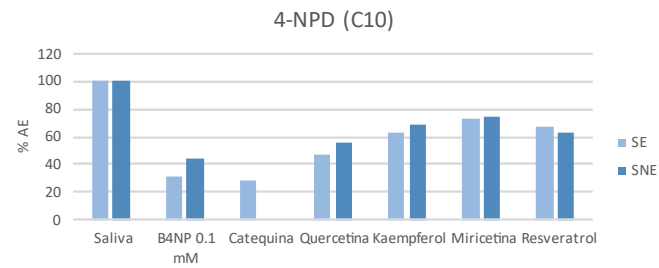
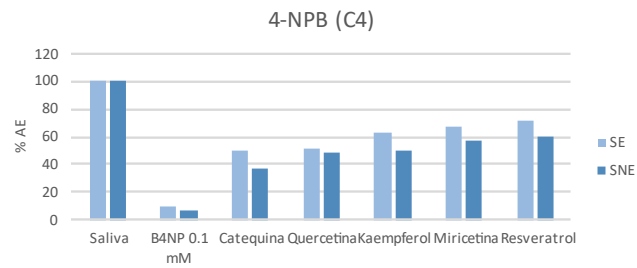
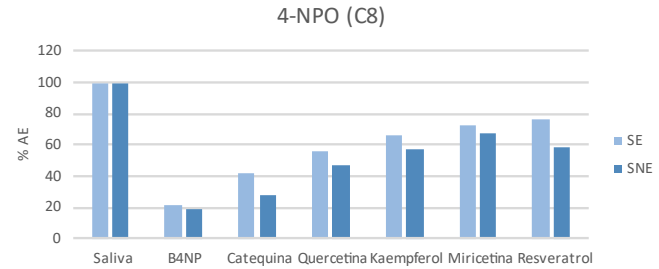
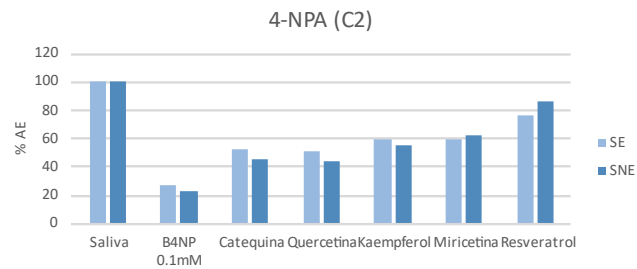


Figura 13. Porcentajes de la actividad total de esterasa salivar (%TSEA) de la saliva estimulada y no estimulada en presencia de polifenoles presentes en el vino tinto, reaccionando con cada uno de los sustratos (4-NPA, 4-NPB, 4-NPH, 4-NPO, 4-NPD Y 4-NPDD).

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; %AE: porcentaje de actividad esterásica; B4NP: Bis(4-Nitrophenil) Phosphate

Como se muestran en los gráficos de la **Figura 13**, se puede apreciar como existe un efecto inhibitor de los compuestos fenólicos sobre la TSEA, tanto en la saliva estimulada como en la saliva no estimulada; siendo la catequina el compuesto que más inhibición ejerce desde un 50% con el sustrato 4-NPA hasta un 70% con el sustrato 4-NPD. También los valores de media de AE vuelven a reflejar cómo a medida que aumentamos la cadena de carbonos del sustrato, la AE disminuye proporcionalmente, excepto en el caso del sustrato de 4-NPA, siendo con el sustrato NPB donde se recogieron los valores media más altos de AE. Tras el estudio de todos estos resultados, se decidió elegir la catequina y el sustrato 4-NPB, para la realización de los últimos ensayos, más próximos a las condiciones de consumo de vino.

4.5. Efecto inhibitor de los compuestos fenólicos del vino tinto en condiciones de consumo

El ensayo realizado, permitió examinar si la TSEA que había sido estudiada durante los ensayos realizados a pH=7 (salivar), seguía actuando a condiciones de pH=5, que como se mostró en la sección anterior (**Figura 12**) es el pH de la saliva tras la ingesta del vino. Además, se ensayó el efecto inhibitor considerando un grado alcohólico del 12% vol. (típico del contenido de etanol del vino). Para ello se preparó un ensayo donde se comparó la TSEA sin catequina y sin etanol, la TSEA sin catequina y con etanol, la TSEA con catequina y sin etanol, y la TSEA con catequina y con etanol. A su vez cada una de estas muestras se realizaron a pH= 7 (salivar) y a pH=5 (condiciones de consumo de vino). Para este ensayo sólo se empleó como sustrato, el 4-NPB, para el que la actividad esterásica mostró una gran especificidad. Los resultados de este ensayo se muestran en la **Tabla 16**, y gráficamente en la **Figura 14** y **15**.

Tabla 16. Datos recogidos en los ensayos

Muestras	Media AE	SD	AE%	Muestras	Media AE	SD	AE%
SE	2.336	0.307	100	SNE	1.738	0.047	100
SE-12%	1.660	0.116	71.08	SNE-12%	1.490	0.068	85.77
SE-B4NP	0.266	0.018	11.39	SNE-B4NP	0.159	0.002	9.13
SE-B4NP-12%	0.179	0.013	7.67	SNE-B4NP-12%	0.130	0.012	7.50
SE-B4NP-pH5	0.092	0.026	3.92	SNE-B4NP-pH5	0.005	0.000	0.32
SE-B4NP-pH5-12%	0.044	0.047	1.88	SNE-B4NP-pH5-12%	0.000	0.000	0.00
SE-C	1.669	0.039	71.43	SNE-C	1.368	0.043	78.72
SE-C-12%	1.394	0.044	59.68	SNE-C-12%	1.178	0.033	67.81
SE-C-pH5	0.162	0.002	6.91	SNE-C-pH5	0.047	0.007	2.69
SE-C-pH5-12%	0.226	0.009	9.68	SNE-C-pH5-12%	0.046	0.019	2.63
SE-pH5	0.196	0.005	8.39	SNE-pH5	0.055	0.004	3.17
SE-pH5-12%	0.201	0.025	8.61	SNE-pH5-12%	0.062	0.003	3.58

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; C: catequina; B4NP: Bis(4-Nitrophenil) Phosphate; AE: actividad esterásica; SD: desviación estándar; %AE: porcentaje de actividad esterásica

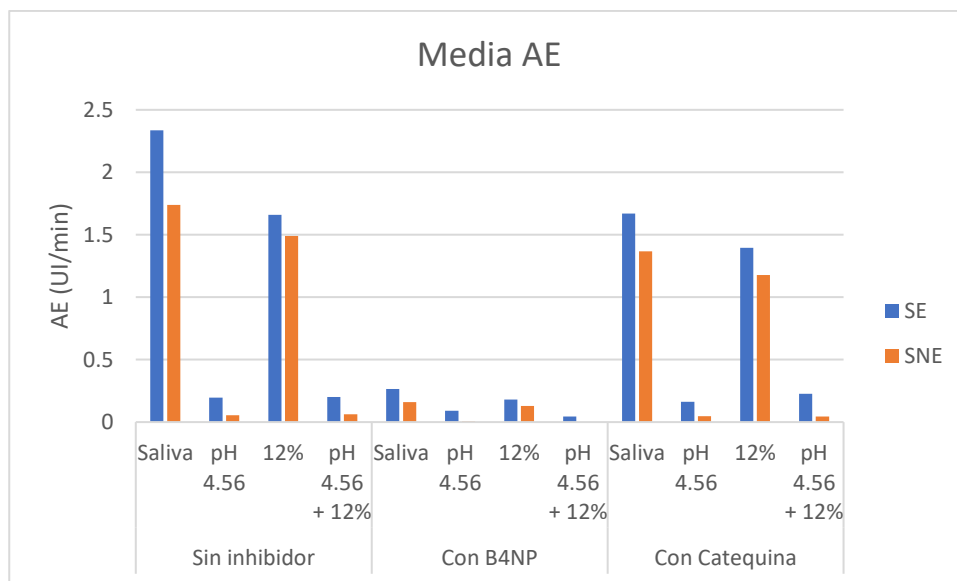


Figura 14. Gráfico de los valores de media AE en los ensayos realizados con inhibidor, etanol, catequina, a pH=7 y a pH=5, y con el sustrato 4-NPB.

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; B4NP: Bis(4-Nitrophenil) Phosphate; AE: actividad esterásica; SD: desviación estándar; %AE: porcentaje de actividad esterásica

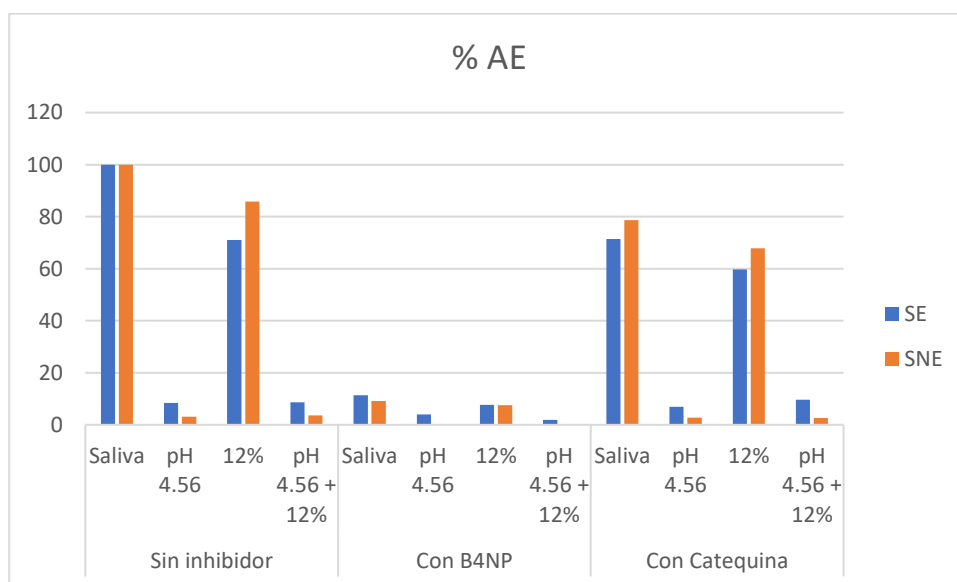


Figura 15. Gráfico de los porcentajes de AE en los ensayos realizados con inhibidor, etanol, catequina, a pH=7 y a pH=5, y con el sustrato 4-NPB.

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; B4NP: Bis(4-Nitrophenil) Phosphate; AE: actividad esterásica; SD: desviación estándar; %AE: porcentaje de actividad esterásica

Los resultados mostraron cómo la TSEA a pH=7 en presencia de etanol, sin catequina y con ausencias de inhibidor, seguía actuando al margen de la presencia del 12% vol. de alcohol. La actividad en salivas estimuladas era de un 30% inferior, y en las salivas no estimuladas solo se reducía un 15%. La TSEA se comportaba de la misma manera en presencia de catequina, sin etanol y con ausencia de inhibidor, a un pH=7. La saliva estimulada disminuía un 30% y la saliva estimulada un 20%. Los resultados obtenidos de las muestras en presencia de etanol y de catequina, con ausencia de inhibidor, a un pH=7 confirmaron los resultados anteriores. La TSEA obtenida disminuía un 10% con respecto a los datos anteriores siendo: en salivas estimuladas una disminución del 40% y 30% en salivas no estimuladas.

Por otro lado, los ensayos realizados, donde se disminuyó el pH a 5, mostraron una inhibición superior del 90%, tanto en saliva estimulada como en saliva no estimulada. Todas las muestras que fueron sometidas a pH=5, con y sin etanol, con o sin catequina, y con o sin inhibidor, mostraron ese efecto inhibitorio.

4.5.1. Ensayo con sustratos de mayor y menor cadena a distintos pHs

Además, como ensayo complementario, se examinó el efecto que ejercía un rango de pHs determinados sobre la TEA de dos sustratos: uno de cadena corta (4-NPB) y otro de cadena larga (4-NPO). Los resultados se representaron en la **Figura 16 y 17**.

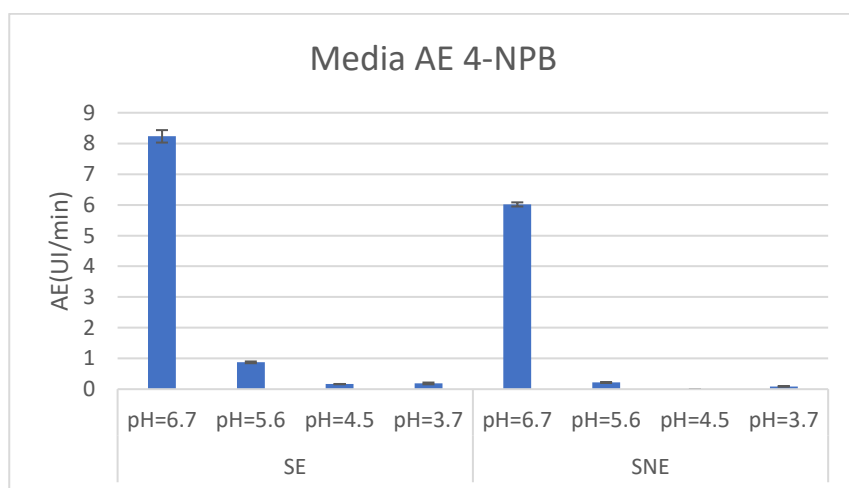


Figura 16. Valores de media de la actividad esterasa con 4-NPB a pH=6.7, pH=5.6, pH=4.5 y pH=3.7, en muestras de saliva estimulada y no estimulada

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; AE: actividad esterásica

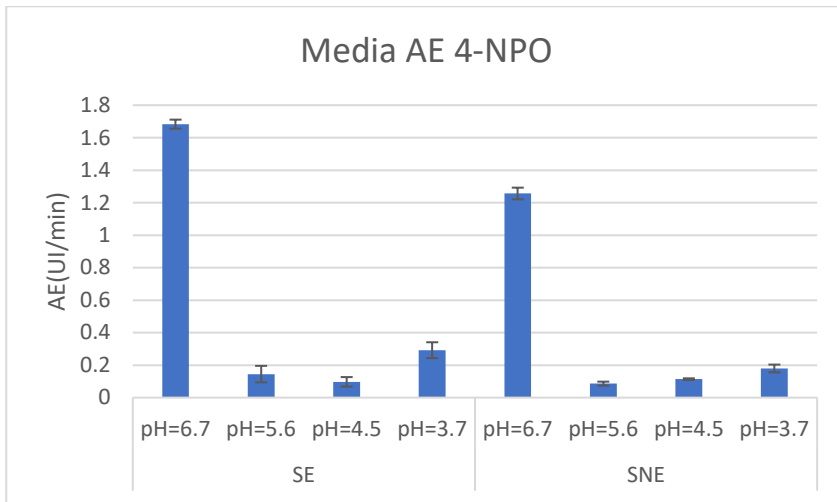


Figura 17. Valores de media de la actividad esterasa con 4-NPO a pH=6.7, pH=5.6, pH=4.5 y pH=3.7, en muestras de saliva estimulada y no estimulada.

SE: saliva estimulada; SNE: saliva no estimulada; AE: actividad esterásica

Los resultados de este ensayo determinaron que la TSEA de ambos sustratos, 4-NPB y 4-NPO, se reducía drásticamente cuando el pH disminuía de 6.7.

5. CONCLUSIONES

1. La actividad total de esterasa salivar es diferente en saliva estimulada y saliva no estimulada, siendo mayor la actividad esterasa en la saliva estimulada
2. El inhibidor de enzimas esterasas comercial Bis(4-Nitrophenil) Phosphate (B4NP) no aumenta su grado efecto inhibidor conforme aumenta su concentración, siendo 0.1 mM su concentración máxima a la cual reduce un efecto inhibidor de la actividad esterásica de un 65%.
3. La TSEA se ve afectada según la longitud de la cadena de carbonos del sustrato, siendo mayor con sustratos de cadena corta (4-NPB, 4-NPH) y menor con sustratos de cadena larga (4-NPO, 4-NPD, 4-NPDD), a excepción del 4-NPA que presenta una TSEA inferior.
4. El efecto inhibidor del inhibidor comercial B4NP aumenta proporcionalmente según aumenta la cadena de carbonos del sustrato.
5. La catequina es el compuesto fenólico de los estudiados (catequina, quercetina, kaempferol, miricetina y resveratrol) que mayor efecto inhibidor produjo sobre la actividad esterásica.
6. La ingesta de vino produce un descenso del pH de la saliva (pH=5.5), pero la recuperación a su pH basal se produce en pocos segundos.
7. En condiciones más próximas a las de consumo de vino, es decir, en presencia de 12% de etanol, catequina y pH de 5, la actividad esterásica salivar se reduce un 95% comparado con la actividad esterásica de la saliva inicial.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Bendicho, S., Trigueros, M.C., Hernández, T., Martín, O., 2001. Validation and Comparison of Analytical Methods Based on the Release of p-Nitrophenol to Determine Lipase Activity in Milk. *Journal of Dairy Science* 84, 1590–1596. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74592-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74592-4)
- Canon, F., Neiers, F., Guichard, E., 2018. Saliva and Flavor Perception: Perspectives. *J. Agric. Food Chem.* 66, 7873–7879. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01998>
- Denny, P., Hagen, F.K., Hardt, M., Liao, L., Yan, W., Arellano, M., Bassilian, S., Bedi, G.S., Boontheung, P., Cociorva, D., Delahunty, C.M., Denny, T., Dunsmore, J., Faull, K.F., Gilligan, J., Gonzalez-Begne, M., Halgand, F., Hall, S.C., Han, X., Henson, B., Hewel, J., Hu, S., Jeffrey, S., Jiang, J., Loo, J.A., Ogorzalek Loo, R.R., Malamud, D., Melvin, J.E., Miroschnyenko, O., Navazesh, M., Niles, R., Park, S.K., Prakobphol, A., Ramachandran, P., Richert, M., Robinson, S., Sondej, M., Souda, P., Sullivan, M.A., Takashima, J., Than, S., Wang, J., Whitelegge, J.P., Witkowska, H.E., Wolinsky, L., Xie, Y., Xu, T., Yu, W., Ytterberg, J., Wong, D.T., Yates, J.R., Fisher, S.J., 2008. The Proteomes of Human Parotid and Submandibular/Sublingual Gland Salivas Collected as the Ductal Secretions. *J. Proteome Res.* 7, 1994–2006. <https://doi.org/10.1021/pr700764j>
- Esteban-Fernández, A., Rocha, N., Pérez-Jiménez, M., Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bayón, M.Á., 2016a. Adsorción y liberación de compuestos del aroma del vino a la mucosa oral. <https://doi.org/10.13039/501100003329>
- Esteban-Fernández, A., Rocha-Alcubilla, N., Muñoz-González, C., Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bayón, M.Á., 2016b. Intra-oral adsorption and release of aroma compounds following in-mouth wine exposure. *Food Chemistry* 205, 280–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.030>
- Gomar-Vercher, S., Simón-Soro, A., Montiel-Company, J.M., Almerich-Silla, J.M., Mira, A., 2018. Stimulated and unstimulated saliva samples have significantly different bacterial profiles. *PLOS ONE* 13, e0198021. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198021>
- Guichard, E., 2006. Flavour retention and release from protein solutions. *Biotechnology Advances* 24, 226–229. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.11.003>
- Humphrey, S.P., Williamson, R.T., 2001. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *Journal of Prosthetic Dentistry* 85, 162–169. <https://doi.org/10.1067/mpr.2001.113778>
- Lubbers, S., Landy, P., Voilley, A., 1998. Retention and release of aroma compounds in foods containing proteins. *undefined*.
- Mizrahi, A., Vinograd, A., 2020. Chapter 11 - Synaptogenesis in the adult CNS—olfactory system, in: Rubenstein, J., Rakic, P., Chen, B., Kwan, K.Y., Cline, H.T., Cardin, J. (Eds.), *Synapse Development and Maturation*. Academic Press, pp. 255–274. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823672-7.00011-9>
- Muñoz González, C., 2014. Influencia de la matriz vínica y de parámetros oro-fisiológicos en la liberación del aroma del vino: impacto en el aroma retronasal.
- Muñoz-González, C., Feron, G., Guichard, E., Rodríguez-Bencomo, J.J., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., Pozo-Bayón, M.Á., 2014. Understanding the Role of Saliva in Aroma Release from Wine by Using Static and Dynamic Headspace Conditions. *J. Agric. Food Chem.* 62, 8274–8288. <https://doi.org/10.1021/jf503503b>
- Neyraud, E., 2014. Role of Saliva in Oral Food Perception. *Saliva: Secretion and Functions* 24, 61–70. <https://doi.org/10.1159/000358789>
- Neyraud, E., Palicki, O., Schwartz, C., Nicklaus, S., Feron, G., 2012. Variability of human saliva composition: Possible relationships with fat perception and liking. *Archives of Oral Biology* 57, 556–566. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.09.016>

- Özay, H., Çakır, A., Ecevit, M.C., 2019. Retronasal Olfaction Test Methods: A Systematic Review. *Balkan Med J* 36, 49–59. <https://doi.org/10.4274/balkanmedj.2018.0052>
- Pérez Jiménez, M., Chaya, C., Pozo-Bayón, M., 2019. Individual differences and effect of phenolic compounds in the immediate and prolonged in-mouth aroma release and retronasal aroma intensity during wine tasting. *Food Chemistry* 285. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.152>
- Pérez Jiménez, M., Muñoz-González, Carolina, Pozo-Bayón, María Ángeles, 2020. Understanding human salivary esterase activity and its variation under wine consumption conditions†. *RSC Adv.* 10, 24352–24361. <https://doi.org/10.1039/D0RA04624H>
- Pérez-Jiménez, M., 2015. Impacto de los polifenoles en la capacidad de adsorción de moléculas del aroma a la cavidad oral y su relación con la percepción de la intensidad del aroma del vino.
- Pérez-Martín, F., Seseña, S., Izquierdo, P.M., Palop, M.L., 2013. Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines. *International Journal of Food Microbiology* 163, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.024>
- Ployon, S., Morzel, M., Canon, F., 2017. The role of saliva in aroma release and perception. *Food Chemistry* 226, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.055>
- Sánchez-Patán, F., Cueva, C., Monagas, M., Walton, G.E., Gibson M., G.R., Quintanilla-López, J.E., Lebrón-Aguilar, R., Martín-Álvarez, P.J., Moreno-Arribas, M.V., Bartolomé, B., 2012. In Vitro Fermentation of a Red Wine Extract by Human Gut Microbiota: Changes in Microbial Groups and Formation of Phenolic Metabolites. *J. Agric. Food Chem.* 60, 2136–2147. <https://doi.org/10.1021/jf2040115>
- Schipper, R.G., Silletti, E., Vingerhoeds, M.H., 2007. Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology* 52, 1114–1135. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.06.009>
- Slotnick, B., 2021. Olfactory perception.
- Sterri, S.H., Johnsen, B.A., Fonnum, F., 1985. A radiochemical assay method for carboxylesterase, and comparison of enzyme activity towards the substrates methyl [1-14C] butyrate and 4-nitrophenyl butyrate. *Biochemical Pharmacology* 34, 2779–2785. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(85\)90579-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(85)90579-9)
- Tecles, F., Tvarijonavičiute, A., Torre, C.D., Carrillo, J.M., Rubio, M., García, M., Cugat, R., Cerón, J.J., 2016. Total esterase activity in human saliva: Validation of an automated assay, characterization and behaviour after physical stress. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 76, 324–330. <https://doi.org/10.3109/00365513.2016.1163417>