



VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA

CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Estudio de las interacciones supramoleculares entre  
compuestos fenólicos y proteínas salivales y su  
relación con la astringencia

Study of the supramolecular interactions between  
phenolic compounds and salivary proteins and their  
relationship with astringency

Facultad de Farmacia

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología  
(Grupo de Investigación en Polifenoles)

Alba María Ramos Pineda

2019



La Dra. M<sup>a</sup> Teresa Escribano Bailón, Profesora Titular del Área de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Salamanca, y el Dr. Ignacio García Estévez, directores del trabajo "*Estudio de las interacciones supramoleculares entre compuestos fenólicos y proteínas salivales y su relación con la astringencia*", realizado por **Alba María Ramos Pineda** para optar al título de Doctor por la Universidad de Salamanca, AUTORIZAN la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 20 de marzo de 2019



Para la realización de este trabajo se ha contado con las siguientes ayudas institucionales:

- Ayuda para Contratos Predoctorales para la Formación de Doctores (FPI). Ref. BES-2015-071948. Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.
- Proyecto de investigación “Evaluación de estrategias tecnológicas adaptativas para vinificación en condiciones de cambio climático” (AGL2014-58486-C2-1-R) Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.
- Proyecto de investigación “Bases moleculares para la interpretación de la astringencia y de su modulación mediante el uso de biopolímeros” (AGL2017-84793-C2-1-R) Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.
- FEDER-Interreg España-Portugal Programme (Ref. 0377\_IBERPHENOL\_6\_E)



Me gustaría comenzar mostrando mi agradecimiento a los directores de este trabajo, María Teresa Escribano Bailón e Ignacio García Estévez, gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de este grupo de investigación. Ha sido un placer trabajar con vosotros día a día, ayudándome a formarme y progresar en este complicado mundo. Gracias por transmitirme el esfuerzo y dedicación, pero sobretodo la ilusión con la que afrontáis cada proyecto, sois un gran ejemplo a seguir.

Del mismo modo me gustaría agradecer a Julián Rivas Gonzalo, que también comenzó siendo director de esta tesis, su participación en las primeras etapas de este trabajo. Incluso después de su jubilación ha seguido de cerca todos mis progresos, mostrándome su interés y apoyo.

También quiero dar las gracias a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de esta Tesis, especialmente a todos mis compañeros del departamento, que durante estos años se han convertido en mi segunda familia. Gracias por los cafés de cada día, todas las celebraciones (que no han sido pocas), las cañas de los viernes, las cenas navideñas, las comidas del mediodía en el laboratorio, y muchos otros momentos compartidos.

Muchas gracias a todos: Ana, Susana, Tino, Pilar, Milagros, Cesar, Alfonso, Rafael, Concha y María Jesús; ha sido un placer compartir estos años con vosotros, gracias por vuestro interés, cercanía y amabilidad. Gracias a María José y José Joaquín por vuestra disponibilidad y ayuda, por estar siempre ahí salvándonos de cualquier apuro. Gracias a Begoña, Sofía y Eva, por los momentos compartidos, tanto dentro como fuera del laboratorio, por hacerlo todo más divertido. Gracias también a todos los que han pasado por el departamento durante más o menos tiempo, por hacernos aprender de otros países.

Igualmente, quiero mostrar un especial agradecimiento a todos mis compañeros de grupo con los que he trabajado más estrechamente: Montse, Rebeca, Elvira, SiYu, Cristina y, por supuesto, Maite y Nacho. Gracias por haber sido el mejor equipo que podía tener, por ayudarme siempre que lo he necesitado, por animarme en esos momentos más complicados

y por todas las conversaciones del día a día. Por todas las horas de laboratorio, pero también por los viajes y congresos y otros momentos más ociosos. Gracias por estar siempre con una sonrisa; ha sido muy fácil y agradable trabajar con vosotros.

Gracias al Dr Carpenter y la unidad del Salivary Research Group por aceptar mi estancia de cuatro meses en su grupo y poner a mi disposición todas las instalaciones para realizar mis experimentos, y darme la oportunidad de vivir esa experiencia.

Pero no podía olvidarme de agradecer el apoyo de muchas otras personas que han estado ahí durante estos años de Tesis. Quiero dedicar de forma especial este trabajo a mi familia, principalmente a mis padres; gracias por transmitirme los mejores valores personales, por vuestra educación y vuestros esfuerzos por darme todo lo mejor. Gracias por haberme apoyado en cada paso que he dado, por estar siempre ahí, pase lo que pase. Sin vosotros no habría llegado a ser quien soy. Gracias también al resto de mi familia, mi hermano, mis primos, tíos, abuelos... por vuestro cariño, confianza y mostrarme vuestro orgullo por cada logro.

Gracias también a mis amigos, por interesarse y tratar de entender “esas cosas raras de la saliva”, especialmente a Alicia, que siempre ha seguido ahí desde nuestros inicios como “científicas”, demostrándome que se siente orgullosa de cada uno de mis pequeños triunfos.

Gracias a ti Pedro, por todo lo que me aportas día a día, que sería imposible describir en unas líneas. Gracias por compartir y celebrar cada uno de los pasos que voy dando, pero también por ayudarme a levantarme cada vez que me tropiezo en el camino. Gracias por esforzarte por entender a qué nos dedicamos los investigadores, y por tu interés por saber “qué es eso de la astringencia” e incluso tratar de entender mis publicaciones. Gracias por ser esa pieza fundamental en mi vida.

Esta tesis tiene un pedacito de cada uno de vosotros. GRACIAS.



“Después de todo, ¿qué es un científico entonces? Es un hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede.”  
Jacques Yves Cousteau



# TABLA DE CONTENIDO





<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
<b>I. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS UVAS Y EL VINO.....</b>	<b>5</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	5
2. FLAVONOIDES .....	7
2.1. Flavonoles .....	8
2.2. Flavanoles .....	10
2.3. Antocianos.....	11
3. NO FLAVONOIDES.....	16
3.1. Ácidos fenólicos.....	17
3.2. Estilbenos .....	19
4. TANINOS.....	20
4.1. Taninos hidrolizables.....	21
4.2. Taninos condensados .....	21
<b>II. PROTEÍNAS DE LA SALIVA .....</b>	<b>25</b>
1. ASPECTOS GENERALES DE LA SALIVA.....	25
2. COMPONENTES DE LA SALIVA.....	27
2.1. Proteínas ricas en prolina (PRPs).....	30
2.1.1. Proteínas ricas en prolina básicas (bPRPs y gPRPs).....	31
2.1.2. Proteínas ricas en prolina ácidas (aPRPs) .....	32
2.2. Histatínas.....	33
2.3. Cistatínas .....	34
2.4. Estaterina.....	35
2.5. Otras proteínas y péptidos.....	36

<b>III. ASTRINGENCIA.....</b>	<b>38</b>
1. INTRODUCCIÓN.....	38
2. MECANISMOS DE ASTRINGENCIA.....	39
2.1. La astringencia como sensación táctil.....	42
2.2. La astringencia como sensación gustativa .....	45
3. INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS Y COMPUESTOS FENÓLICOS...	49
4. FACTORES QUE AFECTAN EN LA INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS Y COMPUESTOS FENÓLICOS .....	52
4.1. Estructura del tanino.....	52
4.2. Estructura de la proteína .....	54
4.3. Polisacáridos.....	55
4.3.1. Manoproteínas .....	57
4.3.2. Otros polisacáridos.....	58
4.4. Otros factores.....	59
<b>Publicación .....</b>	<b>63</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>79</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>83</b>
<b><u>BLOQUE I: ESTUDIO MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN ENTRE</u></b> <b>COMPUESTOS FENÓLICOS Y PROTEINAS: SINERGIAS DE</b> <b>ASTRINGENCIA.....</b>	<b>85</b>
<b>CAPÍTULO 1: EFECTO SINÉRGICO DE MEZCLAS DE FLAVANOLES EN</b> <b>EL FENÓMENO DE LA ASTRINGENCIA .....</b>	<b>87</b>
1.1. Objetivos.....	89
1.2. Resumen.....	90
1.3. Publicación.....	93

<b>CAPÍTULO 2: EFECTO SINÉRGICO DE LA MEZCLA DE FAMILIAS DE PRPs EN SU INTERACCIÓN CON FLAVANOLES .....</b>	<b>103</b>
2.1. Objetivos.....	105
2.2. Resumen.....	106
2.3. Publicación.....	109
<b><u>BLOQUE II: ESTRATEGIAS PARA LA MODULACIÓN DE LA ASTRINGENCIA.....</u></b>	<b>115</b>
<b>CAPÍTULO 3: EFECTO DE LA ADICIÓN DE MANOPROTEÍNAS EN LA INTERACCIÓN FLAVONOL-PROTEÍNA.....</b>	<b>117</b>
3.1. Objetivos.....	119
3.2. Resumen.....	120
3.3. Publicación.....	123
<b>CAPÍTULO 4: INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE OTRAS ESPECIES QUÍMICAS EN LAS INTERACCIONES TANINO-PROTEÍNA .....</b>	<b>131</b>
4.1. Objetivos.....	133
4.2. Resumen.....	134
4.3. Publicación.....	137
<b>SUMMARY .....</b>	<b>145</b>
<b>CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....</b>	<b>173</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>179</b>





# PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

La presente Memoria de Tesis está elaborada utilizando el formato de compendio de artículos/publicaciones establecido por la Comisión de Doctorado (15 de febrero de 2013) al amparo del Artículo 14 del Capítulo II del Reglamento de Doctorado de la Universidad de Salamanca (25 de octubre de 2011, modificado el 18 de julio de 2013). Los estudios realizados están enmarcados dentro de los proyectos de investigación “Evaluación de estrategias tecnológicas adaptativas para vinificación en condiciones de cambio climático” y “Bases moleculares para la interpretación de la astringencia y de su modulación mediante el uso de biopolímeros”, dando lugar a la siguiente producción científica a partir de la cual se ha elaborado esta memoria:

- Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., Brás, N. F., Martín del Valle, E. M., Dueñas, M., Escribano Bailón, M. T. Molecular approach to the synergistic effect on astringency elicited by mixtures of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2017**, 65, 6425-6433.
- Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., E. M., Dueñas, M., Escribano Bailón, M. T. 2018. Effect of the addition of mannoproteins on the interaction between wine flavonols and salivary proteins. *Food Chemistry*, **2018**, 264, 226-232.
- García-Estévez, I., Ramos-Pineda, A. M., Escribano Bailón, M. T. Interactions between wine phenolic compounds and human saliva in astringency perception. *Food & Function*, **2018**, 9, 1294-1309.
- Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., Soares, S., de Freitas, V., Dueñas, M., Escribano-Bailón, M. T. Synergistic effect of mixture of two proline-rich-protein

salivary families (aPRP and bPRP) on the interaction with wine flavanols. *Food Chemistry*, **2019**, 272, 210-215.

- Ramos-Pineda, A. M., Carpenter, G.H., García-Estévez, I., Escribano Bailón, M. T. Influence of Chemical Species on Polyphenol-Protein Interactions related to Wine Astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00527 (*aceptada para su publicación*).
- Escribano Bailón, M. T., Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I. Astringency and color of wine: role, significance, mechanism and methods of evaluation, In: *Winemaking: Fundamental and Applied Aspects*. CRC- Press Food Biology series. Taylor and Francis Group (en prensa).

# INTRODUCCIÓN





## **I. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE LAS UVAS Y EL VINO**

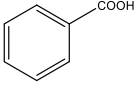
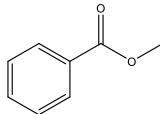
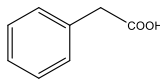
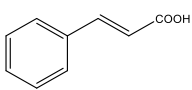
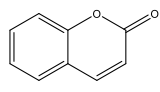
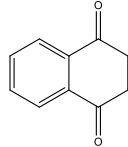
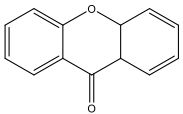
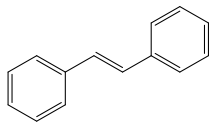
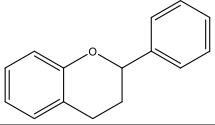
### **1. INTRODUCCIÓN (Bravo, 1998; Cheynier et al., 2003; Crozier et al., 2006; Kennedy, 2008)**

Los compuestos fenólicos son un grupo de metabolitos secundarios de las plantas ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Juegan un papel esencial en la fisiología de las plantas, participando en las etapas de crecimiento y reproducción, además de proporcionar resistencia ante patógenos y depredadores. Además, este complejo grupo de sustancias también tiene diversas aplicaciones industriales, siendo usados en la producción de pinturas, papel, cosméticos, tintes y colorantes, entre otros.

Durante años se ha investigado el papel de algunos de estos compuestos en la dieta humana. A pesar de no resultar esenciales, se ha demostrado que su ingesta puede resultar beneficiosa a largo plazo. Se ha estudiado su efecto sobre la incidencia de cáncer y otras enfermedades crónicas como diabetes tipo II, obesidad y enfermedades cardiovasculares. También resulta de gran interés su alta capacidad antioxidante que ha sido asociada con un efecto potencialmente beneficioso sobre la salud.

Desde el punto de vista químico, se caracterizan por tener un núcleo bencénico con uno o varios grupos hidroxilo. Se han descrito más de 8000 estructuras fenólicas pudiendo variar desde moléculas simples, como los ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. Aunque se han descrito numerosas clasificaciones, una de las más aceptada se basa en el número y disposición de sus átomos de carbono (**Tabla 1**).

**Tabla 1:** Estructura básica de los compuestos fenólicos

Nº de carbonos	Esqueleto	Clasificación	Estructura básica
7	C6-C1	Ácidos hidroxibenzoicos	
8	C6-C2	Acetofenonas	
8	C6-C2	Ácidos fenilacéticos	
9	C6-C3	Ácidos hidroxicinámicos	
9	C6-C3	Cumarinas	
10	C6-C4	Naftoquinonas	
13	C6-C1-C6	Xantonas	
14	C6-C2-C6	Estilbenos	
15	C6-C3-C6	Flavonoides	

Dentro de este amplio grupo de compuestos fenólicos, podemos distinguir dos categorías principales: flavonoides y no flavonoides. En las uvas, los flavonoides se distribuyen mayoritariamente entre los hollejos, semillas y raspones, mientras que los compuestos no flavonoides se localizan principalmente en la pulpa. Los flavonoides son los más numerosos y resultan de especial interés en los vinos, ya que se encuentran

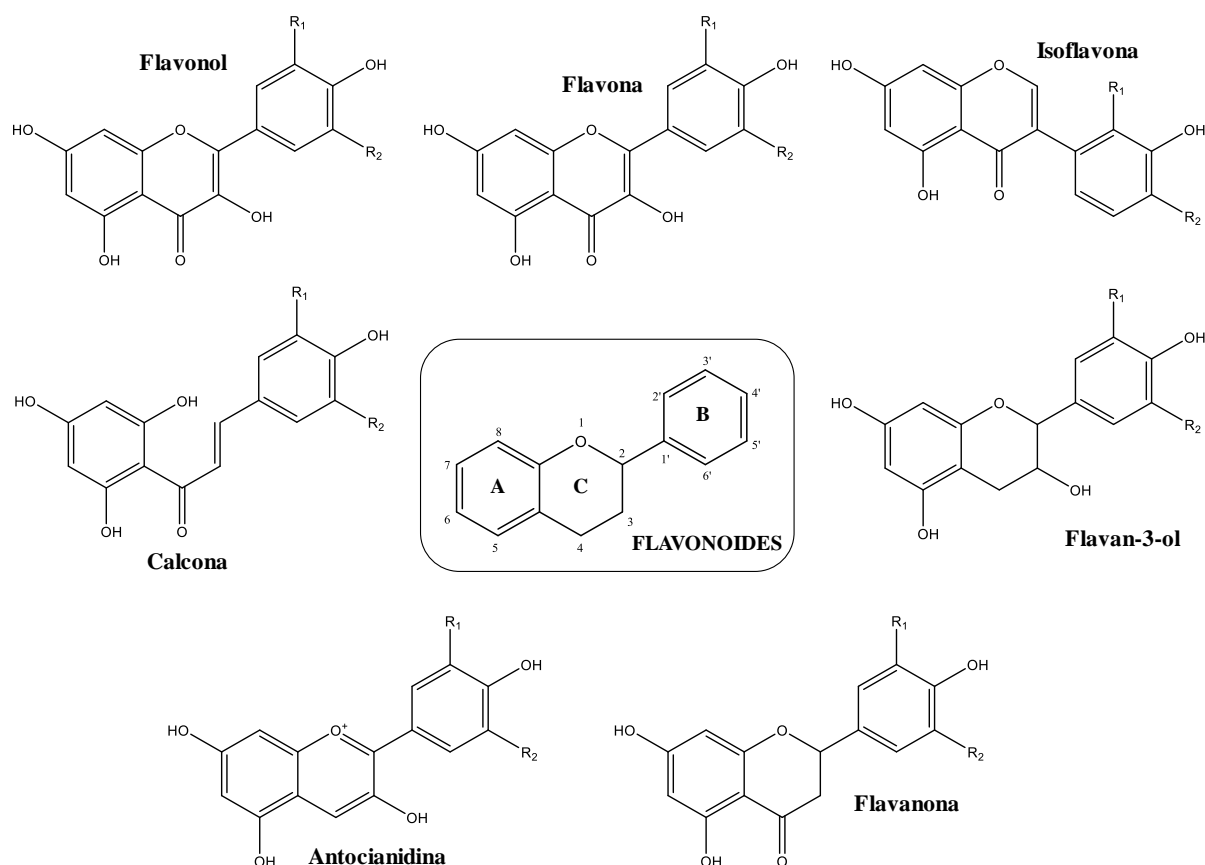
altamente relacionados con su calidad, contribuyendo a numerosas propiedades sensoriales como el color y la astringencia. Aunque la mayoría de los compuestos fenólicos que encontramos en el vino son extraídos de la uva durante el proceso de vinificación, algunos de ellos también pueden provenir de la madera de las propias barricas.

2. FLAVONOIDES (Cheynier, 2006; Cheynier et al., 2003; Crozier et al., 2006; Ribéreau-Gayon et al., 2003; Terrier et al., 2009)

Como se ha indicado anteriormente, los flavonoides son el grupo más numeroso dentro de los compuestos fenólicos. Se caracterizan por tener un esqueleto básico de 15 átomos de carbono (C6-C3-C6), estructurado en dos anillos fenólicos (anillos A y B) conectados entre sí por un esqueleto de tres átomos de carbono, que generalmente se encuentra formando un anillo heterocíclico (anillo C).

Las principales subclases de flavonoides aparecen representadas en la **Figura 1**: flavonas, isoflavonas, flavanonas, calconas, flavonoles, flavan-3-oles, y antocianidinas. De todos ellos, los más abundantes en las uvas y el vino son las antocianidinas y los flavanoles, aunque también encontramos ciertas cantidades de flavonoles y dihidroflavonoles. Muchos de estos compuestos pueden presentar diferentes sustituciones, generando de este modo gran diversidad de compuestos. Dentro de estas modificaciones se incluyen hidroxilación, metilación, glicosilación, acilación y polimerización.

## I. Los compuestos fenólicos de las uvas y el vino



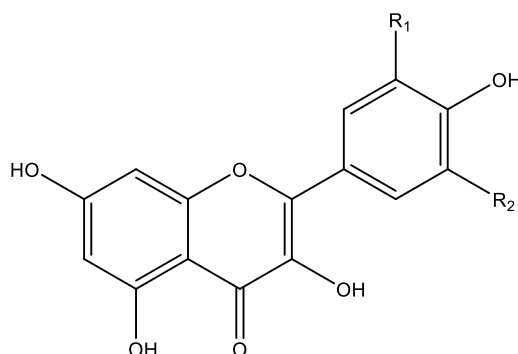
**Figura 1.** Estructuras generales de los principales flavonoides.

### 2.1. FLAVONOLES

Los flavonoles están presentes de forma abundante en la mayoría de las plantas, normalmente en su forma glicosilada. En la Figura 2 aparece representada su estructura básica y los seis principales flavonoles de la uva bajo su forma aglicona. La conjugación con el azúcar suele tener lugar en la posición 3 del anillo C, aunque pueden aparecer sustituciones en otras posiciones del anillo de carbono como en 5 y en 7, dando lugar a una gran variedad de flavonoles conjugados. En la uva se sintetizan principalmente en el hollejo, desde donde son extraídos durante las primeras etapas de la elaboración en los vinos tintos, ya que en el caso de los vinos blancos los hollejos no permanecen suficiente tiempo en contacto con el mosto para que tenga lugar su extracción. Aunque en menor



cantidad, también pueden encontrarse en hojas y en pulpa, pero no se han llegado a detectar en semillas.



FLAVONOLES	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Kaempferol	H	H
Quercetina	OH	H
Miricetina	OH	OH
Isoramnetina	OCH <sub>3</sub>	H
Laricitrina	OCH <sub>3</sub>	OH
Siringetina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Figura 2.** Estructura general de los flavonoles de la uva.

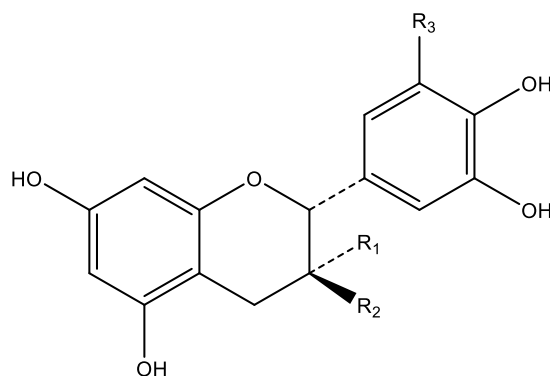
Los flavonoles tienen un papel clave en la planta como protectores ante radiación ultravioleta, además de participar en las interacciones de la planta con patógenos y actuar como copigmentos de las antocianinas en flores y frutos (Mattivi et al., 2006). Su síntesis parece estar inducida en respuesta a la exposición solar, aunque su concentración en bayas puede ser muy variada dependiendo de diversos factores como el estado de desarrollo y la genética de la planta, además de factores ambientales.

Su contenido en la uva varía entre 10 y 100 mg/kg de uva, mientras que en vinos tintos su concentración se encuentra en torno a 15 mg/L. Se consideran de gran importancia en el color de los vinos tintos debido a su capacidad para formar complejos

de copigmentación muy estables con los antocianos, además de contribuir en cierta medida al amargor y a la sensación de astringencia de los vinos.

## 2.2. FLAVANOLES

Los flavonoides hidroxilados en la posición 3 son denominados flavan-3-oles o, de forma más general, flavanoles. Se trata del grupo de compuestos flavonoides más abundante en las plantas. Pueden encontrarse en forma de monómeros, oligómeros o polímeros. Los principales flavanoles monómeros de la uva son (+)-catequina y su isómero (-)-epicatequina, junto con los flavanoles trihidroxilados en el anillo B (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina (**Figura 3**). Estos, además, pueden aparecer como derivados metilados, glicosilados o esterificados. Cuando la esterificación tiene lugar con ácido gálico, se denomina galoilación.



FLAVAN-3-OLES	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Catequina	H	OH	H
Epicatequina	OH	H	H
Galocatequina	H	OH	OH
Epigalocatequina	OH	H	OH

**Figura 3.** Estructura de los flavan-3-oles monómeros de la uva.

En la vid encontramos flavanoles en diferentes partes de la planta, incluyendo hollejos y semillas, aunque se ha visto que su contenido en la semilla es considerablemente superior. En hollejos podemos encontrar tanto catequinas como galocatequinas, mientras que en semillas solo aparecen catequinas, que además presentan una mayor proporción de unidades galoiladas.

Estos compuestos se encuentran altamente relacionados con algunas de las propiedades organolépticas de los vinos, especialmente con el color, la astringencia y el amargor. Las catequinas monoméricas son más amargas que astringentes, mientras que en forma oligomérica y polimérica se minimiza el amargor predominando la astringencia. El aumento de la suavidad del carácter tánico se encuentra relacionado con el tiempo de envejecimiento de los vinos tintos, lo que parece explicarse por un aumento del tamaño de los polímeros durante el envejecimiento, que posteriormente se vuelven insolubles y precipitan.

Por otro lado, la interacción entre flavanoles y proteínas ha sido objeto de numerosos estudios, en particular por su capacidad de unirse a proteínas salivales, produciendo una sensación de sequedad en la cavidad oral, siendo este uno de los mecanismos más aceptados para la explicación de la sensación de astringencia, como se tratará más adelante en el apartado destinado a la astringencia.

Por último, en cuanto al color, es conocida la capacidad de los flavanoles de interactuar con los antocianos, no solo a través del proceso de copigmentación sino también en reacciones que llevan a la formación de nuevos pigmentos derivados.

### 2.3. ANTOCIANOS

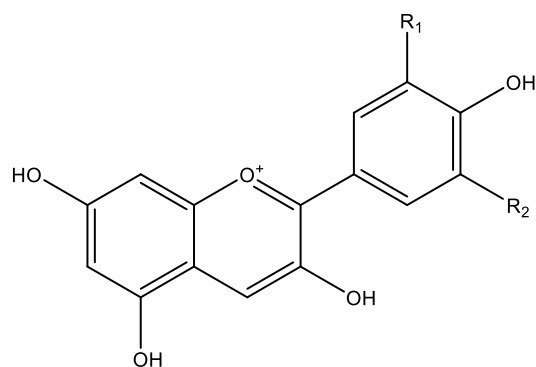
Otro grupo destacable dentro de los flavonoides son los antocianos, compuestos ampliamente distribuidos en los tejidos vegetales, responsables de algunos de los colores

## I. Los compuestos fenólicos de las uvas y el vino

que podemos apreciar en flores y frutos, principalmente tonos rojizos, azulados y violáceos.

En la uva se localizan en las células del hollejo y en las primeras capas celulares del hipodermo, aportando el color característico a la piel de las uvas tintas. Sin embargo, de manera excepcional, también se encuentran en la pulpa de las cepas tintoreras. A nivel subcelular, se localizan dentro de un orgánulo especializado denominado antocianoplasto, dentro de las vacuolas.

Estructuralmente son heterósidos polihidroxiados y/o metoxilados, derivados del catión flavilio o 2-fenilbenzopirilo. En uvas y vinos se han identificado cinco antocianidinas principales: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, que se diferencian entre ellas por el número y la posición de los grupos hidroxilo y metoxilo localizados en el anillo B de la molécula (**Figura 4**).



ANTOCIANIDINAS	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

**Figura 4.** Estructura general de las antocianidinas del vino.

Estas moléculas presentan mayor estabilidad cuando se encuentran en forma de glucósido (antocianina) frente a su forma de aglicona (antocianidina). En la especie *Vitis vinifera* destacan por su abundancia los 3-*O*-monoglucosidos de antocianidinas y sus formas aciladas 3-*O*-acetil monoglucósidos y 3-*O*-cumaroil monoglucósidos. En ciertas variedades del género *Vitis* se detectan cantidades significativas de antocianinas diglucósido, especialmente en variedades americanas y en variedades híbridas, pero en el caso de la especie *Vitis vinifera* solo se han encontrado en cantidades traza.

La acilación de los antocianos ocurre en la posición C6 de la molécula de glucosa por esterificación, principalmente con los ácidos *p*-cumárico, acético y, en ocasiones, cafeico. Sin embargo, la cantidad de antocianinas aciladas es altamente variable entre diferentes variedades de uva, pudiendo incluso estar ausente en ciertas variedades como *Pinot noir*.

El contenido de antocianos en el vino tinto depende tanto del perfil fenólico original de la uva como de su extracción y de las técnicas de vinificación empleadas. La concentración de antocianos alcanza su máximo valor en los vinos tras la maceración y durante la fermentación. Sin embargo, su concentración disminuirá a partir de este momento como consecuencia de su adsorción en las paredes celulares de las levaduras, precipitación de la materia coloidal y eliminación durante la filtración y clarificación. Además, estos compuestos pueden sufrir reacciones que involucran a otros compuestos presentes en el vino, que provocarán la transformación de las antocianinas en otras moléculas más estables.

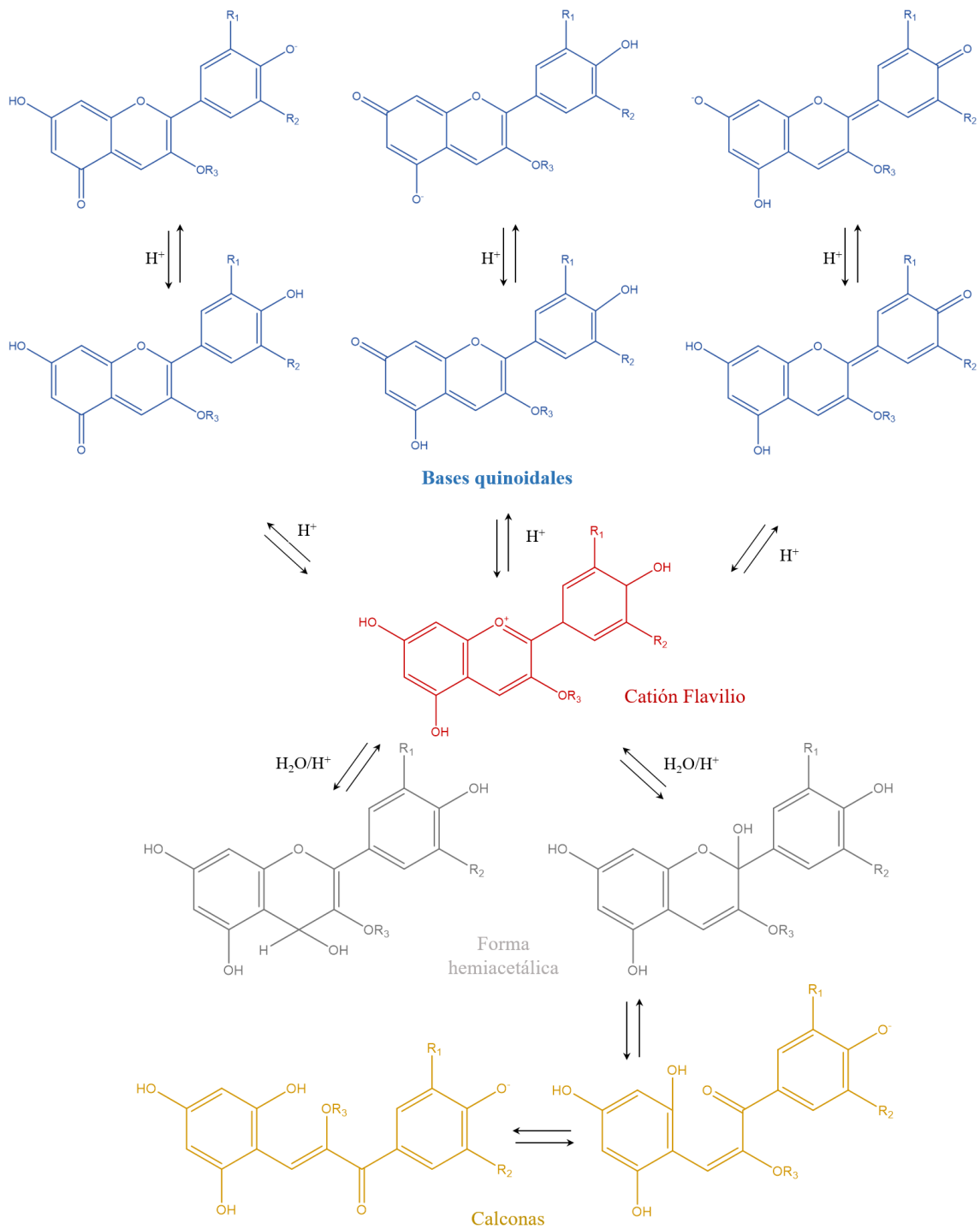
Como se ha señalado anteriormente, su concentración puede variar en gran medida en función de la variedad de la uva y de la edad del vino. Pueden encontrarse niveles iniciales de antocianos desde 100 mg/L hasta 1500 mg/L, pero su concentración

disminuye sustancialmente durante los primeros años, en las fases de crianza en barrica y en botella, pudiendo alcanzar valores mínimos de 0-50 mg/L.

La malvidina es la molécula de antocianidina predominante en todas las variedades de uva, pudiendo variar desde el 90% hasta menos del 50%. De hecho, el monoglucósido de malvidina puede ser considerado uno de los principales responsables del color rojo de las uvas y, por consiguiente, del vino tinto.

El color de los antocianos viene determinado por las condiciones del medio (pH, presencia de sulfitos, temperatura, luz, copigmentación con otras moléculas, etc.) además de su estructura molecular. Los antocianos pueden sufrir modificaciones estructurales con cierta facilidad en función del pH del medio, lo que tiene un papel fundamental en la estabilidad de estos compuestos, además de determinar el color de los mismos.

En disolución acuosa encontramos cuatro formas estructurales de antocianos en equilibrio, estas son el catión flavilio (rojo), la base quinoidal (azul), la pseudobase carbinol o forma hemiacetálica (incolora) y la calcona (incolora o ligeramente amarillenta) (**Figura 5**). La interconversión entre ellas se produce en función del pH del medio. A pH ácido, predominará la forma protonada, el catión flavilio, a pH entre 3 y 6 se forman las especies carbinol incoloras, mientras que las bases quinoidales se forman a pH poco ácido y medios no acuosos. En función de la estructura predominante, la disolución tendrá un determinado color. Al pH del vino, en torno a 3,5; el equilibrio se encuentra desplazado hacia las formas incoloras hemiacetálicas (Brouillard et al., 2000). Sin embargo, el color de los antocianos puede verse afectado por los fenómenos de copigmentación, dando lugar al color característico del vino tinto.



**Figura 5.** Equilibrios estructurales de los antocianos.

La copigmentación se define como un proceso espontáneo y exotérmico que consiste en la interacción entre el núcleo planar polarizable de las formas coloreadas de las antocianinas con otra molécula orgánica presente en el medio, denominada copigmento

(copigmentación intermolecular). Entre los copigmentos más efectivos se encuentran los flavonoles, los flavanoles y los ácidos fenólicos (He et al., 2010; Escribano-Bailon y Santos-Buelga, 2012). Un caso particular de copigmentación intermolecular es la autoasociación, que tiene lugar cuando las propias moléculas del antociano actúan como copigmentos. El fenómeno de la copigmentación puede producirse también cuando actúa como copigmento parte de la estructura de la propia molécula del antociano, por ejemplo ácidos orgánicos que se encuentren como sustituyentes (copigmentación intramolecular).

Las interacciones que tienen lugar son principalmente de tipo  $\pi$ - $\pi$  e hidrofóbicas. A través de este fenómeno, se reduce parcialmente el ataque nucleofílico del agua al antociano, evitando de este modo su conversión hacia formas hemiacetal y calcona, lo que se traduce en un aumento de la intensidad del color de las disoluciones. Además, la copigmentación tiene como consecuencia un efecto batocrómico (desplazamiento de la longitud de onda de máxima absorción hacia longitudes de onda más altas).

### 3. NO FLAVONOIDES (Cabanis et al., 2003; Cheynier et al., 2003; Crozier et al., 2006; Rentsch et al., 2009)

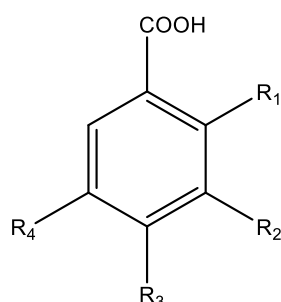
Dentro de esta categoría se encuentran principalmente los ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, y otros derivados fenólicos como los estilbenos. Aunque los compuestos no-flavonoides son compuestos incoloros, pueden contribuir al aumento y estabilización del color de los vinos tintos mediante reacciones de copigmentación. También afectan al sabor y olor de los vinos, ya que pueden llegar a ser moléculas precursoras de compuestos aromáticos.



### 3.1. ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos se dividen principalmente en ácidos benzoicos (C6-C1) y ácidos cinámicos (C6-C3). En la uva y el vino aparecen en forma de ácido hidroxicinámico y ácido hidroxibenzoico, frecuentemente combinados con azúcares o formando ésteres. Se estima que su concentración en vinos tintos es del orden de 100-200 mg/L.

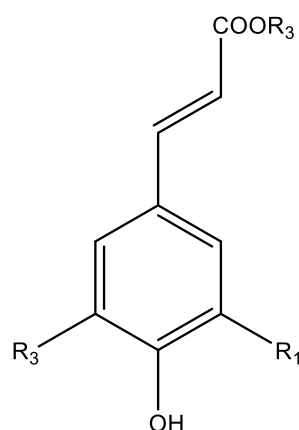
En función del patrón de sustitución del anillo bencénico podemos encontrar diferentes derivados del ácido hidroxibenzoico (**Figura 6**). Los derivados más comunes encontrados en el vino son el ácido gálico, gentísico, *p*-hidroxibenzoico, protocatéquico, salicílico, siríngico y vanílicico. De todos, ellos, el ácido gálico es el más abundante (95 mg/L en vino tinto). Este compuesto puede proceder de la propia uva, pero también puede aparecer por hidrólisis de taninos hidrolizables y condensados.



ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Ácido gálico	H	OH	OH	OH
Ácido gentísico	OH	H	H	OH
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	H	H	OH	H
Ácido protocatéquico	H	OH	OH	H
Ácido salicílico	OH	H	H	H
Ácido siríngico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
Ácido vanílicico	H	OCH <sub>3</sub>	OH	H

**Figura 6.** Estructura de los ácidos hidroxibenzoicos del vino.

Sin embargo, los principales ácidos fenólicos de la uva son los ácidos hidroxicinámicos (**Figura 7**), que provienen del hollejo y de la pulpa, encontrándose habitualmente en forma de ésteres tartáricos. Estos se denominan comúnmente como ácidos cutárico, fertárico y caftárico en función del ácido del que provengan (ácidos *p*-cumárico, ferúlico y cafeico, respectivamente). Entre ellos, destaca el ácido caftárico, que supone más del 50% del total de los ácidos hidroxicinámicos. La concentración de estos compuestos en uvas y vinos es variable, ya que depende de muchos factores como la variedad de uva empleada, las condiciones de cultivo, el clima, etc.



ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ácido cafeico	OH	H	H
Ácido caftárico	OH	H	Ácido tartárico
Ácido <i>p</i> -cumárico	H	H	H
Ácido <i>p</i> -cutárico	H	H	Ácido tartárico
Ácido ferúlico	OCH <sub>3</sub>	H	H
Ácido fertárico	OCH <sub>3</sub>	H	Ácido tartárico
Ácido sinápico	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H

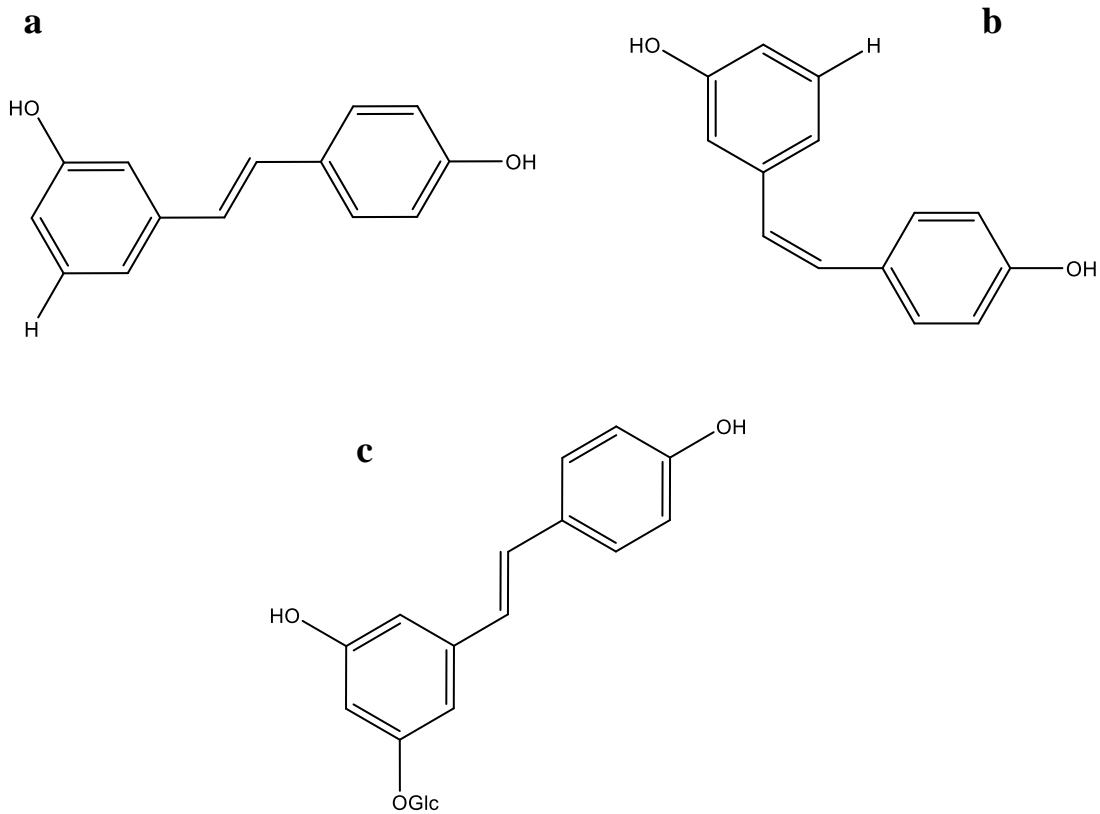
**Figura 7.** Estructura de los ácidos hidroxicinámicos del vino.

### 3.2. ESTILBENOS

Los miembros de la familia de los estilbenos se caracterizan por presentar un esqueleto C6-C2-C6. Son un tipo de fitoalexinas, metabolitos secundarios producidos por las plantas como mecanismo de defensa ante determinadas situaciones de estrés, como un ataque por patógenos o radiación UV. Dentro del reino vegetal, destaca su presencia en las uvas, concretamente en las células del hollejo, transfiriéndose al mosto y al vino durante el proceso de vinificación. Su concentración dependerá del tiempo de contacto del mosto con los hollejos durante el proceso de fermentación, además del contenido fenólico de las uvas y otros factores que puedan afectar al fruto.

Entre los estilbenos cabe destacar el resveratrol, ampliamente estudiado por su potencial antioxidante y su actividad biológica con relación a la posible prevención de enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otros. El resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) se puede encontrar en dos formas isoméricas (*cis* y *trans*), así como en forma glicosilada, denominadas piceidos (**Figura 8**). En los vinos, el *trans*-resveratrol se encuentra en bajas concentraciones, sin embargo, su forma glicosilada, el *trans*-piceido, puede alcanzar concentraciones de hasta 30 mg/L (Vitrac et al., 2005).

A su vez, los estilbenos también pueden aparecer en forma de oligómeros y polímeros, conocidos como viniferinas, producidos como resultado de reacciones de polimerización oxidativa del resveratrol (Pezet et al., 2003).



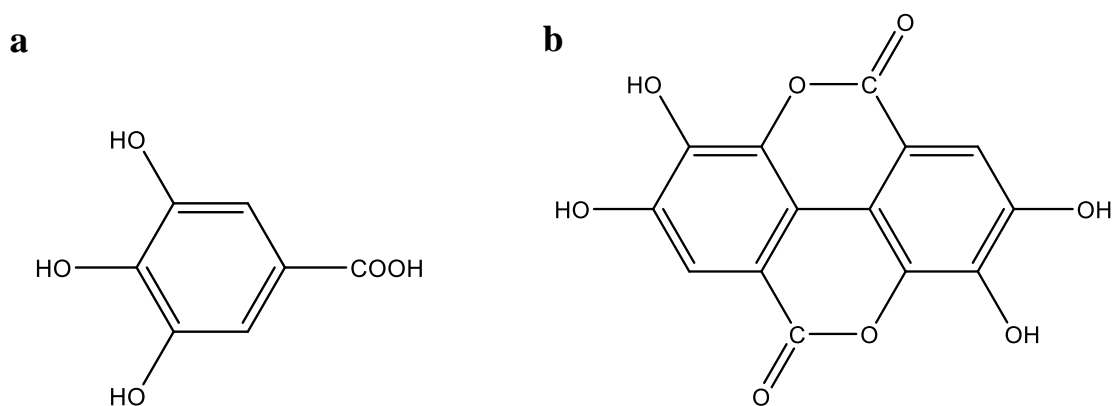
**Figura 8.** Estructura química de algunos estilbenos: *trans-resveratrol* (a); *cis-resveratrol* (b); *trans-piceido* (c).

#### 4. TANINOS (Cheynier et al., 2003; Ribéreau-Gayon et al., 2003; Terrier et al., 2009)

El término tanino hace referencia a la capacidad de estos compuestos para formar combinaciones estables con proteínas, provocando su precipitación. Esta capacidad parece estar relacionada con la sensación de sequedad en la boca que provocan el vino y otros alimentos ricos en taninos, denominada astringencia. En función del tipo de molécula a partir del cual se forman, los taninos se clasifican en taninos hidrolizables y taninos condensados.

#### 4.1. TANINOS HIDROLIZABLES

Dentro de este grupo se incluyen los galotaninos y elagitaninos, que generan en su hidrólisis ácido gálico o elágico (**Figura 9**), respectivamente. Están constituidos por un glúcido cuyos grupos hidroxilos se encuentran esterificados por restos de ácido gálico o sus derivados. Estos compuestos no se encuentran de forma natural en la uva, sino que provienen de la madera de roble de las barricas y se extraen hacia el vino durante su envejecimiento. Los principales elagitaninos provenientes del roble son la vescalagina y castalagina, que originan vescalina y castalina tras su hidrólisis. Estos tienen un papel destacable en el envejecimiento de los vinos pudiendo afectar a sus propiedades organolépticas, especialmente al color de los vinos tintos, a través de reacciones de oxidación que pueden afectar a la formación de pigmentos derivados de antocianos



**Figura 9.** Estructura del ácido gálico (a) y ácido elágico (b).

#### 4.2. TANINOS CONDENSADOS O PROANTOCIANIDINAS

Estos compuestos se forman a partir de la polimerización de unidades monoméricas de flavan-3-ol, también denominadas catequinas. Aunque son menos susceptibles a hidrólisis que los taninos hidrolizables, bajo calentamiento en medio ácido se puede producir la ruptura del enlace interflavánico y liberar antocianidinas. Podemos encontrar

## *I. Los compuestos fenólicos de las uvas y el vino*

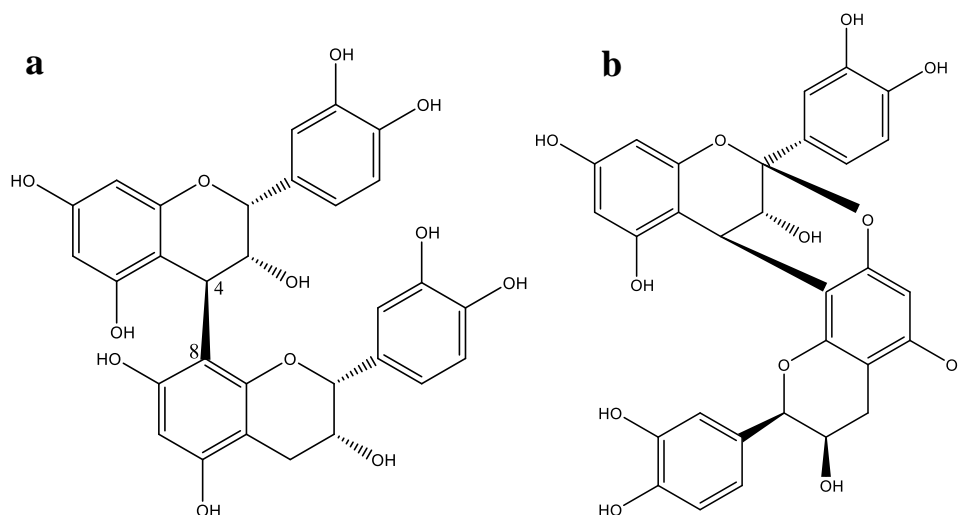
una gran diversidad estructural, desde dímeros y trímeros hasta oligómeros o incluso polímeros. Las unidades monoméricas no se consideran proantocianidinas ya que no generan antocianidinas en su hidrólisis.

Según la antocianidina que se genera tras el proceso de hidrólisis podemos hablar de dos tipos de proantocianidinas presentes en uvas y vinos: procianidinas y prodelfinidinas, que generan cianidina y delfinidina, respectivamente. Las procianidinas están formadas por la condensación de (+)-catequina y/o (-)-epicatequina, mientras que las prodelfinidinas están constituidas por (+)-galocatequina y/o (-)-epigalocatequina.

La condensación entre las unidades monómeras de flavan-3-oles que constituyen las proantocianidinas ocurre a través de enlaces de diferentes tipos, pudiendo clasificarse mediante un sistema alfanumérico como se explica a continuación:

- Procianidinas tipo B: dímeros resultantes de la condensación entre monómeros con enlace C4-C8 o C4-C6 (Ejemplo: Procianidina B2, **Figura 10a**).
- Procianidinas tipo A: dímeros con enlaces interflavánicos C4-C8 o C4-C6, y un enlace tipo éter adicional entre los carbonos C5 o C7 de la subunidad inferior y el C2 de la subunidad superior (Ejemplo: Procianidina A2, **Figura 10b**).
- Procianidinas tipo C: trímeros con enlaces C4-C8 y/o C4-C6.

En la **Tabla 2** se recogen las principales proantocianidinas presentes en plantas y alimentos.



**Figura 10.** Estructura de la procianidina B2 con enlace C4-C8 (a) y procianidina A2 con enlace C4-C8 y C2-C7 (b).

**Tabla 2:** Estructura básica de las principales proantocianidinas de plantas y alimentos.

Tipo	Nomenclatura
A1	Epicatequina-(4 $\beta$ →8, 2 $\beta$ →O→7)-catequina
A2	Epicatequina-(4 $\beta$ →8, 2 $\beta$ →O→7)-epicatequina
B1	Epicatequina-(4 $\beta$ →8)-catequina
B2	Epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina
B3	Catequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina
B4	Catequina-(4 $\alpha$ →8)-epicatequina
B5	Epicatequina-(4 $\beta$ →6)-epicatequina
B6	Catequina-(4 $\alpha$ →6)-catequina
B7	Epicatequina-(4 $\beta$ →6)-catequina
B8	Catequina-(4 $\alpha$ →6)-epicatequina
C1	Epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina-(4 $\beta$ →8)-epicatequina
C2	Catequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina-(4 $\alpha$ →8)-catequina

## *I. Los compuestos fenólicos de las uvas y el vino*

Por lo general, la epicatequina es la unidad monomérica predominante en las procianidinas de uvas y vinos, siendo la catequina la siguiente en abundancia (Waterhouse, 2002). Respecto a los dímeros, las procianidinas tipo B son las más comunes, destacando la procianidina B1 por ser la mayoritaria en vinos (Edwin, 1980).

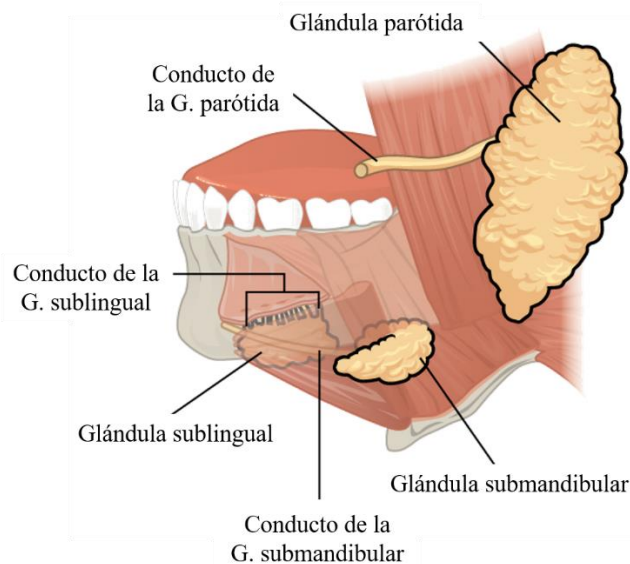
Aunque su contenido en las uvas depende en gran medida de la variedad analizada, se localizan principalmente en semillas y hollejos, destacando su presencia en la semilla, donde pueden encontrarse en un porcentaje desde un 40% hasta más del 90% (Waterhouse, 2002). En los vinos tintos podemos encontrar contenidos entre 1 y 4 g/L, mientras que en vinos blancos son mucho más bajos, entre 100 mg/L y 300mg/L.



## II. PROTEÍNAS DE LA SALIVA.

### 1. ASPECTOS GENERALES DE LA SALIVA.

La saliva es un fluido corporal cuya principal función es la lubricación de la cavidad oral. Se trata de una secreción exocrina de gran complejidad, compuesta principalmente por agua (99%) junto con proteínas, electrolitos, péptidos, enzimas, hormonas, azúcares, lípidos y productos nitrogenados. Esta mezcla proviene de las secreciones de tres tipos de glándulas principales: parótidas, submandibulares y sublinguales (**Figura 11**), además de otras glándulas minoritarias y el fluido crevicular gingival (Edgar, 1992; Huq et al., 2007).



**Figura 11.** Distribución de las glándulas salivales.

Podemos diferenciar entre saliva estimulada, cuando se produce en respuesta a algún estímulo, y no estimulada o secreción basal en reposo. De media, el flujo de saliva sin estimular en adultos se encuentra en torno a 0.3-0.5 mL/min. Curiosamente, cuando dormimos, este flujo se reduce significativamente hasta valores de 0.1 mL/min. Por otro lado, cuando hablamos de saliva estimulada encontramos valores de flujo mucho mayores. La secreción de saliva puede estimularse mediante estímulos mecánicos,

## *II. Proteínas de la saliva*

gustativos y olfativos, llegando a representar el 80-90% de la producción de saliva diaria. Este flujo de saliva estimulada puede llegar hasta máximos de 7 mL/min bajo ciertas circunstancias (Carpenter, 2013; Edgar, 1992; Humphrey y Williamson, 2001).

La saliva resulta fundamental en el mantenimiento de la salud de los tejidos orales, además de resultar una herramienta útil para el diagnóstico de ciertas enfermedades e incluso para estudios sobre el metabolismo humano. Entre sus numerosas funciones podemos destacar las siguientes: participa en la percepción del sabor y en las primeras etapas de la digestión, así como en la lubricación y protección de la cavidad oral; presenta capacidad amortiguadora y participa en el mantenimiento de la integridad dental y limpieza bucal, además de presentar propiedades antibacterianas y de reparación de tejidos (De Almeida et al., 2008; Humphrey y Williamson, 2001).

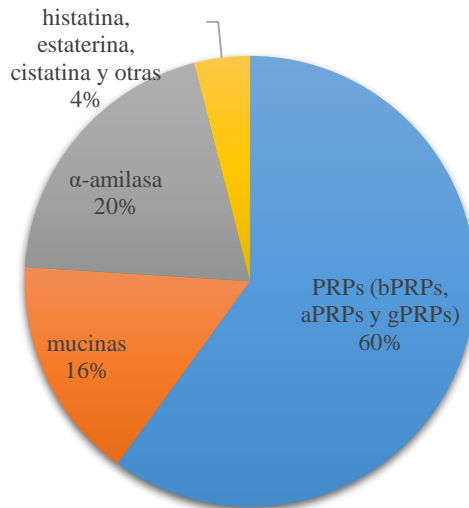
El flujo y la composición de la saliva puede variar en gran medida entre individuos, además de verse afectado por diversos factores externos. El género, la edad, el peso o estado de salud del individuo son algunos de los principales factores determinantes, además de factores externos como la dieta, exposición a la luz, consumo de alcohol y otras sustancias nocivas, medicación y estado de hidratación, entre otros, que pueden causar variación en el mismo individuo. Cabe destacar el papel de los ritmos circadianos en la producción de saliva, que afectan no solo al flujo sino también a la composición de la misma, pudiendo variar en gran medida en diferentes momentos del día e incluso entre las estaciones del año (Dawes, 1972; Dodds et al., 2005; Humphrey y Williamson, 2001).

## 2. COMPONENTES DE LA SALIVA.

Como se ha mencionado anteriormente, la saliva es el producto de la mezcla de secreciones de varios tipos de glándulas. De todas ellas, la parótida es la de mayor tamaño y la que contribuye en mayor medida al flujo en condiciones de estimulación (más del 60% del total). El producto de su secreción es rico en amilasa y proteínas ricas en prolina (PRPs), pero carece de mucinas. Sin embargo, la aportación de cada glándula al flujo total varía considerablemente en condiciones basales sin estimulación, destacando las glándulas submandibulares (65-70% de la producción en estado de reposo). Las glándulas minoritarias solo contribuyen en un 10% a la saliva no estimulada, pero destaca su importancia en la producción de mucinas (Carpenter, 2013a; Edgar, 1992).

La saliva se compone fundamentalmente de agua, electrolitos y proteínas. Concretamente, el 40% del contenido proteico de la saliva se corresponde con pequeñas proteínas y péptidos, también conocido como el proteoma salival. Se han llegado a identificar más de 2000 péptidos y proteínas diferentes presentes en la saliva humana, procedentes tanto de las secreciones de las glándulas salivales como de otros tejidos y fluidos corporales (Castagnola et al., 2011; Vitorino et al., 2009). Entre las principales proteínas salivales podemos destacar las proteínas ricas en prolina (PRPs), que representan alrededor del 50-60% del proteoma salival total (**Figura 12**), seguidas de la  $\alpha$ -amilasa, que supone un 20%. El porcentaje restante se corresponde principalmente con histidinas, estaterina, cistatinas y mucinas, además de otras proteínas minoritarias como la anhidrasa carbónica, el péptido P-B y las inmunoglobulinas IgG y sIgA.

## II. Proteínas de la saliva



**Figura 12.** Porcentaje aproximado (m/m) de las principales proteínas y péptidos de la saliva humana.

Las proteínas salivales son altamente polimórficas y sufren modificaciones postraduccionales frecuentemente, entre las que se incluyen escisión proteolítica, glicosilación, fosforilación y sulfatación. Dichas modificaciones pueden tener lugar antes, durante y tras la secreción, gracias a la acción de ciertas enzimas exógenas (procedentes de la microflora) y endógenas (leucocitos del exudado gingival y células epiteliales), generando una gran diversidad de péptidos. Esto hace que los estudios de identificación y caracterización de la composición salival sean de cierta complejidad (Castagnola et al., 2011; Messana et al., 2008).

En la **Tabla 3** se muestran las principales proteínas salivales, su función correspondiente, los genes codificantes y la proteína madura resultante tras sufrir las modificaciones postraduccionales.

**Tabla 3.** Principales proteínas de la saliva, funciones, genes y proteína antes y tras la modificación postraducciona (Adaptado de Castagnola y colaboradores, 2011).

Familia	Función	Gen	Proteína precursora	Proteína madura
aPRPs	Lubricación, mineralización, revestimiento tisular	PRH1	Fosfoproteína salival ácida rica en prolina 1	Db-s, Pa, PIF-s, Pa 2-mer, Db-f, PIF-f, Péptido P-C
		PRH2	Fosfoproteína salival ácida rica en prolina 2	PRP-1, PRP-2, PRP-3, PRP-4, Péptido P-C
bPRPs	Unión de taninos, revestimiento tisular	PRB1	bPRP1	II-2, P-E, IB-6
		PRB2	bPRP2	IB-1, IB-7, IB-8a, P-F, P-J, P-H
gPRPs	Antiviral, lubricación	PRB3	bPRP3	Proteína rica en prolina GI 1-8
		PRB4	bPRP4	Proteína rica en prolina Po, proteína N1, P-D, II-1, CD-IIg
$\alpha$ -amilasa	Antibacteriana, digestión y revestimiento tisular	AMY1A	Precursor 1 de la $\alpha$ -amilasa	$\alpha$ -amilasa 1
Mucinas	Antibacteriana, antiviral, digestión, lubricación y revestimiento tisular	MUC5B	Precursor de la mucina-5B	Mucina-5B
		MUC19	Precursor de la mucina-19	Mucina-19
		MUC7	Precursor de la mucina-7	Mucina-7
Histatinas	Antifúngica, antibacteriana, mineralización, cicatrizante	HTN1	Hst 1 no P	Hst 1, Hst 2
		HTN3	Hst 3	Hst 3, Hst 5, Hst 6
Cistatinas	Antibacteriana, antiviral, mineralización, revestimiento tisular	CST1	Precursor Cyst SN	Cyst SN
		CST2	Precursor Cyst SA	Cyst SA
		CST3	Precursor Cyst C	Cyst C
		CST4	Precursor Cyst S	Cyst S
		CST5	Precursor Cyst D	Cyst D
Estaterina	Inhibición de la formación de cristales, lubricación, mineralización, revestimiento tisular	STATH	Precursor de la estaterina	Estaterina, estaterina SV2
Péptido P-B	-	SMR3B	Precursor del péptido P-B	Péptido P-B rico en prolina

### 2.1. PROTEÍNAS RICAS EN PROLINA (PRPs)

Las proteínas ricas en prolina (PRPs) son una de las principales familias de proteínas salivales. Como su nombre indica, se caracterizan por un alto contenido en prolina, además de glicina y glutamina, y por la ausencia de hidroxiprolina e hidroxilisina. Concretamente, el contenido en prolina de las PRPs se encuentra en torno al 25-40% del total de los residuos de aminoácidos. Se dividen a su vez en tres grupos diferentes: básicas (bPRPs), ácidas (aPRPs) y básicas glicosiladas (gPRPs) (Oppenheim et al., 2007).

Estas proteínas son altamente polimórficas y heterogéneas en su secuencia primaria de aminoácidos, presentando tamaños muy diferentes. A menudo sufren modificaciones postraduccionales, lo que puede estar relacionado con su diversidad funcional (Castagnola et al., 2003; Oppenheim et al., 2007). Se han identificado más de 11 PRPs básicas en humanos y 5 isoformas de PRPs ácidas, representando en su conjunto alrededor del 60% (*m/m*) del proteoma salival total (Inzitari et al., 2005; Messana et al., 2004).

Las diferencias entre las distintas clases de PRPs dependen de su carga y de la presencia o ausencia de carbohidratos. Las aPRPs se caracterizan por tener una región N-terminal muy ácida, rica en residuos de aspártico y ácido glutámico, mientras que su región C-terminal es similar a la de las bPRPs. Por su parte, las gPRPs son bPRPs con carbohidratos en el 50% de su estructura, en forma *N*- y *O*-glicosilada (Soares et al., 2018).

Las PRPs han sido muy estudiadas con relación al desarrollo de la astringencia, debido a su capacidad de interacción con compuestos fenólicos, en especial las bPRPs, cuya principal función biológica conocida es la precipitación de taninos. Este tema se desarrollará con más detalle en el apartado dedicado a la astringencia.

### 2.1.1. PROTEÍNAS RICAS EN PROLINA BÁSICAS (bPRPs y gPRPs).

Las PRPs básicas, dentro de las cuales también se incluyen las gPRPs, pueden considerarse el grupo más complejo dentro de los péptidos salivales, constituyendo más del 30% de las proteínas secretadas por las glándulas parótidas. Son expresadas por cuatro genes diferentes, denominados *PRB1-4*, que a su vez presentan diferentes formas alélicas. De forma más precisa, los genes *PRB1* y *PRB2* codifican las bPRPs (no glicosiladas) mientras que *PRB3* y *PRB4* originan las gPRPs. Esta alta variabilidad genética, junto con el *splicing* diferencial y las modificaciones postraduccionales implicadas en el proceso de maduración de las proteínas, además de otras transformaciones posteriores que sufren en la cavidad oral, contribuyen a la gran diversidad de bPRPs (Manconi et al., 2016; Oppenheim et al., 2007; Vitorino et al., 2009).

Dentro de las modificaciones postraduccionales que sufren estas proteínas, la escisión proteolítica es la de mayor importancia en las bPRPs. De hecho, la mayoría de las proteínas precursoras se dividen en diferentes péptidos antes de su secreción, gracias a la acción de las convertasas, a excepción de la proteína codificada por *PRB3*. La escisión de estas proteínas precursoras ocurre concretamente en la secuencia KSR $X$ SR (donde  $X$  puede ser P, S o A) (**Tabla 4**).

En cuanto a su papel biológico, se ha propuesto que la principal función de las gPRPs sería la lubricación de la cavidad oral, mientras que para las bPRPs no se ha descrito otra función más allá de su capacidad de unir taninos, evitando su posible efecto tóxico en el tracto gastrointestinal (Huq et al., 2007; Messana et al., 2008).

**Tabla 4.** Secuencia de aminoácidos de las proteínas precursoras de las proteínas ricas en prolina básicas de la saliva (Fuente: UniProtKB; números de acceso: PRB1: P04280, PRB2: P02812, PRB3: Q04118, PRB4: P10163).

Gen	Proteína	Secuencia aminoacídica
<i>PRB1</i>	<b>bPRP1</b>	MLLILLSVALLALSSAQNLEDVDSQEESPSLIAGNPQGSPQGGNKPQGGPPPPGKPPQGG NKPQGGPPPPGKPPQGGD <b>KSRSPRS</b> PPGKPPQGGNQPQGGPPPPGKPPQGGNKPQ GPPPPGKPPQGGDKSQSPRSPGKPPQGGNQPQGGPPPPGKPPQGGNKPQGGPP PGKPPQGGDKSQSPRSPGKPPQGGNQPQGGPPPPGKPPQGGNRPPGPPPPGK QGGPPQGGDKSRSPQSPGKPPQGGNQPQGGPPPPGKPPQGGNKPQGGPPGKPP AQGGSKSQSARSPPGKPPQGGEGNPPQGGPPAGGNPQQPQAPPAGQPQGGPPRPPQGGRPSRPPQ
<i>PRB2</i>	<b>bPRP2</b>	MLLILLSVALLALSSAQNLEDVDSQEESPSLIAGNPQAPPQGGNKPQGGPPSPGKPPQGG NQGGPPPPGKPPQGGNKPQGGPPPGKPPQGGD <b>KSRSPRS</b> PPGKPPQGGNQPQ GPPPPGKPPQGGNKPQGGPPGKPPQGGD <b>KSRSSR</b> PPGKPPQGGNQPQGGP PPGKPPQGGNKPQGGPPGKPPQGGDKSQSARSPPGKPPQGGNQPQGGPPPP GKPPQGGNKSQGGPPPGKPPQGG <b>KSRSSR</b> PPGKPPQGGNQPQGGPPPPGK QGGPPQGGNKPQGGPPGKPPQGG <b>KSRARS</b> PPGKPPQGGEGNPPQGGPPAGGNPQQ PQAPPAGQPQGGPPRPPQGGRPSRPPQ
<i>PRB3</i>	<b>bPRP3</b>	MLLILLSVALLALSSAQLNEDVDSQEESPSVISGKPEGRRPQGGNQPQRTPPPPGKPEGRRPPQGGN QSQGGPPRPGKPEGPPQGGNQSQGGPPRPGKPEGPPQGGNQSQGGPPRPGKPEGPPQGGNQSQ GPPRPGKPEGPPQGGNQSQGGPPHPGKPEGPPQGGNQSQGGPPRPGKPEGPPQGGNQSQGGP PRPGKPEGPPQGGNQSQGGPPRPGKPEGSPSQGGNKPQGGPPHPGKPPQGGPPQEGNKPQRPPPPG RQGGPPPPGGNPQQPLPPAGKPPQGGPPPPQGGRPHRPPQGGPPQ
<i>PRB4</i>	<b>bPRP4</b>	MLLILLSVALLALSSAESSSEDEVDSQEEESLFLISGKPEGRRPQGGNQPQRP QSQGGPPPPGKPEGRRPPQGGNQSQGGPPHPGKPERPPQGGNQSQGGPPHPGKPERPPQGGHQSQ GPPPTPGKPEGPPQGGNQSQGGTTPPPGKPEGRRPPQGGNQSQGGPPHPGKPERPPQGGNQS PPGKPERPPQGGNQSQGGPPHPGKPEGPPQEGN <b>KSRARS</b> PPGKPPQGGEGNKPQGGPPPPG KPQGGPPAGGNPQQPQAPPAGKPPQGGPPPPQGGRPPRPAQGGQPPQ

\*Las regiones señaladas en negrita son posibles puntos de corte de las proteínas.

### 2.1.2. PROTEÍNAS RICAS EN PROLINA ÁCIDAS (aPRPs).

El otro grupo de PRPs, las PRPs ácidas, se encuentran codificadas en dos loci denominados *PRH1* y *PRH2*. *PRH1* genera las isoformas Db-s, PIF-s y Pa, mientras que *PRH2* da lugar a PRP1 y PRP2. Estas formas pueden sufrir escisión proteolítica en la región RPPR (Tabla 5) de la secuencia primaria de la proteína, generando nuevos péptidos (Vitorino et al., 2009). Muchas de ellas se encuentran fosforiladas a lo largo de su estructura (Ser-8, 17 y 22) (Manconi et al., 2016).

Las aPRPs han mostrado una gran afinidad por la hidroxiapatita (mineral que recubre las piezas dentales) y se encuentran implicadas en la formación de la película adquirida



dental, junto con la estaterina. Su principal función biológica parece estar relacionada con la homeostasis mineral y el mantenimiento de la integridad dental (Oppenheim et al., 2007).

**Tabla 5.** Secuencia de aminoácidos de la proteína precursora de las proteínas ricas en prolina acidas de la saliva (Fuente: UniProtKB; número de acceso PRH1/PRH2: P02810)

Gen	Proteína	Secuencia aminoacídica
PRH1/ PRH2	PRP-1/ PRP-2	MLLILLSVALLAFSSAQDLDEDVSQEDVPLVISDGGDSEQFIDEERQGPPLGGQQSQPS AGDGNQDDGFPQQGPPQQGGQQQQGPPPPQGKPPQGGHPPPPQGRPQGGPPQQGGHP <b>RPPR</b> GRPQGGPPQQGGHQQGPPPPPPGKPPQGGPPQGGRPQGGPPQQGQSPQ

\*La región señalada en negrita se corresponde con un punto de corte de la proteína.

## 2.2.HISTATINAS

Otro grupo de proteínas salivales de interés son las histatinas, denominadas así por su alto contenido en residuos de histidina, un aminoácido poco frecuente en las proteínas de mamíferos. Estas proteínas son secretadas por las glándulas parótida y submandibular, destacando tres de ellas: histatinas 1 (Hst 1), 3 (Hst 3) y 5 (Hst 5) (Oppenheim et al., 1988). Las dos primeras son el producto de los genes *HTN1* y *HTN3* (Vitorino et al., 2009) (**Tabla 6**), mientras que la histatina 5 se piensa que resulta de las modificaciones postraduccionales de la histatina 3 (Oppenheim et al., 2007).

Entre sus efectos biológicos destaca su actividad antifúngica frente a *Candida albicans*, en especial la actividad de Hst 3 y Hst 5, y sus fragmentos. Aunque existe una alta similitud estructural entre Hst 1 y Hst 3, se ha encontrado una función específica de Hst 1, mostrando una interesante actividad cicatrizante que está siendo investigada por su potencial en el tratamiento de diferentes heridas de la piel en humanos (Castagnola et al., 2004, 2011).

**Tabla 6.** Secuencia de aminoácidos de las proteínas precursoras de las principales histatinas de la saliva (Fuente: UniProtKB; números de acceso: histatina 1: P15515, histatina 3: P15516).

Gen	Proteína	Secuencia aminoacídica
<i>HTN1</i>	Histatina 1 (Hst 1)	MKFFVVFALVLLALMISMISADSHEKRHHGYRRKFHEKHSHSHREFPFYGDYGSNYLYDN
<i>HTN3</i>	Histatina 3 (Hst 3)	MKFFVVFALILALMLSMTGADSHAKRHHGYKRKFHEKHSHRGYRSNYLYDN

### 2.3.CISTATINAS

Las cistatinas son una familia de proteínas cuya principal función conocida es la inhibición de proteasas de la cisteína. Dentro de las cistatinas salivales diferenciamos dos familias, en las que se agrupan varios tipos de proteínas codificadas por 5 genes diferentes (CST 1-5) que comparten un 90% de homología en su secuencia (**Tabla 7**).

**Tabla 7.** Secuencia de aminoácidos de las proteínas precursoras de las cistatinas de la saliva (Fuente: UniProtKB; números de acceso: cistatina SN: P01037, cistatina SA: P09228, cistatina C: P01034, cistatina S: P01036, cistatina D: P28325).

Gen	Proteína	Secuencia aminoacídica
<i>CST1</i>	Cistatina-SN (Cyst SN)	MAQYLSTLLLLLATLAVALAWSPKEEDRIIPGGIYNADLNDEWVQRALHFAISEYNKATK DDYYRRPLRVLRLARQQTVGGVNYFFDVEVGRITICTKSQPNLDTCAFHEQPELQKKQLCSF EIEYVWPENRRSLVKSRCQES
<i>CST2</i>	Cistatina-SA (Cyst SA)	MAWPLCTLLLLLATQAVALLAWSPQEEEDRIIEGGIYDADLNDEWVQRALHFVISEYNKATE DEYYRRLRLRRLRAREQIVGGVNYFFDIEVGRITICTKSQPNLDTCAFHEQPELQKKQLCSF QIYVWPEDRMSLVNSRCQEA
<i>CST3</i>	Cistatina-C (Cys C)	MAGPLRAPLLLLLAILAVALAVSPAAGSSPGKPPRLVGGPMDASVEEEGVRRALDFAVGGEY NKASNDMYHSRALQVVRARKQIVAGVNYFLDVELGRITCTKTQPNLDCPFHDQPHLKRK AFCSFQIYAVPWQGTMTLSKSTCQDA
<i>CST4</i>	Cistatina-S (Cys S)	MARPLCTLLLLMATLAGALASSSKEENRIIPGGIYDADLNDEWVQRALHFAISEYNKATE DEYYRPLQVLRAREQTFGGVNYFFDVEVGRITICTKSQPNLDTCAFHEQPELQKKQLCSF EIEYVWPEDRMSLVNSRCQEA
<i>CST5</i>	Cistatina-D (Cyst D)	MMWPMHTPLLLLLTALMVAVAGSASASQSRTLAGGIHATDLNDKSVQCALDFAISEYNKVIN KDEYYSRPLQVMAAYQQIVGGVNYFFNVKFGRTTCTKSQPNLDCPFNDQPKLKEEEFCS FQINEVPWEDKISILNYKCRKV

Debido a su actividad inhibitoria, parecen estar implicadas en la protección de los tejidos orales frente a la acción proteolítica de las proteinasas producidas por algunas bacterias orales. Algunos estudios han llegado a relacionar altas concentraciones de cistatinas con la presencia de gingivitis y periodontitis (Henskens et al., 1993; Messana et al., 2008).

#### 2.4.ESTATERINA

La estaterina es un pequeño péptido de 43 aminoácidos, con abundantes residuos de tirosina y habitualmente fosforilado en la Ser-2 y Ser-3, producto del gen *STATH* (**Tabla 8**). Ha sido relacionada con propiedades de lubricación, además de encontrarse implicada la homeostasis del calcio, concretamente en la inhibición de la precipitación del fosfato cálcico contrarrestando la desmineralización dental. También se sabe que participa en la formación de la película adquirida del esmalte dental (Castagnola et al., 2011; Messana et al., 2008; Vitorino et al., 2009). Inicialmente se observaron tres isoformas principales: SV1, SV2 y SV3, pero posteriormente se vio que SV3 era idéntico a SV2 excepto en que carece de la fenilalanina del carboxilo terminal (Jensen et al., 1991).

**Tabla 8.** Secuencia de aminoácidos de la proteína precursora de la estaterina (Fuente: UniProtKB; números de acceso: Isoforma 1: P02808-1, Isoforma 2: P02808-2).

Gen	Proteína	Secuencia aminoacídica	
STATH	Estaterina	Isoforma 1	MKFLVFAFILALMVSMIGADSSEEKFLRRIGRFGYGYGPYQPVPEQP LYPQPYQPQYQQYTF
		Isoforma 2	MKFLVFAFILALMVSMIGADSSEEYGYGPYQPVPEQPLYPQPYQPQY QQYTF

## 2.5. OTRAS PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS

El péptido P-B suele incluirse dentro de las bPRPs, a pesar de sus similitudes con la estaterina. Es el producto de un gen específico, *PROL3*, localizado muy cerca del gen *STATH*. Este péptido no resulta como degradación de otras proteínas mayores, muy habituales entre las proteínas salivales, sino que es una proteína madura en sí misma. A pesar de los numerosos estudios realizados, no se ha encontrado ninguna función específica de este péptido (Inzitari et al., 2006; Vitorino et al., 2009).

Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular con un contenido en carbohidratos del 70-80%, cuya principal función está relacionada con la lubricación, hidratación y protección de la cavidad oral. Su estructura alargada contribuye significativamente al comportamiento viscoelástico de la saliva, pudiendo agregarse entre ellas para formar estructuras muy largas. Se han identificado dos tipos principales de mucinas: mucinas de alto peso molecular altamente glicosiladas (MG1), producidas por las células mucosas, y mucinas de bajo peso molecular glicosiladas en solo una de sus cadenas peptídicas (MG2), siendo las del primer grupo las más abundantes. Son secretadas como producto de los genes *MUC5B* y *MUC7* por las glándulas submandibulares y sublinguales, además de por algunas glándulas minoritarias (Carpenter, 2013; Humphrey y Williamson, 2001; Huq et al., 2007).

Por último, la  $\alpha$ -amilasa representa un 20% (*m/m*) del total de las proteínas salivales, siendo la proteína más abundante de la secreción de la glándula parótida. Se trata de una enzima de 60 kDa de la familia de las hidrolasas, encargada de degradar el almidón de los alimentos (Huq et al., 2007; Messana et al., 2008).

A pesar de que los grupos de proteínas descritos anteriormente representan las principales proteínas de la saliva humana, podemos encontrar muchas otras especies de

proteínas tanto de secreción glandular como de otras fuentes. Algunos ejemplos son la lisozima, lactoferrina, peroxidasas, aglutinina, IgA e IgG, albúmina, defensinas, etc. Además, los estudios centrados en el proteoma salival continúan identificando nuevas proteínas y péptidos con gran potencial para futuras investigaciones.

### **III. ASTRINGENCIA**

#### **1. INTRODUCCIÓN**

La astringencia es una experiencia sensorial de gran complejidad que se percibe al consumir ciertos alimentos y bebidas, entre los que se incluyen el vino, el té y algunos frutos. En algunos alimentos, la astringencia se puede interpretar como una sensación desagradable, sin embargo, es un atributo fundamental en los vinos tintos y puede incluso considerarse un parámetro de calidad de un vino cuando se encuentra bien equilibrado con otros matices (Upadhyay et al., 2016).

El concepto de astringencia puede definirse como el conjunto de sensaciones que generan sequedad, rugosidad o aspereza en la boca al ingerir un determinado alimento o bebida. A pesar de los numerosos estudios centrados en este fenómeno, aún no se han llegado a esclarecer los mecanismos moleculares y fisiológicos subyacentes, ni siquiera parece claro si se trata de un único fenómeno perceptual o es un término que acompaña a varias sensaciones sutiles (Bajec y Pickering, 2008).

Uno de los mecanismos más aceptados para explicar el origen de esta sensación consiste en la interacción entre compuestos fenólicos y proteínas de la saliva (principalmente PRPs) formando agregados tanino-proteína que pueden llegar a precipitar, provocando una disminución de la lubricación del epitelio oral (Canon et al., 2013; de Freitas y Mateus, 2012; Rinaldi et al., 2012). Otros autores han propuesto otros posibles mecanismos como la activación de receptores específicos del gusto (Tachibana et al., 2004) o la interacción directa entre los taninos y las células del epitelio oral (Payne et al., 2009), o incluso se sugiere la participación de varios de estos mecanismos simultáneamente (Gibbins y Carpenter, 2013).

Por otro lado, se sabe la percepción de la astringencia puede variar ampliamente entre individuos, e incluso puede aumentar con una ingesta repetida. Todos estos factores en su conjunto hacen que el estudio de este complejo fenómeno resulte especialmente laborioso (Bajec y Pickering, 2008; González-Royo et al., 2017).

## 2. MECANISMOS DE ASTRINGENCIA

La palabra astringencia deriva del latín *ad stringem*, que significa “unir”, revelando las bases de este proceso químico. El primer mecanismo de astringencia fue propuesto por Bathe-Smith (1954), indicando que la precipitación de proteínas y mucopolisacáridos de las secreciones mucosas era el principal proceso que desencadenaba el desarrollo de astringencia (Bate-Smith, 1954). En la actualidad, esta teoría sigue considerándose válida, aunque existen numerosas opiniones en torno a los posibles mecanismos de astringencia.

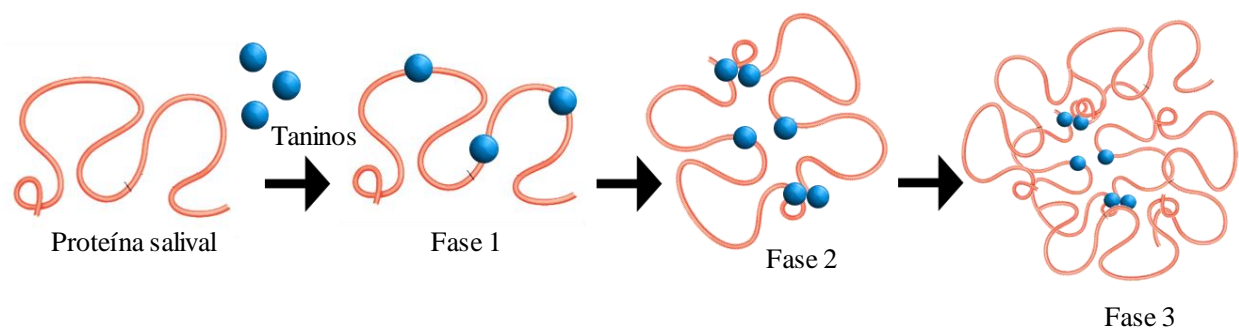
Lee y Lawles (1991) propusieron que la astringencia se podía dividir en múltiples subcualidades. Su estudio sugería que los atributos táctiles más relacionados con la astringencia eran la sequedad y aspereza, implicando cambios en la textura de la mucosa oral (Lee y Lawless, 1991). Green (1993) también consideraba un origen táctil de la sensación de astringencia, causada principalmente por la precipitación de proteínas de la saliva y, posiblemente, por reticulación de proteínas de la mucosa (Green, 1993). Debido a la capacidad de unión a proteínas de algunos polifenoles, estos pueden formar agregados tanino-proteína insolubles que precipitan en la boca causando una pérdida de lubricación y un aumento de fricción en la cavidad oral, lo que podría explicar su astringencia (Baxter et al., 1997).

El mecanismo más aceptado para explicar este fenómeno fue propuesto por Siebert y colaboradores (1996). Según este mecanismo, si consideramos que cada proteína tiene un número fijo de sitios de unión a taninos y, por su parte, cada tanino puede tener dos o más

### III. Astringencia

sitios de unión a la proteína, cuando el número de sitios de unión en la molécula de tanino sea igual al número de sitios de unión en la proteína, se formará un gran entramado y la precipitación de proteínas llegará a su máximo. De este modo, cuando haya un exceso de proteína, cada tanino podrá unirse a varias moléculas de proteína. En función del ratio de proteína o tanino usado, se formarán diferentes complejos proteína-polifenol (Soares et al., 2012).

Profundizando en el estudio de estas interacciones, Jöbstl et al. (2004) propusieron un modelo en tres fases (**Figura 13**). Según estos autores, en la etapa inicial se forman asociaciones reversibles entre la cara hidrofóbica de los anillos aromáticos del polifenol y el anillo de pirrolidina de los residuos de prolina de la proteína, dando lugar a complejos solubles, pudiendo llegar a unirse varias moléculas de tanino al mismo péptido. En la segunda etapa, tras la adición de más moléculas de tanino, se produce el entrecruzamiento o *cross-linking* entre diferentes moléculas de proteína, lo que conduce a complejos de gran tamaño que se vuelven insolubles y precipitan en la tercera etapa (de Freitas y Mateus, 2012; Jöbstl et al., 2004).



**Figura 13.** Modelo en tres etapas para explicar el proceso de interacción entre proteínas salivales y taninos en el desarrollo de astringencia.

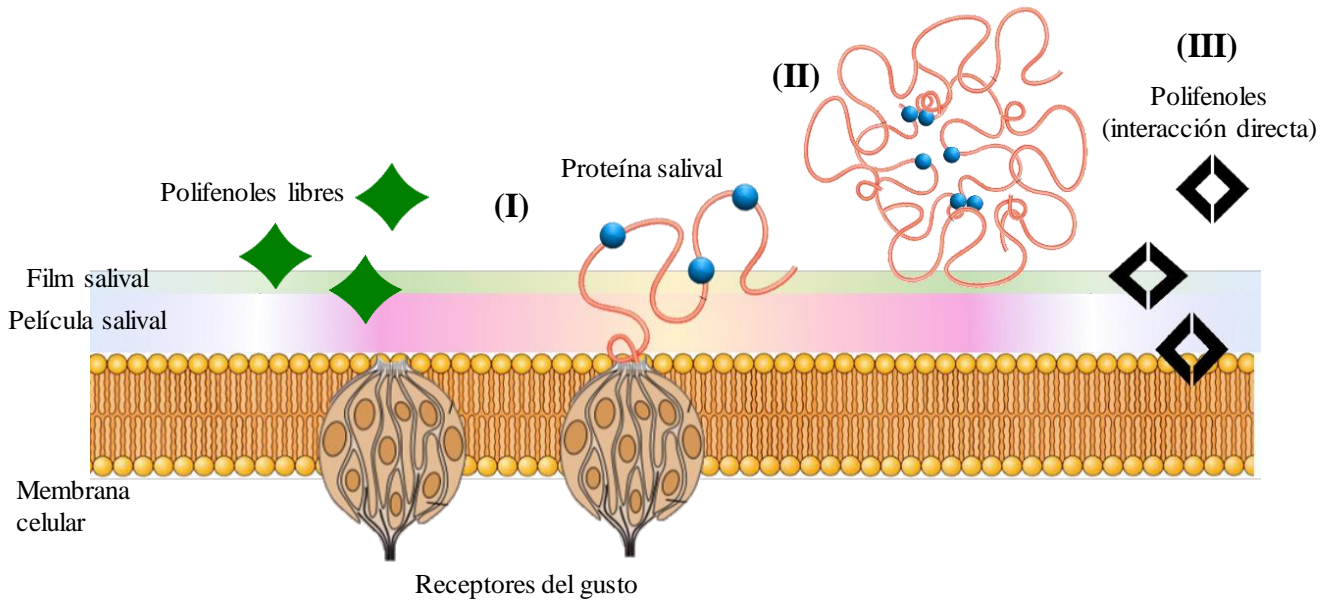
*Adaptado de Jöbstl y colaboradores. (2004).*



Por otro lado, los agregados proteína-polifenol (solubles e insolubles) pueden verse afectados por numerosos factores como el ratio proteína:polifenol, el pH del medio, la temperatura, la fuerza iónica de la solución, así como el tipo de polifenol y proteína usada. Además, recientemente se ha sugerido la existencia de efectos sinérgicos entre compuestos fenólicos, posiblemente debido a un comportamiento cooperativo entre compuestos fenólicos en su unión a proteínas, lo que podría explicar por qué la composición cualitativa tiene mayor influencia en la astringencia que la concentración fenólica total (Ferrer-Gallego et al., 2014; Ramos-Pineda et al., 2017).

A pesar de que la precipitación de proteínas de la saliva, especialmente de PRPs, es uno de los mecanismos más aceptados en el desarrollo de astringencia, también se sabe que no todos los compuestos astringentes provocan precipitación proteica, por lo que parece haber otros mecanismos implicados. Entre ellos, se ha estudiado la influencia de la pérdida de lubricidad en este proceso, mostrando que la precipitación de PRPs o mucinas no es un requisito para el desarrollo de astringencia. Teniendo en cuenta estos resultados, se ha propuesto que la astringencia de los taninos podría estar relacionada con un efecto directo en el tejido oral, mientras que la astringencia ácida podría estar relacionada con la ruptura de la película lubricante (Lee y Vickers, 2012).

Como se comentó anteriormente, otras aproximaciones han sugerido que la astringencia puede deberse a la activación de receptores específicos del gusto (Tachibana et al., 2004) o incluso a una interacción directa entre taninos y las células epiteliales (Payne et al., 2009), pero los estudios más recientes proponen una interpretación de la astringencia que engloba varios mecanismos teniendo lugar al mismo tiempo (**Figura 14**) (Ma et al., 2014).



**Figura 14.** Otros posibles mecanismos de astringencia: los polifenoles libres y los agregados solubles polifenol-proteína pueden alterar el film salival y alcanzar la película oral o incluso activar receptores específicos del gusto (I), los agregados insolubles son rechazados frente al film salival (II), interacción directa entre los polifenoles y el epitelio oral (III). Adaptado de Ma y colaboradores. (2014).

Sin embargo, debido a la falta de resultados concluyentes, la comunidad científica continúa discutiendo sobre los diferentes mecanismos propuestos para explicar este fenómeno de gran complejidad. A pesar de que existen numerosas teorías, aquí nos vamos a centrar en dos hipótesis principales: la astringencia como sensación táctil o como sensación gustativa.

## 2.1. LA ASTRINGENCIA COMO SENSACIÓN TÁCTIL

De acuerdo con esta teoría, la astringencia no es un sabor, sino una sensación, y atribuye su naturaleza táctil a un incremento de la fricción en la superficie oral tras la pérdida de lubricación. Muchos autores han profundizado en esta teoría, sugiriendo que la precipitación de proteínas podría causar constricción del tejido oral debido la pérdida de lubricación en la boca, lo que se percibe como un aumento en la fricción oral (Clifford, 1997).

Otros estudios han sugerido que los compuestos astringentes podrían causar una sensación de rugosidad al modificar el epitelio oral. Bresslin y colaboradores (1993) contribuyeron con esta teoría presentando evidencias de que la astringencia es una sensación táctil resultante de la estimulación de mecanorreceptores durante el movimiento de la mucosa oral, consistente con las afirmaciones anteriores de Bate-Smith (1954).

Asimismo, Green (1993) explicó no solo cómo la deshidratación puede desencadenar sensación de sequedad, sino también como el entrecruzamiento de proteínas puede contribuir al desarrollo de astringencia. La principal razón radica en el efecto que los compuestos astringentes tienen en la capacidad lubricante de la saliva. El entrecruzamiento entre mucoproteínas puede inducir a los astringentes a precipitar, llevando a una pérdida de viscosidad y lubricación en el fluido oral. Además, las proteínas precipitadas libres pueden adherirse a la mucosa y a los dientes, formando un residuo viscoso. Ambos efectos pueden aumentar el coeficiente de fricción entre las superficies orales en la cavidad oral, cambiando la sensación táctil percibida (Green, 1993).

A pesar de que la mayoría de los estudios han asumido que la percepción oral de astringencia se encuentra relacionada con la precipitación de proteínas salivales, otros autores también han propuesto la posibilidad de que el estímulo astringente libre puede interactuar directamente con el tejido oral a través de receptores (Lee y Vickers, 2012; Schwarz y Hofmann, 2008). Además, varios estudios han mostrado que la precipitación de las PRPs no es un factor necesario para el desarrollo de astringencia, pero puede prevenir la interacción entre los compuestos astringentes y la mucosa oral (Horne et al., 2002).

Como se comentó previamente, la interacción entre proteínas de la saliva y polifenoles puede conducir a la formación de agregados insolubles que disminuyen la capacidad

### *III. Astringencia*

lubricante de la cavidad oral. Este aumento de fricción estimula los mecanorreceptores en la mucosa oral, los cuales son los responsables de las respuestas a presión, tacto, vibración, tensión y elasticidad. Breslin y colaboradores (1993) y Lim y Lawless (2005) mostraron resultados fisiológicos para explicar la astringencia como una sensación táctil mediada por mecanismos no-gustativos. En estos estudios, ensayaron algunos compuestos astringentes comprobando que estos podían llegar a producir astringencia en un área de la boca que carece de receptores del gusto, sugiriendo que la presencia de estos receptores no fuese un factor esencial para la astringencia (Breslin et al., 1993; Lim y Lawless, 2005).

Otro hecho que apoya esta teoría es que la intensidad de astringencia percibida aumenta tras una ingesta repetida y, además, la tasa de ingestión afecta la tasa de aumento, una característica típica de las sensaciones trigeminales pero no de las sensaciones gustativas (Guinard et al., 1986; Lyman y Green, 1990).

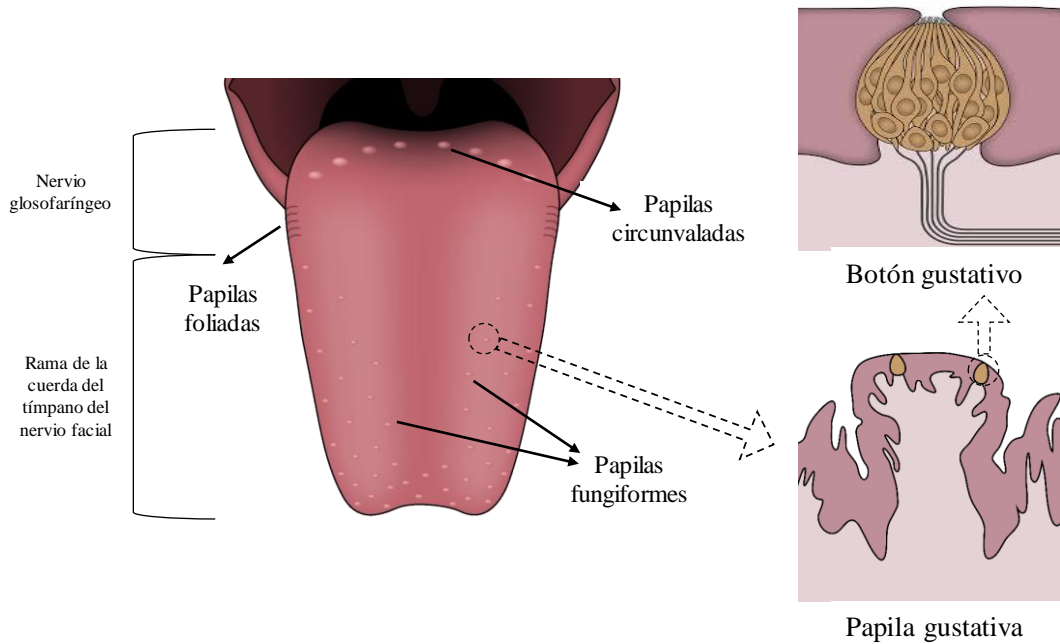
Por último, cabe destacar la falta de estudios centrados en el papel de las mucinas en el desarrollo de astringencia a pesar de que se conoce su importancia en la lubricación oral. Muchos compuestos astringentes han mostrado ser capaces de precipitar mucinas, e incluso se ha propuesto que la película mucosa podría ser más importante que el film salival en la percepción de la astringencia (Lee et al., 2012; Nayak y Carpenter, 2008). En relación a la teoría táctil de la astringencia, también se ha sugerido que los compuestos fenólicos podrían alterar la película mucosa salival, causando un aumento en la fricción de la superficie oral, lo que podría estimular los mecanorreceptores, como se explicó previamente (Gibbins y Carpenter, 2013).

Recientemente, algunos autores han abordado el estudio de la astringencia desde un nuevo enfoque llamado “tribología oral”, ciencia que estudia la adhesión, fricción y

lubricación entre dos superficies que interaccionan en movimiento relativo. Los estudios en este campo muestran un gran potencial para establecer una relación entre los parámetros tribológicos y los atributos sensoriales. Sin embargo, hasta la fecha, no se han obtenido resultados concluyentes que aclaren cómo se produce la percepción de astringencia, a pesar de ser una herramienta muy prometedora (Brossard et al., 2016; Laguna y Sarkar, 2017; Upadhyay et al., 2016).

## 2.2. LA ASTRINGENCIA COMO SENSACIÓN GUSTATIVA

El sentido del gusto comienza a reconocerse en la lengua, donde se localizan los receptores de las células epiteliales, organizados en botones gustativos en las papilas. Podemos encontrar tres tipos de papilas gustativas: las papilas fungiformes, las papilas foliadas y las papilas circunvaladas (**Figura 15**). Al recibir el estímulo, las células receptoras del gusto transmiten el potencial de acción a las neuronas de las fibras gustativas que inervan los botones gustativos. En cuanto a su distribución, las papilas fungiformes se localizan en los dos-tercios anteriores de la lengua y se encuentran inervadas por la cuerda del tímpano, una rama del nervio facial (nervio craneal (NC) VII), que transmite la información referente al gusto. A su vez, la rama lingual del nervio trigémino (NC V) también inerva esta región de la lengua, transmitiendo la información somatosensorial (temperatura, estímulos táctiles o respuestas frente al dolor) (Snyder y Bartoshuk, 2016).



*Figura 15. Distribución de las papilas gustativas en la lengua.*

Las papilas foliadas se encuentran en los laterales de la lengua, mientras que las circunvaladas se encuentran en el tercio posterior. Esta zona de la lengua se encuentra inervada por el nervio glosofaríngeo (NC IX). Estos tres nervios en su conjunto (el nervio facial, el glosofaríngeo y el trigémino) inervan la cavidad oral, recibiendo la información gustativa que se transmite al tálamo y finalmente a las áreas gustativas del córtex (Bajec y Pickering, 2008; Scott, 2005).

En la actualidad, la astringencia no se considera uno de los cinco gustos primarios, entre los que se incluyen dulce, salado, ácido, amargo y umami. Todos estos sabores se perciben en los botones gustativos de la lengua y los nervios gustativos transmiten la información al cerebro. Aún no está claro si existe algún receptor que reconozca de forma específica los compuestos astringentes, ni tampoco qué cascadas de señalización podrían estar implicadas (Jiang et al., 2014). Sin embargo, numerosos autores han defendido la posible interpretación de la astringencia como una sensación gustativa. Kawamura y colaboradores (1969) demostraron que los ácidos tánicos no interactuaban directamente

con mecanorreceptores (Kawamura et al., 1969) y, posteriormente, Schiffman y colaboradores atribuyeron las respuestas táctiles, térmicas y respuestas de dolor al nervio lingual, a pesar de que también se sabe que este nervio es responsable de la estimulación química (Schiffman et al., 1992; Wang et al., 1993). Además, establecieron que la cuerda del tímpano (rama del nervio facial que inerva la parte anterior de la lengua) era sensible a los compuestos astringentes, mientras que la rama lingual del nervio trigémino no lo era. Concluyeron que los mecanorreceptores no podían ser los responsables de la percepción de astringencia debido a la falta de estimulación del nervio lingual por los compuestos astringentes. Sin embargo, a pesar del gran avance que supusieron estos estudios, no aportaron una prueba definitiva sobre las bases gustativas de la astringencia.

Los resultados de Simon y colaboradores (1992) también apoyaron esta teoría. Estos autores publicaron investigaciones electrofisiológicas mostrando que algunos compuestos astringentes afectan al transportador de iones a través de canales  $\text{Na}^+$  en el epitelio lingual. Del mismo modo, la habilidad de algunos compuestos astringentes para cambiar el potencial de membrana de un sensor del gusto lipídico también se ha presentado como evidencia adicional para apoyar esta teoría (Iiyama et al., 1995). Más recientemente, varios estudios han mostrado que los polifenoles pueden activar directamente de una familia de canales TRP (Transient Receptor Protein) en las células epiteliales, produciendo cambios en la concentración intracelular de calcio al abrirse (Kurogi et al., 2012; Wang et al., 2011). Sin embargo, Carpenter (2013) concluyó en sus ensayos, centrados en el estudio de estos canales, que las células epiteliales humanas no respondían a la estimulación por polifenoles (en este caso, polifenoles del té negro) (Carpenter, 2013a).

Por otro lado, se han estudiado los efectos en las células de sustancias astringentes en la señalización cortical. Critchley y Rollos (1996) investigaron la representación cortical

### III. Astringencia

del ácido tánico, que produce sensación de astringencia (Critchley y Rolls, 1996). Sugirieron la existencia de una subpoblación de neuronas específicas del ácido tánico y propusieron que su sabor astringente podría considerarse como una cualidad gustativa distinta de los cinco gustos primarios (Critchley y Rolls, 1996).

Además, en los últimos años, algunas investigaciones se han centrado en el estudio de los receptores que pueden estar implicados en la detección oral de compuestos astringentes. Estudios en líneas celulares cancerígenas han identificado un receptor para epigallocatequina-galato, el receptor de laminina de 67 kDa (Tachibana et al., 2004), una proteína que también ha sido identificada como receptor extracelular en la mucosa oral (Hakkinen et al., 2000). Otros estudios han sugerido que varios compuestos astringentes podrían actuar activando receptores del amargo (Soares et al., 2013).

Profundizando en las bases de neuronales de esta compleja sensación, Schöbel y colaboradores (2014) propusieron que la percepción de la astringencia estaba mediada por los nervios trigéminos a través de la activación de una proteína G y una adenil ciclasa, y analizaron la señalización *downstream* que participaba en esta respuesta. Comprobaron en sujetos humanos que, solo cuando se bloqueaban tanto los nervios trigéminos como los gustativos, estos perdían la sensación de astringencia, mientras que esta sensación no se veía afectada cuando solo se bloqueaban los nervios gustativos, indicando que es más probable que la astringencia sea una sensación trigeminal. Por otra parte, ensayaron si los compuestos astringentes podían activar directamente el nervio trigémino *in vitro*, sugiriendo la existencia de un receptor acoplado a proteína G para fenoles galoilados astringentes (Schöbel et al., 2014).

Se ha demostrado que el mecanismo de astringencia va mucho más allá del enfoque tradicional como una sensación mecánica. Ninguna de las teorías aquí descritas excluye



otros posibles mecanismos, sino que podría existir una explicación del mecanismo de astringencia que radicase en la participación de todos ellos en conjunto. Sin embargo, aún se necesita continuar investigando en esta vía para comprender mejor esta sensación tan enigmática.

### 3. INTERACCIONES ENTRE PROTEÍNAS Y COMPUESTOS FENÓLICOS

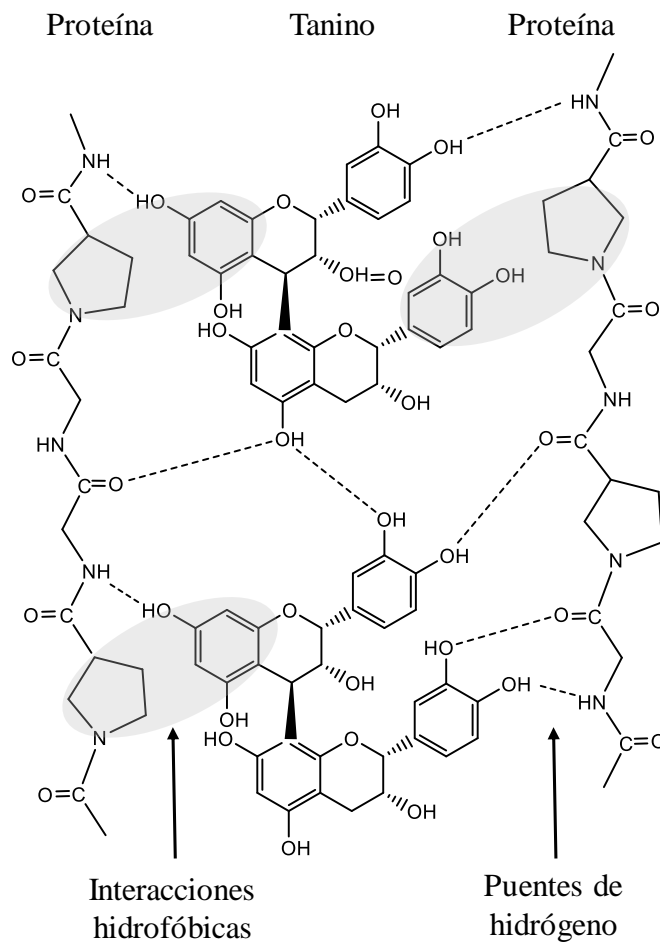
En general, cuando hablamos de interacciones moleculares se suelen relacionar con la formación de agregados, tanto solubles como insolubles. Refiriéndonos a la interacción entre compuestos fenólicos y proteínas, esta puede conllevar la precipitación (o no) de proteínas salivales, lo que resulta significativo en cuanto al desarrollo de la sensación de astringencia, como hemos visto en el apartado anterior. El tipo de interacción va a depender de los diferentes mecanismos implicados que, a su vez, se encontrarán afectados por los diferentes tipos de enlace que participan en las interacciones. Así, el entrecruzamiento entre proteínas y polifenoles puede implicar diferentes tipos de interacciones, entre las que predominan dos principales: las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno (**Figura 16**) (Santos-Buelga y Freitas, 2009).

Las interacciones hidrofóbicas ocurren vía fuerzas de van der Waals-London entre los aminoácidos más apolares de las proteínas y los anillos bencénicos de los compuestos fenólicos. Concretamente, en este tipo de interacciones, parece que las prolina de la proteína son los principales sitios de unión, lo que explica la importancia de las PRPs de la saliva en la astringencia. Esta hipótesis ha sido corroborada por estudios que demuestran que, en la interacción entre compuestos fenólicos y péptidos o proteínas ricas en prolina, existen unos sitios de unión relacionados con asociaciones específicas que

### III. Astringencia

coinciden con el número de dominios hidrofílicos que contienen repeticiones cortas de prolina en la cadena peptídica (Cala et al., 2012; Canon et al., 2013).

Por otro lado, las interacciones polares ocurren vía puentes de hidrógeno entre el grupo carbonilo y el grupo amino de las proteínas y los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos. Se ha propuesto que este tipo de enlaces estabilizan la formación de agregados tanino-proteína (Charlton et al., 2002).



**Figura 16.** Principales fuerzas de interacción entre taninos y proteínas.

*Adaptado de Santos-Buelga y de Freitas (2008).*

Además de estos dos tipos principales de interacciones, se han descrito otros tipos enlaces que pueden participar en las uniones tanino-proteína, como las uniones de tipo

covalente, que pueden darse entre la estructura de quinona resultante de la oxidación de los compuestos fenólicos y el grupo amino o tiol de las proteínas. Por otro lado, se pueden establecer enlaces iónicos entre la parte catiónica de las proteínas y las formas fenolato aniónicas de los compuestos fenólicos, aunque la probabilidad de que se formen este tipo de enlaces es muy baja, ya que, al pH en el que suele tener lugar este tipo de interacciones (pH ácido o neutro), los compuestos fenólicos no presentan grupos con carga (Jöbstl et al., 2004).

Para profundizar en el conocimiento de estas interacciones se han empleado diferentes técnicas analíticas. Una de ellas es la denominada calorimetría de titulación isotérmica (ITC) que nos permite estudiar las interacciones entre moléculas a través el calor que se libera o absorbe en este proceso, esto es, las energías implicadas. Se ha demostrado que la fase inicial de la interacción entre taninos y proteínas es dependiente de la temperatura. En las interacciones hidrofóbicas esta primera fase es endotérmica, ya que se necesita energía para romper la capa de hidratación que se encuentra alrededor de los residuos apolares de los taninos, además de darse a temperatura relativamente baja y con un aumento en la entropía. Por el contrario, las interacciones por puentes de hidrógeno no son dependientes de la temperatura y se relacionan con procesos exotérmicos y con una disminución en la entropía (Kilmister et al., 2016; McRae et al., 2010).

En relación al modelo en tres etapas de Jöbstl y colaboradores (2004) para el proceso de interacción entre proteínas salivales y taninos, explicado anteriormente, se ha visto que, en cada etapa, parece predominar un tipo de fuerza de unión. En la primera etapa dominan las interacciones hidrofóbicas, aunque también participan puentes de hidrógeno, aportando estabilidad al complejo. En una segunda fase, predominan las interacciones inespecíficas y los puentes de hidrógeno, aportando mayor estabilidad y reforzando las uniones en los complejos. Por último, en la tercera fase, estos complejos de gran tamaño

precipitan como resultado de la coalescencia. Por lo tanto, los compuestos fenólicos se unen en primer lugar al péptido a través de los sitios hidrofóbicos en una interacción más específica para formar complejos relativamente pequeños que luego agregan entre ellos, principalmente a través de interacciones hidrofílicas no específicas, para formar agregados altamente solubles, que luego se agrupan y precipitan. (Cala et al., 2012; Canon et al., 2013).

Se ha propuesto que el tipo de fuerza predominante en las interacciones tanino-proteína podría estar determinada por la polaridad del compuesto fenólico de manera que, los compuestos más polares favorecerían las uniones por puentes de hidrogeno mientras que, para los compuestos relativamente apolares, dominarían las fuerzas hidrofóbicas (Hagerman et al., 1998). Además de la polaridad, otros aspectos como la estructura de los compuestos fenólicos o de la proteína, o las condiciones del medio de reacción, afectan en gran medida a estas interacciones, como se desarrollará a continuación.

## **4. FACTORES QUE AFECTAN EN LA INTERACCIÓN ENTRE COMPUESTOS FENÓLICOS Y PROTEÍNAS**

### **4.1. ESTRUCTURA DEL TANINO**

Los taninos son un grupo estructuralmente diverso de compuestos cuya principal propiedad es su capacidad de interaccionar con proteínas. Normalmente se dividen en taninos hidrolizables y condensados, aunque puede haber otros compuestos del vino que también tengan un papel significativo en el desarrollo de astringencia.

A pesar de que los taninos hidrolizables han mostrado gran afinidad por las proteínas, son compuestos minoritarios en el vino y, por tanto, contribuyen en menor medida a la astringencia. Otros compuestos fenólicos, como los flavonoles, los ácidos fenólicos o las

antocianinas, han mostrado diferente afinidad por las proteínas. Sin embargo, los compuestos más importantes en cuanto a la astringencia del vino son los flavanoles, también denominados taninos condensados. Estos compuestos, además de ser uno de los grupos de compuestos fenólicos más representativos en vinos, tienen una alta afinidad por las proteínas, por lo que generalmente se suele asumir que la astringencia de los vinos se debe esencialmente a los flavanoles (Gawel, 1998).

Las principales características estructurales de los flavanoles que pueden afectar en su interacción con proteínas están relacionadas con el peso molecular, los enlaces interflavánicos, la presencia de galoilación y el patrón de sustitución del anillo B. En general, se considera que las formas compactadas de los flavanoles muestran menor afinidad en la unión a proteínas que las conformaciones más extendidas y con mayor flexibilidad, ya que en este caso tendrían disponibles más sitios de unión a proteínas (Cala et al., 2011).

Parece que los flavanoles en forma de monómeros pueden inducir sensación de astringencia, en concreto la epicatequina ha mostrado mayor potencial astringente que la catequina, a pesar de ser una astringencia matices más desagradables (Ferrer-Gallego et al., 2015a). En cuanto al peso molecular, se sabe que la percepción de astringencia de los taninos condensados aumenta con el tamaño del tanino, lo que podría explicarse por el aumento de posibles sitios de unión a proteínas. Sin embargo, cuando hablamos de las estructuras de mayor tamaño y complejidad (grado medio de polimerización mayor a 7) parece que su solubilidad disminuye, e incluso pueden llegar a precipitar antes de interaccionar con las proteínas (Santos-Buelga y Freitas, 2009). Además, al aumentar su tamaño, las regiones hidrofóbicas pueden encontrarse menos accesibles, y disminuye su flexibilidad, lo que dificulta su unión a proteínas (Kilmister et al., 2016).

### *III. Astringencia*

La galoilación es otra de las características estructurales que influye en las interacciones entre taninos y proteínas. En general, se considera que la galoilación aumenta la afinidad de los flavanoles por las proteínas (Soares et al., 2018). La presencia de ácido gálico en la molécula de flavanol favorece la unión con las proteínas al aumentar los posibles sitios de unión. Sin embargo, el efecto de la galoilación dependerá también de la estructura del flavanol, siendo menos efectiva en el caso de las estructuras más compactas (De Freitas y Mateus, 2001).

El número de grupos hidroxilo como sustituyentes en el anillo B de los flavanoles también resulta de importancia en la interacción con las proteínas de la saliva y en el desarrollo de astringencia (Schwarz y Hofmann, 2008). Los ensayos con flavanoles trihidroxilados en el anillo B (galocatequinas, presentes en prodelphinidinas) han mostrado una astringencia más agradable que aquella producida por los flavanoles dihidroxilados (catequinas, que forman procianidinas) (Ferrer-Gallego et al., 2015a) .

#### 4.2. ESTRUCTURA DE LA PROTEÍNA

La interacción entre taninos y proteínas también puede verse afectada por diferentes aspectos referentes a la proteína, como su tamaño, su carga, la presencia de cadenas laterales o su conformación. La presencia de prolina es una característica común en las proteínas que tienen alta afinidad con los taninos, como ya se comentó anteriormente, destacando especialmente en el caso de las PRPs. Sin embargo, estudios recientes parecen indicar que, de entre todas las proteínas salivales, el péptido PB es el que tiene mayor afinidad tanto por los taninos hidrolizables como por los taninos condensados (Silva et al., 2017; Soares et al., 2018).

La glicosilación de la proteína también parece ser un factor clave en su capacidad de interacción con taninos, como ocurre en las PRPs básicas glicosiladas (gPRPs), en las que

se ha propuesto que la porción glicosilada proporciona una conformación más abierta a la proteína. Se ha demostrado que, a baja concentración de tanino, los agregados con gPRPs permanecen solubles, mientras que con otro tipo de PRPs no glicosiladas, estos precipitan. Sin embargo, a concentraciones de tanino más altas, crece el número de taninos unido a la molécula de proteína, lo que aumenta la hidrofobicidad de los complejos, provocando agregación y precipitación (Sarni-Manchado et al., 2008; Soares et al., 2011).

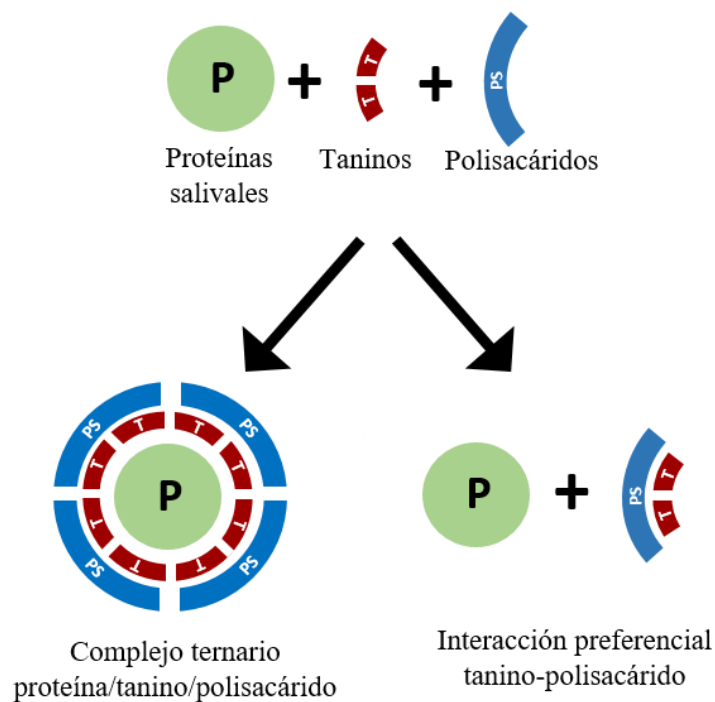
#### 4.3. POLISACÁRIDOS

Entre los diferentes factores que pueden modular la sensación de astringencia de los vinos también se encuentran la presencia de otros compuestos como los polisacáridos. Se han publicado diversos estudios que muestran que diferentes tipos de polisacáridos, como la pectina, el xantano, la goma arábica o la gelatina, pueden alterar las interacciones entre proteínas y taninos.

Se han descrito varias familias de polisacáridos capaces de interactuar con taninos, aunque aún no está clara la relación existente entre la composición polisacáridica de las paredes celulares y la capacidad de unión a taninos. Estos polisacáridos pueden reducir la astringencia limitando la cantidad de procianidinas disponibles para la interacción con proteínas (García-estévez et al., 2017). También se ha descrito la capacidad de algunos polisacáridos de la pared celular para unirse a los taninos reduciendo su extractabilidad (Hanlin et al., 2010), o incluso se ha sugerido que podrían afectar a la percepción de astringencia a través de un proceso competitivo a nivel sensorial. Por estas razones, se ha planteado el uso de polisacáridos con el fin de mejorar la astringencia, aportando una sensación de redondez y dulzura a los vinos.

### III. Astringencia

Se han propuesto dos mecanismos principales para explicar la reducción de la astringencia mediante la adición de polisacáridos (**Figura 17**). El primero consiste en la formación de complejos ternarios proteína/polifenol/polisacárido, solubles en medio acuoso (Mateus et al., 2004; Soares et al., 2017), mientras que el segundo mecanismo propuesto implica la interacción preferencial entre el polifenol y el polisacárido, compitiendo con la proteína e inhibiendo de este modo la formación de agregados tanino-proteína (Brandão et al., 2017).



**Figura 17.** Posibles mecanismos de interacción para explicar la reducción de la astringencia por polisacáridos. Adaptado de Mateus y colaboradores (2004).

De forma similar, se ha sugerido que estos polisacáridos en solución podrían desarrollar una estructura secundaria, creando “cavidades” hidrofóbicas donde pudiesen encapsular a los polifenoles (Mateus et al., 2004; Ozawa et al., 1987).

En función de su origen, podemos distinguir dos tipos de polisacáridos en el vino: los polisacáridos procedentes de la pared celular de las uvas y los de origen microbiano,



procedentes de las paredes celulares de las levaduras. Dentro del primer grupo encontramos los polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs) y los ramnogalacturonanos (RG), mientras que los principales polisacáridos procedentes de las levaduras son las manoproteínas y los glucanos. La presencia de estos compuestos en el vino ha demostrado una reducción del amargor y/o la astringencia (Santos-Buelga y Freitas, 2009; Vidal, S., 2003). La proporción de cada uno de los tipos de polisacáridos en el vino puede variar en función de las características de la uva, las técnicas de vinificación empleadas y el tipo de levaduras que participan en la fermentación (García-estévez et al., 2017).

#### 4.3.1. MANOPROTEÍNAS

Entre los polisacáridos del vino, las manoproteínas liberadas por las levaduras fermentativas representan alrededor de un 35% del contenido polisacárido total (Vidal, S., 2003). Las manoproteínas son glicoproteínas que se localizan en la capa externa de la pared celular de las levaduras, con un contenido en proteína del 10-20% y en torno a un 80-90% de azúcares, principalmente D-manosa asociada a residuos de D-glucosa y N-acetilglucosamina (Rodrigues et al., 2012). Suelen presentar una estructura bastante homogénea, sin embargo, sus pesos moleculares pueden llegar a variar desde 5 kDa hasta más de 800 kDa (Doco et al., 2003).

Las manoproteínas pueden liberarse al vino en una primera fase durante la fermentación alcohólica por las levaduras, cuando están en fase de crecimiento exponencial, o bien debido a la autólisis celular de las levaduras por acción de las glucanasas de la pared celular, durante la etapa de envejecimiento (Guadalupe et al., 2010).

### *III. Astringencia*

En los últimos años ha aumentado el interés por el uso de manoproteínas durante los procesos de vinificación, debido a los efectos que han demostrado tener estos compuestos. Se han relacionado con la estabilización de proteínas y prevención de la formación de cristales de tartrato, además de la estimulación de la fermentación maloláctica, estabilización del color, reducción de la turbidez e inhibición de la agregación de taninos (Waters et al., 1994). Entre sus efectos sensoriales en los vinos destaca su capacidad para suavizar la astringencia en vinos tintos (Quijada-morín et al., 2014) y la estabilización de la fracción aromática. Considerando su potencial en la industria enológica, se ha propuesto el uso de formulaciones de manoproteínas comerciales con el objetivo de modificar la composición fenólica y las propiedades organolépticas de los vinos (Guadalupe y Ayestarán, 2008; Guadalupe et al., 2010).

#### 4.3.2. OTROS POLISACÁRIDOS

El grupo más abundante de polisacáridos en el vino es el de los polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs), que suponen un 40% del total de los polisacáridos. Dentro de esta categoría, los más abundantes son los arabinogalactanos de tipo II (AGs), arabinogalactanos-proteína, (AGPs) y arabinanos. Otros polisacáridos de importancia en el vino son los ramnogalacturonanos de tipo I (RG I) y ramnogalacturonanos de tipo II (RG II), que representan un 4 y 20% de los polisacáridos solubles presentes en el vino tinto, respectivamente. Todos estos polisacáridos son el resultado de la acción de enzimas endógenas y exógenas que degradan la pectina de las paredes celulares de la uva durante las primeras fases en el proceso de elaboración del vino (Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, 2003; Vidal et al., 2000).

Los RG de tipo I y II tienen carácter ácido, mientras que los PRAGs son polisacáridos neutros, lo que afecta a su posible potencial inhibitorio en la agregación de

taninos. Los RG II han mostrado una disminución en los atributos asociados con la astringencia en vinos modelo, posiblemente debido a su capacidad inhibitoria sobre la agregación entre taninos, mientras que la fracción neutra de polisacáridos del vino parece tener menor efecto sobre estos atributos sensoriales (Riou et al., 2002; Vidal, S., 2003).

#### 4.4. OTROS FACTORES

La interacción entre compuestos fenólicos y proteínas puede verse afectada por muchos otros factores, además de los anteriormente mencionados. Entre ellos se encuentran el pH, la fuerza iónica o el contenido en etanol del vino, que pueden influir en el establecimiento tanto de interacciones hidrofóbicas como de enlaces de hidrogeno entre los compuestos fenólicos del vino y las proteínas (Kawamoto, 1997). Concretamente, el pH del medio ha mostrado tener un importante efecto en la capacidad de las proteínas de interaccionar con taninos, ya que se ha demostrado que tanto la percepción de astringencia como la formación de agregados aumenta a valores bajos de pH (Fontoin et al., 2008; Kawamoto, 1997; Obreque-Slier et al., 2012). A pesar de que el pH del vino normalmente presenta valores de entre 3 y 4, esta pequeña diferencia sería suficiente para provocar cambios en la percepción de astringencia. Parece que el pH del medio puede inducir cambios en el comportamiento iónico de los compuestos fenólicos y las proteínas, que podría explicar las diferencias vistas en la agregación entre estos compuestos (Fontoin et al., 2008).

Del mismo modo, se ha postulado que tanto el tamaño como el índice de polidispersidad de los agregados proteína-polifenol aumentan con la fuerza iónica, provocando su precipitación (Poncet-Legrand et al., 2003). Este hecho podría explicarse por un incremento en las interacciones hidrofóbicas debido al aumento la fuerza iónica,

### *III. Astringencia*

siendo este tipo de interacciones las más implicadas en la formación de agregados entre proteínas y compuestos fenólicos (Poncet-Legrand et al., 2003).

En cuanto al etanol, está ampliamente reconocida la relación entre el aumento en los niveles de etanol en el vino y la disminución en la percepción de astringencia. Se piensa que este hecho podría deberse a una menor formación de agregados proteína-polifenol al aumentar la concentración de etanol en el medio (Fontoin et al., 2008; Poncet-Legrand et al., 2003). El etanol puede modificar tanto la solubilidad de las proteínas como de los compuestos fenólicos, así como las interacciones hidrofóbicas entre estos compuestos, lo que podría explicar la reducción en la formación de agregados o la formación de agregados de bajo peso molecular (Poncet-Legrand et al., 2003).

Parte de los contenidos presentados en esta sección han sido publicado en forma de revisión bibliográfica bajo el título: “Interactions between wine phenolic compounds and human saliva in astringency perception”.





Cite this: *Food Funct.*, 2018, **9**, 1294

## Interactions between wine phenolic compounds and human saliva in astringency perception

Ignacio García-Estévez,  Alba María Ramos-Pineda  and María Teresa Escribano-Bailón  \*

Astringency is a complex perceptual phenomenon involving several sensations that are perceived simultaneously. The mechanism leading to these sensations has been thoroughly and controversially discussed in the literature and it is still not well understood since there are many contributing factors. Although we are still far from elucidating the mechanisms whereby astringency develops, the interaction between phenolic compounds and proteins (from saliva, oral mucosa or cells) seems to be most important. This review summarizes the recent trends in the protein–phenol interaction, focusing on the effect of the structure of the phenolic compound on the interaction with salivary proteins and on methodologies based on these interactions to determine astringency.

Received 22nd December 2017,  
Accepted 22nd January 2018

DOI: 10.1039/c7fo02030a

[rsc.li/food-function](http://rsc.li/food-function)



































# OBJETIVOS







Los efectos del cambio climático sobre la viticultura se están traduciendo en un desfase entre la madurez tecnológica y la madurez fenólica y aromática de las uvas en el momento de cosecha. Esto da lugar, entre otros defectos, a vinos con astringencia desequilibrada y con inestabilidad de color, lo que está obligando a la industria vitivinícola a buscar herramientas tecnológicas para paliar sus efectos y mantener la calidad de los vinos.

Aunque está ampliamente aceptado que la astringencia del vino tinto se debe a la presencia de compuestos fenólicos, los mecanismos que conducen a su desarrollo no están aclarados a nivel molecular. A pesar de que parece estar relacionada con la interacción de los compuestos fenólicos del vino con las proteínas de la saliva, especialmente con las proteínas ricas en prolina (PRPs), en los últimos años se baraja la posibilidad de que existan además otros mecanismos que participen en la percepción de esta compleja sensación, como la interacción directa de los compuestos fenólicos con las células del epitelio oral. Por tanto, muchos aspectos relacionados con la naturaleza de esta interacción todavía necesitan ser esclarecidos, lo cual hace necesario profundizar en el estudio de la astringencia.

El **objetivo general** esta tesis doctoral es el estudio de las interacciones entre compuestos fenólicos del vino y proteínas de la saliva desde un punto de vista molecular, como mecanismo principal para el desarrollo de la astringencia. Asimismo, se pretende estudiar los posibles mecanismos que conducen a la percepción de sinergias de astringencia y evaluar el efecto, sobre la interacción polifenol-proteína, de la presencia de otras especies químicas presentes en el medio.

## *Objetivos*

Para conseguir este objetivo general, se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

Objetivo 1. Estudiar las interacciones moleculares entre compuestos fenólicos del vino y proteínas salivales mediante técnicas físico-químicas, identificando las principales familias de proteínas implicadas en la interacción.

Objetivo 2. Estudiar los mecanismos moleculares que generan sinergias de astringencia, tanto por mezcla de flavanoles como por coexistencia de familias de proteínas.

Objetivo 3. Estudiar el efecto de las manoproteínas en las interacciones entre compuestos fenólicos y proteínas.

Objetivo 4. Estudiar la influencia de otras especies químicas en las interacciones tanino- proteína.

Los objetivos 1 y 2 han sido agrupados en el bloque I, mientras que el bloque II engloba los objetivos 3 y 4.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN





**BLOQUE I:**

**ESTUDIO MOLECULAR DE LA  
INTERACCIÓN ENTRE COMPUESTOS  
FENÓLICOS Y PROTEINAS:  
SINERGIAS DE ASTRINGENCIA**





## **CAPÍTULO 1:**

### **EFFECTO SINÉRGICO DE MEZCLAS DE FLAVANOLES EN EL FENÓMENO DE LA ASTRINGENCIA**

Los flavan-3-oles son un grupo de compuestos comúnmente presentes en plantas, alimentos y bebidas. En el vino pueden encontrarse en forma de oligómeros y polímeros, compuestos por cuatro tipos de sub-unidades de flavanoles principales: catequina, epicatequina, galocatequina y epigalocatequina (Monagas et al., 2003). Muchos de estos compuestos pueden interactuar con proteínas de la saliva, principalmente proteínas ricas en prolina, siendo este el mecanismo más aceptado para explicar el desarrollo de la sensación de astringencia (Ma et al., 2014). Estas interacciones darían lugar a agregados solubles que se volverían insolubles tras la interacción con más moléculas de flavanol y, como consecuencia, precipitarían (Baxter et al., 1997; Soares et al., 2012).

Se ha comprobado que tanto la estructura como la estereoquímica de los flavanoles influyen en su capacidad de unirse a las proteínas y, por tanto, en el desarrollo de la astringencia. Además, recientemente se ha propuesto la existencia de sinergismos entre compuestos fenólicos en el desarrollo de astringencia, que consisten en un aumento en la intensidad de la astringencia percibida cuando se ensayan mezclas de polifenoles, en comparación con los mismos compuestos ensayados de forma individual, manteniendo constante la cantidad total de estímulo (Ferrer-Gallego et al., 2014, 2015).

En la actualidad, el mejor método para describir y cuantificar la astringencia es el análisis sensorial (Ma et al., 2014), aunque esta metodología no permite explicar los mecanismos subyacentes al desarrollo de la sensación de astringencia a nivel molecular. Como alternativa, se ha propuesto la utilización de diferentes metodologías para analizar la formación de complejos polifenol-proteína: cromatografía líquida de alta eficacia con

## *Capítulo 1*

detección por fotodiodos (HPLC-DAD), resonancia magnética nuclear (NMR), espectroscopia, electroforesis, precipitación de proteínas, turbidimetría, nefelometría, fluorescencia o calorimetría de titulación isotérmica (ITC) (Papadopoulou and Frazier, 2004; Soares et al., 2007).

Cabe destacar que la mayoría de los estudios de interacción entre proteínas y polifenoles se han llevado a cabo utilizando proteínas comerciales como la albúmina de suero bovino (BSA) o la alfa-amilasa (Papadopoulou et al., 2005; Pascal et al., 2007; Watrelot et al., 2015). Sin embargo, son muy escasos los estudios con proteínas salivales humanas, que supondrían un enfoque más próximo a lo que ocurre en la cavidad oral.



## 1.1. OBJETIVOS

El objetivo general del trabajo recogido en este capítulo es el estudio molecular de las sinergias de astringencia originadas por mezclas de flavanoles, con la finalidad de profundizar en el conocimiento sobre la interacción entre flavanoles y proteínas salivales como mecanismo relevante para explicar la astringencia.

Este objetivo general se desarrolla en los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la formación de agregados flavanol-proteína para los tres sistemas estudiados (catequina (CAT), epicatequina (EC) y CAT+EC) mediante HPLC-DAD.
- Comparar e interpretar los parámetros termodinámicos, obtenidos mediante ITC, resultantes de las interacciones flavanol-proteína.
- Analizar la interacción entre proteínas de la saliva y catequina, epicatequina y sus mezclas, mediante simulación de la dinámica molecular utilizando el fragmento peptídico IB7<sub>14</sub>.

## 1.2. RESUMEN

La siguiente publicación recoge los resultados derivados de los trabajos llevados a cabo, constitutivos de este capítulo:

Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., Brás, N. F., Martín del Valle, E. M., Dueñas, M., Escribano Bailón, M. T. Molecular approach to the synergistic effect on astringency elicited by mixtures of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2017**, 65, 6425-6433.

En un estudio sensorial realizado con anterioridad a este trabajo se describió la existencia de sinergismos de astringencia por mezcla de flavanoles (Ferrer-Gallego et al., 2014). Con el propósito de tener evidencias objetivas de las sinergias de astringencia observadas, se han estudiado, a nivel molecular, las interacciones entre proteínas de la saliva humana y flavanoles del vino (catequina, epicatequina, y la mezcla de ambas) usando técnicas tales como HPLC-DAD, calorimetría de titulación isotérmica (ITC), y simulación de la dinámica molecular.

El estudio por HPLC permitió separar e identificar siete fracciones diferentes de proteínas y péptidos en el perfil salival. Se analizaron los cambios en el área de los picos cromatográficos de cada fracción de proteínas identificadas que ocurrían en las mezclas proteínas salivales - catequina (CAT), proteínas salivales - epicatequina (EC), y proteínas salivales - catequina más epicatequina (CAT+EC), en comparación con el respectivo control de las proteínas salivales sin la adición de flavanol. La concentración de flavanol en cada uno de los sistemas anteriores se mantuvo siempre constante.

En los ensayos con los flavanoles individuales, la epicatequina destacó por su capacidad de formar agregados solubles, especialmente con las proteínas ricas en prolina básicas (bPRPs), mientras que la catequina mostró una tendencia a formar agregados

insolubles con la mayoría de las proteínas ensayadas. Los resultados en las mezclas CAT+EC parecían indicar la existencia de un comportamiento sinérgico entre ambos flavanoles que facilitaba la interacción con proteínas salivales, favoreciéndose la formación de precipitados en detrimento de la formación de agregados solubles, evidenciados, respectivamente, como descensos o aumentos de las áreas cromatográficas de algunas fracciones salivales.

Los estudios llevados a cabo por calorimetría de titulación isotérmica (ITC) permitieron analizar los cambios de energía asociados a las interacciones flavanol-proteína. Se obtuvieron los siguientes parámetros termodinámicos para los tres sistemas estudiados: constante unión aparente ( $K_{app}$ ), número de sitios de unión ( $n$ ), variación de energía libre ( $\Delta G$ ), variación de entalpía ( $\Delta H$ ) y variación de entropía ( $\Delta S$ ); así como las correspondientes isothermas de unión. Para el análisis, el modelo que mostró un mejor ajuste fue aquel que contemplaba sitios de unión independientes y dos *sets* en el proceso de unión. Los resultados obtenidos para estos dos *sets* parecían corresponderse con los dos tipos de fuerzas de unión principales implicadas en las interacciones flavanol-proteína, las interacciones hidrofóbicas y los puentes de hidrógeno.

La comparación de los parámetros termodinámicos obtenidos en los sistemas binarios proteína/flavanol parecían indicar una mayor afinidad de la EC en su unión a las proteínas salivales frente a la CAT. Los valores de  $\Delta G$  y  $K_{app}$  mostraron que la interacción cuando se ensayó la mezcla CAT+EC era más favorable que cuando se ensayaron los flavanoles por separado, a igualdad de concentración total de flavanoles. En este sistema (CAT+EC), se observaron dos tipos de contribuciones a la isoterma de unión, un componente endotérmico hidrofóbico y un componente exotérmico de puentes de hidrógeno.

Con relación a los estudios de simulación de la dinámica molecular, se trata de una herramienta que permite estudiar el comportamiento teórico de las moléculas en disolución. Como modelo proteico se utilizó el péptido IB7<sub>14</sub>, representativo de las proteínas ricas en prolina (PRPs) presentes en la saliva humana. Se realizaron varias simulaciones de 50 ns de la interacción entre las moléculas de péptido y los flavanoles, que permitieron identificar los aminoácidos principalmente implicados en las interacciones con estos compuestos fenólicos. Así mismo, se observó una unión cooperativa más rápida y más fuerte entre los péptidos IB7<sub>14</sub> y los compuestos fenólicos cuando ambos tipos de flavanoles están presentes simultáneamente en la disolución, en comparación con las simulaciones realizadas únicamente con la presencia de uno de los dos flavanoles. Las diferencias conformacionales entre las moléculas de catequina y epicatequina explican por qué la epicatequina interacciona con mayor facilidad con el péptido y, una vez que esto ocurre, la formación de cavidades en la estructura peptídica que favorecerían la inclusión de la molécula de catequina. Por tanto, la presencia de ambos tipos de flavanol en la solución produciría un efecto sinérgico que facilita la unión a los péptidos de forma más eficiente.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los dos flavanoles ensayados, catequina y epicatequina, presentan un comportamiento diferente en su unión a las proteínas salivales, el cual parece estar relacionado con su estructura conformacional. Además, los resultados evidencian la existencia de un comportamiento cooperativo entre las moléculas de catequina y epicatequina en su unión a proteínas, lo que podría explicar las sinergias de astringencia previamente observadas en la evaluación por un panel sensorial.



## Molecular Approach to the Synergistic Effect on Astringency Elicited by Mixtures of Flavanols

Alba María Ramos-Pineda,<sup>†</sup> Ignacio García-Estévez,<sup>†,§</sup> Natércia F. Brás,<sup>⊗</sup> Eva M. Martín del Valle,<sup>‡</sup> Montserrat Dueñas,<sup>†</sup> and María Teresa Escribano Bailón<sup>\*,†</sup>

<sup>†</sup>Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Facultad de Farmacia, University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>§</sup>LAQV, REQUIMTE, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>⊗</sup>UCIBIO, REQUIMTE, Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, Porto, Portugal

<sup>‡</sup>Department of Chemical Engineering, University of Salamanca, Salamanca, Spain

### Supporting Information

**ABSTRACT:** The interactions between salivary proteins and wine flavanols (catechin, epicatechin, and mixtures thereof) have been studied by HPLC-DAD, isothermal titration microcalorimetry, and molecular dynamics simulations. Chromatographic results suggest that the presence of these flavanol mixtures could facilitate the formation of precipitates to the detriment of soluble aggregates. Comparison between the thermodynamic parameters obtained showed remarkably higher negative values of  $\Delta G$  in the system containing the mixture of both flavanols in comparison to the systems containing individual flavanols, indicating a more favorable scenario in the mixing system. Also, the apparent binding constants were higher in this system. Furthermore, molecular dynamics simulations suggested a faster and greater cooperative binding of catechin and epicatechin to IB7<sub>14</sub> peptides when both types of flavanols are present simultaneously in solution.

**KEYWORDS:** *astringency, flavan-3-ols, proline-rich proteins, salivary proteins, isothermal titration calorimetry, molecular dynamics simulations*





















## **CAPÍTULO 2:**

### **EFFECTO SINÉRGICO DE LA MEZCLA DE FAMILIAS DE PRPs EN SU INTERACCIÓN CON FLAVANOLES**

La saliva es una solución acuosa compleja, altamente variable y dinámica. En general, las proteínas salivales se agrupan en  $\alpha$ -amilasas, mucinas, anhidrasas carbónicas, histatinas, estaterinas, cistatinas y proteínas ricas en prolina (PRPs), las cuales se dividen a su vez en proteínas ricas en prolina ácidas (aPRPs), básicas (bPRPs) y glicosiladas (gPRPs) (Castagnola et al., 2011; Manconi et al., 2016). La mayoría de los estudios sobre astringencia se centran en las bPRPs por su conocida capacidad para precipitar taninos, sin embargo, estudios recientes han revelado que esta no es una propiedad exclusiva de las bPRPs, sino que existen otras familias de proteínas salivales capaces de interactuar con taninos (Quijada-Morín et al., 2016; Soares et al., 2018).

A pesar de la existencia en bibliografía de trabajos enfocados al estudio de la interacción entre compuestos fenólicos y proteínas salivales como principal mecanismo para explicar la sensación de astringencia, las bases moleculares de este proceso siguen sin estar bien definidas e, incluso, los resultados obtenidos en los diferentes estudios en relación con la afinidad de las diferentes familias de proteínas parecen contradictorios. Muchos de estos trabajos se han llevado a cabo en un ensayo competitivo donde todas las proteínas de la saliva están presentes de forma simultánea (Brandão et al., 2014; Quijada-Morín et al., 2016), aunque recientemente otros autores han estudiado la interacción entre fracciones de proteínas aisladas, principalmente PRPs, con algunos compuestos fenólicos representativos de los alimentos (Soares et al., 2018).

Las conclusiones obtenidas en estos dos tipos de trabajos son frecuentemente contradictorias. Esto nos sugirió la posibilidad de que la interacción de las PRPs con los

## *Capítulo 2*

taninos podría cambiar en gran medida en función de si las proteínas se encuentran de forma aislada o en mezcla. Por ello, nos propusimos estudiar la posible existencia de mecanismos sinérgicos entre fracciones de proteínas salivales en su interacción con los flavanoles, como paso adicional al estudio de la elucidación de los mecanismos responsables de la astringencia.



## 2.1. OBJETIVOS

El principal objetivo planteado en este capítulo es evaluar el posible efecto sinérgico resultante de la coexistencia de dos fracciones de PRPs salivales (aPRPs y bPRPs) en su interacción con flavanoles.

Este objetivo general fue desarrollado en los siguientes objetivos específicos:

- Analizar la formación de agregados flavanol-proteína para las dos fracciones de PRPs, por separado y de forma conjunta mediante HPLC-DAD.
- Analizar la distribución del tamaño de partícula de los agregados formados en estas interacciones mediante Dynamic Light Scattering (DLS).
- Identificar y caracterizar los agregados formados con las dos fracciones de proteínas aisladas o en mezcla, antes y después de la interacción con los flavanoles mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF).

## 2.2. RESUMEN

Los resultados obtenidos dieron lugar a la siguiente publicación:

Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., Soares, S., de Freitas, V., Dueñas, M., Escribano-Bailón, M. T. Synergistic effect of mixture of two proline-rich-protein salivary families (aPRP and bPRP) on the interaction with wine flavanols. *Food Chemistry*, **2019**, 272, 210-215.

En este estudio se evaluó el posible efecto sinérgico de la coexistencia de dos fracciones de PRPs salivales (bPRPs y aPRPs) en la interacción con flavanoles. Tras la separación y purificación de las distintas fracciones de proteínas salivales, se seleccionaron las bPRPs y aPRPs para realizar los ensayos de interacción con dos flavanoles, catequina y epicatequina, ya que en estudios previos han mostrado estar altamente involucradas en la interacción con diferentes compuestos fenólicos (Brandão et al., 2014; Quijada-Morín et al., 2016).

La determinación del perfil cromatográfico de proteínas salivales antes y después de la interacción con compuestos fenólicos ha sido usada para investigar la existencia de interacciones entre compuestos fenólicos y proteínas salivales. En este estudio se determinaron los cambios en las áreas cromatográficas de las fracciones de proteínas aisladas ensayadas antes y después de la interacción con los flavanoles catequina y epicatequina, y se comparó con los resultados obtenidos cuando los dos tipos de proteínas se ensayaban de forma conjunta, manteniendo siempre la misma concentración de proteína.

Los resultados obtenidos en los análisis por HPLC muestran un aumento significativo de la formación de agregados solubles entre epicatequina y bPRPs cuando las aPRPs también están presentes en la mezcla, lo que parece indicar que la fracción de aPRPs

podría favorecer la formación de los agregados bPRP-flavanol y/o su estabilidad, si bien la presencia de bPRPs no parecía afectar a la interacción aPRPs-flavanol. Además, parece sugerir una mayor capacidad de la epicatequina para formar agregados solubles en comparación con la catequina.

Adicionalmente, se determinó el tamaño de los agregados formados en estas interacciones mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). De este modo, los agregados más pequeños podrían relacionarse con agregados solubles, mientras que los de mayor tamaño podrían considerarse más propensos a precipitar. Los resultados mostraron que los agregados de mayor tamaño se formaban en las interacciones con catequina. Para los sistemas estudiados con epicatequina, se vio que la fracción de bPRPs formaba agregados de mayor tamaño que con aPRPs, y estos agregados eran más pequeños, y por tanto más solubles, cuando las dos fracciones (aPRPs y bPRPs) estaban juntas en comparación con los respectivos sistemas con fracciones aisladas, lo que parecía estar en consonancia con los resultados observados mediante HPLC.

Gracias al análisis mediante espectrometría de masas utilizando desorción/ionización láser asistida por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF) se pudieron identificar un total de 30 agregados solubles entre las moléculas de flavanol (catequina o epicatequina) y las fracciones de aPRPs y/o bPRPs. Se observó un importante aumento en el número de agregados formados cuando las dos fracciones estaban presentes de forma simultánea, en comparación con las proteínas por separado. Además, se formaron más agregados con bPRPs que con aPRPs, pero el número de moléculas de aPRPs en los agregados aumentaba considerablemente cuando las dos proteínas estaban juntas, lo que podría indicar que las aPRPs interaccionan más fácilmente con los agregados flavanol-bPRPs que con los flavanoles libres. Se observó que la formación de agregados solubles era un 15% mayor con epicatequina que con catequina, lo que parece estar de acuerdo

## *Capítulo 2*

con los resultados obtenidos en los análisis anteriores en los que la catequina mostraba tendencia a formar agregados insolubles de mayor tamaño.

Los resultados en su conjunto apoyan los anteriormente obtenidos en los que se observaban diferencias entre catequina y epicatequina en la formación de agregados con proteínas salivales, y además confirman un comportamiento diferente de las fracciones de proteínas salivales cuando se encuentran aisladas frente a cuando están juntas en mezcla, indicando un efecto sinérgico en la interacción.



## Synergistic effect of mixture of two proline-rich-protein salivary families (aPRP and bPRP) on the interaction with wine flavanols



A.M. Ramos-Pineda<sup>a</sup>, I. García-Estévez<sup>a,\*</sup>, S. Soares<sup>b</sup>, V. de Freitas<sup>b</sup>, M. Dueñas<sup>a</sup>,  
M.T. Escribano-Bailón<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Facultad de Farmacia, University of Salamanca, Salamanca, Spain

<sup>b</sup> REQUIMTE/LAQV, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, Portugal

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Salivary proline-rich proteins  
Interaction  
Flavan-3-ols  
Astringency  
HPLC-DAD  
MALDI-TOF  
Dynamic-light-scattering

### ABSTRACT

In this study, we have evaluated by HPLC-DAD, DLS and MALDI-TOF a synergic effect of the coexistence of two salivary-PRP fractions (basic-PRPs and acidic PRPs) on the interaction with flavanols. Results obtained showed noticeable enhancement of the interaction between (epi)catechin and PRPs when both types of proteins are blended. Up to 30 soluble aggregates have been tentatively identified with molecular weight from 4680 to 35,851. (epi)Catechins seem to bind preferentially bPRPs than aPRPs, although the medium size aggregates flavanol-bPRPs formed could favour the interaction with aPRPs giving rise to soluble mixed aggregates.

\* Corresponding author.

E-mail address: [igarest@usal.es](mailto:igarest@usal.es) (I. García-Estévez).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.024>

Received 31 January 2018; Received in revised form 30 July 2018; Accepted 7 August 2018

Available online 08 August 2018

0308-8146/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.













BLOQUE II:

## ESTRATEGIAS PARA LA MODULACIÓN DE LA ASTRINGENCIA





## **CAPÍTULO 3:**

### **EFFECTO DE LA ADICIÓN DE MANOPROTEÍNAS EN LA INTERACCIÓN FLAVONOL-PROTEÍNA**

Los flavonoles son un tipo de compuestos fenólicos que se encuentran de forma habitual en plantas, alimentos y bebidas, siendo el vino una de las principales fuentes en la dieta. Estos compuestos se suelen encontrar en su forma glicosilada, siendo los 3-*O*-glucósidos los conjugados más frecuentes (Mattivi et al., 2006). En el vino, la quercetina y sus conjugados son los principales flavonoles descritos. Estos compuestos se han relacionado con diferentes propiedades organolépticas como el color, el amargor o la astringencia.

Debido a su capacidad para actuar como buenos copigmentos (Escribano-Bailón y Santos-Buelga, 2012), se ha sugerido la adición de extractos ricos en flavonoles para la mejora y estabilización del color en vinos tintos. Además, a pesar de que no hay muchos estudios centrados en la astringencia de los flavonoles del vino, recientemente se ha demostrado que pueden interactuar con proteínas salivales humanas resultando en un aumento en la percepción de astringencia (Ferrer-Gallego et al., 2015).

Como ya se ha comentado en el apartado de introducción, diversos factores pueden modular la sensación de astringencia, como son la presencia de azúcares, ácidos o etanol, entre otros. Concretamente, varias familias de polisacáridos han mostrado tener capacidad de interactuar con los taninos, pudiendo inhibir la agregación entre las proteínas salivales y los polifenoles de los alimentos y, por tanto, podrían llegar a modular la astringencia. Se han propuesto dos mecanismos principales para explicar la reducción de astringencia provocada por la adición de polisacáridos. El primero de ellos consiste en la formación de complejos ternarios solubles proteína/polifenol/polisacárido, mientras

que el otro mecanismo implicaría una interacción preferencial entre el polifenol y el polisacárido, compitiendo con la agregación proteína-polifenol (Brandão et al., 2017a; Mateus et al., 2004).

Las manoproteínas son un tipo de polisacáridos que se libera al vino a partir de la pared celular de las levaduras, llegando a representar el 35% de los polisacáridos del vino. En los últimos años ha aumentado el interés por el uso de manoproteínas durante el proceso de vinificación, debido a los efectos positivos que podrían tener sobre la calidad sensorial, concretamente sobre la estabilidad del color y sobre la astringencia. En este sentido, se ha demostrado su capacidad de suavizar la astringencia en los vinos tintos (Quijada-morín et al., 2014). De hecho, la adición de manoproteínas comerciales al vino, es una práctica llevada a cabo para mejorar la suavidad y redondez, y corregir la astringencia excesiva (Brandão et al., 2017a; Carvalho et al., 2006; Freitas et al., 2003; Guadalupe et al., 2010).

Sin embargo, no existen trabajos previos que hayan estudiado los mecanismos de interacción entre el sistema ternario proteína/flavonol/manoproteína en relación con la astringencia y su modulación, lo que sería de gran interés para lograr una mayor comprensión sobre los mecanismos implicados en la reducción de astringencia por polisacáridos.

### 3.1. OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo es profundizar en el conocimiento de los mecanismos que llevarían a una reducción de la astringencia inducida por la presencia de polisacáridos, estudiando específicamente el efecto de la adición de una manoproteína comercial en la interacción flavonol-proteína.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Evaluación sensorial del efecto que produce la adición de manoproteína sobre la astringencia provocada por la quercetina 3-*O*-glucósido.
- Estudio molecular del efecto de la adición de manoproteína sobre la interacción flavonol-proteínas salivales.
- Análisis de la formación de agregados en los sistemas flavonol-proteínas salivales y/o manoproteína.
- Caracterización de las interacciones que tienen lugar en las diferentes mezclas estudiadas a través de sus parámetros termodinámicos.

### 3.2. RESUMEN

Los resultados obtenidos en este apartado de la tesis han sido publicados en el siguiente artículo:

Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., Dueñas, M., Escribano Bailón, M. T. 2018. Effect of the addition of mannoproteins on the interaction between wine flavonols and salivary proteins. *Food Chemistry*, **2018**, 264, 226-232.

En este trabajo se estudió el efecto de la adición de una manoproteína comercial (MP) sobre la interacción entre quercetina 3-*O*-glucósido (Q) y proteínas de la saliva (SP). La manoproteína usada en estos ensayos presenta un contenido de 10.1% de proteína y 89.9% de azúcares (76.7% manosa, 21.1% glucosa, 0.9% xilosa, 0.7% galactosa y 0.6% arabinosa).

Se realizaron evaluaciones sensoriales para comparar la intensidad de la astringencia de un vino control con la de los diferentes tratamientos con la manoproteína y/o quercetina: MP (12 g L<sup>-1</sup>), Q (0.4 g L<sup>-1</sup>), Q (0.4 g L<sup>-1</sup>) + MP (4 g L<sup>-1</sup>), Q (0.4 g L<sup>-1</sup>) + MP (12 g L<sup>-1</sup>). El análisis sensorial confirmó la capacidad de la manoproteína para reducir la astringencia provocada por el flavonol. Además, se estudiaron las interacciones MP/SP/flavonol usando espectroscopia de fluorescencia, dispersión de luz dinámica y calorimetría de titulación isotérmica.

Los resultados obtenidos en los estudios de *quenching* de fluorescencia indicaron la existencia de interacciones entre las proteínas salivales y la manoproteína ensayada, así como entre las proteínas salivales y el flavonol, aunque el descenso en la intensidad de fluorescencia de las proteínas fue mucho mayor tras la interacción con el flavonol (37.9%). Sin embargo, los máximos valores de quenching de fluorescencia (48.5%) se



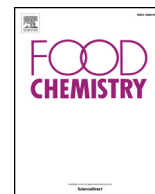
alcanzaron cuando las tres especies se encontraban en mezcla (SP+Q+MP), sugiriendo que los tres componentes pudiesen interactuar entre sí.

El estudio de los agregados por dispersión de luz dinámica mostró un aumento destacable en el tamaño de los agregados en la disolución, cuando la manoproteína y el flavonol están juntos (SP+Q+MP), en comparación con los agregados formados en los sistemas binarios SP+MP y SP+Q, lo que parece sugerir la formación de agregados ternarios proteína/polifenol/polisacáridos solubles. La presencia de las moléculas de azúcar en estos agregados de mayor tamaño podría actuar favoreciendo su permanencia en disolución, evitando que precipiten, teoría que ha sido sugerida previamente por otros autores (Brandão et al, 2017a).

Los parámetros termodinámicos obtenidos en la calorimetría indican valores de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) y de constante de afinidad ( $K_{app}$ ) más favorables en las mezclas ternarias que en las mezclas binarias MP-SP y flavonol-SP. Así mismo, la interacción entre los tres componentes, MP+SP+flavonol, podría estar gobernada inicialmente por fuerzas hidrofóbicas, pero la presencia de manoproteínas en la mezcla permite establecer enlaces de hidrógeno que podrían estabilizar el sistema, corroborando así la posible formación de este tipo de agregados ternarios y su permanencia en disolución.

Los resultados obtenidos mediante estas técnicas en conjunto indican no solo la posibilidad de interacciones entre proteínas salivales y flavonoles, sino también entre manoproteínas y proteínas de la saliva, sugiriendo la posible formación de complejos ternarios solubles proteína/polifenol/polisacáridos que podrían afectar la percepción de astringencia. Además, los resultados apuntan a una interacción más fuerte cuando los tres componentes están juntos.





## Effect of the addition of mannoproteins on the interaction between wine flavonols and salivary proteins



Alba M. Ramos-Pineda, Ignacio García-Estévez\*, Montserrat Dueñas, M. Teresa Escribano-Bailón

Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, University of Salamanca, Salamanca E37007, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Astringency  
Wine flavonols  
Mannoproteins  
Salivary proteins  
Sensory analysis  
Polyphenol-protein interaction

### ABSTRACT

It has been suggested that the addition of flavonols (i.e. white grape skins) improves and stabilizes the color of red wines. However, it has been shown that flavonol glycosides produce a mouth-drying and mouth-coating sensation at very low threshold concentrations. Moreover, the addition of polysaccharides to wines is a practice addressed to improve the smoothness and roundness and correct excessive astringency, so we have studied the effect of the addition of yeast mannoproteins (MP) on the interaction between quercetin 3-glucoside and human salivary peptides. Sensory analysis showed the first evidence of the mannoprotein smoothing effect when the flavonol is added to wine. Additionally, MP/SP/polyphenol interactions were studied using fluorescence spectroscopy, dynamic light scattering and isothermal titration calorimetry. Results obtained indicate not only the existence of interactions between mannoproteins and flavonols but also between mannoproteins and salivary proteins (SP), suggesting a possible formation of protein/polyphenol/polysaccharide ternary complex.

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [amramos@usal.es](mailto:amramos@usal.es) (A.M. Ramos-Pineda), [igarest@usal.es](mailto:igarest@usal.es) (I. García-Estévez), [mduenas@usal.es](mailto:mduenas@usal.es) (M. Dueñas), [escriban@usal.es](mailto:escriban@usal.es) (M.T. Escribano-Bailón).

















## **CAPÍTULO 4:**

### **INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE OTRAS ESPECIES QUÍMICAS EN LAS INTERACCIONES TANINO-PROTEÍNA**

Los polifenoles del vino atraen gran interés tanto por sus potenciales beneficios para la salud como por ser los responsables de las propiedades organolépticas de muchos alimentos, como el color, el sabor o la sensación en boca. En el caso del vino tinto, la astringencia es uno de los principales atributos sensoriales que se evalúa, considerándose incluso un indicador de calidad de un vino.

Los taninos condensados o proantocianidinas han sido los compuestos fenólicos más relacionados con la astringencia de los vinos. Estos compuestos se extraen tanto de la semilla como del hollejo de las uvas durante el proceso de vinificación. La relación de estos compuestos con la astringencia del vino así como su capacidad para interactuar con los pigmentos del mismo hace que en la actualidad se pueda encontrar extractos de semillas ricos en flavanoles disponibles comercialmente para ser añadidos a los vinos con el objetivo de mejorar su sensación en boca, estructura o incluso estabilizar el color (Cliff et al., 2012).

La astringencia es un proceso de gran complejidad que todavía no se ha logrado entender por completo. Se ha propuesto que podría ser el resultado de la contribución de varios mecanismos, como la pérdida de lubricidad en la boca, alteración de la película mucosa, activación de receptores del gusto o una interacción directa entre los taninos y el epitelio oral, o incluso varios de estos mecanismos teniendo lugar simultáneamente (Gibbins y Carpenter, 2013; Payne et al., 2009; Ployon et al., 2018; Rossetti et al., 2009; Tachibana et al., 2004).

En los últimos años se han publicado numerosos estudios tratando de elucidar los mecanismos que subyacen en el desarrollo de la astringencia, sin embargo, solo algunos autores han considerado la posible participación de las células del epitelio oral. El primer estudio que abordó este nuevo enfoque logró demostrar que las procianidinas del vino reaccionan con las células del epitelio oral *in vitro* (Payne et al., 2009). Otros estudios posteriores han considerado tanto el papel del epitelio oral como el de las proteínas salivales en estas interacciones, e incluso se ha sugerido que las PRPs podrían actuar impidiendo el acceso de los taninos a la película mucosa salival que recubre el epitelio oral (Ployon et al., 2018; Soares et al., 2016).

Hay que tener en cuenta que el consumo de vino tinto suele ir acompañado de otros alimentos que podrían modificar la percepción de algunas de sus propiedades sensoriales, a veces potenciando ciertos atributos y, en otras ocasiones, enmascarándolos. Aparte de las características de los alimentos susceptibles de acompañar su ingesta, las sensaciones que provoca el vino en la boca pueden verse afectadas en gran medida por la fisiología oral y, concretamente, por la interacción de algunos de estos compuestos con la saliva (Harrington, 2005; Muñoz-González et al., 2018). Se sabe que la interacción de los compuestos fenólicos y las proteínas de la saliva puede verse afectada por diversos factores, como la composición del medio y la presencia de otras especies químicas. Varios autores han estudiado la relación entre el pH y la astringencia y sugieren la existencia de una relación lineal negativa entre ellos (Guinard et al., 1986). También se ha investigado el efecto de la fuerza iónica y el contenido en etanol en la formación de agregados taninos-proteínas salivales y, por lo tanto, su importancia en la astringencia (Poncet-Legend et al., 2003). Sin embargo, apenas hay estudios en los que se evalúe el efecto de la presencia de otras sustancias químicas en dichas interacciones (Brandão et al., 2017b).

#### 4.1. OBJETIVOS

El objetivo general de este capítulo fue profundizar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en la astringencia, considerando la participación tanto de las proteínas salivales como de las células epiteliales, y estudiar su modulación por la presencia de otras sustancias químicas susceptibles de ser utilizadas como aditivos en alimentos.

Este objetivo general fue desarrollado en los siguientes objetivos específicos:

- Analizar el perfil proteico de la saliva humana por electroforesis SDS-PAGE, identificando las principales proteínas implicadas en la unión a flavanoles.
- Estudiar las interacciones entre flavanoles procedentes de la semilla de la uva y células epiteliales en un modelo celular, evaluando cómo afecta la presencia de proteínas salivales en estas interacciones.
- Evaluar el efecto de la presencia de distintas especies químicas en las interacciones flavanol-proteína salival y flavanol-célula epitelial.

#### 4.2. RESUMEN

Los resultados obtenidos en este capítulo se han recogido en el siguiente artículo:

Ramos-Pineda, A. M., Carpenter, G.H., García-Estévez, I., Escribano Bailón, M. T. Influence of Chemical Species on Polyphenol-Protein Interactions related to Wine Astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, DOI: 10.1021/acs.jafc.9b00527 (aceptada para su publicación).

En este trabajo se ha evaluado el efecto de la presencia de diferentes especies químicas (susceptibles de ser incorporados a los alimentos como aditivos) sobre la interacción entre flavanoles de un extracto de semillas de uva y proteínas de la saliva, mediante electroforesis en gel de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE) y mediante un modelo celular basado en el epitelio oral, donde también se ha estudiado la posible contribución de las células epiteliales en el proceso de astringencia.

El análisis del perfil proteico de la saliva mediante SDS-PAGE permitió determinar las principales proteínas de la saliva implicadas en la unión a los flavanoles, destacando la formación de agregados insolubles flavanol-proteína con PRPs y estaterina. Se evaluó el efecto de la presencia de varias sustancias químicas en la formación de agregados flavanol-proteína, mostrando que la incubación con algunas de estas sustancias producía un efecto inhibitor en la unión de estos polifenoles a las proteínas salivales, disminuyendo la formación de agregados insolubles. Los compuestos que mostraron un efecto significativo en la electroforesis fueron el bicarbonato amónico, carbonato sódico y bicarbonato sódico.

Por otro lado, los ensayos con cultivos celulares se llevaron a cabo usando células TR146, las cuales han mostrado buenos resultados como modelo del epitelio oral *in vitro* (Jacobsen et al, 1995). Este modelo ha sido utilizado por su capacidad para retener una

película mucosa, por lo que resulta una herramienta muy útil cuando se trata de simular la situación fisiológica (Ployon et al., 2016). En este ensayo, las células fueron tratadas con saliva humana con el objetivo formar una película mucosa sobre la superficie celular y poder estudiar, de este modo, la posible contribución de esta película en la interacción con flavanoles. También se evaluó el efecto de la incubación previa de la saliva y los flavanoles del extracto antes de su interacción con el modelo celular, con el objetivo de estudiar el efecto de la presencia de proteínas de la saliva en la solución.

Los resultados indicaron que cuando se interponen los flavanoles aislados con el modelo celular TR146, estos se unen directamente a la célula y establecen uniones suficientemente fuertes para resistir a los lavados posteriores. Sin embargo, la incubación de la saliva con el extracto de semillas, antes de ser añadido a las células, podría dar lugar a la formación de complejos flavanol-proteína suficientemente estables para prevenir la interacción posterior de los flavanoles con las células epiteliales.

Por otro lado, se ensayó el efecto de la presencia de diferentes sustancias químicas en las interacciones flavanol-proteína y célula-flavanol en el modelo celular del epitelio oral. Se observó que uno de los compuestos que había mostrado un efecto inhibitor en la formación de agregados flavanol-proteína salival en los estudios mediante electroforesis también mostraba una capacidad de inhibición en las interacciones observadas en los ensayos en cultivos celulares. Este compuesto era el carbonato sódico, el cual mostró una capacidad de inhibición tanto en la interacción flavanol-proteína como en la interacción célula-flavanol.

Estos resultados sugieren que los flavanoles se unen directamente a las células orales y la presencia de proteínas salivales podría prevenir esta interacción compitiendo por la unión de los flavanoles. Además, las interacciones flavanol-proteína salival podrían verse

#### *Capítulo 4*

afectadas por la presencia de algunos compuestos químicos usados como aditivos alimentarios, lo que podría ayudar a comprender mejor posibles cambios en la percepción de la astringencia de los vinos cuando se consumen conjuntamente con ciertos alimentos.



# Influence of Chemical Species on Polyphenol–Protein Interactions Related to Wine Astringency

A. M. Ramos-Pineda,<sup>†</sup> G. H. Carpenter,<sup>‡</sup> I. García-Estévez,<sup>\*,†</sup> and M. T. Escribano-Bailón<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP), Facultad de Farmacia, University of Salamanca, 37007 Salamanca, Spain

<sup>‡</sup>Salivary Research Unit, King's College London Dental Institute, Guy's Hospital, London SE1 9RT, United Kingdom

**S** Supporting Information

**ABSTRACT:** One of the most accepted mechanisms of astringency consists of the interaction between polyphenols and some specific salivary proteins. This work aims to obtain further insights into the mechanisms leading to a modulation of astringency elicited by polyphenols. The effect of the presence of different chemical species (present in food and beverages as food additives) on the polyphenol–protein interaction has been evaluated by means of techniques such as sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and cell cultures using a cell-based model of the oral epithelium. Results obtained showed that several chemicals, particularly sodium carbonate, seem to inhibit polyphenol binding to salivary proteins and to oral epithelium. These results point out that polyphenol–saliva protein interactions can be affected by some food additives, which can help to better understand changes in astringency perception.

**KEYWORDS:** *astringency, tannin, wine, salivary proteins, SDS–PAGE, epithelial cell*

















# SUMMARY





## **1. INTRODUCTION**

Phenolic compounds are a group of secondary metabolites widely distributed in the plant kingdom. They are commonly found in foods and beverages, including wine as one of the main sources in the diet. From a chemical point of view, the term "polyphenol" includes a very heterogeneous group of compounds, characterized by having an aromatic ring with one or more hydroxyl groups. According to their chemical structure, they can be divided into two large groups of compounds: flavonoids and non-flavonoids (Crozier et al., 2006).

In grapes, these compounds are mainly located in the solid parts (essentially skin and seeds) and become part of the wine during the winemaking process. They have a great interest in oenology since they are responsible for many of the organoleptic properties of wines, such as colour, bitterness or astringency (Santos-Buelga and Freitas, 2009).

Grape tannins are a group of polyphenols with a great structural variety and a wide range of molecular masses. In particular, the term tannin refers to the ability of these compounds to form stable complexes with proteins and other macromolecules, leading to precipitation. This ability seems to be related to the sensation of dryness in the mouth caused by wine and other foods rich in tannins, called astringency.

Astringency can be interpreted as an unpleasant sensation in some foods, however, it is a fundamental attribute in red wines, being even considered a quality parameter and a major contributor to its consumer acceptance (Upadhyay et al., 2016). The concept of astringency can be defined as the set of sensations that produce drying, roughing and puckering of the mouth epithelia. Although there are a few theories about the origin of the astringency sensation, the most widely accepted mechanism consists on the interaction between tannins and salivary proteins (Soares et al., 2012).

## *Summary*

Saliva mainly consists of water, electrolytes and proteins. Specifically, 40% of the protein content of saliva corresponds to small proteins and peptides, also known as the salivary proteome. More than 2,000 different peptides and proteins present in human saliva have been identified, both from the secretions of the salivary glands and from other tissues and body fluids (Castagnola et al., 2011; Vitorino et al., 2009). Salivary proteins are usually divided into several major families including proline-rich proteins (PRPs), which represent around 50-60% of the total salivary proteome, followed by  $\alpha$ -amylase, which accounts for 20%. The remaining percentage corresponds mainly to histidines, staterin, cystatins and mucins, in addition to other minority proteins such as carbonic anhydrase, peptide P-B and immunoglobulins IgG and sIgA.

PRPs are characterized by high content in proline residues. This family is in turn divided into acidic (aPRPs), basic (bPRPs), and glycosylated (gPRPs). Most of the PRPs are able to precipitate tannins, so much of astringency research has been focused in this protein family. However, although precipitation of salivary proteins is one of the most accepted mechanisms, not all astringents cause salivary protein precipitation, evidencing there must be other mechanisms implicated in astringency development.

Along the years a significant amount of research has been done toward astringency understanding. Although it is generally considered that astringency is produced by many mechanisms that result in a loss of oral lubricity, widely differing opinions exist on the molecular bases of this oral sensation. It is not even clear whether it is a single perceptual phenomenon or a concept which combines several subtle sensations (Bajec and Pickering, 2008).

Among all the proposed theories, the most widely accepted consists on the interaction between tannins and salivary proteins, resulting in the formation of soluble or insoluble

complexes. Many authors have furthered the tactile theory of astringency, suggesting that protein precipitation could lead to oral tissue constriction due to a loss of oral lubrication, perceived as an increase in oral friction by activation of mechanoreceptors (Breslin et al., 1993; Clifford, 1997). However, it has been proposed that tannin-protein interactions are more closely associated with astringency than tannin-protein precipitation (Ma et al., 2014; Obrique-Slier et al., 2012).

While some research strongly suggests that the sensation of astringency is a tactile phenomenon, evidence has also been reported supporting the speculation that astringency is a gustatory sensation. Some authors have proposed the possibility of free astringent stimulus that interacts directly with the oral tissue through receptors (Lee and Vickers, 2012; Schwarz and Hofmann, 2008). Moreover, recent publications have suggested a direct activation of the oral epithelial cells by polyphenols, evoking responses on the taste buds through specific taste receptors and ion channels (Carpenter, 2013; Gibbins and Carpenter, 2013). Furthermore, several studies have suggested that the main role of PRPs is not to precipitate tannins, but they could play a protective role preventing astringent compounds from interacting directly with the oral mucosa (J. et al., 2002; Ployon et al., 2018; Schwarz and Hofmann, 2008). Thus, it has been demonstrated that astringency is a highly complex sensation that goes much beyond the traditional view focused on mechanosensation. The most recent studies seem to suggest that astringent compounds can be detected by multiple sensory mechanisms and the possible explanation of astringency lies in the sum of several mechanisms working together.

Moreover, it is widely acknowledged that the astringent sensation can be modulated by several factors such as pH, the presence of acids, percentage of ethanol, content of sugars, and saliva characteristics (de Freitas and Mateus, 2012). Particularly, polysaccharides have been used to improve the smoothness and roundness and correct

## *Summary*

excessive astringency of wines. Among wine polysaccharides, mannoproteins released from yeast during winemaking, have aroused increasing interest during the last years for their different effects reported, such as protein and tartrate stabilization, stimulation of malolactic fermentation, colour stabilization, reduction of protein haze formation and inhibition of tannin aggregation.

Despite the importance of the astringency on the quality of red wines, and therefore its economic importance in the winemaking industry, there is still a gap in the knowledge regarding the mechanisms involved in this sensation and how these could be modulated to improve the mouthfeel of the astringent molecules in wine. For this reason, the molecular, physiological and psychological mechanisms underlying the perception of astringency should be further studied.

## **1. AIM**

Astringency of red wine has been widely associated with the presence of phenolic compounds, but the underlying molecular and physiological mechanisms have not yet been clarified. Although it seems to be related with the interaction between polyphenols and some specific salivary proteins, namely, proline-rich salivary proteins, several mechanisms have been proposed during the last years, such as the participation of specific taste receptors in the mouth. However, astringency is a complex sensation that still need to be clarified, which encourages a deeper study of the processes involved in this phenomenon.

The general aim of this PhD Thesis is to study, at molecular level, the interactions between wine phenolic compounds and salivary proteins as the main mechanism for the astringency development. Moreover, this work aims to study the possible mechanisms leading to the perception of astringency synergies and to evaluate the effect of the presence of other chemical species on protein-polyphenol interactions.

The specific aims of this PhD Thesis were:

Objective 1. To study molecular interactions between wine phenolic compounds and salivary proteins using physicochemical techniques, identifying the main protein families involved on the interactions (Chapters 1 and 2).

Objective 2. To investigate the molecular mechanisms leading to synergies of astringency, both by mixture of flavanols and by coexistence of different protein families (Chapters 1 and 2).

Objective 3. To assess the effect of the addition of yeast mannoproteins on the interactions between polyphenols and salivary proteins (Chapter 3).

## *Summary*

Objective 4. To study the influence of the presence of other chemical species on the polyphenol-protein interactions (Chapter 4).



## 2. EXPERIMENTAL SECTION

### SECTION I: MOLECULAR STUDY OF THE INTERACTIONS BETWEEN PHENOLIC COMPOUNDS AND PROTEINS: SYNERGISMS OF ASTRINGENCY

#### **CHAPTER 1: SYNERGISTIC EFFECT ON ASTRINGENCY BY THE MIXTURE OF FLAVANOLS**

The main objective of this chapter was to study, at molecular level, the synergisms of astringency caused by mixtures of flavanols, with the purpose of going deeper into the knowledge of the interactions between flavanols and proteins as a relevant mechanism for explaining astringency.

The results obtained in this chapter led to the following *peer reviewed* publication:

Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., Brás, N. F., Martín del Valle, E. M., Dueñas, M., Escribano Bailón, M. T. Molecular approach to the synergistic effect on astringency elicited by mixtures of flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2017**, 65, 6425-6433.

#### 1. MATERIALS AND METHODS

Whole human saliva was collected from six healthy volunteers. The saliva pool was immediately treated with 10% TFA and centrifuged for 10 min at 12,000g. After that, the supernatant was dialyzed using a Spectra/Por® 3 cellulose membrane. Treated saliva was analyzed by HPLC-DAD. Seven salivary proteins (SP) fractions were collected at the DAD chromatographic-detector outlet and identified using a LTQ-Orbitrap Velos mass spectrometer, following the procedure described elsewhere (Quijada-Morín et al., 2016).

## *Summary*

The variations occurred in the profile of the different salivary protein fractions after the interaction with catechin (CAT) and or epicatechin (EC) were studied by HPLC-DAD (Agilent 1200 Series). Interaction mixtures were prepared with 125  $\mu$ L of SP and 125  $\mu$ L of the flavanol solution, incubating during 30 min. Incubation mixture was filtered prior to the analysis to remove insoluble complexes formed. Differences in the salivary profiles were assessed by comparison of the profiles registered at 214 nm.

Isothermal titration calorimetry (ITC) assays were performed using a Nano microcalorimeter for measuring enthalpy changes associated with SP-flavanol interactions at 283 K. The titrant (a flavanol solution containing CAT or EC or a mixture CAT+EC, 10 mM) was loaded into the injection syringe while the SP solution (0.025 mM) was placed into the sample cell of the calorimeter. Flavanol solution was titrated into the sample cell as a sequence of 25 injections of 10  $\mu$ L aliquots. The raw data obtained from ITC were transformed and analyzed using AFFINIMETER software. The resulting curve was fitted using the independent sites model with two set of sites.

Molecular dynamic simulations were conducted using a peptide model IB7<sub>14</sub> and several flavanols (CAT and/or EC) molecules. The molecular systems comprise four IB7<sub>14</sub> peptides and 1) eight CAT; 2) eight EC; and 3) four CAT and four EC. The CAT molecules were randomly placed around the peptides, reproducing the experimental conditions. The position of these flavonoids was used to create the other systems to better compare the results. Since the third system may have different CAT+EC order combinations, we created three different systems in order to get an average of the various possibilities. Geometry optimization and MD simulations were carried out using the GAFF (Wang et al., 2004) and ff99SB (Hornak et al., 2006) force fields for flavanols and peptides, respectively. The AMBER 12.0 (Case et al., 2012) simulations package was used to run all minimizations and simulations. The PTRAJ module of AMBER 12.0, and

the Visual Molecular Dynamics 1.9.1 software (Humphrey et al., 1996) were used to analyse and visualize, respectively, the MD trajectories.

Statistical data treatment was performed in order to determine statistical significance of the difference between the chromatographic areas. Data were evaluated using the software packing for Windows IBM SPSS 21 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA).

## 2. RESULTS AND DISCUSSION

In order to evaluate the effect of the addition of the studied flavan-3-ols in the chromatographic salivary profile, the chromatographic areas of the different fractions were obtained after injection of the three studied systems (CAT, EC, and CAT+EC) and compared to those corresponding to the SP control. Statistically significant differences were observed for fractions 1 (bPRP), 3 (gPRP), 4 (histatin) and 7 (statherin). The fraction corresponding with bPRPs showed an important increase in the chromatographic area for EC, which could be understood as the formation of soluble aggregates of flavanol-protein, which were not observed in the presence of catechin. For the gPRPs and histatin fractions, the mixture CAT+EC showed a higher decrease in the chromatographic area than that observed for the flavanols tested individually, what might indicate the existence of a cooperation between both flavanols that facilitates the interaction with salivary proteins, resulting in a higher formation of insoluble aggregates.

These chromatographic results suggested that the presence of flavanol mixtures could facilitate the formation of precipitates to the detriment of soluble aggregates, indicating the possible existence of a synergistic behaviour in CAT+EC mixtures.

Isothermal Titration Calorimetry (ITC) analyses were performed to study changes in the thermodynamic parameters obtained, that is, apparent binding constant ( $K_{app}$ ), number of binding sites in each set ( $n$ ), free energy change ( $\Delta G$ ), change in enthalpy ( $\Delta H$ ), and

## Summary

change in entropy ( $\Delta S$ ) in the system “pure flavanol” toward the system “mixture of flavanols-salivary proteins”.

Using the software for the data treatment, the model that best fitted the isothermal data contemplated independent binding sites and considered two sets, in which the number of binding sites corresponds to a fitting parameter. Results obtained for these two sets were in concordance with the main forces implicated in the interaction between flavanols and proteins, namely, hydrophobic interactions and hydrogen bonding.

Regarding the binary system protein/flavanol, the  $\Delta G$  and  $K_{app}$  values obtained for the epicatechin system indicated higher affinity of this flavanol than of catechin to the salivary proteins. In the system formed by the mixture of flavanols and salivary proteins (CAT+EC/protein), the same two types of contribution to the binding isotherm were observed, the endothermic hydrophobic component and the exothermic hydrogen bond component. Comparison between the parameters obtained from the three systems studied showed remarkable higher negative values of  $\Delta G$  in the system containing the mixture of both flavanols in comparison with the systems containing individual flavanols, indicating a more favorable scenario for interaction in the mixing system. Also the apparent binding constants were higher in this system.

To better characterize the behaviour of the three systems studied, MD simulations were performed using the IB7<sub>14</sub> peptide as a representative peptide of the human salivary PRPs. Several simulations of 50 ns were carried out, in which the recognition and interaction of two different types of flavanols and the IB7<sub>14</sub> peptidic fragments in aqueous environment were studied. Results showed that simultaneous binding of more than two molecules only occurred during the simulation with both flavanols. It could be hypothesized that the more planar structure of epicatechin could facilitate the interaction

between the phenolic ring surfaces, enabling a more effective interaction with peptide. Once epicatechin interacted with the peptide, the formation of new cavities in the structure could facilitate the inclusion of catechin, with more distorted structure.

Thus, MD simulations supported the results obtained in the experiments performed by HPLC-DAD and ITC, pointing out the existence of a cooperative behaviour between catechin and epicatechin when binding proteins that could explain the synergies of astringency evidenced when the sensory panel evaluated these compounds in a previous study (Ferrer-Gallego et al., 2014). Moreover, these compounds interact in a discriminated way with salivary proteins: epicatechin seems to bind preferentially the protein and form soluble aggregates, while catechin tends to form insoluble aggregates that precipitate, probably due to their different conformational structure. These results highlight the complexity of protein-tannin interactions involving different groups of proteins and flavanols, which could be related to the different astringency sub-qualities described by tasters (Quijada-Morin et al., 2016).

Different mechanisms for explaining astringency has been proposed; the tactile mechanism seems to be related with changes in saliva's rheological properties and/or activation of mechanoreceptors, while the gustatory mechanism point to a specific interaction between astringents and chemoreceptors on the taste buds. Our results showed that catechin and epicatechin behave differently on their interaction with salivary proteins, so they could trigger different astringency molecular mechanisms.

Catechin tends to form insoluble protein-flavanol aggregates that may precipitate in the oral cavity, leading to loss of lubricity perceived as an increase in the oral friction. As a consequence, mechanoreceptors would be activated and the tactile signaling pathway would be switched on, feeling as astringency with specific sub-qualities. On the other

## *Summary*

hand, the interaction between epicatechin and salivary proteins seems to result in smaller soluble aggregates which may reach the oral surface and directly interact with the epithelial cells through lipid interaction on the cell's membrane or by activation of specific chemoreceptors. This interaction would activate the taste signaling pathway, feeling in the gustatory areas of the cortex in the brain. This signal would be also traduced in the astringency sensation, but with other different sub-quality attributes.

Previous studies have established that precipitation is not required for astringency to develop, so there must exist another explanation for the underlying cause of astringency that leads to the astringency sensation. In particular, Rossetti et al. (2009) demonstrated that epicatechin did not alter the lubricating properties of saliva and they conclude that the depletion of saliva lubricating proteins is not necessary to obtain an astringent perception, and that astringency is unlikely to be a purely tactile phenomenon. Moreover, Schöbel et al. (2014) studied the contribution of the taste as well as of the trigeminal sensory system to the astringency perception of a range of phenolic compounds with different structures, revealing that their conformational structure elicited different neural responses. They proposed that puckering astringency may be elicited by the coactivation of trigeminal chemosensors and mechanosensors, whereas velvety astringents might exclusively activate trigeminal mechanosensation.

These findings seem to be in good agreement with our results. In a sensory study previously carried out (Ferrer-Gallego et al., 2014) epicatechin was found to be more bitter and astringent than catechin, in general, more “unpleasant” than catechin. These astringency subqualities could be related with the activation of chemoreceptors and mechanoreceptors while velvety attributes might be associated with the activation only of mechanoreceptors. Even more, a possible synergism between chemosensory and mechanosensory activation by astringent has been proposed, which could support the

synergisms on astringency observed when catechin and epicatechin were tested as mixtures. All these results indicate that astringency is likely to be a very complex sensation recognized by the neurological system as the combination of multiple sensory mechanisms, and minor differences in the structure of the astringent molecules might lead to the activation of different molecular mechanisms.

## CHAPTER 2: SYNERGISTIC EFFECT OF THE MIXTURE OF PRPs FAMILIES ON THEIR INTERACTION WITH FLAVANOLS

The aim of this study was to evaluate the effect of the coexistence of two salivary-PRP fractions (basic-PRPs and acidic-PRPs) on the interaction with flavanols.

The results obtained in this chapter led to the following *peer reviewed* publication:

Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., Soares, S., de Freitas, V., Dueñas, M., Escribano-Bailón, M. T. Synergistic effect of mixture of two proline-rich-protein salivary families (aPRP and bPRP) on the interaction with wine flavanols. *Food Chemistry*, **2019**, 272, 210-215.

### 1. MATERIALS AND METHODS

Saliva was collected from six healthy, non-smoker volunteers. TFA (final concentration of 0.1%) was immediately added to inhibit protease activity and to precipitate high molecular weight salivary proteins (SP). After that, sample was dialyzed and analyzed by HPLC-DAD. Basic and acidic PRPs protein fractions were collected at the DAD chromatographic-detector outlet. Identification was carried after tryptic digestion using a nano-UPLC system coupled to a LTQ-Orbitrap Velos mass via a nano-electrospray ion source (Quijada-Morín et al., 2016). The obtained fractions were freeze-dried and frozen prior to its use in the interaction assays.

Purified basic and acidic Proline-Rich-Proteins (bPRPs and aPRPs) were dissolved in Milli-Q water and analyzed both isolated (aPRPs or bPRPs) and blended (aPRPs + bPRPs), before (control) and after (samples) the interaction with catechin (CAT) or epicatechin (EC) in a ratio protein:flavanol 1:3. In each case, the SP were blended with water (control) or with the tannin solution (samples) and incubated for 25 min and



centrifuged for 5 min. The supernatant was injected to HPLC-DAD (Agilent 1200 Series) and changes in the chromatographic area for each fraction were measured at 214 nm.

The size of the complexes formed between purified bPRPs and aPRPs and the flavanol (catechin or epicatechin) was determined by dynamic light scattering (DLS, Zetasizer Nano) at 633 nm at an angle of 173°. Sample solutions with PRPs and flavanol were prepared in a final volume of 20 µL (1:3 protein:flavanol *w/w*) and the intensity fluctuations of the particles were measured before and after the interaction with the flavanols.

MALDI-TOF analyses were carried out in order to characterize the different aggregates formed with both salivary proteins isolated (aPRPs or bPRPs) and blended (aPRPs + bPRPs), before and after the interaction with the flavanols. Two microliters of sample was overlaid with 2 µL of matrix solution and 2 µL of this mixture was applied onto a stainless steel target plate and finally air-dried. Mass spectra were automatically acquired on an UltrafleXtream MALDI-TOF/TOF mass spectrometer operating in linear positive ion detection mode with laser SmartBeam-III and under FlexCompass 1.4 software control. Python (Python Software Foundation) was used for elucidating the identity of the new flavanols-protein aggregates.

The IBM SPSS 21 Windows IBM SPSS 21 (SPSS, Inc. Chicago, IL, USA) was used to determine statistical significance of the difference between the chromatographic areas.

## 2. RESULTS AND DISCUSSION

Results obtained from HPLC-DAD revealed the existence of different behaviour of salivary protein fractions when they were alone compared to when they were blended. A significant increase in the chromatographic area of bPRPs was observed in both assays with CAT and EC, which could be interpreted as formation of soluble aggregates

## *Summary*

flavanol-protein. Moreover, the increase in the bPRPs area with EC was even more noticeable when bPRPs and aPRPs were together, showing an enhanced interaction when proteins were assayed as a mixture. However, no synergic effect between the two families of SP was observed for aPRPs fraction. These results might indicate that the presence of aPRPs fraction could stabilize the complex formed between bPRPs and flavanols.

DLS was used to determine the size distribution of the aggregates of epicatechin and catechin with bPRPs, aPRPs and the mixture of both. Results showed that the aggregates formed after the interaction with EC were larger in the system with bPRPs than in the system with aPRPs. The results of the interaction with CAT showed higher size distribution values compared to those obtained with EC. Moreover, the aggregates formed were smaller when both fractions were together than when only a type of salivary protein was assayed. As the formation of smaller aggregates might be considered as more soluble than the larger ones, these results seemed to be in line with the HPLC data.

MALDI-TOF analyses were carried out with both salivary proteins isolated (aPRPs or bPRPs) and blended (aPRPs + bPRPs), before and after the interaction with CAT or EC. Up to 30 soluble tannin-protein aggregates were tentatively identified with molecular weight ranged from 4680 to 35851. Results showed outstanding amount of new peaks comparing the assays with both protein fractions blended (bPRPs + aPRPs) to the assays performed with individual fractions (non-blended). These new peaks could be attributed to possible soluble protein-tannin aggregates that resulted from the interaction of both protein fractions with flavanols. Epicatechin, in particular, was more prone to form soluble aggregates than catechin.

Higher number of aggregates were constituted by bPRPs than by aPRPs, although the number of aPRPs molecules present in the aggregates increased when both types of proteins were blended, which may indicate that aPRPs interact easier with flavanols-bPRPs aggregates than with the free flavanol.

Results obtained from the analyses performed with mixtures of proteins showed enhanced interaction with flavanols when comparing to the assays performed with only one type of protein isolated, suggesting the formation of new protein-tannin aggregates. The two flavanols assayed, catechin and epicatechin, seem to bind preferentially bPRPs than aPRPs, although the aggregates flavanol-bPRPs formed could favour the interaction with aPRPs giving rise to soluble mixed aggregates.

## SECTION II: STRATEGIES FOR MODULATING THE ASTRINGENCY

### **CHAPTER 3: EFFECT OF THE ADDITION OF MANNOPROTEINS ON FLAVONOL-PROTEIN INTERACTION**

The main objective of this chapter is to go deeper into the knowledge of the mechanisms leading to a reduction of the astringency induced by the presence of polysaccharides, evaluating the effect of the addition of yeast mannoproteins on the flavanol-saliva interaction.

The results obtained in this chapter led to the following *peer reviewed* publication:

Ramos-Pineda, A. M., García-Estévez, I., E. M., Dueñas, M., Escribano Bailón, M. T. 2018. Effect of the addition of mannoproteins on the interaction between wine flavonols and salivary proteins. *Food Chemistry*, **2018**, 264, 226-232.

#### 1. MATERIALS AND METHODS

Whole human saliva was collected from six healthy, nonsmoker volunteers according to (Quijada-Morín et al., 2016). The yeast mannoprotein employed (MP) was kindly supplied by Laffort S.A and it has been described to be used in wines for astringency modulation.

Sensory perception of astringency was evaluated by using a sensory panel composed of seven panelists previously trained to recognize and rate the perceived intensity of astringency. The tests carried out consisted on evaluating the effect of the addition of quercetin 3-*O*-glucoside (Q) and mannoprotein (MP) in white wine. Four different samples were prepared: MP (12 g L<sup>-1</sup>), Q (0.4 g L<sup>-1</sup>), Q (0.4 g L<sup>-1</sup>) + MP (4 g L<sup>-1</sup>) and Q

(0.4 g L<sup>-1</sup>) + MP (12 g L<sup>-1</sup>). The panelists were asked to evaluate perceived astringency and to order it on a Labeled Magnitude Scale (LMS).

The interaction between salivary proteins (SP), MP and Q was investigated using fluorescence quenching measurements (Perkin-Elmer LS 55 fluorimeter). The excitation wavelength was set at 282 nm and the emission spectra were recorded from 290 nm to 490 nm. Mannoprotein was mixed with a 0.035 mM solution of quercetin-3-*O*-glucoside (1:30 Q:MP), and then 50 µL of saliva was added to 50 µL of the quercetin glucoside + mannoprotein solution. The systems SP-MP, SP-Q and SP-Q-MP were studied and the percentage of quenching between the different systems was calculated.

The size of the complexes formed between SP, MP and Q was determined by dynamic light scattering (DLS, Litesizer TM500) at a wavelength of 658 nm. The intensity of the scattered light was measured at 5°C and at an angle of 90° from the incident beam.

A MicroCal Auto-iTC200 calorimeter was used to measure enthalpy changes associated with SP-MP-Q interactions at 288 K. The SP solution was placed into the 200 µL sample cell and the titrant was loaded into the 40 µL injection syringe. The titrant was a solution of Q, MP or both as a mixture (1:30 Q:MP). The raw data obtained from ITC were transformed and fitted using AFFINIMETER software.

Statistical data treatment was performed in order to determine statistical significance of the difference between the results from the sensory analysis and from the fluorescence quenching studies. Data were evaluated using the software packing for Windows IBM SPSS 21.

## 2. RESULTS AND DISCUSSION

Sensory evaluations were performed to compare the intensity of the astringency of the control wine with that of the different treatments with quercetin glucoside (Q) and

## Summary

mannoprotein (MP). Results showed that the perception of the astringency elicited by Q decreases when MP was added, being this decrease significant at the highest concentration of MP ( $12 \text{ mg mL}^{-1}$ ), thereby confirming the ability of the mannoprotein to significantly reduce perceived astringency in wines treated with this mannoprotein.

Fluorescence quenching was used to evaluate the effect of the addition of the mannoprotein to the mixture flavanol and whole saliva. The analysis of the fluorescence emission spectra showed a decrease in the fluorescence intensity of SP caused by quenching of both MP and Q. This decrease was statistically significant when MP was added to the saliva solution at the highest concentration (16.9%, MP 30). Higher decrease in the fluorescence intensity was observed in the sample SP+Q (37.9%), indicating a strong interaction between the flavonol and salivary proteins. This decrease was even more outstanding after the addition of the mannoprotein to the mixture, particularly for the sample containing SP and Q+MP (1:30), reaching the highest quenching values (48.5%). These results pointed that the mechanisms for astringency modulation may be related to the formation of protein/polyphenol/polysaccharide ternary soluble complexes.

DLS analyses showed the formation of aggregates of saliva with both Q and MP. Those aggregates were noticeably larger when the flavonol and the mannoprotein were together (from  $0.8233 \mu\text{m}$  with Q to  $5.593 \mu\text{m}$  with Q+MP). Moreover, the size of the aggregates was also affected by the concentration of the mannoprotein (from  $4.580 \mu\text{m}$  at the lowest concentration to  $5.593 \mu\text{m}$  at the highest one). The results obtained seemed to support the formation of ternary complexes MP/SP/polyphenol.

ITC was used to obtain the binding isotherms of the different systems and estimate the apparent binding constant and the thermodynamic parameters. The obtained results were in good agreement with those obtained by the techniques previously used. The

values of  $\Delta G$  pointed out that the interaction between the mixture Q+MP with saliva was more favored than the interaction between SP and Q or MP alone. The system SP-(Q+MP) had also higher affinity apparent constant ( $K_{app}$ ) than the systems SP-Q or SP-MP. These results pointed out a stronger interaction when the three components were in the mixture. Moreover, it seemed that the interaction between MP+Q and SP was mainly driven by hydrophobic forces, but the presence of MP in the mixture allowed establishing H-bonds that can stabilize the aggregates.

These results showed the existence of interactions between salivary proteins and flavonols but also between salivary proteins and mannoproteins. Although flavanol-saliva interactions were stronger than mannoprotein-saliva interactions, the addition of the mannoprotein to the mixture seems to stabilize the system, allowing the aggregates to remain soluble despite their larger size. Altogether, results obtained suggest a possible formation of proteins/polyphenol/mannoprotein ternary soluble complex, which may explain the modulation in the astringency perception.

## **CHAPTER 4: INFLUENCE OF THE PRESENCE OF DIFFERENT CHEMICAL SPECIES ON THE POLYPHENOL-PROTEIN INTERACTION**

The aim of this work was to obtain further insights into the mechanisms involved in food oral astringency, considering both salivary proteins and epithelial cells, and its modulation by the presence of other substances used as specific additives in food and beverages.

The results obtained are being drafted for publication.

### **1. MATERIALS AND METHODS**

Unstimulated whole mouth saliva (WMS) was collected from five healthy individuals. The samples were pooled, centrifuged and immediately frozen. Additionally, 12 food additives with different applications were used for the interaction assays: (1) ascorbic acid, (2) ammonium bicarbonate, (3) citric acid, (4) calcium carbonate, (5) calcium chloride, (6) EDTA, (7) glycine, (8) zinc sulfate, (9) sodium carbonate, (10) sodium chloride, (11) sodium bicarbonate, (12) magnesium sulfate.

Grape seed extract (GSE) was obtained from lyophilized grape seeds of the Zulema variety. The composition of the GSE and the mean degree of polymerization (mDP) was determined by HPLC-DAD-MS analysis according to a method described in the literature (García-Estévez et al., 2017).

For the binding assays, interaction mixtures were prepared in a final volume of 20  $\mu$ l, containing 11.5  $\mu$ l of whole saliva (WS), GSE (final concentration 0.6 mg/ml) and/or chemicals (final concentration 10 mM). The mixture was then centrifuged and LDS sample buffer was added to the supernatant before loading the samples into the gel (1:4 LDS:sample).



Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of samples was carried out under non-reducing conditions. 15 µl of each sample was loaded (per well) into a NuPAGE Novex Bis-Tris 4-12% resolving gels. Resolved proteins were stained using a solution of Coomassie Brilliant Blue (CBB) in 25% methanol and 10% acetic acid for 1h. Gels were then destained in 10% acetic acid overnight.

TR146 epithelial cells were used in this study as an in vitro model of human buccal epithelium. TR146 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F12 (1:1, v/v) supplemented with 15% Foetal Bovine Serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (P/S). Cells were cultured in T75 flasks and subcultures were prepared at 80% confluence using Trypsin-EDTA. Culture conditions were maintained at 37° and 7.5% CO<sub>2</sub>. Cells were then cultured into 96 well flat and grown to confluence before its use in the interaction assays with polyphenols. These assays were performed following two different protocols:

- Protocol A: Cells were incubated for 2h with whole saliva diluted into growth medium in order to deposit a mucosal pellicle on the cell's surface. After incubation, samples were washed twice with Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS). GSE or DPBS and the different chemical solutions were added in triplicate (final concentration GSE: 0.6 mg/ml, chemicals 1-12: 10 mM), incubating for 15 min. After two washes with DPBS, the DMACA assay was done.
- Protocol B: Whole saliva was mixed with GSE and the chemical solutions, incubating during 15 min, before adding to the cells. The mixture was added in triplicate to attain the final concentration GSE: 0.6 mg/ml, chemicals 1-12: 10 mM and left in contact with the monolayers for 15 min. After two washes with DPBS, the DMACA assay was performed.

## *Summary*

4-(dimethylamino)cinnamaldehyde (DMACA) assay was performed in order to quantify the amount of procyanidins that remained bound to the epithelial cells after the interaction assays. This compound reacts selectively with catechins and procyanidins to form a blue-green product. Cells were incubated with 70  $\mu$ l/well of the reagent for 20 min and the absorbance of the wells at 655 nm was determined in a microtiter plate reader.

In order to determine statistical significance of the differences between the absorbance values obtained for the interaction assays, data were evaluated using the software packing for Windows IBM SPSS 23.

## 2. RESULTS AND DISCUSSION

In order to evaluate the effect of the different chemicals on the interaction polyphenol-salivary protein, they were mixed with saliva and analyzed by SDS-PAGE, identifying which of the main proteins bands were altered in CBB intensity. The main salivary proteins present in the saliva samples were identified as mucins, amylase, PRPs, cystatin and statherin. After the incubation with GSE, PRPs and statherin were found to be the proteins most involved in tannin-binding.

Considering the possible effect that these substances could have on the salivary proteins (in absence of GSE), saliva samples were incubated with the chemicals in the same conditions used for the binding assay but without adding GSE. Only mucins were affected by acetic and citric acids, but they did not produce any effect on the PRPs. However, zinc sulfate appeared to precipitate many proteins, particularly the PRPs, so it was excluded from the study.

Regarding the effect of the chemicals on GSE-protein interactions in the SDS-PAGE electrophoresis, three lines exhibiting a different band pattern in the gels were identified, which corresponded to ammonium bicarbonate, sodium carbonate, sodium bicarbonate.

These compounds seemed to have the ability to inhibit the interaction between salivary proteins and tannins, leading to less precipitation. By contrast, the rest of the compounds tested did not present any significant effect on tannin-PRPs interactions.

A cell based oral epithelium was used to investigate the role of salivary proteins in the context of tannins-cell interactions. In the first protocol assayed (Protocol A), oral cells were incubated for 2h with clarified saliva to deposit a mucosal pellicle on the cell's surface, susceptible to affect tannin-cell interactions. After washing the cells with buffer, GSE was added and the interaction with oral cells was analyzed. The absorbance values obtained after the interaction assays showed no statistical significance between the control of oral cells with GSE and oral cells incubated with saliva and with GSE. However, the lack of statistical significance could be due to a different distribution of the tannins interacting with both oral cells and salivary mucins in the mucosal pellicle.

The effect of the presence of different chemicals, previously used in the SDS-PAGE electrophoresis, on the cell-tannin interactions was also evaluated. The results obtained after the incubation with DMACA showed that sodium carbonate produced a significant change, resulting in a 39% decrease in the interaction between flavanols and oral cells.

In the second protocol assayed (Protocol B), GSE was incubated with whole saliva and with the 12 chemical solutions and, then, those mixtures were added to the oral cells. Results showed that the previous incubation with saliva produced a significant decrease on the interaction between tannins and the oral cells, suggesting that salivary proteins could prevent tannins to interact with the cells. The same effect of sodium carbonate was observed when the effect of the presence of the chemicals was evaluated, reducing the interaction between procyanidins and cells by 53%.

## *Summary*

To summarize, the incubation of GSE with whole saliva could result in soluble/insoluble protein-tannin complexes stable enough to reduce their interaction with oral cells. After washing the cells, these complexes were removed and lower absorbance values were obtained in DMACA assay. However, when GSE (without saliva) was added to the cells, tannins were able to bind directly to oral cells and they remained bound after washing the cells with buffer, revealed by high absorbance values after DMACA reaction. These evidences could suggest that, when tannins are previously incubated with saliva and then that mixture is added to the oral cells, SP-tannin interactions dominate over tannin-cell absorption. Looking at the effect of the presence of the different food additives on these interactions, it should be noted that sodium carbonate was the only chemical that produced a significant change, suggesting not only an inhibition on the interaction between tannins and salivary proteins, but also between tannins and oral cells.

# CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS





Las principales conclusiones obtenidas en los trabajos que componen esta tesis doctoral con las siguientes:

1. Los flavanoles catequina y epicatequina presentan un comportamiento diferente en su unión a proteínas salivales. La epicatequina interacciona con mayor facilidad con las proteínas, formando agregados solubles, mientras que la catequina tiende a formar agregados de mayor tamaño que se vuelven insolubles y precipitan.
2. Las diferencias en la estructura conformacional entre ambas moléculas parece ser la causa de su comportamiento diferencial en la unión a proteínas salivales y también podría estar relacionado con las diferentes sub-cualidades de astringencia que estas generan. Catequina y epicatequina podrían activar diferentes vías de señalización relacionadas con un origen táctil y/o químico de la astringencia. La participación de una u otra vía podría interpretarse a nivel neural como sub-cualidades de astringencia más punzantes y negativas o bien como una astringencia más suave.
3. Las moléculas de catequina y epicatequina exhiben un comportamiento cooperativo en su unión a proteínas salivales. Cuando están juntas en disolución, la epicatequina interacciona primero y facilita la posterior unión de la catequina, formando agregados más grandes e insolubles. Este comportamiento podría dar lugar a sinergias de astringencia por mezclas de flavanoles.
4. Los flavanoles catequina y epicatequina tienen más afinidad por la unión a las proteínas ricas en prolina básicas (bPRPs) frente a las ácidas (aPRPs). Además, las aPRPs se unen más fácilmente al complejo bPRP-flavanol que a la molécula de flavanol libre. Existe un efecto sinérgico entre familias de proteínas salivales en su interacción con flavanoles que ha sido puesto de manifiesto por un aumento

## *Conclusiones*

en la interacción entre los flavanoles y las PRPs cuando ambos tipos de proteínas están juntas en disolución, dando lugar a un mayor número y tamaño de los agregados.

5. Las manoproteínas son capaces de modular la astringencia provocada por los flavonoles. La formación de complejos ternarios proteína/flavonol/manoproteína se postula como el principal mecanismo para explicar la reducción de la astringencia provocada por la presencia de polisacáridos.
6. Los polifenoles se unen directamente a las células del epitelio oral, si bien esta interacción célula-tanino se encuentra inhibida cuando los polifenoles se interponen previamente con proteínas salivales. En este sentido, las proteínas salivales podrían actuar “secuestrando” e inhibiendo la unión de los taninos a las células.
7. La presencia de algunas especies químicas, susceptibles de ser usadas como aditivos alimentarios, puede afectar tanto a las interacciones entre proteínas salivales y polifenoles, como a las interacciones entre polifenoles y células del epitelio oral, llegando a verse inhibidas.



The main conclusions obtained through the studies carried out in this PhD thesis are the following:

1. Flavanols catechin and epicatechin interact in a discriminated way with salivary proteins. Epicatechin seems to bind preferentially the protein and form soluble aggregates, while catechin tends to form bigger aggregates that became insoluble and precipitate.
2. The differences in the conformational structure between both molecules seems to explain their differential behavior when binding to salivary proteins and could also be related to the different sub-qualities of astringency they elicited. Catechin and epicatechin could activate different signaling pathways related with a tactile and/or chemical origin of astringency. The participation of one pathway or the other could be interpreted at neural level as puckering and negative astringency or velvety astringency.
3. Catechin and epicatechin molecules exhibit a cooperative behavior when binding to salivary proteins. When both flavanols are present simultaneously in solution, epicatechin interacts in first place and facilitates the subsequent inclusion of catechin, forming bigger and insoluble aggregates. This behaviour could result in synergisms on astringency by mixtures of flavanols.
4. Flavanols catechin and epicatechin bind preferentially basic proline-rich proteins (bPRP) than acidic proline-rich proteins (aPRPs). Moreover, aPRPs interact easier with the bPRP-flavanol complex than with the free flavanol. There is a synergistic effect between salivary proteins families in their interaction with flavanols, evidenced by an increase on the interaction between flavanols and PRPs when both types of proteins are together in mixture, giving rise to higher number and larger size of protein-flavanol aggregates.

## *Conclusions*

5. Mannoproteins have shown to modulate the astringency elicited by flavonols. The formation of protein/flavonol/mannoprotein ternary complexes has been postulated as the main mechanism to explain the reduction of astringency caused by the presence of polysaccharides.
6. Polyphenols bind directly to oral epithelial cells, although the previous incubation with salivary proteins prevent tannins to interact with the cells. In this sense, salivary proteins could act by "scavenging" and inhibiting tannin binding to the cells.
7. The presence of some chemical species, susceptible to be used as food additives, can affect and even inhibit both the interactions between salivary protein and polyphenol as well as the interactions between polyphenols and oral epithelial cells.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS





de Almeida, P.del V., Grégio, A.M., Machado, M.A., de Lima, A.A., Azevedo, L.R. (2008). Saliva composition and functions: A comprehensive review. *J. Contemp. Dent. Pract.*

Bajec, M.R., Pickering, G.J. (2008). Astringency: Mechanisms and perception. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 858–875.

Bate-Smith, E.C. (1954). Astringency in foods. *Food* 23, 124.

Baxter, N.J., Lilley, T.H., Haslam, E., Williamson, M.P. (1997). Multiple interactions between polyphenols and a salivary proline-rich protein repeat result in complexation and precipitation. *Biochemistry* 36, 5566–5577.

Brandão, E., Soares, S., Mateus, N., de Freitas, V. (2014). In Vivo Interactions between Procyanidins and Human Saliva Proteins: Effect of Repeated Exposures to Procyanidins Solution. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 9562-9568.

Brandão, E., Silva, M.S., García-Estévez, I., Williams, P., Mateus, N., Doco, T., de Freitas, V., Soares, S. (2017a). The role of wine polysaccharides on salivary protein-tannin interaction: A molecular approach. *Carbohydr. Polym.* 177, 77–85.

Brandão, E., Silva, M. S., García-Estévez, I., Mateus, N., de Freitas, V., Soares, S. (2017b). Molecular study of mucin-procyanidin interaction by fluorescence quenching and Saturation Transfer Difference (STD)-NMR. *Food Chem.*, 228, 427-434.

Bravo, L. (1998). Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr. Rev.* 56, 317-333.

Brossard, N., Cai, H., Osorio, F., Bordeu, E., Chen, J. (2016). “Oral” Tribological Study on the Astringency Sensation of Red Wines. *J. Texture Stud.* 47, 392–402.

Brouillard, R. (1982). Chemical Structure of Anthocyanins. In: *Anthocyanins As Food Colors*, P. Markakis Ed.

Cabanis, J.C., Cabanis, M.T., Cheynier, V., Teissedre, P.L. (2003). Tablas de composición. En: *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, 2ª Edición; Flanzky, C. (Editor). AMV Ediciones, Eds. Mundi-Prensa, p. 218.

Cabrita, L., Fossen, T., Andersen, Ø.M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chem.*, 68, 101-107.

## *Referencias bibliográficas*

Cala, O., Fabre, S., Pinaud, N., Dufourc, E.J., Fouquet, E., Laguerre, M., Pianet, I. (2011). Towards a molecular interpretation of astringency: Synthesis, 3D structure, colloidal state, and human saliva protein recognition of procyanidins. *Planta Med.* 77, 1116–1122.

Cala, O., Dufourc, E.J., Fouquet, E., Manigand, C., Laguerre, M., Pianet, I. (2012). The colloidal state of tannins impacts the nature of their interaction with proteins: The case of salivary proline-rich protein/procyanidins binding. *Langmuir* 28, 17410–17418.

Canon, F., Paté, F., Cheynier, V., Sarni-Manchado, P., Giuliani, A., Pérez, J., Durand, D., Li, J., Cabane, B. (2013). Aggregation of the salivary proline-rich protein IB5 in the presence of the tannin EgCG. *Langmuir* 29, 1926–1937.

Carpenter, G.H. (2013a). The Secretion, Components, and Properties of Saliva. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* 4, 267-276.

Carpenter, G.H. (2013b). Do Transient Receptor Protein (TRP) channels play a role in oral astringency? *J. Texture Stud.* 44, 334–337.

Carvalho, E., Mateus, N., Plet, B., Pianet, I., Dufourc, E., de Freitas, V. (2006). Influence of wine pectic polysaccharides on the interactions between condensed tannins and salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8936–8944.

Castagnola, M., Cabras, T., Inzitari, R., Zuppi, C., Rossetti, D. V., Petruzzelli, R., Vitali, A., Loy, F., Conti, G., Fadda, M.B. (2003). Determination of the post-translational modifications of salivary acidic proline-rich proteins. In *European Journal of Morphology*, 41, 93–98.

Castagnola, M., Inzitari, R., Rossetti, D.V., Olmi, C., Cabras, T., Piras, V., Nicolussi, P., Sanna, M.T., Pellegrini, M., Giardina, B., Messina, I. (2004). A cascade of 24 histatins (histatin 3 fragments) in human saliva: Suggestions for a pre-secretory sequential cleavage pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 41436-41443.

Castagnola, M., Cabras, T., Vitali, A., Sanna, M.T., Messina, I. (2011). Biotechnological implications of the salivary proteome. *Trends Biotechnol.* 29, 409-418.

Charlton, A.J., Baxter, N.J., Khan, M.L., Moir, A.J.G., Haslam, E., Davies, A.P., Williamson, M.P. (2002). Polyphenol/peptide binding and precipitation. *J. Agric. Food Chem.* 50, 1593–1601.

Cheynier, V. (2006). Flavonoids in Wine. In *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*, O. Andersen, and K. Markham, Eds. Taylor & Francis, p. 263.

Cheynier, V., Moutounet, M., Sarni-Manchado, P. (2003). Los compuestos fenólicos. En: *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, 2ª Edición; Flanzy, C. (Editor). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa. Madrid (España), p. 114.

Cliff, M.A., Stanich, K., Edwards, J.E., Saucier, C.T. (2012). Adding Grape Seed Extract to Wine Affects Astringency and Other Sensory Attributes. *J. Food Qual.* 35, 263-271.

Clifford, M. (1997). Astringency. *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe* 41: 87-107

Critchley, H.D., Rolls, E.T. (1996). Responses of primate taste cortex neurons to the astringent tastant tannic acid. *Chem. Senses* 21, 135–145.

Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites: occurrence, structure and role in the human diet*. Blackwell Pub.: Oxford; Ames, Iowa.

Case, D.A. Darden, T.A. Cheatham, III, C.L. Simmerling, J. Wang, R.E. Duke, R., R.C. Walker Luo, W. Zhang, K.M. Merz, B. Roberts, S. Hayik, A. Roitberg, G. Seabra, A.W. Götz J. Swails, I. Kolossváry, K.F. Wong, F. Paesani, J. Vanicek, R.M. Wolf, J. Liu., S.R. Brozell X. Wu, T. Steinbrecher, H. Gohlke, Q. Cai, X. Ye, J. Wang, M.-J. Hsieh, G., D.R. Roe Cui, D.H. Mathews, M.G. Seetin, R. Salomon-Ferrer, C. Sagui, V. Babin, T., S. Gusarov Luchko, A. Kovalenko, P.A. Kollman. (2012) *AMBER 12*; University of California, San Francisco.

Dawes, C. (1972). Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol* 220, 529–545.

Doco, T., Vuchot, P., Cheynier, V., Moutounet, M. (2003). Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 150-157.

Dodds, M.W.J., Johnson, D.A., and Yeh, C.K. (2005). Health benefits of saliva: A review. *J. Dent.* 33, 223-233

Edgar, W.M. (1992). Saliva: Its secretion, composition and functions. *Br. Dent. J.* 172, 305.

## *Referencias bibliográficas*

Edwin, H. (1980). In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry*. 19, 2577-2582.

Escribano-Bailon, M.T., Santos-Buelga, C. (2012). Anthocyanin Copigmentation - Evaluation, mechanisms and implications for the colour of red wines. *Curr. Org. Chem.* 16, 715–723.

Delgado-Vargas, F., Jiménez, A. R., Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40, 173-289.

Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J.M., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T. (2014). Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: Synergistic effect and modulation by aromas. *Food Res. Int.* 62, 1100–1107.

Ferrer-Gallego, R., Quijada-Morín, N., Brás, N.F., Gomes, P., de Freitas, V., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T. (2015b). Characterization of sensory properties of flavanols-A molecular dynamic approach. *Chem. Senses* 40, 381–390.

Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P.L., and Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Qual. Prefer.* 19, 286–291.

de Freitas, V., Carvalho, E., Mateus, N. (2003). Study of carbohydrate influence on protein – tannin aggregation by nephelometry. 81, 503–509.

de Freitas, V., Mateus, N. (2012). Protein/Polyphenol Interactions: Past and Present Contributions. Mechanisms of Astringency Perception. *Curr. Org. Chem.* 16, 724–746.

de Freitas, V., Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* 49, 940–945.

García-Estévez, I., Pérez-gregorio, R., Soares, S., Mateus, N., de Freitas, V. (2017). Oenological perspective of red wine astringency. *OENO One* 51, 1–19.

García-Estévez, I., Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M.T. (2017). Flavanol Quantification of Grapes via Multiple Reaction Monitoring Mass Spectrometry. Application to Differentiation among Clones of *Vitis vinifera* L. cv. Rufete grapes. *J. Agric. Food Chem.* 65, 6359-6368.



Gawel, R. (1998). Red wine astringency: a review. *Aust. J. Grape Wine Res.* 4, 74–95.

Gibbins, H.L., and Carpenter, G.H. (2013). Alternative mechanisms of astringency - What is the role of saliva? *J. Texture Stud.* 44, 364–375.

González-Royo, E., Esteruelas, M., Kontoudakis, N., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2017). The effect of supplementation with three commercial inactive dry yeasts on the colour, phenolic compounds, polysaccharides and astringency of a model wine solution and red wine. *J. Sci. Food Agric.* 97, 172-181.

Green, B.G. (1993). Oral astringency: A tactile component of flavor. *Acta Psychol. (Amst).* 84, 119–125.

Guadalupe, Z., Ayestarán, B. (2008). Effect of Commercial Mannoprotein Addition on Polysaccharide, Polyphenolic, and Color Composition in Red Wines. 9022–9029.

Guadalupe, Z., Martínez, L., and Ayestarán, B. (2010). Yeast Mannoproteins in Red Winemaking: Effect on Polysaccharide, Polyphenolic, and Color Composition. 2, 191–200.

Guinard, J. X, Pangborn, R.M., and Lewis, M.J. (1986). Preliminary studies on acidity-astringency interactions in model solutions and wines. *J. Sci. Food Agric.* 37, 811-817.

Hagerman, A.E., Rice, M.E., and Ritchard, N.T. (1998). Mechanisms of Protein Precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicatechin 16 (4→8) catechin (Procyanidin). *J. Agric. Food Chem.* 46, 2590–2595.

Hakkinen, L., Uitto, V.-J., And Larjava, H. (2000). Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol.* 2000 24, 127–152.

Hanlin, R.L., Hrmova, M., Harbertson, J.F., and Downey, M.O. (2010). Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16, 173-188.

Harrington, R.J. (2005). The Wine and Food Pairing Process: Using Culinary and Sensory Perspectives. *J. Culin. Sci. Technol.* 4, 101-112.

## *Referencias bibliográficas*

He, J., Carvalho, A.R.F., Mateus, N., de Freitas, V. (2010). Spectral features and stability of oligomeric pyranoanthocyanin-flavanol pigments isolated from red wines. *J. Agric. Food Chem.* 58, 9249-9258.

Henskens, Y.M.C., van der Velden, U., Veerman, E.C.I., Amerongen, A. N. (1993). Protein, albumin and cystatin concentrations in saliva of healthy subjects and of patients with gingivitis periodonitis. *J. Periodontal Res.* 28, 43-48.

Hornak, V., Abel, R., Okur, A., Strockbine, B., Roitberg, A., Simmerling, C. (2006). Comparison of multiple amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 65, 712–725.

Humphrey, S.P., Williamson, R.T. (2001). A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J. Prosthet. Dent.* 85, 162-169

Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38.

Huq, N.L., Cross, K.J., Ung, M., Myroforidis, H., Veith, P.D., Chen, D., Stanton, D., He, H., Ward, B.R., Reynolds, E.C. (2007). A review of the salivary proteome and peptidome and saliva-derived peptide therapeutics. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 13, 547–564.

Iiyama, S., Ezaki, S., Toko, K., Matsuno, T., Yamafuji, K. (1995). Study of astringency and pungency with multichannel taste sensor made of lipid membranes. *Sensors Actuators B. Chem.* 24, 75–79.

Inzitari, R., Cabras, T., Onnis, G., Olmi, C., Mastinu, A., Sanna, M.T., Pellegrini, M.G., Castagnola, M., and Messana, I. (2005). Different isoforms and post-translational modifications of human salivary acidic proline-rich proteins. In *Proteomics*, p. 805–815.

Inzitari, R., Cabras, T., Rossetti, D.V., Fanali, C., Vitali, A., Pellegrini, M., Paludetti, G., Manni, A., Giardina, B., Messana, I., (2006). Detection in human saliva of different statherin and P-B fragments and derivatives. *Proteomics* 6, 6370–6379.

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

Jacobsen, J.; van Deurs, B.; Pedersen, M.; Rassing, M. R. (1995). TR146 Cells Grown on Filters as a Model for Human Buccal Epithelium: I. Morphology, Growth, Barrier Properties, and Permeability. *Int. J. Pharm.*, 125, 165-184.

Jensen, J.L., Lamkin, M.S., Troxler, R.F., Oppenheim, F.G. (1991). Multiple forms of statherin in human salivary secretions. *Arch. Oral Biol.* 36, 529-534.

Jiang, Y., Gong, N.N., Matsunami, H. (2014). Astringency: A more stringent definition. *Chem. Senses* 39, 467–469.

Jöbstl, E., O’Connell, J., Fairclough, J.P.A., Williamson, M.P. (2004). Molecular model for astringency produced by polyphenol/protein interactions. *Biomacromolecules* 5, 942–949.

Kawamoto, H. (1997). Effects of Environmental Factors on Two-Stage Tannin-Protein Co-Precipitation. *Phytochemistry* 46, 479–483.

Kawamura, Y., Funakoshi, M., Kasahara, Y., Yamamoto, T. (1969). A neurophysiological study on astringent taste. *Jpn J Physiol* 19, 851–865.

Kennedy, J. A. (2008). Grape and wine phenolics: Observations and recent findings. *Ciencia e investigación agraria*, 35 107-120.

Kilmister, R.L., Faulkner, P., Downey, M.O., Darby, S.J., Falconer, R.J. (2016). The complexity of condensed tannin binding to bovine serum albumin – An isothermal titration calorimetry study. *Food Chem.* 190, 173–178.

Kurogi, M., Miyashita, M., Emoto, Y., Kubo, Y., Saitoh, O. (2012). Green tea polyphenol epigallocatechin gallate activates trpa1 in an intestinal enteroendocrine cell Line, STC-1. *Chem. Senses* 37, 167–177.

Laguna, L., Sarkar, A. (2017). Oral tribology: update on the relevance to study astringency in wines. *Tribol. - Mater. Surfaces Interfaces* 11, 116–123.

Lee, C.A., Vickers, Z.M. (2012). Astringency of foods may not be directly related to salivary lubricity. *J. Food Sci.* 77, 302–306.

Lee, C.B., Lawless, H.T. (1991). Time-course of astringent sensations. *Chem. Senses* 16, 225–238.

Lee, C.A., Ismail, B., and Vickers, Z.M. (2012). The Role of Salivary Proteins in the Mechanism of Astringency. *J. Food Sci.* 77.

Lim, J., Lawless, H.T. (2005). Oral sensations from iron and copper sulfate. *Physiol. Behav.* 85, 308–313.

## *Referencias bibliográficas*

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

Ma, W., Guo, A., Zhang, Y., Wang, H., Liu, Y., Li, H. (2014). A review on astringency and bitterness perception of tannins in wine. *Trends Food Sci. Technol.* 40, 6–19.

Manconi, B., Castagnola, M., Cabras, T., Olianias, A., Vitali, A., Desiderio, C., Sanna, M.T., and Messana, I. (2016). The intriguing heterogeneity of human salivary proline-rich proteins: Short title: Salivary proline-rich protein species. *J. Proteomics* 134, 47–56.

Mateus, N., Carvalho, E., Lu, C., and de Freitas, V. (2004). Influence of the tannin structure on the disruption effect of carbohydrates on protein – tannin aggregates. 513, 135–140.

Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *J. Agri. Food Chem*, 54, 7692-7702.

McRae, J.M., Falconer, R.J., Kennedy, J.A. (2010). Thermodynamics of grape and wine tannin interaction with polyproline: Implications for red wine astringency. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12510–12518.

Messana, I., Cabras, T., Inzitari, R., Lupi, A., Zuppi, C., Olmi, C., Fadda, M.B., Cordaro, M., Giardina, B., Castagnola, M. (2004). Characterization of the human salivary basic proline-rich protein complex by a proteomic approach. *J. Proteome Res.* 3, 792–800.

Messana, I., Inzitari, R., Fanali, C., Cabras, T., Castagnola, M. (2008). Facts and artifacts in proteomics of body fluids. What proteomics of saliva is telling us? *J. Sep. Sci.* 31, 1948–1963.

Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., Ricardo Da Silva, J.M. (2003). Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6475–6481.

Muñoz-González, C., Feron, G., Canon, F. (2018). Main effects of human saliva on flavour perception and the potential contribution to food consumption. In Proceedings of the Nutrition Society, 1-9.

Nayak, A., Carpenter, G.H. (2008). A physiological model of tea-induced astringency. *Physiol. Behav.* 95, 290–294.

Obrique-Slier, E., Peña-Neira, Á., López-Solís, R. (2012). Interactions of enological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *LWT - Food Sci. Technol.* 45, 88–93.

Oppenheim, F.G., Xu, T., Mcmillian, F.M., Levitz, S.M., Diamond, R.D., Offner, G.D., Troxler, R.F. (1988). Histatins, a Novel Family of Histidine-rich Proteins in Human Parotid Secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 263, 7472-7477.

Oppenheim, F.G., Salih, E., Siqueira, W.L., Zhang, W., Helmerhorst, E.J. (2007). Salivary proteome and its genetic polymorphisms. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098, 22-50.

Ozawa, T., Lilley, T. H., Haslam, E. (1987). Polyphenol interactions: astringency and the loss of astringency in ripening fruit. *Phytochem*, 26, 2937-2942.

Papadopoulou, A., Frazier, R.A. (2004). Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends Food Sci. Technol.* 15, 186–190.

Papadopoulou, A., Green, R.J., Frazier, R.A. (2005). Interaction of flavonoids with bovine serum albumin: A fluorescence quenching study. *J. Agric. Food Chem.* 53, 158–163.

Pascal, C., Poncet-Legrand, C., Imberty, A., Gautier, C., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., Vernhet, A. (2007). Interactions between a non-glycosylated human proline-rich protein and flavan-3-ols are affected by protein concentration and polyphenol/protein ratio. *J. Agric. Food Chem.* 55, 4895–4901.

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

## *Referencias bibliográficas*

Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J. B., Tabacchi, R., Gindro, K., Viret, O. (2003).  $\delta$ -Viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *J Agric. Food Chem.*, 51, 5488-5492.

Ployon, S.; Belloir, C.; Bonnotte, A.; Lherminier, J.; Canon, F.; Morzel, M. (2016). The Membrane-Associated MUC1 Improves Adhesion of Salivary MUC5B on Buccal Cells. Application to Development of an in Vitro Cellular Model of Oral Epithelium. *Arch. Oral Biol.* 61, 149-155.

Ployon, S., Morzel, M., Belloir, C., Bonnotte, A., Bourillot, E., Briand, L., Lesniewska, E., Lherminier, J., Aybeke, E., Canon, F. (2018). Mechanisms of astringency: Structural alteration of the oral mucosal pellicle by dietary tannins and protective effect of bPRPs. *Food Chem.* 253, 79-87.

Poncet-Legrand, C., Cartalade, D., Putaux, J.L., Cheynier, V., Vernhet, A. (2003). Flavan-3-ol aggregation in model ethanolic solutions: Incidence of polyphenol structure, concentration, ethanol content, and ionic strength. *Langmuir* 19, 10563–10572.

Quijada-Morín, N., Williams, P., Rivas-Gonzalo, J. C., Doco, T., Escribano-Bailón, M.T. (2014). Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chem.*, 154, 44-51.

Quijada-Morín, N., Crespo-Expósito, C., Rivas-Gonzalo, J.C., García-Estévez, I., Escribano-Bailón, M.T. (2016). Effect of the addition of flavan-3-ols on the HPLC-DAD salivary-protein profile. *Food Chem.* 207, 272–278.

Ramos-Pineda, A.M., García-Estévez, I., Brás, N.F., Martín Del Valle, E.M., Dueñas, M., Escribano Bailón, M.T. (2017). Molecular approach to the synergistic effect on astringency elicited by mixtures of flavanols. *J. Agric. Food Chem.* 65, 6425–6433.

Rentzsch, M., Wilkens, A., Winterhalter, P. (2009). Non-Flavonoid Phenolic Compounds. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*, M.V. Moreno-Arribas, and M.C. Polo, Ed. Springer, p. 509.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D. (2003). Phenolic Compounds. In: *Handbook of Enology. Volume 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments*, Eds. Wiley and Sons, p. 404.

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

Riou, Â., Vernhet, A., Doco, T., Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine—effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocoll.*, 16, 17-23.

Rodrigues, A., Ricardo-da-silva, J.M., Lucas, C., Laureano, O. (2012). Effect of commercial mannoproteins on wine colour and tannins stability. *Food Chem.* 131, 907–914.

Rossetti, D., Bongaerts, J.H.H., Wantling, E., Stokes, J.R., Williamson, A.M. (2009). Astringency of tea catechins: More than an oral lubrication tactile percept. *Food Hydrocoll.* 23, 1984–1992.

Santos-Buelga, C., de Freitas, V. (2009). Influence of phenolics on wine organoleptic properties. In *Wine Chemistry and Biochemistry*, Ed. Springer, p. 529–570.

Sarni-Manchado, P., Canals-Bosch, J.M., Mazerolles, G., Cheynier, V. (2008). Influence of the glycosylation of human salivary proline-rich proteins on their interactions with condensed tannins. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9563–9569.

Schiffman, S.S., Suggs, M.S., Sostman, L., Simon, S.A. (1992). Chorda tympani and lingual nerve responses to astringent compounds in rodents. *Physiol. Behav.* 51, 51–63.

Schöbel, N., Radtke, D., Kyereme, J., Wollmann, N., Cichy, A., Obst, K., Kallweit, K., Kletke, O., Minovi, A., Dazert, S., Wetzels, C.H., Vogt-Eisele, A., Gisselmann, G., Ley, J.P., Bartoshuk, L.M., Spehr, J., Hofmann, T., Hatt, H. (2014). Astringency is a trigeminal sensation that involves the activation of G protein-coupled signaling by phenolic compounds. *Chem. Senses* 39, 471–487.

Schwarz, B., Hofmann, T. (2008). Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *Eur. Food Res. Technol.* 227, 1693–1698.

Scott, K. (2005). Taste recognition: Food for thought. *Neuron.* 48, 455-464.

Silva, M.S., García-Estévez, I., Brandão, E., Mateus, N., de Freitas, V., Soares, S. (2017). Molecular Interaction between Salivary Proteins and Food Tannins. *J. Agric. Food Chem.* 65, 6415–6424.

## *Referencias bibliográficas*

Snyder, D.J., Bartoshuk, L.M. (2016). Oral sensory nerve damage: Causes and consequences. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 17, 149-158.

Soares, S., Mateus, N., de Freitas, V. (2007). Interaction of different polyphenols with bovine serum albumin (BSA) and human salivary  $\alpha$ -amylase (HSA) by fluorescence quenching. *J. Agric. Food Chem.* 55, 6726–6735.

Soares, S., Vitorino, R., Osório, H., Fernandes, A., Venâncio, A., Mateus, N., Amado, F., de Freitas, V. (2011). Reactivity of human salivary proteins families toward food polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 59, 5535–5547.

Soares, S., Mateus, N., de Freitas, V. (2012). Interaction of different classes of salivary proteins with food tannins. *Food Res. Int.* 49, 807–813.

Soares, S., Kohl, S., Thalmann, S., Mateus, N., Meyerhof, W., de Freitas, V. (2013). Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors. *J. Agric. Food Chem.* 61, 1525–1533.

Soares, S., Ferrer-Galego, R., Brandão, E., Silva, M., Mateus, N., de Freitas, V. (2016). Contribution of Human Oral Cells to Astringency by Binding Salivary Protein/Tannin Complexes. *J. Agric. Food Chem.* 64, 7823-7828

Soares, S., Brandão, E., Mateus, N., de Freitas, V. (2017). Sensorial properties of red wine polyphenols: Astringency and bitterness. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 57, 937–948.

Soares, S., García-Estévez, I., Ferrer-Galego, R., Brás, N.F., Brandão, E., Silva, M., Teixeira, N., Fonseca, F., Sousa, S.F., Ferreira-da-Silva, F. (2018). Study of human salivary proline-rich proteins interaction with food tannins. *Food Chem.* 243, 175–185.

Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., Yamada, K. (2004). A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 380–381.

Terrier, N., Poncet-Legrand, C., Cheynier, V. (2009). Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols. In: *Wine Chemistry and Biochemistry*, M.V. Moreno-Arribas, and M.C. Polo, Ed. Springer, p. 463.

Upadhyay, R., Brossard, N., and Chen, J. (2016). Mechanisms underlying astringency: Introduction to an oral tribology approach. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 49, 104003.



Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., Pellerin, P. (2003). The polysaccharides of red wine: total fractionation and characterization. *J. Agric. Food Chem.* 51, 439–447.

Vidal, S., Doco, T., Moutounet, M., Pellerin, P. (2000). Soluble polysaccharide content at initial time of experimental must preparation. *Am. J. Enol. Vitic.* 51, 115-121.

Vitorino, R., Barros, A., Caseiro, A., Domingues, P., Duarte, J., and Amado, F. (2009). Towards defining the whole salivary peptidome. *Proteomics - Clin. Appl.* 3, 528-540.

Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J.C., Mérillon, J.M., Teissédre, P.L. (2005). Determination of stilbenes ( $\delta$ -viniferin, trans-astringin, trans-piceid, cis- and trans-resveratrol,  $\epsilon$ -viniferin) in Brazilian wines. *J. Agric. Food Chem.* 53, 5664-5669.

Wang, B., Danjo, A., Kajiya, H., Okabe, K., and Kido, M.A. (2011). Oral epithelial cells are activated via TRP channels. *J. Dent. Res.* 90, 163–167.

Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., Case, D. A. (2004). Development and testing of a general amber force field. *Journal of computational chemistry.* *J. Comput. Chem.* 25, 1157-1174.

Wang, Y., Erickson, R.P., Simon, S.A. (1993). Selectivity of lingual nerve fibers to chemical stimuli. *J. Gen. Physiol.* 101, 843-866.

Waterhouse, A.L. (2002). Wine phenolics. In *Annals of the New York Academy of Sciences*, 957, 21-36.

Waters, E.J., Pellerin, P., Brillouet, J. (1994). A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydrate Polymers*, 23, 185-191.

Watrelet, A.A., Renard, C.M.G.C., Le Bourvellec, C. (2015). Comparison of microcalorimetry and haze formation to quantify the association of B-type procyanidins to poly-L-proline and bovine serum albumin. *LWT - Food Sci. Technol.* 63, 376–382.



