



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS DE ORUJO Y
ESCOBAJO SOBRE *Helicobacter pylori* Y *Escherichia coli***

Tesis para optar al Grado de Magíster en Enología y Vitivinicultura

NORMA ROSARIO MENDIVIL LÓPEZ

Directores de Tesis
ELÍAS OBREQUE SLIER
HÉCTOR TOLEDO ARAYA

Profesores consejeros
CIELO CHAR AUBRY
REMIGIO LÓPEZ SOLÍS

SANTIAGO - CHILE

2015

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

EFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS DE ORUJO Y ESCOBAJO SOBRE
Helicobacter pylori Y *Escherichia coli*

Tesis presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Magíster en
Enología y Vitivinicultura

NORMA ROSARIO MENDIVIL LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS

Calificaciones
(Tesis de Grado)

Dr. Elías Obreque Slier
Ingeniero Agrónomo, Dr.

Aprobada

Dr. Héctor Toledo Araya
Químico Farmacéutico, Dr.

Aprobada

PROFESORES CONSEJEROS

Dra. Cielo Char Aubry
Bioquímico, Dr.

Aprobada

Dr. Remigio López Solís
Bioquímico, Dr.

Aprobada

Santiago, Chile

2015

TÍTULO

Efecto Antibacteriano de Extractos de Orujo y Escobajo sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la fortaleza y respaldo en cada paso, eres mi guía.

A mis padres, Francisco y Norma por su amor incondicional, por su esfuerzo y confianza en mí. Por sus palabras sabias que siempre me reconfortan y animan. Gracias infinitas.

A mis profesores guías, Elías Obreque y Héctor Toledo por su siempre disposición, por su paciencia y dirección.

A mi hermana Miriam por mostrarme el camino con su ejemplo.

Al resto de mi familia y amigos, por mostrar su interés, preocupación y apoyo a lo largo de esta trayectoria, siempre serán parte de mis logros.

A Fondecyt que a través de los proyectos 1120126 (HT) y 11121322 (EO) permitieron financiar este trabajo.

DEDICATORIA

Para mis personas favoritas.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 1 |
| Palabras claves | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| Key words | 2 |
| REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| CAPITULO I: EFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS DE ORUJO Y ESCOBAJO SOBRE <i>Helicobacter pylori</i> Y <i>Escherichia coli</i> | 7 |
| INTRODUCCIÓN | 8 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 10 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 11 |
| Lugar de estudio | 11 |
| Obtención de las muestras | 11 |
| Equipos | 11 |
| Materiales | 11 |
| Cepas bacterianas | 12 |
| Medios de cultivo | 12 |
| METODOLOGÍA | 12 |
| Diseño experimental | 12 |
| Procedimientos | 13 |
| Variables a medir | 16 |
| Análisis estadístico | 16 |

| | |
|--|----|
| RESULTADOS | 17 |
| Caracterización polifenólica de los extractos de escobajo y orujo | 17 |
| Viabilidad de <i>H. pylori</i> en medio sólido con presencia de extracto de escobajo | 18 |
| Viabilidad de <i>H. pylori</i> en medio líquido en presencia de extracto de escobajo | 18 |
| Viabilidad de <i>H. pylori</i> en medio sólido en presencia de extracto de orujo | 19 |
| Viabilidad de <i>H. pylori</i> en medio líquido en presencia de extracto de orujo | 20 |
| Viabilidad de <i>E. coli</i> en medio líquido en presencia de extracto de escobajo | 20 |
| Viabilidad de <i>E. coli</i> en medio líquido en presencia de extracto de orujo | 21 |
| | |
| DISCUSIÓN | 22 |
| | |
| CONCLUSIONES | 24 |
| LITERATURA CITADA | 25 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | | |
|-----------------|---|----|
| Cuadro 1 | Dosis de extracto de escobajo u orujo utilizadas durante los tratamientos de viabilidad de <i>H. pylori</i> (cepas 26695 y ATCC 43504) en medio sólido | 14 |
| Cuadro 2 | Dosis de extracto de escobajo u orujo utilizadas durante los tratamientos de viabilidad de <i>E. coli</i> en medio líquido | 15 |
| Cuadro 3 | Dosis de extracto de escobajo u orujo utilizadas durante los tratamientos de viabilidad de <i>H. pylori</i> (cepas 26695 y ATCC 43504) en medio líquido | 15 |
| Cuadro 4 | Compuestos fenólicos de orujo y escobajo de uvas de Carménère detectados por HPLC-DAD y contenido polifenólico. | 17 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Figura 1 | Obtención de los extractos de escobajo y orujo de uva (<i>Vitis vinífera</i> L.) | 13 |
| Figura 2 | Diámetro del halo de inhibición provocado por el extracto de escobajo sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> | 18 |
| Figura 3 | Efecto del extracto de escobajo sobre <i>H. pylori</i> en medio líquido. | 19 |
| Figura 4 | Diámetro del halo de inhibición provocado por el extracto de orujo sobre el crecimiento de <i>H. pylori</i> | 19 |
| Figura 5 | Efecto del extracto de orujo sobre la viabilidad de <i>H. pylori</i> en medio líquido. | 20 |
| Figura 6 | Efecto del extracto de escobajo sobre la viabilidad de <i>E. coli</i> en medio líquido. | 21 |
| Figura 7 | Efecto del extracto de orujo sobre la viabilidad de <i>E. coli</i> en medio líquido | 21 |

RESUMEN

Los polifenoles son compuestos generados a partir del metabolismo secundario de las plantas que se encuentran en diversos alimentos tales como la uva, el vino y sus subproductos. Estos compuestos se han asociado con distintas propiedades, tales como, la actividad antibacteriana. Por otro lado, *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa, de forma bacilar espiralada, microaerofílica, flagelada, neutrófila, que habita en la capa mucosa que recubre el epitelio del estómago humano. Se ha estimado que el 60% de la población mundial está colonizada con la bacteria, alcanzando un 73% de prevalencia en la población en Chile. Ésta bacteria se ha relacionado con enfermedades como gastritis, úlceras y es un factor de alto riesgo para adquirir cáncer gástrico. Las terapias de erradicación de *H. pylori* consisten en el uso de antibióticos que no siempre son exitosas. Por esta razón, es necesario investigar tratamientos alternativos contra la infección por *H. pylori*. Diversas investigaciones muestran que constituyentes de *Vitis vinifera* y del vino tendrían efecto sobre la bacteria. El propósito de este trabajo fue estudiar el efecto antibacteriano de los extractos de orujo y escobajo sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*. Esta última fue usada como microorganismo control, dados los diversos estudios que afirman que polifenoles presentes en *Vitis vinifera* y en el vino tendrían efecto anti-*Escherichia coli*. Los extractos de orujo y escobajo fueron analizados mediante espectrofotometría y análisis de HPLC-DAD.

La metodología consistió en cultivar las bacterias en medio líquido o en medio sólido, suplementados con rangos de dosis de extractos de orujo y escobajo. La actividad antibacteriana de los polifenoles en medio líquido se evaluó midiendo la DO600 de los cultivos y contabilizando las UFC/mL. Además, se midió el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de las bacterias en medios sólidos, suplementados con los extractos en forma individual. Los resultados indican que tanto el extracto de escobajo como el extracto de orujo presentaron actividad bactericida sobre ambas bacterias. La bacteria más sensible a los polifenoles correspondió a *H. pylori*.

Palabras claves: Actividad antibacteriana, compuestos fenólicos, residuos vinificación

ABSTRACT

Polyphenols are compounds generated by the secondary metabolism of plants, these compounds can be found in various alimentary products such as grapes, wine and its by-products present, among other properties, antibacterial activity. On the other hand *Helicobacter pylori* is a Gram negative bacteria, bacillary spiral shape, microaerophilic, scourged, neutrophil, which lives in the mucous layer lining the epithelium of the human stomach. It has been estimated that 60% of the world population is infected with the bacteria, reaching a 73% prevalence in the population in Chile. This bacteria has been linked to diseases such as gastritis, ulcers and is a risk factor for acquiring gastric cancer. Therapies to eradicate *H. pylori* include the use of antibiotics that are not always successful. For this reason, it is necessary to investigate alternative treatments for *H. pylori* infection. Research shows that constituents of *Vitis vinifera* and wine have effect on bacteria. The purpose of this work was to study the antibacterial effect of extracts of pomace and stems of *Helicobacter pylori* and *Escherichia coli*. The latter was used as microorganism control given the various studies that suggest that polyphenols in *Vitis vinifera* and wine have anti-*Escherichia coli* effect. Stems and pomace extracts were analyzed by spectrophotometry and HPLC-DAD analysis.

The methodology consisted of culturing the bacteria in liquid or solid medium supplemented with ranges of doses of extracts from pomace and stems. The antibacterial activity of polyphenols in liquid medium was evaluated by measuring OD600 of the cultures and counting the CFU / mL. Furthermore, the inhibition zone diameter of the bacteria growth on solid media, supplemented with extracts was measured individually. The results indicate that both the extract of stems and pomace extract have bactericidal activity on both bacterias. The most sensitive bacteria to the polyphenols corresponded to *H. pylori*.

Key words: Antimicrobial activity, phenolic compounds, winemaking residues.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Compuestos fenólicos

Los polifenoles son los componentes activos más importantes presentes en la vid. Éstos se originan principalmente en las plantas, que los sintetizan en gran cantidad, como producto de su metabolismo secundario. La importancia de estos compuestos radica en su aporte a nivel sensorial (aroma, color, astringencia y amargor), nutricional y farmacológico (Cheynier *et al.*, 2000). Además, se ha observado que estos compuestos poseen acción fungicida y bactericida (Quiñones *et al.*, 2012).

El contenido cualitativo y cuantitativo de los polifenoles difiere en cada especie vegetal. Entre las plantas con alto contenido se encuentran la vid (*Vitis vinifera*), el cacao (*Theobroma cacao*), el té (*Camelia sinensis*) y el manzano (*Malus domestica*). Así, las fuentes mayoritarias de polifenoles en la dieta humana son principalmente las frutas, el vino, el té, y el chocolate (Miller *et al.*, 2009; Unachukwu *et al.*, 2010). En la uva para vino los compuestos fenólicos representan el tercer componente más abundante después de los hidratos de carbono y los ácidos orgánicos y están principalmente distribuidos en la piel, semillas, escobajos y hojas (Pastrana-Bonilla *et al.*, 2003; Makris *et al.*, 2008).

Los compuestos fenólicos en general se caracterizan por poseer un núcleo bencénico que puede llevar uno o varios grupos hidroxilos (Cheynier *et al.*, 2003). Los polifenoles se clasifican en dos grandes grupos: no flavonoides y flavonoides. Los primeros se encuentran primordialmente en la pulpa de las bayas (Monagas *et al.*, 2005), poseen sólo un anillo bencénico, pudiendo destacar dentro de este grupo los ácidos benzoicos (C6-C1), los ácidos cinámicos (C6-C3) y los estilbenos (Garrido y Borges, 2011). Los flavonoides constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavanoles y antocianos (Monagas *et al.*, 2005). Los flavonoles (quercetina, kaempferol, miricetina) se encuentran localizados en los hollejos, participan en la coloración amarilla de los vinos blancos y son importantes agentes antioxidantes (Flanzy, 2000). Por su parte, los flavanoles o taninos condensados son abundantes en las pepitas que presentan entre el 50% y el 90% de las proantocianidinas totales y, en menor medida, en el hollejo y raspón (Bertamini y Mattivi, 1999). Asimismo, entre los flavanoles destacan como unidades monoméricas, la (+)-catequina y la (-)-epicatequina, las cuales contribuyen sensorialmente al amargor y astringencia. Finalmente, los antocianos representan una parte importante de los flavonoides de la baya de uva tinta, pues son los pigmentos responsables del color de las especies tintas y se localizan en el hollejo en las 3 ó 4 primeras capas del hipodermo, además de la pulpa en cepas tintoreras (Flanzy, 2000).

Residuos de la vinificación

La uva es uno de los principales cultivos de frutas y aproximadamente el 80% de la cosecha es utilizado por la industria en la elaboración del vino, lo que conduce a la generación de grandes cantidades de residuos. Los principales residuos orgánicos producidos actualmente en la industria del vino incluyen: orujo (62%), lías (14%), escobajo (12%) y lodo deshidratado (12%) (Ruggieri *et al.*, 2008). Los orujos corresponden a los residuos de pieles y pepitas que quedan de la uva después del prensado de esta en vinos blancos o después de la vinificación de los tintos (Giorgia *et*

al., 2005). Por otro lado, los escobajos corresponden al material vegetal que sirve como soporte al racimo de uva.

Durante el proceso de elaboración del vino, parte de los compuestos fenólicos presentes en la uva son transferidos al vino, pero una alta proporción, aproximadamente el 50%, aún permanece en los residuos de vinificación (Alonso *et al.*, 2002). El orujo de uva es reconocido como una fuente valiosa de polifenoles, está constituido principalmente por ácidos fenólicos, estilbenos, antocianos y catequina (Mendoza *et al.*, 2013). A pesar de lo anterior, su uso se limita a la producción de compost y como alimento para animales (Kammerer *et al.*, 2005). Asimismo, se ha reportado que los extractos de orujo de uva poseen niveles de fenoles totales que varían entre 250 a 480 mg equivalente de ácido gálico/100 g (peso fresco), siendo los antocianos totales aproximadamente la mitad de los fenoles totales (Alonso *et al.*, 2002; Lafka *et al.*, 2007). Recientemente, se ha descrito que los compuestos fenólicos que más abundan en extractos de orujo de uva Carménère son la (+)-catequina y la (-)-epicatequina con valores de 178 a 131 mg/g respectivamente (De la Cerda *et al.*, 2014).

Por otra parte, diversos autores han descrito que los escobajos de uva, son una fuente importante de polifenoles. Souquet *et al.*, (2000) y Anastasiadi *et al.*, (2012), reportaron que los escobajos de *Vitis vinifera* L. poseen cantidades significativas de ácidos fenólicos, flavonoles y *trans*-resveratrol. Asimismo, se ha observado que los ácidos fenólicos, la (-)-epicatequina y la (+)-catequina son los principales constituyentes de los escobajos (Anastasiadi *et al.*, 2012).

En la actualidad, se ha estimado que se producen millones de toneladas de subproductos de la vinificación (Antonia, 2012). Basado en un estudio de la industria vitivinícola australiana se ha calculado que las bodegas producen más de 300 kg de residuos sólidos por cada tonelada de fruta triturada, es decir 30% de la cosecha (Bacic, 2003). Así, se ha reportado que en la elaboración de 100 L de vino tinto se producen 18 kg de orujo y 4 kg de escobajo (Rockenbach *et al.*, 2011). El alto contenido de polifenoles en el escobajo y el orujo de uva permiten una amplia gama de aplicaciones de estos productos en los alimentos, industrias cosméticas y farmacológicas.

Potencial antimicrobiano de polifenoles

El campo de estudio de las propiedades de los compuestos fenólicos presentes en la uva ha comenzado a ampliarse más allá de la conocida como “paradoja francesa”, relacionada con la prevención de enfermedades cardiovasculares. Así, se han desarrollado estudios acerca de la capacidad que presentan los polifenoles de la uva en la protección frente a otro tipo de enfermedades, tales como enfermedades dérmicas y procesos neurodegenerativos, (Gómez *et al.*, 2012). Mientras que otros estudios demuestran el potencial de los compuestos fenólicos contra enfermedades cardiovasculares, antiinflamatorias y anticancerígenas (Shrikhande, 2000; Van de Wiel *et al.*, 2001; Khanna *et al.*, 2002).

Una de las propiedades de los polifenoles estudiadas corresponde a la antibacteriana (Bae *et al.*, 1998; Alberto *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2009). La actividad antibacteriana de los polifenoles consiste en inhibir el crecimiento de algunas bacterias.

La inhibición de los polifenoles sobre el crecimiento bacteriano puede ser originada por los siguientes mecanismos: hiperacidez citosólica, disrupción de la cadena transportadora de electrones, desestabilización de la membrana, disrupción de transportadores de membrana, inhibición de la bomba H⁺-ATPasa e inhibición del metabolismo bacteriano (Shetty y Wahlqvist, 2004).

Escherichia coli* y *Helicobacter pylori

Las bacterias *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* han sido ampliamente estudiadas, debido a los problemas que causan a la salud humana. (O’Gara *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008, Díaz *et al.*, 2012). *Escherichia coli*, es una bacteria, Gram negativa, flagelada, anaeróbica facultativa capaz de fermentar o bien de suplir sus necesidades mediante un metabolismo aeróbico. Esta bacteria es habitante frecuente del intestino de los mamíferos (Yoon *et al.*, 2009). Las infecciones más comunes por *E. coli* ocurren en el tracto gastrointestinal, debido a la facilidad de acceso del patógeno mediante alimentos o bebidas. La incidencia de tales infecciones está relacionada directamente con la higiene personal y la alimentación del individuo, además de la temperatura del medio (Sussman, 1997). Eydelnant y Tufenkji (2008), han reportado que los polifenoles provenientes de diversas fuentes naturales afectan la viabilidad de *Escherichia coli*. Así se ha descrito que algunos compuestos fenólicos no flavonoides, como los ácidos vainillínico, protocatéquico, gálico y cafeico. Además de flavonoides, como catequina, quercetina y rutina, afectan el crecimiento de *Escherichia coli* (Rodríguez *et al.*, 2007).

Por su parte *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa de forma bacilar espiralada, microaerofílica, flagelada, neutrófila, que habita en la capa mucosa que recubre el epitelio del estómago humano y es de lento crecimiento. Esta bacteria como parte de sus métodos de adaptación para poder sobrevivir hidroliza la urea por medio de la enzima ureasa, a través de la cual le es posible convertir la urea en amonio y anhídrido carbónico, produciendo un ambiente local alcalino necesario para sobrevivir en el medio ácido del estómago (Mobley *et al.*, 1997). *Helicobacter pylori* infecta el estómago de casi el 60% de la población adulta del mundo (Mitchell, 1999), con prevalencias que llegan al 95% en los países en desarrollo (Frenck y Clemens 2003). Esta bacteria, es el agente causal reconocido de una multitud de enfermedades gástricas, incluyendo gastritis crónica (Dixon, 1992) y las úlceras duodenales y gástricas (Nomura *et al.*, 1994). Además, es un importante factor de riesgo para el desarrollo de cáncer gástrico. Es importante mencionar que el cáncer gástrico es el segundo cáncer en prevalencia a nivel mundial según datos otorgados por la OMS, se estima que en Chile al menos el 73% de la población es portadora del microorganismo, siendo la mayoría de los pacientes asintomáticos (Ruggiero *et al.*, 2007).

Actualmente, el tratamiento para estas patologías incluye terapias potentes donde se combinan dos o más antibióticos (por ejemplo, claritromicina, amoxicilina o metronidazol) más un inhibidor de la bomba de protones (omeprazol). Estos regímenes de tratamiento son a menudo problemáticos, con efectos secundarios indeseables, limitando el cumplimiento del paciente, provocando resistencia a los antibióticos y altos costos de las terapias de erradicación (Delaney, 2006; Lane *et al.*, 2006), lo que conlleva a tasas de fracaso que varían de 20% a 40% (Nakayama y Graham, 2004). Así, son necesarios nuevos tratamientos y medidas preventivas que sean fácilmente accesibles y asequibles en todo el mundo y sin susceptibilidad a presentar resistencia.

Actividad anti-*E. coli* y anti-*H. pylori*

Diversos estudios se han realizado para evaluar el potencial antimicrobiano de compuestos fenólicos del vino. Díaz *et al.*, (2013), evaluaron el efecto del ácido gálico y (+)-catequina sobre la viabilidad de *H. pylori*, revelando la alta sensibilidad de la bacteria a la presencia del ácido gálico. Así, mediante el uso de (+)-catequina, se observaron resultados similares, pero menores que los observados en presencia de ácido gálico. Finalmente, estos autores observaron un efecto aditivo, cuando ambos polifenoles fueron aplicados conjuntamente. Paulo *et al.*, (2011), investigaron las propiedades antibacterianas de resveratrol y vino tinto sobre diferentes cepas de *H. pylori*, encontrando que tanto el resveratrol como el vino tinto inhibieron el crecimiento de todas las cepas probadas en el estudio, reportando diámetros de inhibición de 16 a 28 mm y una concentración mínima inhibitoria de 25 a 100 µg/mL.

Por otro lado, se ha reportado una actividad anti-*H. pylori* y anti-*E. coli* de diversos extractos, entre ellos, de ajo, arándano, té verde y uva, los cuales poseen abundantes compuestos fenólicos (Mabe *et al.*, 1999; Fahey *et al.*, 2002; Mahady *et al.*, 2003; Vattem *et al.*, 2005). Particularmente, Brown *et al.*, (2009), mencionan que el ácido elágico tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *H. pylori*. Además, estos autores reportan que la piel de la uva posee la mayor actividad anti-*H. pylori* seguido por la sinergia de los polifenoles presentes en la piel y la semilla. Finalmente, Tambola *et al.*, (2003) y Yahiro *et al.*, (2005), afirman que polifenoles presentes en el vino tinto tales como quercetina, epigallocatequina y ácido elágico, inhiben potencialmente la vacuolización celular producida por *H. pylori* en células del tejido gástrico. Por otro lado, se ha demostrado que los polifenoles obtenidos de extractos de cranberries tienen efecto sobre la viabilidad de *E. coli* (Eydelnant y Tufenkji, 2008). Otros estudios mencionan que los compuestos fenólicos no flavonoides (ácido vainillínico, ácido protocatequico, ácido gálico y ácido cafeico) y flavonoides (catequina, quercetina y rutina) presentan un efecto antibacteriano sobre *E. coli* (Rodríguez *et al.*, 2007; Díaz, 2012).

A partir de los antecedentes anteriormente expuestos, existe evidencia que apunta a que los compuestos de la uva poseen un potencial antimicrobiano, así como los subproductos de la vinificación. Además, en la búsqueda bibliográfica que se realizó en el presente estudio no se encontró información acerca del efecto de los polifenoles de los extractos de orujo y escobajo de uva de *Vitis vinifera* L. sobre *E. coli* y *H. pylori*. Por lo tanto, en este estudio se utilizarán extractos de subproductos de la vinificación (escobajo y orujo) como alternativa para el control antimicrobiano de *E. coli* y *H. pylori*.

CAPITULO I

**EFECTO ANTIBACTERIANO DE EXTRACTOS DE ORUJO Y ESCOBAJO SOBRE
Helicobacter pylori Y *Escherichia coli***

INTRODUCCIÓN

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios sintetizados por las plantas (Rodríguez *et al.*, 2005). Estos compuestos se caracterizan por poseer un núcleo bencénico que puede presentar uno o varios grupos hidroxilos (Cheynier *et al.*, 2003). Se clasifican en dos grandes grupos: no flavonoides y flavonoides. Los primeros se encuentran primordialmente en la pulpa de las bayas de uva (Monagas *et al.*, 2005), poseen sólo un anillo bencénico, pudiendo destacar dentro de este grupo los ácidos benzoicos, los ácidos cinámicos y los estilbenos (Garrido y Borges, 2011). Los flavonoides por su parte, constituyen la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. Los principales subgrupos de compuestos flavonoides son: flavonoles, flavanoles y antocianos. Debido a la composición química de los compuestos fenólicos, estos contribuyen en las características sensoriales de los alimentos tales como el aroma, el color, la astringencia y el amargor, además de tener un alto valor nutricional y farmacológico (Cheynier *et al.*, 2000).

Las fuentes mayoritarias de polifenoles en la dieta humana son principalmente las frutas, el vino, el té, y el chocolate (Miller *et al.*, 2009). En la uva representan el tercer componente más abundante después de los hidratos de carbono y los ácidos orgánicos (Singleton, 1980), localizándose preferentemente en las partes sólidas: hollejos, semillas y escobajos (Pastrana-Bonilla *et al.*, 2003; Makris *et al.*, 2008).

La actividad antimicrobiana y capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en los extractos de plantas, han sido la base de su aplicación en áreas como la alimentación, farmacéutica, cosmética y médica (Bakkali *et al.*, 2008). La actividad antimicrobiana de los polifenoles consiste en inhibir el crecimiento de algunas bacterias con incidencia sobre la salud, tales como *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori* (O'Gara *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2008; Díaz *et al.*, 2013).

Escherichia coli, es una bacteria, Gram negativa, flagelada, anaeróbica facultativa, capaz de fermentar o bien de suplir sus necesidades mediante un metabolismo aeróbico. Esta bacteria es habitante frecuente del intestino de los mamíferos (Yoon *et al.*, 2009). Las infecciones más comunes por *E. coli* ocurren en el tracto gastrointestinal, debido a la facilidad de acceso del patógeno mediante alimentos o bebidas. La incidencia de tales infecciones está relacionada directamente con la higiene personal y alimentación del individuo, además de la temperatura del medio ambiente (Sussman, 1997).

Por otra parte, *Helicobacter pylori* es una bacteria Gram negativa de forma bacilar espiralada, microaerofílica, flagelada, neutrófila, que habita en la capa mucosa que recubre el epitelio del estómago humano. Esta bacteria infecta el estómago de casi el 60% de la población adulta del mundo (Mitchell, 1999), con prevalencias que llega al 95% en los países en desarrollo (Frenck y Clemens, 2003). Esta bacteria, es el agente causal reconocido de una multitud de enfermedades gastrointestinales, incluyendo gastritis crónica (Dixon, 1992) y las úlceras duodenales y gástricas (Nomura *et al.*, 1994). Además este microorganismo es un importante factor de riesgo para el cáncer gástrico. En Chile al menos el 73% de la población es portadora del microorganismo, siendo la mayoría de los pacientes asintomáticos (Ruggiero *et al.*, 2007).

Hoy en día el tratamiento empleado para las patologías provocadas por *Helicobacter pylori* incluye terapias potentes donde se combinan dos o más antibióticos (por ejemplo, claritromicina, amoxicilina o metronidazol) más un inhibidor de la bomba de protones (omeprazol). Sin embargo, estos tratamientos son a menudo problemáticos, con efectos secundarios indeseables, limitando el cumplimiento del paciente, desarrollando resistencia a los antibióticos y altos costos de las terapias de erradicación (Delaney, 2006; Lane *et al.*, 2006), lo que conlleva a tasas de fracaso que varían del 20% al 40% (Nakayama y Graham, 2004). Así, son necesarios nuevos tratamientos y medidas preventivas que sean fácilmente accesibles y asequibles en todo el mundo y sin susceptibilidad a la resistencia.

Existen estudios sobre la extracción de polifenoles desde fuentes naturales (ajo, té verde, arándano, uva) que son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos tales como *H. pylori* y *E. coli*. (Mabe *et al.*, 1999; Fahey *et al.*, 2002; Mahady *et al.*, 2003; Vatter *et al.*, 2005). Asimismo, se ha demostrado que el vino y algunos de sus constituyentes como el resveratrol, son efectivos contra *E. coli* y *H. pylori*. Particularmente, Brown *et al.*, (2009), mencionan que el ácido elágico tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *H. pylori*. Por otra parte, Tambola *et al.*, (2003) y Yahiro *et al.*, (2005), afirman que los polifenoles presentes en el vino tinto tales como quercetina, epigallocatequina y ácido elágico, inhiben potencialmente la vacuolización celular producida por *H. pylori* en células del tejido gástrico.

Chile ocupa el quinto lugar como exportador y séptimo como productor de vino a nivel mundial con una producción de 12 millones de hectolitros (SAG, 2013). Esta industria genera grandes cantidades de desechos en el proceso de vinificación; principalmente orujo y escobajo. Durante el proceso, se estima que el 50% de los compuestos fenólicos presentes en la uva son transferidos al vino, mientras que la otra mitad aún permanece en los residuos, principalmente en el orujo y escobajo (Alonso *et al.*, 2002; Lafka, Sinanoglou y Lazos, 2007). Diversos estudios han reportado que los escobajos de uva vinífera poseen cantidades significativas de ácidos fenólicos, flavonoles, *trans*-resveratrol, (-)-epicatequina y (+)-catequina (Souquet *et al.*, 2000; Anastasiadi *et al.*, 2012). De la misma manera, algunos estudios mencionan que los orujos de uva poseen importantes contenidos de polifenoles, antocianos totales y específicamente altas concentraciones de (+)-catequina y (-)-epicatequina (De la Cerda *et al.*, 2014; Alonso *et al.*, 2002; Lafka *et al.*, 2007).

A pesar de lo anterior, existe poca información de la actividad antimicrobiana de compuestos fenólicos extraídos de orujo y escobajo de uva. Por lo anteriormente expuesto, en este estudio se realizó una caracterización polifenólica de extractos de escobajo y orujo de uva del cultivar Carménère y se evaluó el efecto antimicrobiano de estos extractos sobre *H. pylori* y *E. coli*.

HIPÓTESIS

Los extractos de escobajo u orujo de uva (*Vitis vinifera* L.) del cultivar Carménère provocan la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* en cultivo líquido y sólido.

OBJETIVOS

- **Objetivo general**

Evaluar el efecto antibacteriano de los extractos de escobajo y orujo de uva (*Vitis vinifera* L.) del cultivar Carménère sobre el crecimiento de *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* en cultivo líquido y sólido.

- **Objetivos específicos**

1. Realizar la caracterización polifenólica de extractos de escobajo y orujo de uva (*Vitis vinifera* L.) del cultivar Carménère.
2. Evaluar el efecto antibacteriano de los extractos de escobajo y orujo de uva sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* en medio de cultivo líquido y sólido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

Los ensayos microbiológicos se realizaron en el laboratorio de Microbiología Molecular perteneciente al Programa de Biología Celular y Molecular, del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

La caracterización polifenólica de los extractos se llevó a cabo en el laboratorio de Enología del Departamento de Agroindustria y Enología pertenecientes a la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de Chile.

Obtención de las muestras

El estudio se realizó con muestras de escobajo y orujo de *Vitis vinifera* L. cv. Carmènère proveniente del valle del Maule, de la localidad de Molina. Las bayas fueron cosechadas el 31 de mayo del 2013, estas provenían de plantas de 10 años de edad de la Región del Maule (35°8.94'S y 71°20.73'O), cultivadas en sistema de conducción espaldera, orientación norte-sur y con una producción anual aproximada de 8.000 kg/ha. Los escobajos fueron extraídos del proceso de despallado, mientras que el orujo fue extraído del prensado de las bayas, luego de finalizado el proceso de fermentación alcohólica.

Equipos

- Incubadora de atmósfera controlada (Shel Lab)
- Agitador (PSU-10i, Biosan)
- Incubadora con agitación orbital (LSI-3016R, Labtech)
- Incubadora sin control de atmósfera (IR2424, Shel Lab)
- Agitador miniTwist (Select Bioproducts)
- Freezer -80 °(LDF-9007, Labtech)
- Espectrofotómetro (SP-830, Metertek)
- Espectrofotómetro (V-530 UV-vis, Jasco)
- Cromatógrafo líquido de Alta Eficiencia (HPLC-DAD) (1200, Agilent technologies), constituido por un inyector automático modelo L-7200, un detector de arreglo de fotodiodos alineados modelo L-7455 y una columna Nova-Pak C18 (4 µm; 3.9 mm DI x 300 mm; Water Corporation, Milford, MA, USA).

Materiales

- Filtros de acetato de celulosa (Asahi Glass, Tokio, Japón)
- Filtros de acetato (Minisart, EE.UU)
- Cloruro de sodio y Bacto Agar (J.T. Baker, México)
- Bacto triptona, caldo de soya triptona y agar soya triptona (Becton y Dickson, Nueva Jersey, EE.UU.)
- Dimetilsulfóxido (Winkler, Santiago, Chile)
- Suero de caballo (Thermo scientific Hyclone, Utah, EE.UU.)
- Suplementos Dent y Vitox, (Oxoid Hampshire, Inglaterra)
- Amortiguador fosfato-salino pH 7.2 (PBS) (Gibco BRL, Maryland, EE.UU.)

- Los reactivos grado pro-análisis y grado HPLC se adquirieron en Merk (Darmstadt, Germany). Los estándares de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular fueron obtenidos en Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) y los cartuchos de fraccionamiento Sep-Pak C18, se adquirieron en Waters (Ireland).

Cepas bacterianas

Las cepas utilizadas para el presente estudio fueron *H. pylori* 26695 y ATCC 43504, y la cepa *E. coli* JM109, pertenecientes al cepario del laboratorio de Microbiología Molecular del Programa de Biología Celular y Molecular, del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Medios de cultivo

- **Caldo de Soya Triptona (TSB):** 30 g/L de caldo de soya tripticasa (TSB), suplementado con 50 mL/L de suero de caballo, 10 mL/L de Vitox y 4 mL/L de suplemento antibiótico Dent (Mobley y Foxall, 1997).
- **Agar Soya Triptona (TSA):** 40 g/L de Agar soya tripticasa (TSA), suplementado con 50 mL/L de suero de caballo, 10 mL/L de Vitox y 4 mL/L de suplemento antibiótico Dent (Mobley y Foxall, 1997).
- **Caldo Luria-Bertani (LB):** 10 g/L de Bacto Triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 5 g/L de NaCl (Sambrook *et al.*, 1989).
- **Agar Luria-Bertani (LB agar):** 10 g/L de Bacto Triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl y 15 g/L de Bacto Agar (Sambrook *et al.*, 1989).

METODOLOGÍA

Diseño experimental

El efecto inhibitorio del escobajo y del orujo sobre el crecimiento de cada una de las cepas bacterianas fue evaluado mediante dos ensayos independientes correspondientes a cada extracto (escobajo y orujo), con un diseño al azar y estructura factorial (3x6). El primer factor correspondió a las cepas bacterianas usadas para el presente estudio (*H. pylori* 26695 y ATCC 43504, y *E. coli* JM109), mientras que el segundo factor correspondió a las distintas cantidades del extracto utilizado en los experimentos. Los ensayos se realizaron por duplicado y se repitieron 3 veces.

La unidad experimental para llevar a cabo los ensayos en medio líquido fue el medio de cultivo líquido (TSB o LB) inoculado con 3×10^8 UFC/mL de la respectiva bacteria. En dicho ensayo se evaluó la actividad antibacteriana de los extractos sobre la viabilidad de las bacterias.

Por otra parte, para evaluar la actividad antibacteriana de los extractos en medio sólido, la unidad experimental fue el medio sólido (TSA o LB agar) inoculado con 3×10^8 UFC/mL de la respectiva bacteria. En el ensayo mencionado se midió el diámetro del halo de inhibición como medida de la potencia antimicrobiana de los extractos.

Procedimientos

Preparación de los extractos de escobajo y orujo de uva

Los extractos fueron obtenidos a través de la metodología propuesta por (Izquierdo, 2011):

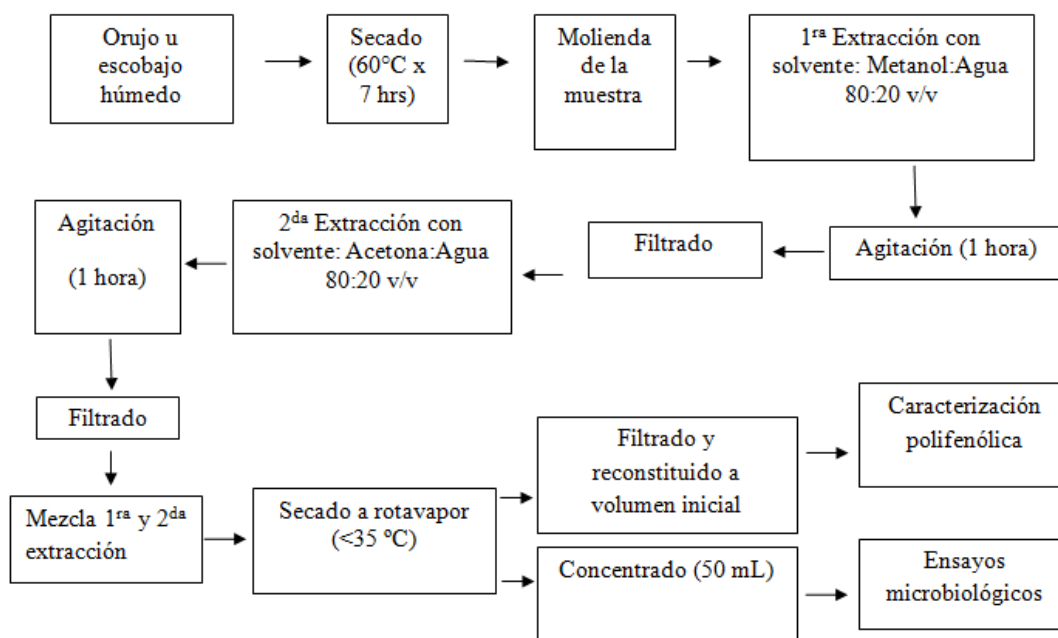


Figura 1. Obtención de los extractos de escobajo y orujo de uva (*Vitis vinifera* L.).

Luego de obtenidos los extractos de escobajo y orujo se realizó la caracterización polifenólica.

Cultivo de bacterias

Las cepas de *H. pylori* se cultivaron en medio TSA, bajo condiciones microaerófilas (5% CO₂ y 70% de humedad relativa) a 37°C, durante 48 horas, en placas Petri de 90x14 mm. Una vez crecido los cultivos, las bacterias fueron colectadas raspando la placa con una asa metálica y resuspendidas en 300 µL de amortiguador fosfato-salino pH 7,2 (PBS: 2,1 g/L KH₂PO₄, 90 g/L NaCl, 7,26 mg/L Na₂HPO₄ x 7H₂O), posteriormente fueron sembradas y sometidas al estudio. Por su parte, *E. coli* se cultivó en tubos de ensayo con 5 mL de medio líquido LB, a 37°C por 24 h con agitación constante de 200 rpm de acuerdo a lo descrito por Sambrook *et al.*, (1989).

Ensayo de la actividad antibacteriana en medio sólido sobre *Helicobacter pylori*

Con el propósito de evaluar el efecto inhibitorio de los extractos de escobajo u orujo sobre el crecimiento bacteriano en medio sólido, se sembraron 100 µL de inóculo (3x10⁸ células/mL) sobre placas de medio sólido a partir de un cultivo previo de bacterias (Rodríguez *et al.*, 2007). En las placas uniformemente sembradas, se realizaron pocillos de 3 mm de diámetro utilizando un sacabocados, en cada uno de los cuales fueron depositadas cantidades crecientes de extracto de escobajo u orujo respectivamente (Cuadro 1) previamente esterilizados mediante filtración, utilizando filtros de membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm. Posteriormente, las placas se

incubaron bajo las condiciones descritas previamente para la bacteria, y transcurrido el tiempo de incubación se midió el diámetro del halo de inhibición como medida de la potencia antimicrobiana de los extractos.

Cuadro 1. Dosis de extracto de escobajo u orujo utilizadas durante los tratamientos de viabilidad de *H. pylori* (26695 y ATCC 43504) en medio sólido.

| Tratamiento | Dosis de extracto de escobajo (µL) | Dosis de extracto de orujo (µL) |
|-------------|------------------------------------|---------------------------------|
| T0 | 0 | 0 |
| T1 | 5 | 5 |
| T2 | 10 | 10 |
| T3 | 15 | 15 |
| T4 | 20 | 20 |
| T5 | 25 | 25 |
| T6 | 30 | 30 |

Escobajo: 1 mL de extracto equivale a 43 mg (peso seco); **Orujo:** 1 mL de extracto equivale a 36 mg (peso seco).

Ensayo de la actividad antibacteriana en medio líquido sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*

Para evaluar el efecto inhibitorio de los extractos de escobajo u orujo sobre el crecimiento bacteriano en medio líquido, a los tubos de ensayo que contenían 5 mL de medio de cultivo (TSB o LB) se les adicionó una dosis de extracto de escobajo u orujo (previamente esterilizado mediante filtración) en la cual la cantidad de extracto varió de acuerdo a los Cuadros 2 y 3. Estos tubos de ensayo se incubaron bajo las condiciones específicas de crecimiento para cada bacteria, con el fin de favorecer la interacción entre el medio de cultivo y el extracto, ocasionando la formación de un precipitado que posteriormente podría interferir con el crecimiento de la bacteria.

Con el propósito de evitar la posible precipitación de las bacterias por el efecto de la interacción de los compuestos presentes en los extractos (escobajo u orujo) con el medio de cultivo, transcurrido el tiempo de incubación el precipitado que se formó fue separado mediante centrifugación (3.000 rpm, 4 °C, 2 min). El sobrenadante resultante de la centrifugación fue separado en tubos de ensayo, donde se realizó la inoculación con la bacteria en estudio a una concentración de 3×10^8 células/mL (según la relación de medición por espectrofotometría a 600 nm = 0.5 U.A. descrita por Stevens *et al.*, 1991).

Los tubos de ensayo fueron incubados según las condiciones de cultivo que se han descrito anteriormente, después del tiempo de incubación se tomaron 100 µL de cada tubo, con los cuales se hicieron diluciones seriadas para posteriormente ser

sembradas en placas (TSA o LBA) por duplicado, e incubadas nuevamente según los requerimientos de cada bacteria.

Transcurrido el tiempo de incubación, a cada placa se le realizó un conteo de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), para determinar la viabilidad de cada bacteria en presencia de los extractos utilizados para este estudio (Stevens *et al.*, 1991).

Cuadro 2. Dosis de extracto de escobajo u orujo utilizadas durante los tratamientos de viabilidad de *E. coli* en medio líquido.

| Tratamiento | Dosis de extracto de escobajo (μL) | Dosis de extracto de orujo (μL) |
|-------------|---|--|
| T0E | 0 | 0 |
| T1E | 500 | 500 |
| T2E | 1000 | 1000 |
| T3E | 1500 | 1500 |
| T4E | 1700 | 1700 |
| T5E | 2000 | 2000 |
| T6E | 2500 | 2500 |

Escobajo: 1 mL de extracto equivale a 43 mg (peso seco); **Orujo:** 1 mL de extracto equivale a 36 mg (peso seco).

Cuadro 3. Dosis de extracto de escobajo u orujo utilizadas durante los tratamientos de viabilidad de *H. pylori* (26695 y ATCC 43504) en medio líquido.

| Tratamiento | Dosis de extracto de escobajo (μL) | Dosis de extracto de orujo (μL) |
|-------------|---|--|
| T0H | 0 | 0 |
| T1H | 50 | 50 |
| T2H | 75 | 75 |
| T3H | 100 | 100 |
| T4H | 150 | 150 |
| T5H | 200 | 200 |
| T6H | 250 | 250 |

Escobajo: 1 mL de extracto equivale a 43 mg (peso seco); **Orujo:** 1 mL de extracto equivale a 36 mg (peso seco).

Variables a medir

Grado de turbidez. Mediante análisis espectrofotométrico, con una longitud de onda de 600 nm, de acuerdo a lo propuesto por Stevens *et al.* (1991).

Conteo en placas. A través de la técnica de siembra de diluciones seriadas en medio sólido (Eydelnant y Tufenkji, 2008).

Diámetro del halo de inhibición. Siguiendo la metodología propuesta por Rodríguez *et al.* (2007).

Composición fenólica:

- Fenoles totales: Espectrofotometría a longitud de onda a 280 nm (García-Barceló, 1990).
- Taninos totales: Reacción con Metilcelulosa (Mercurio *et al.*, 2007).
- Intensidad colorante: Espectrofotometría a longitud de onda a 420, 520 y 620 nm (Glories, 1978).
- Antocianos totales: Mediante la decoloración por bisulfito (García-Barceló, 1990).
- Fenoles de bajo peso molecular: Por análisis HPLC-DAD según lo descrito por Bengochea *et al.* (1995) modificado por Peña *et al.* (2007).
- Fraccionamientos de taninos condensados: Mediante el uso de cartuchos C18 Sep Pak (Sun *et al.*, 1998).
- Capacidad antioxidante: Usando el método DPPH (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Análisis estadístico

El software utilizado para llevar a cabo el análisis estadístico fue Minitab v. 16. Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANDEVA) para determinar la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos de los ensayos. Las diferencias significativas ($p < 0.05$) fueron evaluadas utilizando la prueba Tukey.

RESULTADOS

Caracterización polifenólica de los extractos de escobajo y orujo

En el Cuadro 4 se muestra el contenido polifenólico y los valores de capacidad antioxidante de orujo y escobajo de uva del cultivar Carménère, así como los compuestos fenólicos detectados por HPLC-DAD. Se observó que los orujos de Carménère presentaron contenidos significativamente mayores de fenoles y antocianos totales que los presentes en escobajos. Por su parte, los valores de taninos totales y capacidad antioxidante fueron similares en ambos subproductos. De la misma manera, en el Cuadro 4 se muestran los compuestos fenólicos de bajo peso molecular identificados y cuantificados. Los compuestos correspondieron a ácido gálico (AG), ácido protocatéuico (AP), ácido caftárico (AC), procianidinas B3 (PB3), B1 (PB1), B4 (PB4), B2 (PB2), (+)-catequina (C), ácido vainillínico (AV), (-)-epicatequina (EC), triptofol (T), flavonoles (Fs), procianidinas (Ps), galatos de procianidinas (GPs) y resveratrol (Rv). Los polifenoles más abundantes presentes en ambos subproductos fueron C y EC. Asimismo, se observó que los orujos presentaron mayores concentraciones de AC, PB3, C, PB4, EC, T, Ps y GPs con respecto a lo observado en los escobajos de Carménère. Por su parte el escobajo destaca por su contenido en AG, AP, PB1, PB2, Fs, y Rv. En cuanto al contenido mono, oligo y polimérico de flavan-3-oles, la fracción polimérica fue la más abundante en ambas muestras, y la fracción monomérica la menos presente. Comparativamente, el orujo presentó un contenido mayor en la fracción monomérica, oligomérica y polimérica comparadas con la muestra de escobajo.

Cuadro 4. Compuestos fenólicos de orujo y escobajo de uvas de Carménère detectados por HPLC-DAD y espectrofotometría.

| Parámetro (mg/kg) | Escobajo | Orujo |
|-------------------------------------|----------------|----------------|
| Fenoles totales ^a | 22.4 ± 0.02 | 23.63 ± 0.31* |
| Antocianos totales ^b | 0.66 ± 0.03 | 1.72 ± 0.05* |
| Taninos totales ^c | 0.94 ± 0.12 | 0.98 ± 0.18 |
| Capacidad antioxidante ^d | 56.32 ± 0.04 | 66.61 ± 0.22* |
| Ácido gálico | 23,48 ± 2,0 * | 19,9 ± 10,3 |
| Ácido protocatéuico | 3,10 ± 0,92* | 0,9 ± 0,3 |
| Ácido caftárico | - | 2,9 ± 0,2 |
| Procianidina B3 ² | 9,95 ± 1,15 | 18,8 ± 3,9 * |
| Procianidina B1 ² | 20,79 ± 4,52 * | 11,9 ± 2,3 |
| Catequina | 73,42 ± 3,02 | 178,3 ± 52,2 * |
| Ácido vainillínico | 6,69 ± 2,26 | 8,7 ± 1,6 |
| Procianidina B4 ² | 6,69 ± 1,27 | 17,7 ± 3,0 * |
| Procianidina B2 ² | 27,01 ± 3,96 | - |
| Epicatequina | 79, 13 ± 12,92 | 130,9 ± 42,5 * |
| Triptofol | - | 6,6 ± 5,7 |
| Flavonoles ³ | 112,81 ± 2,86 | 74,6 ± 9,9 * |
| Procianidinas ² | - | 13,9 ± 5,9 |
| Galatos procianidinas ¹ | - | 74,3 ± 9,9 |
| Resveratrol | 122.72 ± 13.16 | - |
| Fracción monomérica | 0.03±0.003 | 0.25±0.024* |
| Fracción oligomérica | 0.90± 0.105 | 1.37±0.031* |
| Fracción polimérica | 1.03±0.32 | 1.55±0.109 * |

*Diferencias estadísticamente significativas (Tukey, $p \leq 0,05$).^aEquivalente de ácido gálico; ^bEquivalente de malvidina; ^cEquivalente de (+)-catequina; ^dμmol Equivalente Trolox/g. ¹Compuestos cuantificados con ácido gálico; ²Compuestos cuantificados con (+)-catequina; ³Compuestos cuantificados con quercetina.

Efecto del extracto de escobajo sobre la viabilidad de *H. pylori*

Viabilidad de *H. pylori* en medio sólido con presencia de extracto de escobajo. Con el propósito de evaluar el efecto causado por el extracto de escobajo sobre la viabilidad de *H. pylori* en medio sólido, en una placa con TSA previamente sembrada con la bacteria, se realizaron pocillos y adicionaron en cada uno de ellos dosis crecientes de extracto de escobajo. Después de transcurrido un tiempo de incubación de 48 horas, se midió el halo de inhibición formado por la acción del extracto sobre la bacteria. El diámetro de los halos de inhibición varió entre 0 y 6.5 mm en ambas cepas estudiadas (Figura 2). Asimismo, en los medios de ambas cepas se observó un aumento significativo del diámetro de los halos de inhibición con cantidades crecientes del extracto de escobajo. De igual modo se observó que *H. pylori* 26695 presentó menores valores del diámetro de halo que *H. pylori* ATCC 43504.

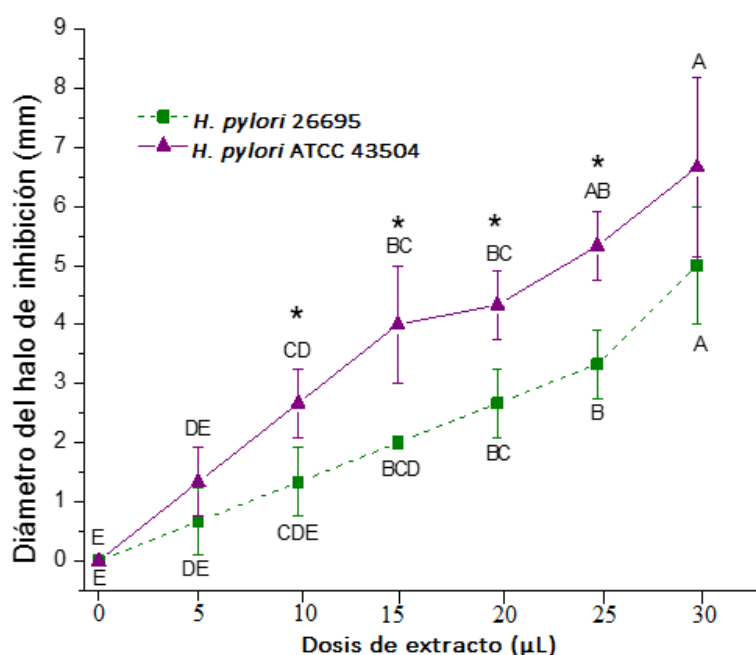


Figura 2. Diámetro del halo de inhibición provocado por el extracto de escobajo sobre el crecimiento de *H. pylori*. Letras iguales en una misma curva muestran diferencias estadísticamente no significativas entre los tratamientos (prueba de Tukey $p \geq 0.05$). * Indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas de *H. pylori*.

Viabilidad de *H. pylori* en medio líquido en presencia de extracto de escobajo. Para determinar el efecto del extracto de escobajo sobre *H. pylori* en medio líquido, se suplementó el medio TSB con dosis crecientes de extracto de escobajo y se incubó por 48 horas. Puede observarse en la Figura 3, que los valores de UFC/ mL fluctuaron entre $8.83 \cdot 10^8$ y 0 UFC/ mL. Además se observó que a medida que aumentó la cantidad del extracto en el medio de ambas cepas, los valores de UFC/ mL decrecen significativamente en ambas cepas de *H. pylori*.

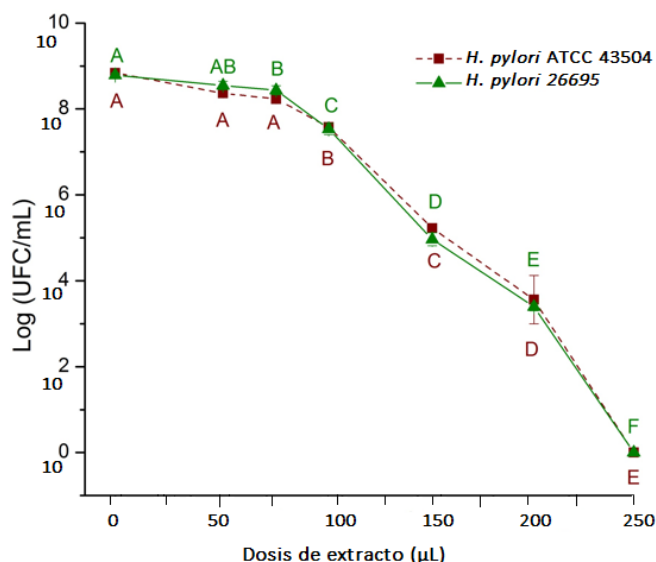


Figura 3. Efecto del extracto de escobajo sobre *H. pylori* en medio líquido. Letras iguales corresponden a diferencias estadísticamente no significativas entre las diferentes dosis de extracto (prueba de Tukey, $p \geq 0.05$). Mientras que * indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas de *H. pylori*.

Efecto del extracto de orujo sobre la viabilidad de *H. pylori*

Viabilidad de *H. pylori* en medio sólido en presencia de extracto de orujo. Para evaluar el efecto de extracto de orujo sobre *H. pylori* en medio sólido se llevó a cabo el procedimiento descrito anteriormente en el ensayo con extracto de escobajo. En este caso los valores del diámetro del halo de inhibición variaron entre 0 y 6.4 mm. (Figura 4). Además, se observó un aumento sostenido y significativo del diámetro del halo de inhibición en la medida que aumentó el contenido del extracto de orujo en el medio.

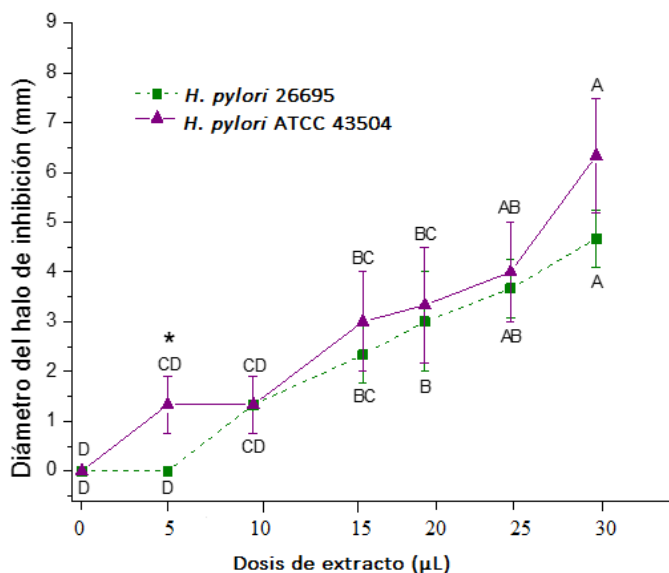


Figura 4. Diámetro del halo de inhibición de *H. pylori* en medios enriquecidos con extracto de orujo. Letras iguales en la misma curva indican diferencias estadísticamente no significativas entre los tratamientos con diferentes dosis del extracto analizado. (Prueba de Tukey, $p \geq 0.05$). * Muestra diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas de *H. pylori*.

Viabilidad de *H. pylori* en medio líquido en presencia de extracto de orujo. Para evaluar el efecto del extracto de orujo sobre *H. pylori*, ambas cepas fueron expuestas a dosis crecientes de dicho extracto en medio TSB durante un tiempo de incubación de 48 horas. En la Figura 5, se observa que los valores de UFC/mL variaron entre $8.54 \cdot 10^8$ y 0. Asimismo, se observó que en la medida que aumentó la dosis de extracto de orujo en el medio, los valores de las UFC/mL disminuyeron drásticamente en ambas cepas, sin observarse diferencias significativas en estas dos últimas.

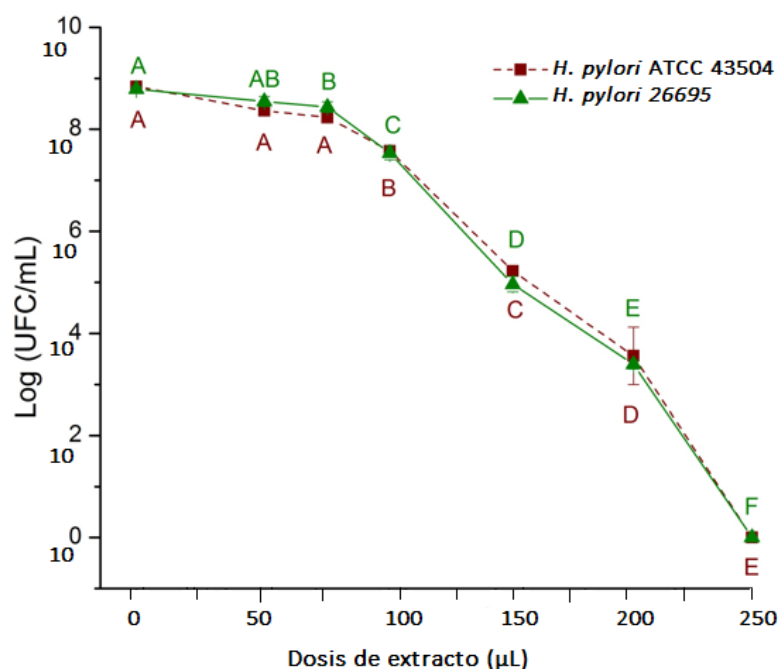


Figura 5. Efecto del extracto de orujo sobre la viabilidad de *H. pylori* en medio líquido. Letras iguales en la misma curva indican diferencias estadísticamente no significativas entre las diferentes dosis de extracto evaluado. (Prueba de Tukey ≥ 0.05). Mientras que * indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas de *H. pylori*.

Efecto del extracto de escobajo sobre la viabilidad de *E. coli*

Viabilidad de *E. coli* en medio líquido en presencia de extracto de escobajo. Con el propósito de observar el efecto del extracto de escobajo sobre *E. coli*, el medio líquido LB se suplementó con dosis crecientes del extracto y este se incubó durante 24 horas. Posteriormente una alícuota fue sembrada en medio sólido para luego contabilizar las UFC/mL. Los valores obtenidos tras el recuento de placas variaron entre $2.7 \cdot 10^9$ y 0. Del mismo modo se observó una disminución progresiva y significativa en la medida que aumento la dosis del extracto de escobajo en el medio líquido (Figura 6).

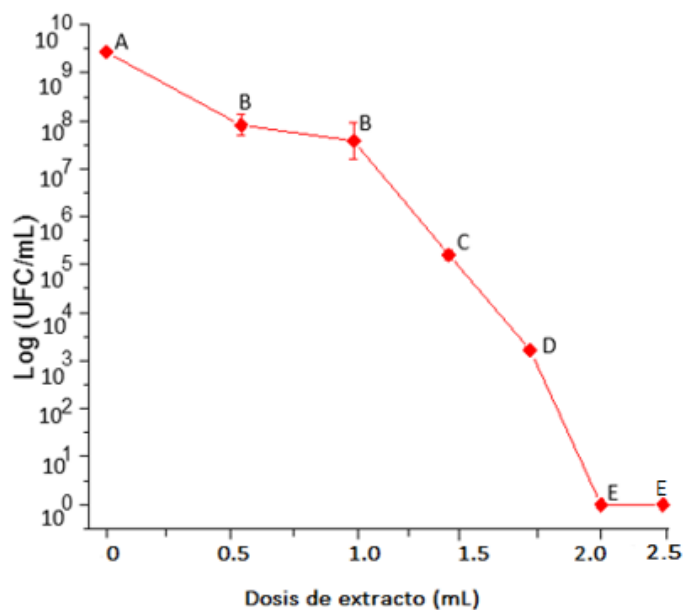


Figura 6. Efecto del extracto de escobajo sobre la viabilidad de *E. coli* en medio líquido. Letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del extracto (prueba de Tukey, $p \geq 0.05$).

Efecto del extracto de orujo sobre la viabilidad de *E. coli*

Viabilidad de *E. coli* en medio líquido en presencia de extracto de orujo. Para determinar el efecto del extracto de orujo sobre *E. coli*, en medio líquido se realizó el procedimiento descrito previamente. En la Figura 7 se observa que tras el recuento los valores de UFC/ml variaron entre $1.7 \cdot 10^9$ y 0. Del mismo modo, se observó que al agregar una mayor dosis de extracto de orujo en el medio líquido, los valores de UFC/mL disminuyeron drásticamente hasta llegar a valores de cero (dosis mayores o iguales a 12 mg/mL de extracto de orujo).

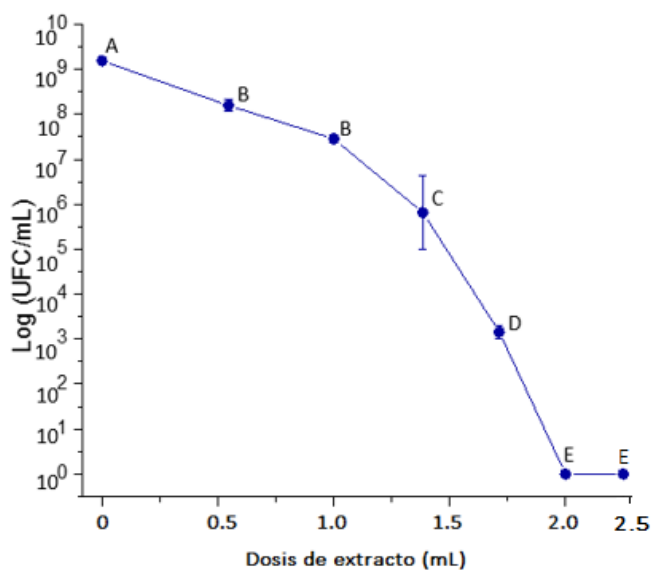


Figura 7. Efecto del extracto de orujo sobre la viabilidad de *E. coli* en medio líquido. En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del extracto de orujo (prueba de Tukey, $p \geq 0.05$).

DISCUSION

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de gran importancia en el reino vegetal, los cuales se han asociados a diversas propiedades sensoriales, taxonómicas, farmacológicas y nutricionales de los alimentos (Monagas *et al.*, 2005; Xia *et al.*, 2010). Diversos autores mencionan que los compuestos fenólicos son importantes agentes antifúngicos y bactericidas (Quiñones *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2013; Alberto *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2009). Así, se ha reportado que distintos polifenoles afectan el crecimiento de diversas bacterias, tales como, *H. pylori* y *E. coli* (Mabe *et al.*, 1999; Vатtem *et al.*, 2005; Romero *et al.*, 2007; Tombola *et al.*, 2003; Yahiro *et al.*, 2005). Una de las fuentes importantes de polifenoles corresponde a la uva vinífera. No obstante lo anterior, durante el proceso de vinificación parte de estos compuestos son transferidos al vino y otra importante fracción permanecen en los residuos de la vinificación que corresponden a los orujos y escobajos (Rockenbach *et al.*, 2011), los cuales representarían una fuente importante de polifenoles (Mikes *et al.*, 2008, Mendoza *et al.*, 2003, Alonso *et al.*, 2002; Lafka *et al.*, 2007). A pesar de lo anterior, existe limitada información acerca de la composición polifenólica de los subproductos de la vinificación y su efecto sobre el crecimiento de *H. pylori* y *E. coli*. Inicialmente, se caracterizó los polifenoles de orujos y escobajos obtenidos durante la vinificación de uva Carménère. Posteriormente, en ensayos independientes se evaluó el efecto de ambos extractos sobre la viabilidad de *H. pylori* y *E. coli*.

Inicialmente, los extractos de orujo y escobajo fueron analizados y caracterizados mediante análisis espectrofotométrico de HPLC-DAD. Se observó que el contenido de fenoles, antocianos y taninos totales coinciden con lo observado en semillas y hollejos de uva vinífera (Rodríguez Montealegre *et al.*, 2006; Obreque-Slier *et al.*, 2010; Rockenbach *et al.*, 2011; Obreque-Slier *et al.*, 2012a; Obreque-Slier *et al.*, 2013). Asimismo, la capacidad antioxidante de ambos extractos bordearon los 60 mol/mL, lo cual está acorde con lo observado en otros estudios (González-Centeno *et al.*, 2013, Yi *et al.*, 2009 y Poudel *et al.*, 2008). Asimismo, se observó la presencia de diversos fenoles de bajo peso molecular, coincidente con estudios previos (Rodríguez Montealegre *et al.*, 2006; Obreque-Slier *et al.*, 2012; Obreque-Slier *et al.*, 2013, De la Cerda *et al.*, 2014). Es importante notar que en el escobajo, se observaron particularmente contenidos importantes de catequina, epicatequina y *trans*-resveratrol, coincidente con los estudios de Anastasiadi *et al.*, 2012, los cuales se han asociado fuertemente con propiedades antimicrobianas (Gaby *et al.*, 2011, Diaz, 2013, Yee y Koo, 2000). Por su parte, los extractos de orujo presentaron contenidos importantes de catequina, epicatequina, flavonoles y galatos de procianidinas, lo que coincide con lo reportado por estudios previos (De la Cerda *et al.*, 2014, Yi *et al.*, 2009).

Luego de caracterizar polifenólicamente los orujos y escobajos de Carménère, se procedió a evaluar el efecto de estos extractos sobre la viabilidad de *H. pylori* y *E. coli*.

En el caso de *H. pylori*, se observó que cantidades crecientes del extracto de escobajo rico en polifenoles, generó un aumento del diámetro del halo de inhibición en el medio sólido. Del mismo modo, la adición de dosis crecientes de este extracto provocó una disminución de los valores de UFC/mL en el medio líquido. Es interesante notar que una similar tendencia se observó al utilizar los extractos de escobajo, es decir, un aumento significativo del diámetro del halo de inhibición y una disminución de la UFC/mL. Ambas observaciones se han relacionado previamente con una inhibición en el crecimiento de la bacteria (Yee y Koo, 2000, Escandón, 2013, Brown *et al.*, 2009, Thimothe *et al.*, 2007), lo cual estaría asociado a la presencia de polifenoles de los respectivos extractos. Diversos estudios realizados con extractos de té verde,

zarzaparrilla, arándano, uva, aceite de oliva y vino tinto, han reportado un efecto inhibitorio sobre *H. pylori* y *E. coli* (Mabe *et al.*, 1999, Vatter *et al.*, 2005, Romero *et al.*, 2007, Tombola *et al.*, 2003 y Yahiro *et al.*, 2005), lo cual coincide con lo observado en este estudio. Más aún, se ha reportado que la (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácido gálico y kaempferol, son polifenoles que individualmente afectan el crecimiento de *H. pylori* (Díaz, 2012 y Escandón, 2013). Nótese que en este estudio tanto los extractos de orujo y escobajo presentan importantes concentraciones de estos compuestos. Aunque se desconoce el mecanismo de inhibición de estos compuestos sobre la viabilidad de *H. pylori* se ha propuesto que podría estar relacionado con la hiperacidez citosólica, disrupción de la cadena transportadora de electrones, desestabilización de la membrana, disrupción de transportadores de membrana, inhibición de la bomba H⁺-ATPasa y/o canales iónicos e inhibición del metabolismo bacteriano (Shetty y Wahlqvist, 2004). Es importante destacar que el uso indistinto del extracto de orujo o escobajo no provocó un efecto diferencial sobre el crecimiento individual de ambas bacterias. Este comportamiento podría estar relacionado con la presencia de polifenoles presentes tanto en los escobajos y orujos, los cuales poseerían importantes propiedades antibacterianas y antifúngicas (Nitta *et al.*, 2002; Lindberg, Willfor, Hemming, y Holmbom, 2004).

En el caso de *E. coli*, los estudios fueron realizados solo en medio líquido, debido a la alta dosis de extracto requerido para inhibir la bacteria. Así, se observó que el uso de cantidades crecientes del extracto de orujo o escobajo provocó una disminución drástica de los valores de UFC/mL, llegando a valores de cero para las cantidades más altas de ambos extractos. Esta observación de inhibición es coincidente con lo observado por otros autores, los cuales utilizaron extractos de escobajos y vino en la inhibición del crecimiento de *E. coli*, *Salmonella enteritidis* y *Staphylococcus faecalis* (Thimothe *et al.*, 2007). Estudios recientes realizados con diferentes estándares de polifenoles, tales como, (+)-catequina, (-)-epicatequina, ácido gálico y kaempferol, reportan efectos inhibitorios relevantes contra *E. coli* (Díaz, 2012 y Escandón, 2013).

Finalmente, es interesante mencionar que la sensibilidad de ambas bacterias a los extractos de escobajos y orujos fue distinta. Así, *H. pylori* presentó mayor sensibilidad que *E. coli* a ambos extractos. Esta observación es coincidente con lo descrito por Díaz (2012), quien observó que *H. pylori* es 10 veces más sensible que *E. coli* al tratamiento con ácido gálico. De acuerdo a los mismos autores, la resistencia de *E. coli* puede estar relacionada al material genético que esta bacteria posee, el cual es tres veces mayor que el de *H. pylori* y que la dota de herramientas genéticas que le permiten adaptarse y contrarrestar situaciones que ponen en peligro su viabilidad (Blattner *et al.*, 1997; Tomb *et al.*, 1997).

A partir de los antecedentes anteriormente expuestos, es posible mencionar que la viabilidad de *H. pylori*, y *E. coli* está estrechamente vinculada con la interacción y dosis de los componentes de los extractos de orujo y escobajo de uva del cultivar Carménère. La riqueza en compuestos fenólicos de estos extractos sugiere que estos podrían ser los responsables de tal inhibición lo cual podría estar asociado a la naturaleza hidrofóbica de los compuestos fenólicos que les permitiría atravesar la membrana alcanzando blancos moleculares en el citosol de la bacteria, o una mayor interacción con las proteínas de la pared celular bacteriana, confiriéndoles una capacidad para disminuir la estabilidad de la membrana y así afectar el buen funcionamiento celular (Brown *et al.*, 2009).

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio es posible concluir que tanto los extractos de orujo como de escobajo de uva del cultivar Carménère poseen cantidades importantes de polifenoles. Además, estos subproductos presentan un efecto significativo sobre la inhibición de crecimiento de *H. pylori* y *E. coli*, el cual está estrechamente asociado a la dosis utilizada. Comparativamente, *H. pylori* presentó una sensibilidad inhibitoria mayor que *E. coli* a ambos extractos.

Finalmente, tanto el extracto de orujo como el de escobajo, poseen propiedades inhibitorias similares y no afectan diferencialmente el crecimiento individual de ambas bacterias.

LITERATURA CITADA

- Alberto, M. R., M.C. Manca de Nadra. 2002. Effect of wine phenolic compounds on *Lactobacillus hilgardii* 5w viability. *Journal of Food Protection* 65:148-150.
- Alonso, M.A., D.A. Guillén, C.G.Barroso, B. Puertas y A. García. 2002. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50:5832-5836.
- Anastasiadi, M., Pratsinis H.,Kletsas D., Skaltsounis A. and Haroutonian S. 2012. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their *in vitro* antioxidant properties. *Food Science and Technology* 48: 316-322.
- Antonia L. y Cañellas J. 2007. Dietary fibre and antioxidant activity of manto negro red grape (*Vitis vinifera*): Pomace and Stem. *Food Chemistry*.101: 659-666.
- Bacic, T. 2003. Recovery of valuable products from lees and integrated approach to minimise waste and add value to wine production. *Grape and Wine Research and Development Corporation*. 43p.
- Bae, E.A., Han M.J., Kim N.J. y Kim. D. H. 1998. Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biological y Pharmaceutical Bulletin* 21: 990-2.
- Bertamini, M., Mattivi, F., 1999. Composti fenolici nei vini rossi: ruolo dell'ambiente e delle tecniche colturali. *L'informatore Agrario* 55: 63-68
- Blattner, F.R., G. Plunkett, C.A. Bloch, N. T .Perna, V. Burland, M. Riley, J.Collado-Vides, *et al.* 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277:1453-1462.
- Brand-Williams, W.,Cuvelier M. E. and Berset C.1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology* 28: 25 – 30.
- Brown J.,Huang G., Haley-Zitlin V. y Jiang. X. 2009. Antibacterial effects of grape extracts on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 848-852.
- Cheyrier, V., M. Moutounet, P. Sarni Machado. 2000. Los compuestos fenólicos (cap. 2 pp.114-136). En: Flanzy, C. 2000. *Enología, Fundamentos Teóricos y Tecnológicos*. Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. 783p.
- Cheyrier, V., M. Moutounet y P. Sarni-Manchado. 2003. Los compuestos fenólicos. 114-133. En: Flanzy. C (Ed). *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. Mundi-Prensa, España. 549 p.
- Díaz, R. 2012. Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*. Memoria para optar por el Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 36p.

- Díaz-Gómez, R., R. López-Solís, E. Obreque-Slier, H. Toledo-Araya. 2013. Comparative antibacterial effect of gallic acid and catechin against *Helicobacter pylori*. *Food Science and Technology*, 54: 331 – 335.
- Delaney, B.C., 2006. Who benefits from *Helicobacter pylori* eradication. *British Medical Journal* 332, 187-188.
- De la Cerda-Carrasco, A., R. López-Solís, H. Nuñez-Kalasic, A. Peña-Neira, E. Obreque-Slier. 2015. Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grapevarieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 95: 1521–1527.
- Escandón, R. 2013. Efecto Antibacteriano de kaempferol y (-)-epicatequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 71p.
- Eydelnant I. y N. Tufenkji. 2008. Cranberry derived proanthocyanidins reduce bacterial adhesion to selected biomaterials. *Langmuir* 24: 10273-10281.
- Fahey, J.W., Haristoy, X. Dolant, M. Kensler, T. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo(a)pyrene-induced stomach tumors. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7610-7615.
- Flanzy, C. 2000. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. A. Madrid Vicente, Ediciones; Ediciones Mundi-Prensa. 783 p.
- Frenck Jr, R.W., Clemens, J., 2003. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes and Infection* 5, 705-713.
- Gaby, A. 2011. *Helicobacter pylori* eradication: are there alternatives to antibiotics. *Alternative Medicine Review*, 6:355-366.
- García-Barceló, J. 1990. *Técnicas Analíticas para Vinos*. Ediciones FAB. Barcelona, España 1713 p.
- Garrido, J. and F. Borges. 2011. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International* 44: 3134.
- Giorgia S. y De Faveri, D.M. 2005. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*, 78: 793-801.
- Glories, Y. 1978. *Recherches sur la matière colorante des vins rouge*. Thèse doctorat d'état, Université de Bordeaux II. 364 p.
- Gómez-Pinilla, F., Nguyen, T. T. J. 2012. Natural mood foods: The actions of polyphenols against psychiatric and cognitive disorders. *Nutritional Neuroscience*, 15:127-133.

González-Centeno, M.R., M. Jourdes, A. Femenia, S. Simal, C. Rosselló, P. Teissedre. 2012. Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking by-products from ten different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60: 2647-2656.

Izquierdo, A. 2011. Estudio comparativo de 4 métodos de extracción de compuestos fenólicos de bayas de *Vitis vinifera*. Memoria Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 33 p.

Kammerer, D., Claus, A., Schieber, A., Carle, R., 2005. A novel process for the recovery of polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) pomace. *Journal of Food Science* 70, C157-C163.

Khanna, S., Venojarvi, M., Roy, S., Sharma, N., Trikha, P., Bagchi, D., Bagchi, M., Sen, C.K., 2002. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 1089-1096.

Kim T., J. Silva y Y. Jung. 2009. Antibacterial activity of fresh and processed red muscadine juice and the role of their polar compounds on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology* 107: 533-539.

Lane, J.A., Murray, L.J., Noble, S., Egger, M., Harvey, I.M., Donovan, J.L., Nair, P., Harvey, R.F., 2006. Impact of *Helicobacter pylori* eradication on dyspepsia, health resource use, and quality of life in the Bristol helicobacter project: randomised controlled trial. *British Medical Journal* 332, 199.

Lindberg, L., Willfor, S., Hemming, J., and Holmbom, B. 2004. Antibacterial effects of hydrophilic knotwood extracts on papermill bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 31, 137–147

Mabe K., M. Yamada, I. Oguni y T. Takahashi. 1999. In vitro and in vivo activities of tea catechins against *Helicobacter pylori*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43: 1788-1791.

Mahady, G.B., S.L. Pendland y L.R. Chadwick. 2003. Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of CagA+ strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *American Journal of Gastroenterology* 98:1440-1441.

Makris, D.P., Boskou G., Andrikopoulos N.K., Kefalas P. 2008. Characterization of certain major polyphenolic antioxidants in grape (*Vitis vinifera*) stems by liquid chromatography-mass spectrometry. *European Food Research and Technology* 226: 1075–1079.

Mendoza, L., Yañez, K., Vivanco, M., Melo, R., Cotoras, M. 2013. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products* 43: 360-364.

Mercurio, M.D., Damberg R.G., Herderich M.J. Smith P.A. 2007. High throughput analysis of red wine and grape phenolics adaptation and validation of methyl

celluloseprecipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 4651-4657.

Mikes, O., Vrchotova N., Triska J., Kyselakova M. y Smidrkal J.2008. Distribution of major polyphenolic compounds in vine grape of different cultivars growing in South Moravian vineyards. *Journal of Food Science* 26: 182-189.

Miller, K.B., Stuart D.A., Smith N.L., Lee C.Y., Mchale N. LL. 2006. Antioxidant activity and polyphenol and procyanidin contents of selected commercially available cocoa-containing and chocolate products in the United States. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54:4062-68

Mitchell, H.M. 1999. The epidemiology of *Helicobacter pylori*. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 241:11-30.

Mobley H. yFoxall. P. 1997. Differentiation of *H. pylori* strains using PCR RFLP. p 119. In Clayton C., Mobley H. eds. (1997). *Helicobacter pylori* protocols. Human Press, New Jersey, USA. 275 p.

Monagas, M.; B. Bartolomé y C. Gómez-Cordovés. 2005. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45: 85–118.

Nakayama, Y., Graham, D.Y., 2004. *Helicobacter pylori* infection: diagnosis and treatment. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2, 599-610.

Nitta, T., Arai, T., Takamatsu, H., Inatomi, Y., Murata, H., Inuma, M., 2002. Antibacterial activity of extracts prepared from tropical and subtropical plants on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Health Science*, 48, 273–276.

Nomura, A., Stemmermann, G.N., Chyou, P.-H., Perez-Perez, G.I., Blaser, M.J., 1994. *Helicobacter pylori* infection and the risk for duodenal and gastric ulceration. *Annals of Internal Medicine* 120, 977-981.

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

Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira, R. López-Solís. 2012. Interaction of enological tannins with the protein fraction of saliva and astringency perception are affected by pH. *Food Science and Technology*, 45: 88–93.

Obreque-Slier, E., A. Peña-Neira, R. López-Solís, A. Cáceres-Mella, H. Toledo-Araya, A. López-Rivera. 2013. Phenolic compositions of skins from four Carmenere grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Food Science and Technology*, 54: 404-413.

O’Gara E., D. J. Hill y D. J. Maslin. 2000. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 2269-2273.

Pastrana-Bonilla, E., C. Akoh, S. Sellappan y G. Krewer. 2003. Phenolic content and antioxidant capacity of muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:5497–5503.

Paulo, L., Oleastro M., Gallardo E., Queiroz J.A. y Domingues. F. 2011. Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine. *Food Reviews in Microbiology* 29:351-9.

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

Poudel, P. R., Tamura H., Kataoka I, Mochioka. R. 2008. Phenolic compounds and antioxidant activities of skins and seeds of five wild grapes and two hybrids native in Japan. *Journal of Food Compositions and Analysis*, 21: 622-625.

Quiñones, M., Miguel, M., Aleixandre, A., 2012. Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* 27, 76-89.

Rockenbach, I., Rodriguez E. Gonzaga L.V., Caliari V., Genovese, Gonçalves, S. Fett R. 2011. Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, 127: 174 – 179.

Rodríguez M., Alberto M., Manca de Nadra M. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control*, 18: 93-101.

Rodríguez Montealegre, R.; R. Romero Peces, J. L. Chacón Vozmediano, J. Martínez Gascueña, E. García Romero. 2006. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 687 – 693.

Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., *et al.* (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, 100, 203–211.

Ruggiero, P., G. Rossi, F. Tombola, L. Pancotto, L. Lauretti, G. Del Giudice and M. Zoratti. 2007. Red wine and green tea reduce *H. pylori*- or *VacA*- induced gastritis in a mouse model. *World Journal of Gastroenterology* 13: 349-354.

SAG. 2012. Informe Ejecutivo: Producción de vinos. División Protección Agrícola y Forestal. Sub-departamento de viñas y vino. Ministerio de Agricultura. Santiago. Chile. 6p.

Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2da ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Press. New York.

- Shetty, K., Wahlqvist, M.L., 2004. A model for the role of proline-linked pentosephosphate pathway in phenolic phytochemical biosynthesis and mechanism of action for human health and environmental applications. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition* 13, 1–24.
- Shrikhande, A.J., 2000. Wine by-products with health benefits. *Food Research International* 33, 469-474.
- Souquet, J., Labarbe B., Le Guernevé C., Chaynier V., Moutounet. M. 2000. Phenolic Composition of Grape Stems. *Journal Agricultural Food Chemistry* 48: 1076-1080.
- Stevens K., Sheldon B., Klapes A., and Klaenhammer. T. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 3613-3615.
- Sun, B.; Ricardo Da Silva J. M. and Spranger. I. 1998. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 4267-4274.
- Sussman M. 1997. *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. pp. 4, 11. Cambridge University Press, UK. 639 p.
- Thimothe J. Illeme A. Bonsi , Olga I. Padilla-Zakour and Hyun Koo. 2007. Chemical characterization of red wine grape (*Vitis vinifera* and *Vitis* Interspecific Hybrids) and pomace phenolic extracts and their biological activity against *Streptococcus mutans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.55:10200–10207
- Tomb, J.F., White O, Kerlavage A., Clayton R., Sutton G., Fleischmann R., Ketchum K., *et al.* 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388:539-547.
- Tombola F., Campello S., De Luca L., De Luca P., Del Giudice G., Papini E. and Zoratti. M. 2003. Plant polyphenols inhibit VacA, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters* 543: 184-189.
- Unachukwu, U.J., Ahmed, S., Kavalier, A., Lyles, J.T., Kennelly, E.J., 2010. White and green teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*): variation in phenolic, methylxanthine, and antioxidant profiles. *Journal of Food Science* 75, C541-C548.
- Van de Wiel, A., Van Golde, P., Hart, H.C., 2001. Blessings of the grape. *European Journal of Internal Medicine* 12, 484-489.
- Vattem, D. A., Lin Y., Ghaedian R. y Shetty K. 2005. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections, *Process biochemistry* (40):1583-1592.
- Xia, E. Q., Deng G-F., Guo Y-J. 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Sciences* 11:6222-646.
- Yahiro, K., Shirasaka D., Tagashira., Wada, M., A. Morinaga N., Kuroda, Choi F. O., Inoue M., Aoyama N., Ikeda M., Hirayama T., Moss J. and Noda. M. 2005. Inhibitory

effects of polyphenols on gastric injury by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Helicobacter* 10: 231-239.

Yee Y.K y Koo M.W. 2000. Anti-*Helicobacter pylori* activity of chinese tea: in vitro study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 14:635-638.

Yi, C., Shi J.,Kramer J., Xue S., Jiang, Y. ,Zhang M.,Ma Y., Pohorly J.. 2009. Fatty acid composition and phenolic antioxidants of winemaking pomace powder. *Food Chemistry*, 114: 570-576.

Yoon S., Jeong., H. Kwon S. and Kim J. 2009. Genomics, biological features and biotechnological applications of *Escherichia coli* B: “Is B for better?” p. 2. In Lee S. *System Biology and Biotechnology of Escherichia coli*. Springer, Korea. 462 p.