



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DE KAEMPFEROL Y
(-)-EPICATEQUINA SOBRE *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli***

Tesis para optar al Título Profesional de Ingeniero Agrónomo
Tesis para optar al Grado de Magíster en Enología y Vitivinicultura

RICARDO ANTONIO ESCANDÓN VILLALOBOS

DIRECTORES DE TESIS
HÉCTOR TOLEDO ARAYA
ELÍAS OBREQUE SLIER

PROFESORES CONSEJEROS
EDUARDO LOYOLA MADARIAGA
CARLA JARA CAMPOS

SANTIAGO – CHILE
2013

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
ESCUELA DE POSTGRADO

EFECTO ANTIBACTERIANO DE KAEMPFEROL Y (-)-EPICATEQUINA SOBRE *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN ENOLOGÍA Y
VITIVINICULTURA

RICARDO ANTONIO ESCANDÓN VILLALOBOS

	Calificaciones (Tesis de Título)	Calificaciones (Tesis de Grado)
Directores de tesis		
Dr. Héctor Toledo Araya Químico Farmacéutico	7,0	Aprobada
Dr. Elías Obreque Slier Ingeniero Agrónomo	6,8	Aprobada
Profesores evaluadores		
Dr. Eduardo Loyola Madariaga Ingeniero Agrónomo	6,8	Aprobada
Dra. Carla Jara Campos Ingeniera Agrónoma	6,8	Aprobada

SANTIAGO – CHILE
2013

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico en primer lugar a mis padres, por su constante e incondicional apoyo y permitirme estudiar lejos de casa. Sin su crianza basada en la confianza, el cariño y el amor que nos impartieron junto a mis hermanas, nada de esto hubiera sido posible.

Por supuesto, dedicárselo a mi familia, tanto mis hermanas Alejandra y Laura como el resto del clan Escandón-Villalobos, por su apoyo incondicional y sus deseos que me llenaron de buena energía para completar este proceso.

Le dedico también esta tesis al amor de mi vida, Daniela. Tú llenas de alegría y amor mi vida y siempre estás a mi lado cuando te necesito. Me haces querer ser mejor persona y me das un ejemplo constante de perseverancia, responsabilidad y valentía. Este es un paso que estamos dando juntos.

A mis amigos de la “U” Pablo, Roberto, Simón y Fernando; ciertamente son anormales por su alegría de vivir y de compartir su vida durante nuestra andanza antumapina. Junto a Daniela fueron mi segunda familia en este período. A Franco, Roberto Q., Juanito y Milton mis amigos de la vida, quienes siempre inquietos y preocupados me dieron su apoyo en todo momento.

Agradezco el apoyo desinteresado, la confianza y los sabios consejos del profe Toledo, quien me acogió en sus dominios con la mejor voluntad. Junto a él, agradezco a los chiquillos del laboratorio que me aguantaron y ayudaron en mi estadía en Medicina: Daniel, Claudia, Óscares y Nico.

A los profesores que me formaron como profesional en Antumapu, con especial mención a Álvaro Peña, Eduardo Loyola y Elías Obreque, éste último un apoyo fundamental en la elaboración de esta tesis.

Por último, y no menos importante, agradezco el apoyo financieros que permitieron este trabajo: el Proyecto Fondecyt N°11121322 y el Proyecto U-INICIA 11/05

INDICE

INDICE	2
ABREVIATURAS	6
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	7
CAPÍTULO II: EFECTO ANTIBACTERIANO DE KAEMPFEROL Y	17
(-)-EPICATEQUINA SOBRE <i>Helicobacter pylori</i> y <i>Escherichia coli</i>	17
RESUMEN.....	18
ABSTRACT	19
Keywords: Antimicrobial, Bactericide, Flavonoids, Gram-negative, Phenols.....	19
INTRODUCCIÓN.....	20
HIPÓTESIS DE TRABAJO	22
OBJETIVOS	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Lugar de estudio	23
Materiales y Reactivos	23
Equipamiento	23
Cepas Bacterianas.....	24
Línea celular.....	24
Medios de cultivo	24
METODOLOGÍA.....	25
Diseño de experimentos	25
Procedimientos	26
Cultivo de bacterias.....	26
Cultivo de células AGS.....	26
Preparación de la solución stock de kaempferol o (-)-epicatequina	27
Estudio de la acción individual y sinérgica de kaempferol y (-)- epicatequina.....	27
Caracterización polifenólica mediante HPLC-DAD de los compuestos usados	29
Ensayo de viabilidad de células AGS usando MTT.....	29
Variables a medir	30
Análisis Estadístico	31
RESULTADOS	32
Efecto de EC sobre la viabilidad de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i>	32
Viabilidad en medio líquido de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i> en presencia de EC	32
Viabilidad en medio sólido de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i> en presencia de EC.....	33
Cinética de inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i> en presencia de EC.....	34
Efecto de K sobre la viabilidad de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i>	35
Viabilidad en medio líquido de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i> en presencia de K.....	35
Viabilidad en medio sólido de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i> en presencia de K	36
Cinética de inhibición del crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i> en presencia de de K	37

Efecto de la aplicación en conjunto de K y EC sobre la viabilidad de <i>H. pylori</i> y <i>E. coli</i>	38
Viabilidad en medio líquido de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i> frente a la aplicación conjunta de K y EC.....	38
Viabilidad en medio sólido de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i> en presencia conjunta de K y EC	40
Cinética del crecimiento de <i>E. coli</i> y <i>H. pylori</i> en presencia conjunta de K y EC	42
Caracterización de la mezcla de flavonoides por HPLC-DAD.....	43
Efecto de EC sobre la viabilidad de células AGS ante infección de <i>H. pylori</i>	44
Evaluación de la infección de <i>H. pylori</i> y el efecto de los polifenoles sobre la viabilidad de las células AGS	44
Efecto de la EC sobre el daño celular producido por <i>H. pylori</i>	45
DISCUSION.....	47
CONCLUSIONES	54
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

ABREVIATURAS

Células AGS :	células de epitelio de adenocarcinoma gástrico.
cv. :	cultivar
DMEM :	medio Dulbecco Eagle Modificado (para células AGS)
DMSO :	dimetil sulfóxido
EC :	(-)-epicatequina
K :	kaempferol
MOI :	multiplicidad de infección
MTT :	bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio
PBS :	amortiguador fosfato-salino
PCs :	procianidinas
U.A. :	unidades de absorbancia
UFC/mL :	unidades formadoras de colonia en 1 mL.
UV :	ultravioleta

CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los polifenoles son metabolitos secundarios de origen vegetal, los cuales constituyen uno de los grupos más abundantes de compuestos naturales y forman una parte importante de la dieta de humanos y animales (Mann, 1978). Estos metabolitos fenólicos sirven para proteger a las plantas contra estrés biológico y medioambiental, y además son sintetizados en respuesta al ataque de patógenos, tanto infecciones fúngicas como bacterianas o a exposición a radiación de alta energía, tal como exposición prolongada a rayos UV (Shetty, 1997; Briskin, 2000). La familia de los compuestos fenólicos comprende a los flavonoides y no flavonoides (Harborne *et al.*, 1999). Los flavonoides son un grupo de polifenoles bioactivos distribuidos ampliamente en el Reino *Plantae*, que están especialmente incorporados en ciertos frutos y vegetales (Ross y Kasum, 2002). Estos compuestos son potentes antioxidantes, capturan radicales libres y actúan como quelantes metálicos, inhiben la peroxidación lipídica y exhiben variadas actividades fisiológicas que incluye actividad anti-inflamatoria, antialérgica, anticarcinogénica, antihipertensiva, antiartritis y antimicrobiana (Rodríguez *et al.*, 2007).

Los tres mayores subgrupos de flavonoides son flavonoles, flavanoles y antocianos (Tabla 1). Los flavonoles son pigmentos amarillos principalmente localizados en las vacuolas de los tejidos epidérmicos (Monagas *et al.*, 2005), siendo el kaempferol, miricetina, isoramnetina y quercetina los principales flavonoles en la vid y el vino (Flanzy, 2000). Estos compuestos son altamente dependientes de la exposición a la luz de los tejidos, reportándose que racimos de uva expuestos al sol presentan mayores niveles de flavonoles que aquellos que permanece sombreados (Spayd *et al.*, 2002). Sin embargo, el contenido de flavonoles en los vinos dependerá también del tipo de proceso de vinificación, pues por ejemplo, los vinos blancos (cuya fermentación se realiza en ausencia de los hollejos) contienen cantidades menores que los vinos tintos. Aunque los flavonoles no contribuyen en proporción elevada al contenido total de compuestos fenólicos del vino, pueden llegar a tener gran influencia sobre el color de los vinos

tintos, al ser capaces de actuar como copigmentos con las antocianinas (Hermosin *et al.*, 2005).

Los flavanoles como unidades monoméricas en *Vitis vinifera* L. son (-)-epicatequina, (+)-catequina, (+)-galocatequina y (-)-epigallocatequina (Sun y Singleton, 1969; Czochanska *et al.*, 1979). Se ubican en las capas hipodermales de los hollejos y en el parénquima de las semillas (Adams, 2006). De las partes constituyentes de las uvas, la semilla es la fuente más abundante de flavanoles (Roby *et al.*, 2004). Además, sub-unidades de flavanoles pueden formar taninos condensados o proantocianidinas (PCs), que son los compuestos fenólicos más abundante en la uva, siendo extraídos de los hollejos, de las semillas y de los escobajos de los racimos (Kennedy *et al.*, 2006).

Los antocianos son los pigmentos tintos de la uva, localizados en el hollejo de la uva y en la pulpa de algunas variedades tintoreras. En la *Vitis vinifera* L. se distinguen cinco moléculas de antocianos monoglucósidos: cianidina, peonidina, petunidina, malvidina y delfinidina (Hidalgo, 2003).

Según Ghiselli *et al.* (1998) en vinos tintos italianos cv. Sangiovese, el kaempferol se encontraría en concentraciones cercanas a 6 mg/L en estado puro y 12 mg/L como kaempferol-3-glucósido. Sin embargo, en otros estudios se encontraron concentraciones de hasta 1.643 mg/L de kaempferol-3-glucósido en muestras de vinos del cv. Merlot provenientes del valle del Maipo (Castro, 2005). Para bayas de la variedad Carménère del valle del Maipo se encontraron concentraciones de hasta 593,9 µg/g de hollejo de kaempferol en los días previos a la cosecha (Cuevas, 2004). Por otra parte, Häkkinen *et al.* (1999) indican que el contenido de flavonoles como kaempferol, es más alto en cranberries, grosellas negras, arándanos y otros berries silvestres, que en frutas y verduras comúnmente consumidas, a excepción de las cebollas y coles. Lo anterior concuerda con varios autores que encontraron concentraciones de kaempferol de hasta 13 mg/100g en fruta fresca de arándano, en cranberry 21 mg/100g, y hasta 89 mg/100g en chokeberry (Häkkinen *et al.*, 1999; USDA, 2003), mientras que en jarabe de cranberry las concentraciones alcanzan 30,7 µg/L (Iswaldi *et al.*, 2012).

Tabla 1. Clasificación y concentración de los compuestos fenólicos en vinos tintos y blancos.

Ácidos fenólicos y polifenoles de vinos tintos y blancos				
GRUPO	FAMILIA	EJEMPLOS	Concentración (mg /L)	
			Vino tinto	Vino blanco
No Flavonoides	Ácidos y aldehídos benzoicos	Gálico	116	1,4
		Siringico	5	-
		Protocatéquico	88	-
	Ácidos y aldehídos cinámicos	Cafeico	8,5	2,8
		Cumárico	12,6	1,5
		Ferúlico	19	-
	Estilbenos	<i>trans</i> -Resveratrol	1,0	0,22
Flavonoides	Flavonoles	Kaempferol	18	0
		Miricetina	16,2	0
		Quercetina	18,8	0
	Flavanoles	Epicatequina	57,3	13,6
		Catequina	89	17,3
	Antocianos	Malvidina 3-monoglucósido	93	1
		Delfinidina 3-monoglucósido	22	0
Cianidina 3-monoglucósido		20	0	

Adaptado de: German y Walzem, 2000. Annual Review Nutrition 20:561-93

En cuanto a los flavanoles, dímeros y trímeros de proantocianidinas, el consumo diario ha sido estimado entre 18 y 50 mg/día, siendo las principales fuentes en los alimentos las uvas, el vino, el té, las manzanas y el chocolate (Arts *et al.*, 2000)

Para el caso de la (-)-epicatequina, en vinos italianos se encontraron concentraciones que bordean los 128 mg/L (Ghiselli *et al.*, 1998). Por su parte, Castro (2005) encontró concentraciones que alcanzaron los 45 mg/L para un vino del cv. Merlot del Valle del Maipo. En hollejos de bayas cultivadas en el valle del Maipo del cv. Carménère, Cuevas (2004) encontró concentraciones de (-)-epicatequina de hasta 3,5 µg/g en el momento de cosecha. Mientras que en semillas de uva de cv. Merlot provenientes del valle del Maipo, Obreque-Slier (2010) encontró concentraciones de hasta 1.416,7 mg/Kg.

Por otra parte, Neto *et al.* (2008) encontraron concentraciones de (-)-epicatequina de 4,3 mg/100g de cranberry, y en té verde chino se identificó una concentración

de hasta 35,5 µg/mL (Yee y Koo, 2000). Mientras que en la piel de manzana se encontraría hasta en concentraciones de 19 mg/100 g de piel (Lee *et al.*, 2003). En el chocolate, la (-)-epicatequina es predominante respecto a otros compuestos fenólicos (Cooper *et al.*, 2007). El cacao en polvo contiene de 2 a 15 mg/g de (-)-epicatequina y 25-55 mg/g de procianidinas (Gu *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2006). Por su parte, el chocolate negro tiene altos niveles de flavanoles, con hasta 2 mg/g de (-)-epicatequina y 31 mg/g de procianidinas (Neilson y Ferruzzi, 2011). Estas concentraciones nos señalan que existe una amplia distribución de los compuestos kaempferol y (-)-epicatequina en distintos alimentos y a concentraciones diferentes según la fuente de donde provengan.

En la actualidad, hay un creciente interés en la explotación de residuos generados por la industria alimenticia. En particular, en las zonas productoras de uva y vino, se genera una gran cantidad de residuos, ya que de los compuestos fenólicos que tienen su origen en la uva sólo una parte se transfiere al mosto durante la vinificación, lo que significa que una cantidad considerable permanece en el orujo (Alonso *et al.*, 2002; Negro *et al.*, 2003). El orujo de uva, obtenido durante la producción de vino, se compone de semillas y pieles prensadas, representando cerca de un 20% del peso original de las bayas (Mazza, 1995). Estos componentes tienen una riqueza cualitativa y cuantitativa en constituyentes fenólicos, que comprenden sobre todo los ácidos fenólicos, los antocianos (Ferreira *et al.*, 2002), los flavonoles y los flavanoles (Flanzy, 2000). Lo anterior se traduce en problemas de almacenamiento, transformación o eliminación tanto en términos ecológicos como económicos. Por ésta razón, existe un particular interés en explotar este tipo de subproductos de la uva con el fin de obtener compuestos fenólicos potencialmente bioactivos y que a su vez podría ser un modo de aprovechar estos desechos vitivinícolas (Alonso *et al.*, 2002; Negro *et al.*, 2003).

La ingesta de ciertos alimentos ricos en polifenoles está asociada a beneficios para la salud atribuidos a sus propiedades como agentes antioxidantes y antiinflamatorios (Bazzano *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2004). Éstos, como son

sintetizados por las plantas en respuesta a infecciones microbianas (Dixon *et al.*, 1983) no sólo podrían actuar de la manera convencional, sino además, ejercer interesantes acciones antimicrobianas en determinadas porciones del tubo digestivo (Morinaga *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2007).

Interesantemente, la biodisponibilidad de los flavanoles galato (EGCG y ECG) parece ser marcadamente menor que las formas no galato (EGC y EC), haciendo a la (-)-epicatequina y la epigallocatequina los metabolitos más abundantes luego de una digestión en humanos de alimentos ricos en estos compuestos (Henning *et al.*, 2004; Stalmach *et al.*, 2010). Estudios realizados por Laurent *et al.* (2007) reafirman éste hecho donde, mediante una digestión gástrica simulada, recuperaron (-)-epicatequina y catequina en más de un 125% (ésto debido a que algunas PCs del estudio fueron hidrolizadas a C y EC, resultando en más de 100% de recuperación para esos compuestos). Adicional a ésto, los estudios de Baba *et al.* (2001) reportaron la baja biodisponibilidad de (+)-catequina comparada con (-)-epicatequina. Por su parte, López de Lacey *et al.* (2012) en un estudio de digestión simulada, obtuvieron una recuperación de flavonoles que varió entre 30 y 70%, donde glucósidos y rutinósidos de kaempferol llegaron hasta un 60%. Resultados similares obtuvieron Tavares *et al.* (2012) en digestiones simuladas para flavonoles de extracto de mora y de jugo de chokeberry.

Los compuestos fenólicos pueden afectar el crecimiento y metabolismo bacteriano. Éstos pueden tener un efecto activador o inhibitorio en el crecimiento bacteriano de acuerdo a su constitución y concentración (Reguant *et al.*, 2000; Alberto *et al.*, 2002). Su actividad se debe probablemente a su capacidad para complejarse con proteínas extracelulares y solubles, y con componentes de las paredes celulares de las bacterias (Tsuchiya *et al.*, 1996), también pueden modular la proliferación celular o poseer efectos tóxicos directo que conducen a la muerte celular en altas dosis (Saleem *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2005).

Dos bacterias de alto impacto en el mundo debido a los problemas que produce en la salud de las personas y por el mismo hecho, muy estudiadas por científicos de distintas disciplinas son *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*.

Escherichia coli es uno de los microorganismos más estudiados y habitante frecuente del intestino de los mamíferos (Yoon *et al.*, 2009). Es una bacteria bacilar, Gram negativa, flagelada, anaeróbica facultativa capaz de fermentar o bien de suplir sus necesidades mediante un metabolismo aeróbico. Las infecciones más comunes por *E. coli* son en el tracto gastrointestinal, debido a la facilidad de acceso del patógeno mediante alimentos o bebidas. La incidencia de tales infecciones depende de la higiene personal y alimenticia, además de la temperatura del medio (Sussman, 1997).

Por su parte, *Helicobacter pylori* es una bacteria bacilar espiralada, Gram negativa, neutrófila, ácido-tolerante, flagelada y microaerofílica, que hidroliza urea como parte de sus mecanismos de adaptación para sobrevivir en el estómago (Montecucco y Rappuoli, 2001; Blaser y Atherton, 2004). Las enfermedades relacionadas a *H. pylori* son gastritis, úlcera gástrica, cáncer gástrico (Graham, 1994; Fox y Wang, 1997; Uemura *et al.*, 2001). Últimamente se ha asociado a enfermedades cardiovasculares (Pellicano *et al.* 2003). Esta bacteria produce altos niveles de enzima ureasa, la cual convierte la urea en amonio y anhídrido carbónico, produciendo un medioambiente local alcalino que le permite al microorganismo sobrevivir en el ambiente ácido del estómago y facilitar la colonización inicial de la mucosa gástrica (Moblely *et al.*, 1988).

Estudios epidemiológicos indican que esta especie del género *Helicobacter* coloniza el estómago de más del 50% de la población mundial y supera el 80% en algunos países (Taylor y Blaser, 1991; Dunn *et al.*, 1997; Mitchell, 1999). La mayoría de las infecciones crónicas de *H. pylori* son asintomáticas y los síntomas aparecen en un 15-20% de la población infectada (Parsonnet, 1998). La prevalencia de *H. pylori* en las personas de los países desarrollados es de alrededor del 30 al 50%, mientras que en los países en vías de desarrollo puede

exceder el 80% (Taylor y Parsonnet, 1995). Esta condición se atribuye a las pobres condiciones sanitarias existentes en estas sociedades, que determinan frecuentes exposiciones al patógeno (Vallejos *et al.*, 2003). Cada año, 21.600 nuevos casos de cáncer gástrico son diagnosticados en Estados Unidos (American Cancer Society, 2002). Es por ello, que *H. pylori* fue incorporada por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), al Grupo carcinogénico 1, por su incidencia directa en el cáncer humano (IARC, 1994; Yamaoka, 2008).

En nuestro país, la información recopilada, correspondiente entre los años 1985 – 1995, señala que la infección por *H. pylori* es bastante frecuente en pacientes con una variedad de patologías gástricas. En Chile, se estima que al menos el 73% de la población es portadora del microorganismo, siendo la mayoría de los pacientes asintomáticos (Ruggiero *et al.*, 2007). El 100% de los pacientes con úlcera duodenal y el 86% de los pacientes con gastritis presentaron niveles altos de *H. pylori*. Sin embargo, de acuerdo a la condición geográfica y socioeconómica, entre 43% y 92% de los adultos, y entre 6% y 100% de los niños presentaron *H. pylori* (Figuroa *et al.*, 1997).

Los tratamientos exitosos de infecciones crónicas de *H. pylori* llevan a la mejoría de la gastritis y en una disminución de la recurrencia a úlcera. Desafortunadamente, la erradicación de *H. pylori* se ha probado que es difícil, y un óptimo régimen no ha sido definido aún (O'Connor *et al.*, 2009). La triple terapia, utiliza al menos dos antibióticos y también bismuto o un inhibidor de la bomba de protones (Marshall, 1993; Correia *et al.*, 2004), consigue una erradicación de 70 al 90% de la infección (Wu *et al.*, 2000). Entre los antibióticos más usados se encuentran amoxicilina, tetraciclina, metronidazol y claritromicina (Penston y McColl, 1997).

Las actuales terapias basadas en antibióticos, si bien, son generalmente efectivas, pueden fallar debido a la resistencia al antibiótico o la falta de compromiso del paciente, debido a los efectos secundarios derivados de la terapia (Correia *et al.*,

2004). Además, los organismos responden pobremente al tratamiento por la inactividad de la medicina en el medio ácido del estómago y la capacidad de la bacteria para meterse en el mucus de éste mismo (Nohynek, 2006).

Otro argumento en contra del tratamiento de estos pacientes, es que el régimen con antibióticos puede tener como consecuencia tanto un aumento en la emergencia y persistencia de cepas resistentes, como el desarrollo de otros microorganismos resistentes en el tracto gastrointestinal (Adamsson *et al.*, 1999). De hecho, Zafra-Stone *et al.* (2007) demostraron que se ha desarrollado lentamente resistencia al fármaco claritromicina, un probado agente antibiótico contra infección de *H. pylori*.

Es por ello, que existe un continuo esfuerzo por desarrollar nuevas herramientas para luchar contra este patógeno (Ruggiero *et al.*, 2002). Una serie de estudios epidemiológicos, demuestran el rol protector de flavonoides en la dieta contra enfermedades cardiovasculares y cáncer (Hertog *et al.*, 1997; Knekt *et al.*, 1996, Keli *et al.*, 1996; Garcia-Closas *et al.*, 1999; Correa *et al.*, 2000; Yamada *et al.*, 1998).

Una estrategia empleada para superar la resistencia al desarrollo del microorganismo es usar una combinación de drogas que sean sinérgicas. El sinergismo, es una interacción positiva creada cuando dos agentes combinados producen un efecto que es mayor que la suma de sus efectos individuales (Hemaiswarya *et al.*, 2008). La terapia de combinación puede ser usada también para expandir el espectro antimicrobiano, para obtener actividad antimicrobiana sinérgica que permita menores dosis de drogas y minimizar la toxicidad. Ésto podría ser una alternativa a la monoterapia para pacientes difíciles de tratar por métodos tradicionales (Aiyegoro y Okoh, 2009).

También se ha probado la efectividad de flavonoides ante las bacterias que causan tipos comunes de envenenamiento por alimentos, como el patógeno alimentario *Escherichia coli* (Weisse *et al.*, 1995). Asimismo, se ha demostrado que el vino y algunos de sus componentes son efectivos contra *E. coli* y *H. pylori* (Daroch *et al.*, 2001; Mahady *et al.*, 2003; Papadopoulou *et al.*, 2005; Martini *et al.*,

2009). Ha sido propuesto que las cualidades digestivas del vino son una gran extensión de sus propiedades antibacterianas (Weisse *et al.*, 1995).

En particular, extractos de plantas o sustancias derivadas de plantas han sido investigados por actividad anti-*H. pylori in vitro* (Ruggiero *et al.*, 2002; Bhamarapavati *et al.*, 2003; Mahady *et al.*, 2003; Martin y Ernst, 2003; Adeniyi y Anyiam, 2004; Krausse *et al.*, 2004; Nariman *et al.*, 2004;) e *in vivo* (Kataoka *et al.*, 2001; Matsubara *et al.*, 2003; Takabayashi *et al.*, 2004; Díaz, 2012); especialmente considerando que varios compuestos fenólicos se encuentran presentes naturalmente en la dieta humana, sin efectos dañinos incluso a altas dosis (Tombola *et al.*, 2003). Además, los consumidores tienden a rechazar el uso de aditivos alimenticios con actividad antibacteriana obtenidos por síntesis química; mientras que los flavonoides, como aditivos derivados de productos naturales, pueden ser una alternativa válida y preferida (Cowan 1999).

Diversos estudios han 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 tales como el ácido vainillínico, ácido protocatéquico, ácido gálico y ácido cafeico, y flavonoides como la catequina, quercetina y rutina, también tienen efecto antibacteriano sobre *E. coli* (Rodríguez *et al.*, 2007; Díaz, 2012).

En efecto, crecientes evidencias indican que el consumo de algunos alimentos particularmente ricos en compuestos fenólicos, contribuiría a la prevención, el manejo y/o la atenuación del daño a la mucosa gástrica asociado a la infección por *H. pylori* (Morinaga *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2007). Previa investigación han reportado varios extractos naturales de plantas con actividad anti-*H. pylori*, incluyendo ajo, brócoli, cranberries, té verde y vid (Mabe *et al.*, 1999; O’Gara *et al.*, 2000; Fahey *et al.*, 2002; Mahady *et al.*, 2003; Vatter *et al.*, 2005); así como el consumo moderado de vino y cerveza (Daroch *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2002).

Brown *et al.* (2009) mostraron que la piel de la uva posee la mayor actividad anti-*Helicobacter pylori*, seguido por la sinergia piel/semilla. En un orden creciente de

la actividad antimicrobiana de los polifenoles en baya de vid fue: pulpa, extracto de fruto entero, mosto fermentado, piel, hojas y semillas (Xia *et al.*, 2010).

Estudios epidemiológicos han indicado que la población que consume dietas ricas en frutas y verduras tiene menor incidencia de ciertos tipos de cáncer, incluyendo al cáncer gástrico (Yamada *et al.*, 1998; Correa *et al.*, 2000). Sin embargo, se cree que los alimentos son más efectivos cuando se comparan con compuestos individuales en el manejo de dietas para distintas enfermedades (Carbonneau *et al.*, 1997; Elattar y Virji, 1999). De ahí, que variados componentes biológicamente activos que tienen actividad anti-*H. pylori* han sido aislados desde frutas, verduras y hierbas (Bae *et al.*, 1998; Fukai *et al.*, 2002).

Pese a lo presentado previamente, el efecto de kaempferol y (-)-epicatequina como compuestos puros individuales no ha sido estudiado respecto a su acción antibacteriana sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*. De la misma manera, no existe evidencia que señale estudios en que se evalúe el efecto sinérgico de estos compuestos sobre las bacterias antes mencionadas. Aunque se ha mostrado evidencia que el consumo de algunos alimentos podría ser benéfico para el control y tratamiento de *H. pylori*, el estudio de los compuestos que forman parte de estos productos, podría llevar a determinar con mayor especificidad cuáles de éstos serían efectivos contra la bacteria, cuáles no tendrían efecto, y cuáles actuarían como activador o promotor del crecimiento de estas bacterias.

Por otra parte, en la elaboración de vinos, especialmente de tintos, la extracción de compuestos fenólicos desde la piel y semilla no es total, quedando en el residuo una cantidad importante de estos compuestos. Dichos residuos no se aprovechan siempre de la mejor manera, siendo incorporados en las hileras de los viñedos, para la alimentación animal o para la elaboración de compost.

Con los datos aportados por esta tesis, se podría proyectar otro uso de estos desechos que pueda generar beneficios, tanto económicos como para la salud pública, con la elaboración de preparados de compuestos fenólicos, con actividad anti-*H. pylori* para un tratamiento más efectivo y sin efectos secundarios.

**CAPÍTULO II: EFECTO ANTIBACTERIANO DE KAEMPFEROL Y
(-)-EPICATEQUINA SOBRE *HELICOBACTER PYLORI* Y *ESCHERICHIA COLI***

RESUMEN

Los compuestos fenólicos provienen del metabolismo secundario de las plantas y se les ha asociado con propiedades antibacterianas. Entre las bacterias más estudiadas por su alta prevalencia y efectos detrimentales sobre la salud humana se encuentran *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*, esta última asociada directamente con el cáncer gástrico. A pesar de lo anterior, existe limitada información acerca del efecto de la aplicación individual y en conjunto de polifenoles ampliamente distribuidos en los vegetales, sobre el crecimiento de *E. coli* y *H. pylori*. Así, la mayoría de los estudios han evaluado el efecto de los polifenoles contenidos en matrices de alta complejidad como bebidas y alimentos. Es por ello, que el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la aplicación individual y en conjunto de kaempferol y (-)-epicatequina sobre *H. pylori* y *E. coli* en cultivos líquidos, sólidos y co-cultivos con células AGS. Para ello, se utilizaron pruebas de viabilidad de las bacterias en medio líquido, con el posterior recuento de UFC/mL; se realizaron pruebas de viabilidad en medio sólido, con la medición del halo de inhibición formado; se hicieron curvas de cinética de la inhibición de crecimiento en presencia de los compuestos y una evaluación del efecto de la (-)-epicatequina sobre la infección de *H. pylori* en células epiteliales (AGS). Los resultados demostraron que los compuestos (-)-epicatequina y kaempferol poseen actividad antibacteriana sobre las bacterias, siendo más efectiva, la (-)-epicatequina que el kaempferol. Además, se demostró que la bacteria *H. pylori* fue más sensible a ambos compuestos que *E. coli*. En los estudios de aplicación conjunta de los compuestos fenólicos, se observó que hubo un efecto sinérgico de kaempferol con (-)-epicatequina a bajas dosis, efecto que no fue observado a las concentraciones mayores probadas en los demás estudios. Finalmente, se observó que (-)-epicatequina posee una propiedad protectora sobre células AGS infectada con *H. pylori*.

Palabras claves: Antimicrobiana, Bactericida, Flavonoides, Gram-negativa, Polifenoles

ABSTRACT

ANTIBACTERIAL EFFECT OF KAEMPFEROL AND (-)-EPICATECHIN ON

Helicobacter pylori AND *Escherichia coli*

Phenolic compounds are generated by the secondary metabolism of plants and have been associated antibacterial properties. Among bacteria affecting human health because of high prevalence and detrimental effects are *Escherichia coli* and *Helicobacter pylori*, directly associated with gastric cancer. Despite this, there is limited information about the effect of individual and grouped phenols application, which are widely spread on vegetables, on the growth of *E. coli* and *H. pylori*. Thus, most of studies had evaluated the phenols effect contained in high complexity matrix as beverages and foods.

The aim of this work was evaluate the antibacterial effect of kaempferol and (-)-epicatechin, both individually and grouped on *H. pylori* and *E. coli* in liquid and solid culture and co-cultured with AGS cells. For this, bacterial viability tests were performed in liquid culture with the subsequent CFU/mL counting, solid culture viability tests measuring the inhibition halo formed, kinetic curves of growth inhibition in presence of the compounds, and measured the effect of (-)-epicatechin on *H. pylori* infection to epithelial cells (AGS).

Results showed that the (-)-epicatechin and kaempferol have an antibacterial activity on bacteria, being (-)-epicatechin more effective than kaempferol. Furthermore, it was shown that *H. pylori* were more sensitive to both compounds than *E. coli*. In the studies of combined application of phenols, it was observed that there was a synergic effect of kaempferol with (-)-epicatechin in low doses, which was not observed at higher concentrations applied on other tests. Finally, the AGS cells protective property of (-)-epicatechin was observed against the infection of *H. pylori*.

Keywords: Antimicrobial, Bactericide, Flavonoids, Gram-negative, Phenols.

INTRODUCCIÓN

La familia de los compuestos fenólicos comprende a los flavonoides y no flavonoides (Harborne *et al.*, 1999). Dos subgrupos importantes de flavonoides son los flavonoles y flavanoles. Entre los flavonoles más importantes en la vid y el vino están el kaempferol y la quercetina (Flanzy, 2000). En particular, el kaempferol (K) se ha encontrado en alimentos como el vino, uvas, arándanos, cranberry y otros berries (Häkkinen *et al.*, 1999; USDA, 2003; Castro, 2005)

Los flavanoles como unidades monoméricas en *Vitis vinifera* L. son (-)-epicatequina, (+)-catequina, (+)-galocatequina y (-)-epigallocatequina (Sun y Singleton, 1969; Czochanska *et al.*, 1979). Para el caso de la (-)-epicatequina (EC), su presencia se ha descrito en alimentos como las uvas, vino, cranberry, té verde, manzanas y chocolates (Yee y Koo, 2000; Lee *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2006; Cooper *et al.*, 2007; Neto *et al.*, 2008; Neilson y Ferruzzi, 2011)

La ingesta de ciertos alimentos ricos en polifenoles se ha asociado a beneficios para la salud, debido a sus propiedades como agentes antioxidantes y antiinflamatorios (Bazzano *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2004). Los compuestos fenólicos exhiben variadas actividades fisiológicas que incluye la actividad antimicrobiana (Rodríguez *et al.*, 2007).

Escherichia coli es un habitante frecuente del intestino de los mamíferos (Yoon *et al.*, 2009). Es una bacteria bacilar, Gram negativa, flagelada, anaeróbica facultativa. Las infecciones más comunes por *E. coli* son en el tracto gastrointestinal (Sussman, 1997). Por otra parte, *Helicobacter pylori* es una bacteria bacilar espiralada, Gram negativa, neutrófila, ácido-tolerante, flagelada y microaerófila (Montecucco y Rappuoli, 2001; Blaser y Atherton, 2004) y que está relacionada a enfermedades como gastritis, úlcera gástrica y cáncer gástrico (Graham, 1994; Fox y Wang, 1997; Uemura *et al.*, 2001). Estudios epidemiológicos indican que *H. pylori* coloniza el estómago de más del 50% de la población mundial y supera el 80% en algunos países (Taylor y Blaser, 1991;

Dunn *et al.*, 1997; Mitchell, 1999). En Chile se estima que al menos el 73% de la población es portadora del microorganismo (Ruggiero *et al.*, 2007).

Los tratamientos exitosos de infecciones crónicas de *H. pylori* llevan a la mejoría de la gastritis y una disminución de la recurrencia a úlcera (O'Connor *et al.*, 2009), consisten en una triple terapia que consigue una erradicación del 70 al 90% (Wu *et al.*, 2000).

Esta terapia basada en antibióticos pueden fracasar debido a la resistencia al antibiótico o la falta de compromiso del paciente debido a los efectos secundarios que provocan (Correia *et al.*, 2004). Es por ello, que existe un continuo esfuerzo por desarrollar nuevas herramientas para luchar contra este patógeno (Ruggiero *et al.*, 2002). El efecto antibacteriano de los flavonoides y de productos que los contienen como el vino, frutos, hierbas y jugos ha sido probado ante bacterias como *E. coli* y *H. pylori* (Weisse *et al.*, 1995; Bae *et al.*, 1998; Daroch *et al.*, 2001; Fukai *et al.*, 2002; Mahady *et al.*, 2003; Papadopoulou *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2007; Martini *et al.*, 2009; Díaz, 2012). En efecto, crecientes evidencias indican que el consumo de algunos alimentos, particularmente ricos en compuestos fenólicos, contribuiría a la prevención, el manejo y/o la atenuación del daño a la mucosa gástrica asociado a la infección por *H. pylori* (Morinaga *et al.*, 2005; Choi *et al.*, 2007).

Sin embargo, los estudios previos no señalan el efecto que tiene el K y la EC como compuestos individuales puros sobre la viabilidad de *H. pylori* y *E. coli*. De la misma manera, el efecto de la aplicación conjunta de ambos polifenoles sobre dichas bacterias no ha sido aún reportado.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

La (-)-epicatequina y el kaempferol presentan un efecto antibacteriano sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* en cultivo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto antibacteriano de kaempferol y (-)-epicatequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* en cultivos líquidos, sólidos y co-cultivos con células AGS.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto antibacteriano individual de kaempferol y (-)-epicatequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*.

Evaluar el efecto de la aplicación en conjunto de kaempferol y (-)-epicatequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*.

Evaluar el efecto protector de los polifenoles en cultivos de células AGS infectadas con *Helicobacter pylori*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lugar de estudio

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

Materiales y Reactivos

Kaempferol, $\geq 90\%$ (HPLC), CAS: 520-18-3. Sigma-Aldrich (Santiago, Chile); (-)-Epicatequina, $\geq 90\%$ (HPLC), CAS: 490-46-0. Sigma-Aldrich (Santiago, Chile); Filtros de acetato de celulosa 0,2 μm (Pall Life Sciences. Nueva York, EE.UU.); Dimetilsulfóxido (DMSO) (Winkler, Santiago, Chile); Bacto triptona, caldo de soya triptona y agar soya triptona (Becton and Dixon, Nueva Jersey, EE.UU.); DMEM, alto en glucosa (Thermo Scientific HyClone, Utah, EE.UU.); Cloruro de sodio y Bacto agar (J.T. Baker, México); 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.); Material de vidrio y productos químicos grado proanálisis (Merk, Santiago, Chile); Microplacas blancas de 96 pocillos (Thermo Scientific Nunc. Utah, EE.UU.); Frascos de cultivo Nunclon (Thermo Scientific Nunc. Utah, EE.UU.).

Equipamiento

Incubadora de atmósfera controlada (Shel Lab. Oregon, EE.UU.); Agitador Modelo PSU-10i (Biosan, Letonia); Incubadora con agitación orbital, LSI-3016R (Labtech, México); Incubadora sin control de atmósfera, IR2424 (Shel Lab. Oregon, EE.UU.); Agitador MiniTwist (BioProducts, New Jersey, EE.UU.); Freezer, LDF-9007. (Labtech, México); Espectrofotómetro (SP-830, Metertek); Lector de Microplacas Multimodo SynergyHT (Biotek Inc., Vermont, EE.UU.); Campana de Flujo laminar, MSC-Advantage (Thermo Scientific, Utah, EE.UU.); Cromatógrafo líquido de Alta Eficacia acoplado a un detector de fotodiodos alineados (HPLC-DAD) marca Agilent Technologies 1200, dotado de una bomba Quat G1311A, un inyector

automático modelo ALS G1329A, un detector de arreglo de fotodiodos DAD modelo G1316A, un degasificador modelo G1322A, una columna Discovery RP Amide C16 (5 µm, 4,6 mm di x 25 mm) y un Agitador Gallenkamp Magnetic Stirrer.

Cepas Bacterianas

Para este estudio se utilizaron las cepas de *H. pylori* 26695 (ATCC 700392) y ATCC 43504 (NCTC 11637), y la cepa de *E. coli* JM109. Estas bacterias pertenecen al cepario del laboratorio de Microbiología Molecular, perteneciente al Programa de Biología Celular y Molecular, del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Línea celular

Se usó un cultivo de células de epitelio derivadas de adenocarcinoma gástrico (AGS) cedidas por el Dr. Alejandro Corvalán del Laboratorio de Patología Molecular y Epidemiología de la Pontificia Universidad Católica 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 (Moblely 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 4mL/L de suplemento antibiótico Dent (Moblely 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).
- **Medio Dulbecco's Eagle Modificado, Alto en Glucosa (DMEM).** 4 mM de glutamina, 4,5 g/L de glucosa y piruvato de sodio suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de piruvato de sodio, 1% de penicilina/estreptavidina y 1% de L-glutamina.

METODOLOGÍA

Diseño de experimentos

En este estudio se realizaron dos ensayos independientes, donde cada uno correspondió a la evaluación de cada polifenol sobre las bacterias. En las pruebas de viabilidad en medio líquido se realizaron 2 sub-ensayos independientes por cada ensayo, para evaluar el efecto de ambos polifenoles sobre *H. pylori* y *E. coli*. Cada sub-ensayo presentó 6 tratamientos consistentes en distintas dosis de kaempferol y (-)-epicatequina. La unidad experimental consistió en un medio líquido (TSB o LB) y un número definido de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) de la bacteria.

Por otra parte, en las pruebas en medio sólido, se realizaron 2 sub-ensayos independientes, al igual que en las pruebas de medio líquido. Cada sub-ensayo presentó 6 tratamientos correspondientes a las distintas dosis de cada polifenol sobre las bacterias. En estas pruebas, la unidad experimental, consistió en un medio sólido (TSA o LB agar) con un número definido de UFC/mL de la bacteria a estudiar.

Para evaluar el efecto de la aplicación conjunta de ambos polifenoles sobre cada bacteria se plantearon dos sub-ensayos independientes donde en cada ensayo se aplicó un tratamiento consistente en la dosis mínima inhibitoria de un compuesto junto a la dosis variable del otro compuesto. Cuando no se pudo cuantificar crecimiento en esas condiciones, se realizó un ensayo con estructura factorial de tratamientos utilizando dosis más bajas, considerando como factores los dos flavonoides.

Para evaluar el efecto del tiempo de exposición de las bacterias al compuesto, tanto individual como de manera conjunta, se plantearon ensayos independientes con la aplicación de los polifenoles a dosis máximas, siendo la unidad experimental el medio líquido con un número definido de UFC/mL de la bacteria.

En el caso de los ensayos en células AGS, la unidad experimental fue el medio DMEM, un número definido de células epiteliales AGS y un número definido de

UFC/mL de *Helicobacter pylori*. Los tratamientos aplicados fueron las distintas dosis de EC probadas.

Todos los ensayos se realizaron en duplicado y con tres repeticiones cada uno, excepto en los ensayos con células AGS que se realizó en cuadruplicado y con dos repeticiones.

Procedimientos

Cultivo de bacterias

H. pylori se cultivó 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, se colectaron raspando la placa con un asa metálica y se resuspendieron 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 7 H₂O) para posteriormente sembrarlas y someterlas a estudio. Para la preservación, las bacterias se centrifugaron a 6.000 rpm por 2,5 minutos y se suspendieron en 300 µL de TSB suplementado con glicerol 20% v/v, según lo descrito por Mobley y Foxall (1997). 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). Para preservar esta bacteria se realizó el mismo protocolo antes descrito para *H. pylori*.

Cultivo de células AGS

Las líneas celulares AGS, se cultivaron en medio DMEM, suplementadas con suero fetal bovino al 10%, 8 mM de L-glutamina y 100 mg/ml de Penicilina/Estreptomicina, condiciones microaerófilas (5% CO₂ y 70% de humedad relativa) a 37°C en frascos de cultivo de 40 y 160 mL. Para los cocultivos AGS-*H.pylori*, no se complementa con antibióticos. Las células son cosechadas con 70-90% de confluencia, despegándose de la placa con Trypsina 0,25%.

Preparación de la solución stock de kaempferol o (-)-epicatequina

El kaempferol fue disuelto en DMSO al 100% a una concentración de 50 mg/mL, mientras que la (-)-epicatequina fue disuelta en metanol:agua (1:1) a una concentración de 50 mg/mL. Posteriormente, las soluciones se esterilizaron mediante filtración utilizando membrana de acetato de celulosa de 0,2 µm de porosidad y 25 mm de diámetro.

Estudio de la acción individual y sinérgica de kaempferol y (-)-epicatequina

Para estudiar los efectos individuales y el efecto sinérgico del kaempferol y (-)-epicatequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* se realizaron ensayos en medio sólido y líquido. Los ensayos de acción sinérgica entre los compuestos se realizaron manteniendo inicialmente la dosis de kaempferol constante y la de (-)-epicatequina variable, para secundariamente evaluar el efecto de la dosis de (-)-epicatequina constante con dosis crecientes de kaempferol (con la excepción de los estudios de cinética en que se evaluó una dosis fija de cada compuesto). Los efectos antes mencionados, fueron evaluados por la siguiente metodología:

a) Actividad antibacteriana sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*, en medio líquido. Para probar la actividad antibacteriana de (-)-epicatequina y kaempferol sobre *H. pylori* y *E. coli* en medio líquido, se incubó previo al ensayo cada bacteria según sus condiciones de crecimiento y se inocularon en tubos de ensayo a una concentración de 3×10^8 células/mL (según relación de medición por espectrofotometría a 560 nm = 0,4 U.A.) con una dosis de cada compuesto fenólico detalladas en el Cuadro 1. Estos tubos se incubaron en las condiciones señaladas anteriormente para cada bacteria, para luego obtener 100 µL de cada tubo y realizar diluciones seriadas en duplicado sobre una placa ELISA. De cada pocillo de la placa ELISA se sacaron 10 µL, los cuales fueron sembrados sobre una placa Petri con medio sólido. Luego de la incubación, a cada placa se le realizó un conteo de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL), para determinar la viabilidad obtenida al final del ensayo.

Cuadro 1. Concentración de los polifenoles ($\mu\text{g}/\text{mL}$) usadas en los ensayos de viabilidad de las bacterias sobre medio líquido.

Tratamientos	<i>E. coli</i>		<i>H. pylori</i>	
	Kaempferol	(-)-Epicatequina	Kaempferol	(-)-Epicatequina
T0	0	0	0	0
T1	200	200	200	200
T2	500	500	400	400
T3	1.000	1.000	600	600
T4	1.250	1.250	800	800
T5	1.500	1.500	1.000	1.000

b) Determinación del halo de inhibición del crecimiento. Para evaluar el efecto de los flavonoides sobre la viabilidad de las bacterias en medio sólido, se realizó el ensayo de halo de inhibición. Éste mide la acción bactericida del compuesto en el halo formado por la difusión de éste sobre el medio. De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, se estimó la dosis de los compuestos a utilizar (Cuadro 2) según una curva patrón. En las placas Petri con medio sólido correspondiente a cada bacteria, se sembró una alícuota de 100 μL de inóculo de *H. pylori* y 50 μL de inóculo de *E. coli* con 3×10^8 células/mL, con el objetivo de asegurar un crecimiento de “césped” sobre el medio. En las placas ya sembradas, se realizaron pocillos de 3 mm de diámetro con un sacabocados, donde se depositaron diferentes dosis del flavonoide. Luego, se incubaron en las condiciones indicadas para cada bacteria, y se midió el halo formado por la inhibición del compuesto sobre el crecimiento de la bacteria. Es importante mencionar que se utilizó como control 45 μL del solvente en el que fue preparado el correspondiente polifenol (DMSO o metanol, según corresponda).

Cuadro 2. Dosis de los polifenoles usadas en los ensayos de viabilidad de las bacterias sobre medio sólido.

Tratamiento	<i>E. coli</i>		<i>H. pylori</i>	
	Kaempferol	(-)-Epicatequina	Kaempferol	(-)-Epicatequina
	(μL)			
T0	0	0	0	0
T1	9,4	9,4	9,4	9,4
T2	23,4	23,4	18,8	18,8
T3	46,7	46,7	28,0	28,0
T4	58,5	58,5	37,5	37,5
T5	70,1	70,1	46,8	46,8

c) Cinética de la inhibición del crecimiento de las cepas bacterianas. En este caso, se inocularon 3×10^8 células/mL de la bacteria correspondiente en tubos Eppendorf y luego se agregó la concentración más alta de kaempferol o (-)-epicatequina utilizada en las pruebas en medio líquido. De la mezcla anterior, se extrajeron 100 μL (*H. pylori*) o 10 μL (*E. coli*) a los 0, 15, 30, 45, 60 y 90 minutos, para determinar el número de células viables después del tratamiento se estimó las UFC/mL.

Caracterización polifenólica mediante HPLC-DAD de los compuestos usados

Los compuestos usados en los estudios de actividad sinérgica fueron caracterizados para determinar su pureza. Por lo mismo, se hizo una mezcla de compuestos usada en el estudio de la acción sinérgica (500 μg/mL de cada uno) y se caracterizó mediante HPLC-DAD para descartar la formación de terceros compuestos que pudieron afectar los datos obtenidos.

Ensayo de viabilidad de células AGS usando MTT

Las células fueron sembradas en placas de 96 pozos en 100 μL de medio DMEM. Para los ensayos de proliferación celular se sembraron 10.000 células por pozo. Luego de 24 h, se removió el medio y se reemplazó por medio fresco que contenía diferentes concentraciones de (-)-epicatequina y/o diferentes multiplicidades de infección (MOI) de *H. pylori*. Luego de 24 horas, nuevamente se cambió a medio fresco con MTT 0,5 μg/mL, y se incubó por 4 h a 37°C. Luego, se adicionaron 200

μL de Isopropanol/HCl 0,1N para disolver la sal de formazán, y se midió la absorbancia a 570 nm, restándose la absorbancia no relacionada a 690 nm. La viabilidad del cultivo se expresó como porcentaje según el control negativo.

Variables a medir

Cantidad de unidades formadoras de colonias. Mediante la siembra de diluciones seriadas en medio sólido (Eydelnant y Tufenkji, 2008).

Diámetro del halo de inhibición. Mediante la metodología propuesta por Rodríguez *et al.* (2007). Que consiste básicamente en la medición del diámetro de la zona formada por la inhibición de un compuesto sobre el crecimiento de la bacteria.

Viabilidad de células AGS con MTT. Mediante la metodología propuesta por Brown *et al.* (2009). Que consiste en la medición de la densidad óptica de un cultivo celular AGS teñido y cuantificado por la actividad de reductasas mitocondriales.

Cinética de la inhibición del crecimiento de cepas bacterianas. Mediante la metodología propuesta por Romero *et al.* (2007). Que implica la medición del crecimiento de la bacteria a distintos tiempos de exposición a un compuesto.

Caracterización polifenólica de los compuestos usados. Mediante HPLC-DAD, según las condiciones descritas por Obreque-Slier *et al.* (2009).

Análisis Estadístico

Para la organización de los datos se utilizó el programa Microsoft® Excel 2002, el análisis estadístico se llevó a mediante un Análisis de Varianza (ANDEVA) usando el programa Minitab® 16, para determinar diferencias significativas entre los tratamientos de cada ensayo. Cuando hubo diferencias significativas entre éstos se utilizó la prueba de comparación múltiple de Tukey con un nivel de significancia del 5%. Para probar diferencias entre dos tratamientos se realizó la prueba de t de Student al 5%.

RESULTADOS

Efecto de EC sobre la viabilidad de *E. coli* y *H. pylori*

Viabilidad en medio líquido de *E. coli* y *H. pylori* en presencia de EC

Para determinar el efecto de la EC sobre *E. coli*, se suplementó el medio LB con concentraciones crecientes de este flavanol y se incubó por 24 horas. Luego, se extrajo una alícuota de los distintos cultivos para contabilizar el número de UFC/mL. La Figura 1A muestra que los valores de UFC/mL variaron desde $2,0 \times 10^9$ a $2,5 \times 10^7$. De la misma manera, se observó que cantidades crecientes de EC, generaron una disminución significativa de los valores de UFC/mL.

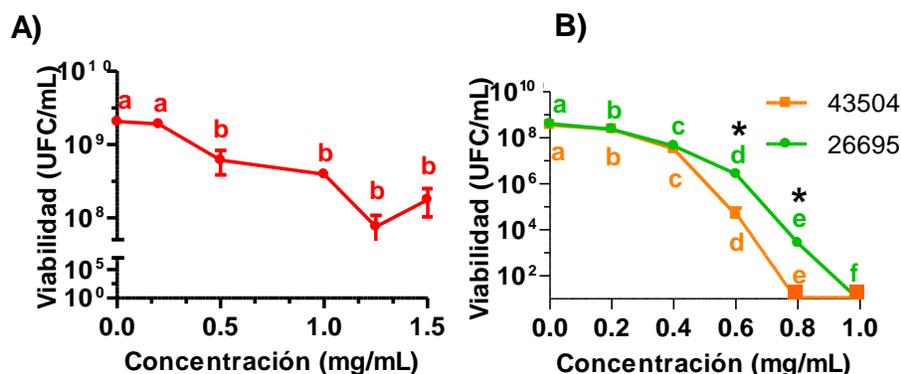


Figura 1. Efecto de la EC sobre la viabilidad de *Escherichia coli* (A) y *Helicobacter pylori* (B) en medio líquido. En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del polifenol (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$).

(*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas de *H. pylori*

Por otro lado, para evaluar el efecto de la EC sobre ambas cepas de *H. pylori*, se suplementó el medio TSB con concentraciones crecientes de este compuesto y se incubó por 48 horas. En la Figura 1B, se observa que los valores de UFC/mL variaron entre 0 y $5,2 \times 10^8$ UFC/mL. De la misma manera, en la medida que aumentó el contenido de EC en el medio de ambas cepas, los valores de CFU/mL presentaron una tendencia significativamente decreciente.

Viabilidad en medio sólido de *E. coli* y *H. pylori* en presencia de EC

Para determinar el efecto de la EC sobre *E. coli* en medio sólido, se hicieron pocillos en una placa con LB agar sembrada con la bacteria. En estos pocillos se colocaron concentraciones crecientes del compuesto a analizar. Luego, se incubó por 24 horas y se midió el halo formado por la inhibición del compuesto sobre el crecimiento de la bacteria. En el caso de *E. coli*, se observó que los valores de los diámetros de los halos de inhibición variaron entre 0 y 10 mm (Figura 2A). Asimismo, se puede observar un efecto creciente en la medida que aumentó la dosis suministrada, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre las dosis contiguas de EC.

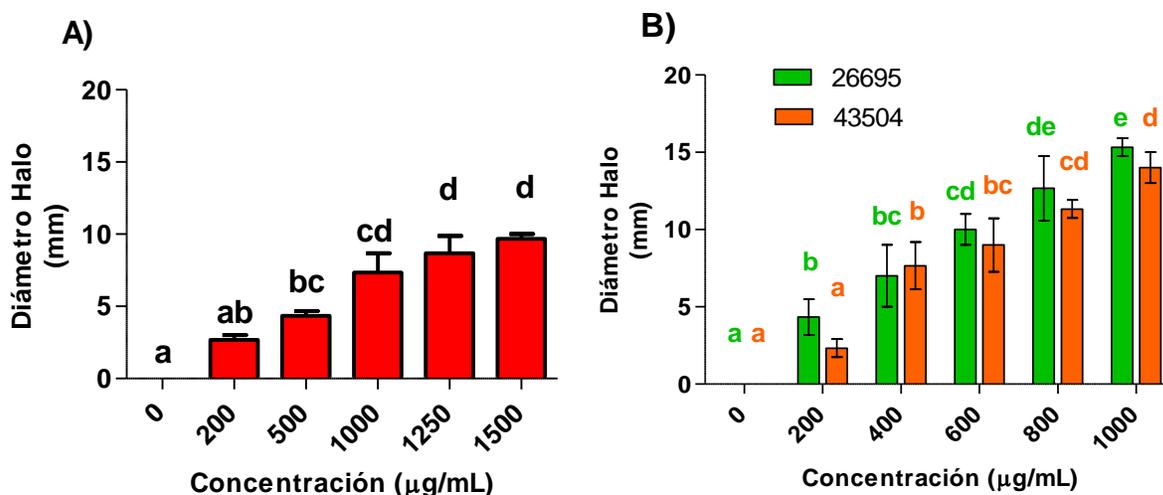


Figura 2. Diámetro del halo de inhibición formado por EC sobre el crecimiento de *E. coli* (A) y *H. pylori* (B). En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del polifenol (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$).

(*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas de *H. pylori*

Por su parte, para evaluar el efecto de EC sobre ambas cepas de *H. pylori*, se hicieron los pocillos sobre placas TSA y se incubaron por 48 horas con dosis crecientes del polifenol. En la Figura 2B se observa que el diámetro varió en un rango de 0 a 17 mm para ambas cepas. De la misma manera, se observó un aumento gradual del diámetro del halo de inhibición en la medida que aumentó la

dosis de EC. Es interesante notar que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el efecto generado en las cepas por este polifenol ($p > 0,05$).

Cinética de inhibición del crecimiento de *E. coli* y *H. pylori* en presencia de EC

Las bacterias fueron expuestas a 1,5 mg/mL de EC en medio líquido durante 90 minutos, para luego obtener una alícuota que se incubó en medio sólido y así evaluar el efecto del compuesto durante ese período. En la Figura 3A, se observa la tendencia decreciente del crecimiento de *E. coli* en presencia de EC en la medida que aumenta el tiempo de exposición al compuesto, alcanzando un 40% menos del crecimiento inicial a los 90 minutos de exposición.

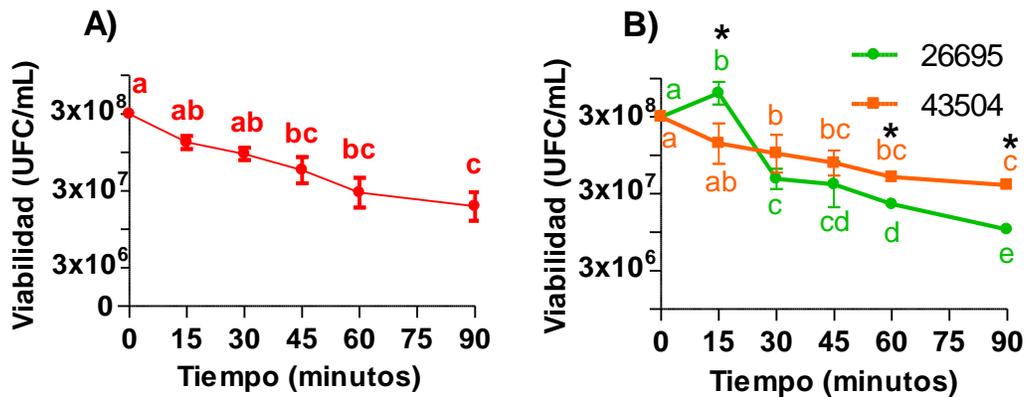


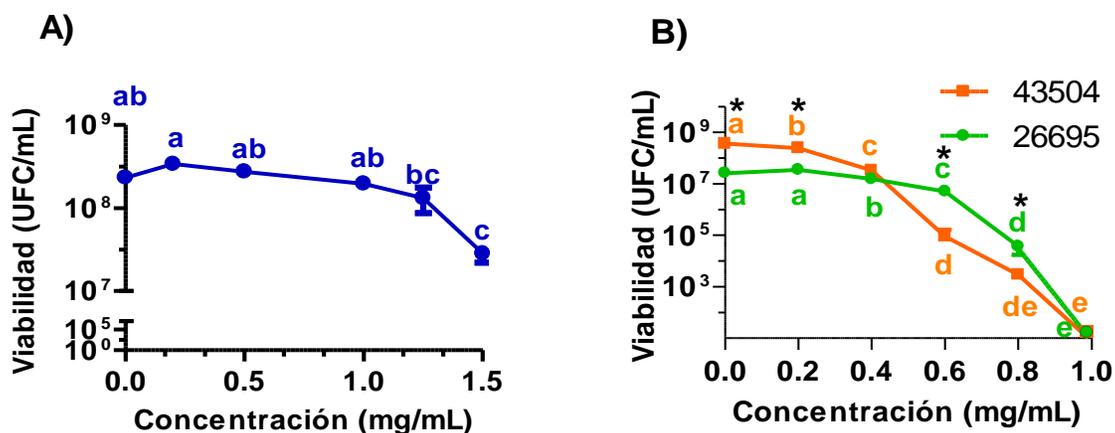
Figura 3. Cinética de la inhibición del crecimiento de *E. coli* (A) y *H. pylori* (B) por la aplicación de EC. En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del polifenol (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$). (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas de *H. pylori*

Al evaluar el efecto de EC sobre el crecimiento *H. pylori* se observó una disminución paulatina y significativa de la viabilidad en ambas cepas durante los 90 minutos (Figura 3B). Así, se observó que a los 30 minutos las viabilidad de ambas cepas disminuyó estadísticamente con respecto al tiempo inicial cero. En el caso de la cepa 26695 alcanzó valores cercanos a 3×10^6 UFC/mL a los 90 minutos, mientras que la cepa 43504 disminuyó de 3×10^8 hasta los $9,5 \times 10^7$ UFC/mL.

Efecto de K sobre la viabilidad de *E. coli* y *H. pylori*

Viabilidad en medio líquido de *E. coli* y *H. pylori* en presencia de K

Para observar el efecto del K sobre *E. coli*, el medio líquido LB se suplementó con dosis crecientes de este compuesto y se incubó por 24 horas. Luego, se extrajo una alícuota que se sembró en medio sólido para contabilizar las UFC/mL. En la Figura 4A se observa que los valores fluctuaron entre $3,8 \times 10^8$ y $1,6 \times 10^7$. Si bien hubo un leve aumento de las UFC/mL con la menor aplicación de K, luego de esto se observó una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad la cual



fue dosis-dependiente.

Figura 4. Efecto de K sobre la viabilidad de *E. coli* (A) y *H. pylori* (B) en medio líquido. En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del polifenol (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$). (*) Indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas de *H. pylori*

Para evaluar el efecto de este flavonol sobre *H. pylori*, ambas cepas se expusieron a distintas dosis de este compuesto en medio TSB y se incubaron por 48 horas. La Figura 4B muestran que las UFC/mL variaron entre $5,2 \times 10^8$ y 0, y que a medida que aumentó la dosis de K en el medio, la viabilidad de ambas cepas disminuyó significativamente.

Viabilidad en medio sólido de *E. coli* y *H. pylori* en presencia de K

Para determinar el efecto de K sobre las bacterias en medio sólido, se procedió de igual manera que lo descrito en el ensayo con EC. En el caso de *E. coli* se pudo observar que los valores del diámetro del halo de inhibición variaron entre 0 y 13 mm (Figura 5A). Del mismo modo, se pudo advertir un mayor diámetro de los halos a medida que aumentó la cantidad del compuesto en el medio.

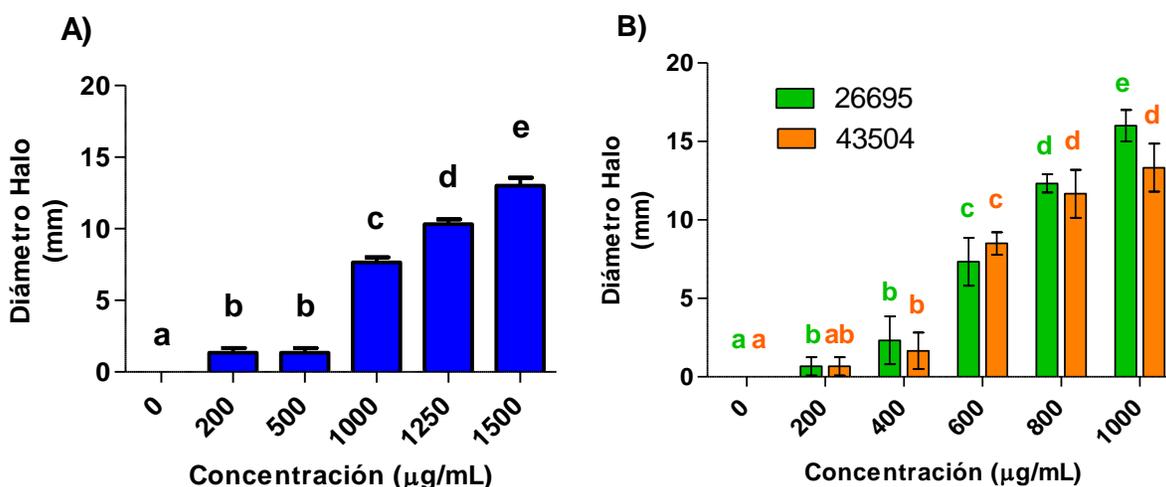


Figura 5. Diámetro del halo de inhibición formado por K sobre el crecimiento de *E. coli* (A) y *H. pylori* (B). En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del polifenol (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$). (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas de *H. pylori*

Al evaluar el efecto de K sobre las cepas 43504 y 26695 de *H. pylori*, los valores de diámetro de los halos variaron entre 0 y 17 mm (Figura 5B). Es posible observar que hubo un efecto dosis-dependiente en la aplicación del compuesto sobre el diámetro del halo inhibición de crecimiento. Es interesante notar que ambas cepas de *H. pylori* no presentaron un comportamiento significativamente diferente al efecto del polifenol ($p > 0,05$).

Cinética de inhibición del crecimiento de *E. coli* y *H. pylori* en presencia de K

Para evaluar el efecto del K sobre las bacterias en el tiempo, se procedió según las condiciones propuestas en el estudio con EC. En la Figura 6A, se puede observar que a medida que aumenta el tiempo de exposición al K, la viabilidad de *E. coli* disminuye gradualmente. Así, a los 90 minutos se observó una disminución hasta en una unidad exponencial de UFC/mL respecto del crecimiento inicial.

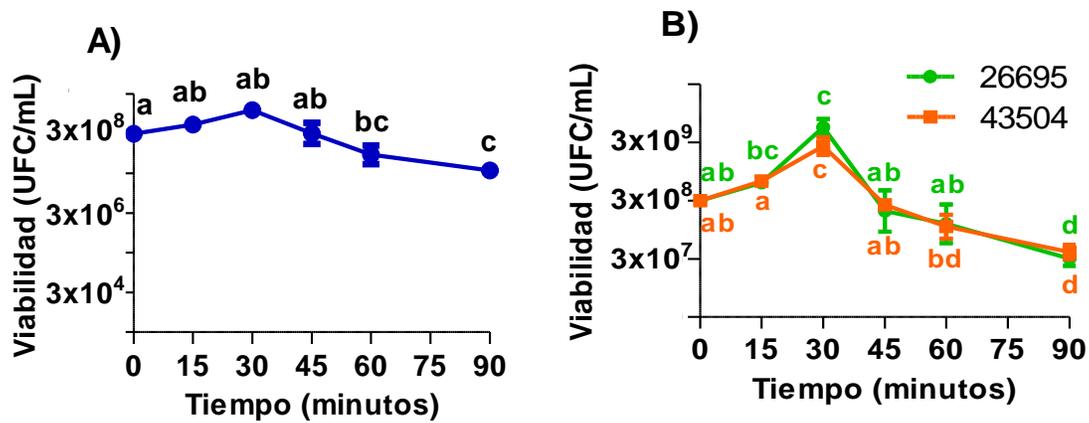


Figura 6. Cinética de la inhibición del crecimiento de *E. coli* (A) y *H. pylori* (B) por la aplicación de K. En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del polifenol (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$). (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre ambas cepas de *H. pylori*

En el caso de ambas cepas de *H. pylori*, hubo un aumento inicial de la sobrevivencia en los primeros 30 minutos, luego hubo un descenso abrupto y estadísticamente significativo de 3×10^9 hasta 3×10^7 UFC/mL hasta los 90 minutos en ambas cepas.

Efecto de la aplicación en conjunto de K y EC sobre la viabilidad de *H. pylori* y *E. coli*

Viabilidad en medio líquido de *E. coli* y *H. pylori* frente a la aplicación conjunta de K y EC

El efecto de la aplicación de ambos compuestos sobre el crecimiento de ambas bacterias se evaluó según la metodología descrita previamente, al aplicar los compuestos individualmente sobre cada bacteria. Inicialmente, se colocó una dosis variable de K en presencia de una cantidad fija de EC y luego viceversa. Las dosis fijas fueron de 0,25 mg/mL y 0,5 mg/mL para la EC y K, respectivamente. La Figura 7 muestra el efecto de ambas condiciones sobre *E. coli*. Se observó que a concentraciones crecientes de EC en presencia de una dosis fija de K (EC/K*), provocó una disminución gradual de la viabilidad de la bacteria, con valores que variaron entre $6,7 \times 10^8$ y $1,7 \times 10^7$ UFC/mL. Por su parte, al mantener una concentración variable de K en presencia de una dosis fija de EC (K/EC*), los valores descendieron levemente desde $2,7 \times 10^8$ a $7,3 \times 10^8$ UFC/mL.

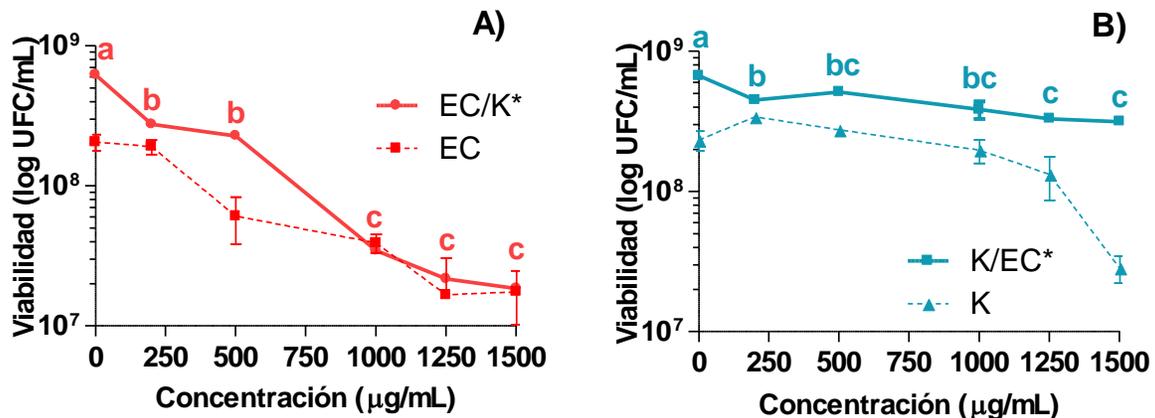


Figura 7. Efecto de la aplicación conjunta de K y EC sobre la viabilidad de *E. coli* en medio líquido. En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$). **A)** EC/K* indica EC variable en presencia de una dosis fija de K. **B)** K/EC* indica K variable en presencia de una dosis fija de EC. En línea discontinua se muestran los efectos individuales cada compuesto.

El efecto de la aplicación conjunta de ambos compuestos sobre *H. pylori* se presenta en el Cuadro 3. En este ensayo, se consideró un arreglo factorial de tratamientos con dosis de 0, 50, 100 y 150 µg/mL de cada compuesto como factor, para evaluar la interacción de los compuestos sobre la cepa 43504 de *H. pylori*.

Cuadro 3. Efectos conjunto de EC y K sobre el crecimiento de *H. pylori* 43504

K/EC	EC ₀	EC ₅₀	EC ₁₀₀	EC ₁₅₀
K ₀	5383,3 ± 84,4 A a	99,45 ± 4,1 B a	88,2 ± 4,5 C a	21,69 ± 4,0 D a
K ₅₀	73,1 ± 3,9 A b	1,48 ± 1,2 B b	4,62 ± 2,1 C b	1,28 ± 1,2 B b
K ₁₀₀	53,6 ± 2,1 A b	0,89 ± 1,1 B b	0,90 ± 0,4 B c	0,89 ± 0,6 B b
K ₁₅₀	28,1 ± 4,6 A b	0,14 ± 0,5 B b	0,42 ± 0,3 B c	0,37 ± 0,3 B b

Promedios (UFC/mL * 10000) ± desviación estándar. Letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas, según la prueba de Tukey ($p \geq 0,05$). Letras minúsculas indican comparación en una misma columna y letras mayúsculas en una misma fila.

Como se puede observar, los valores de UFC/mL variaron entre $5,4 \times 10^7$ UFC/mL, equivalente al crecimiento de la bacteria en ausencia de compuestos, hasta $1,4 \times 10^3$ UFC/mL (50 µg/mL de EC y 150 µg/mL de K). En general, se observa que a concentraciones crecientes de K en presencia de una dosis fija de EC genera una disminución del crecimiento de la bacteria. Similar tendencia fue observada con dosis variables de EC y una cantidad fija de K. Comparativamente, se puede observar que a una misma concentración, el K posee un efecto mayor que la EC sobre la viabilidad de la bacteria, el que se hace amplifica en la medida que aumenta la dosis aplicada.

Viabilidad en medio sólido de *E. coli* y *H. pylori* en presencia conjunta de K y EC

El efecto sinérgico del K y EC sobre *E. coli* fue evaluado a través de la medición del halo de inhibición. Así, se agregaron, dosis crecientes de un polifenol con una dosis constante del otro y viceversa, en los pocillos de una placa inoculada con la bacteria. En la Figura 8A, se observa que en la medida que aumenta la cantidad de EC en presencia de una cantidad fija de K (EC/K*), el diámetro del halo de inhibición aumentó significativamente. Comparativamente, se observó que en tres tratamientos (0,2; 1,25 y 1,5 mg/mL de EC) la adición de ambos polifenoles produjo un aumento del diámetro del halo de inhibición mayor que los mismos polifenoles colocados individualmente. Por otro lado, la colocación de cantidades crecientes de K en presencia de una cantidad fija de EC (K/EC*), provocó un aumento del diámetro de los halos de inhibición. Además, en la mayoría de estos tratamientos, se observó que el diámetro de los halos generados al colocar ambos polifenoles en conjunto, fue significativamente menor que el diámetro de los halos de los compuestos colocados individualmente (Figura 8B).

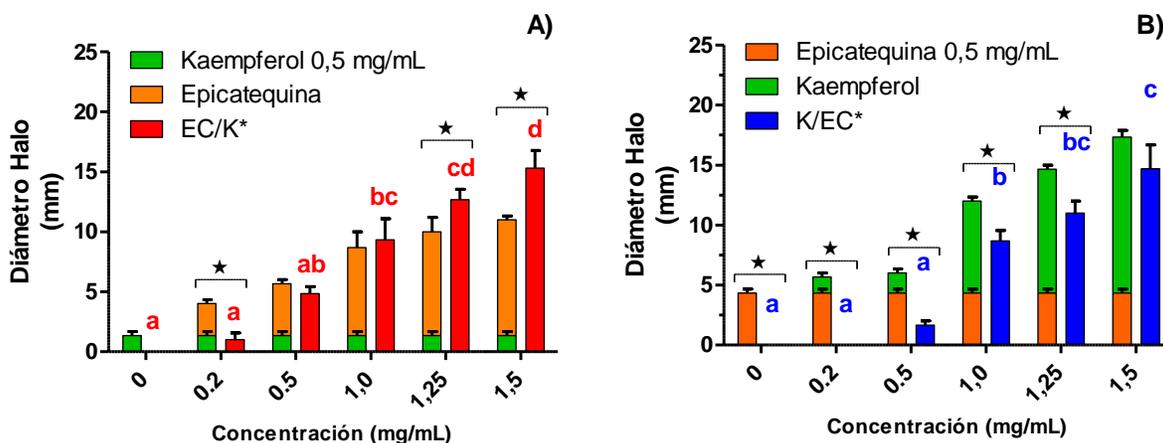


Figura 8. Diámetro del halo de inhibición formado por aplicación de EC/K* (A) y K/EC* (B) sobre *E. coli*. En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del polifenol (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$). ★ Indica diferencias estadísticamente significativas entre aplicación individual y conjunta de los polifenoles.

Para el caso de las cepas de *H. pylori* 26695 y 43504, se observó que en la medida que aumenta la cantidad de EC en presencia de una cantidad fija de K (EC/K*), el diámetro del halo de inhibición aumento gradualmente (Figuras 9A y 9B).

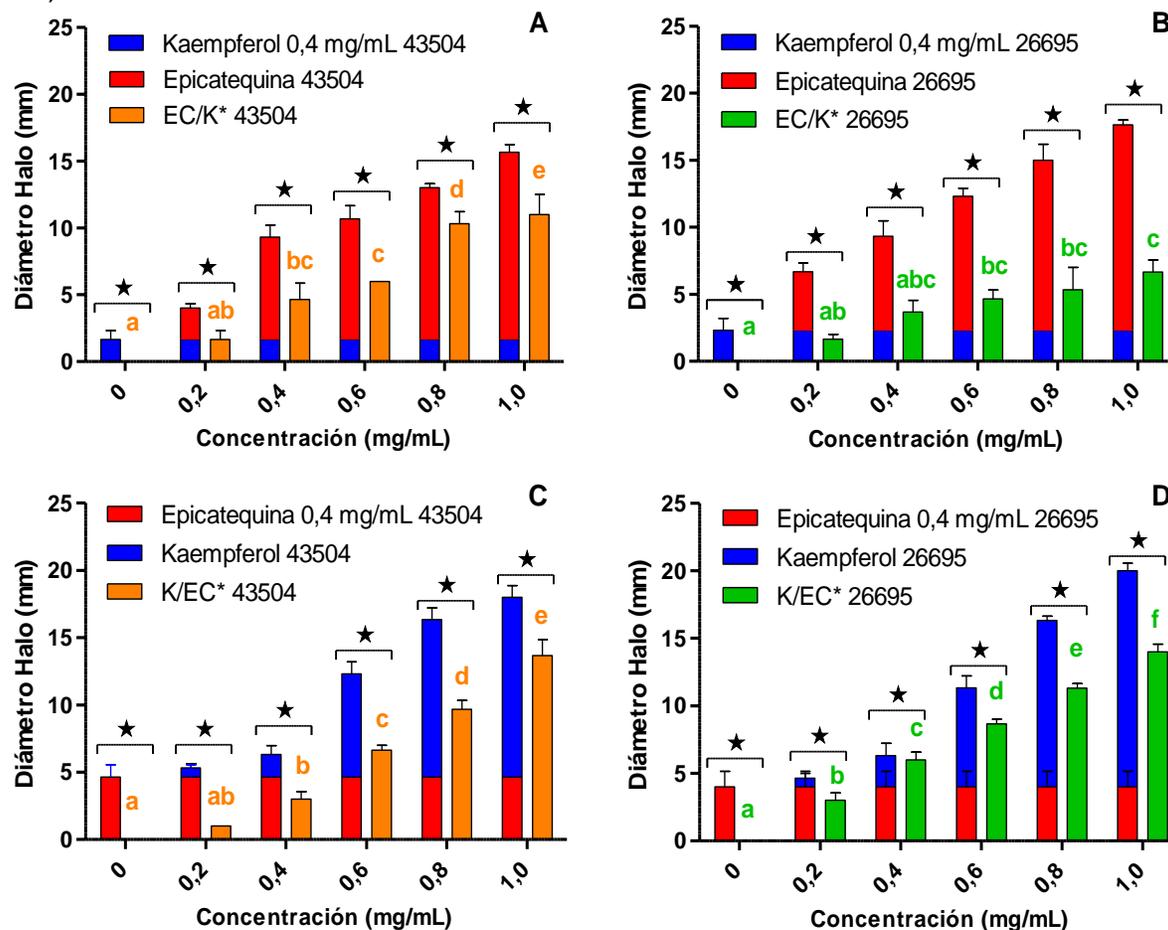


Figura 9. Diámetro del halo de inhibición formado por la interacción: **A)** EC/K* con la cepa 43504, **B)** EC/KI* con la cepa 26695, **C)** K/EC* con la cepa 43504 y **D)** K/EC* con la cepa 26695. En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del polifenol (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$). ★ indica diferencias estadísticamente significativas entre aplicación individual y conjunta de los polifenoles

Sin embargo, se observó que al agregar ambos polifenoles, se produjo una disminución significativa del diámetro del halo de inhibición que los mismos polifenoles colocados individualmente (Figuras A y B). Similar tendencia se observó, al añadir dosis crecientes de K en presencia de cantidades crecientes de EC (Figuras 9C y 9D).

Cinética del crecimiento de *E. coli* y *H. pylori* en presencia conjunta de K y EC

Para determinar el efecto del tiempo de exposición de ambos polifenoles sobre las bacterias, se adicionó una mezcla de 0,75 mg/mL de K y EC en medio líquido, para luego evaluar la viabilidad de cada bacteria. En el caso de *E. coli* se observó que en presencia de ambos polifenoles, la viabilidad de esta bacteria disminuyó significativamente a los 60 minutos de exposición comparado con el control, alcanzando su valor más bajo a los 90 minutos (3×10^7 UFC/mL) (Figura 10).

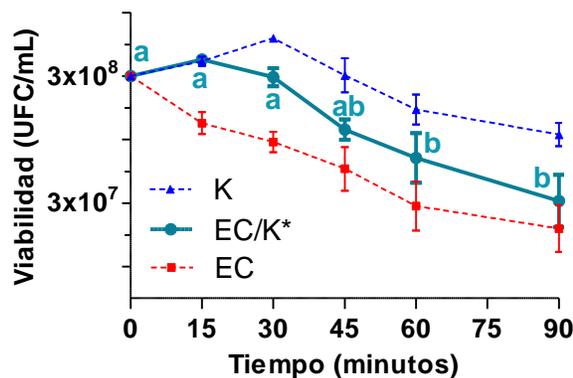


Figura 10. Cinética de la inhibición del crecimiento de *E. coli* en presencia conjunta de 0,75 mg/mL de K y EC. En línea discontinua se muestran los efectos individuales cada compuesto. En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del polifenol (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$).

En el caso de ambas cepas de *H. pylori*, las dosis utilizadas de ambos polifenoles aplicados en conjunto fue de 0,5 mg/mL (Figura 11). Así, se observó que después de 60 minutos de exposición a ambos polifenoles, la viabilidad de ambas cepas de bacterias disminuye significativamente, comparado con el tiempo inicial (cero minutos). Más aún, luego de 90 minutos de exposición a estos polifenoles, los valores de UFC/mL fueron los más bajos en ambas cepas de bacterias.

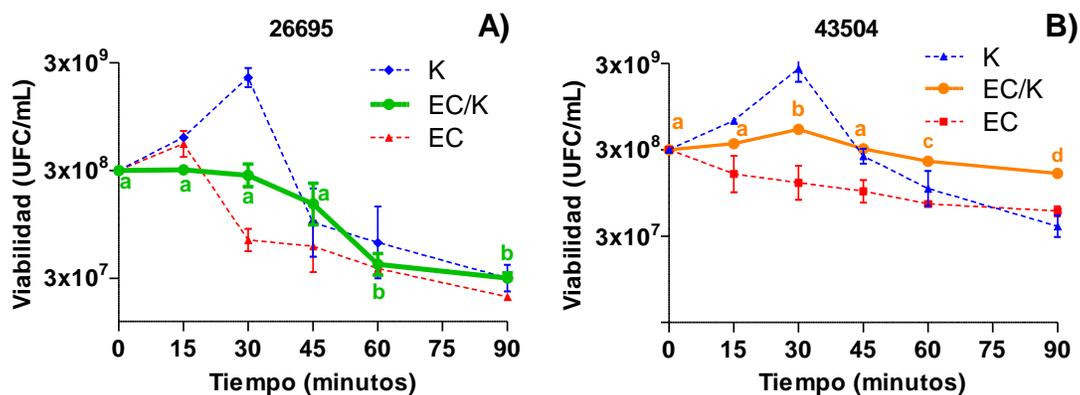


Figura 11. Cinética de la inhibición del crecimiento de *H. pylori* 26695 (A) y 43504 (B) en presencia conjunta de 0,5 mg/mL de K y EC. En línea discontinua se muestran los efectos individuales cada compuesto. En el ensayo respectivo, letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del polifenol (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$).

Caracterización de la mezcla de flavonoides por HPLC-DAD

Ambos polifenoles fueron colocados conjuntamente en una solución de DMSO según lo descrito en los Materiales y Métodos, para así evaluar la presencia de algún compuesto generado por la interacción entre la EC y K. En la Figura 12, se muestra un cromatograma representativo donde se observan dos picos correspondientes a la EC (27,3 min) y K (73,3 min). Es interesante notar la ausencia de un compuesto formado por la interacción entre EC y K.

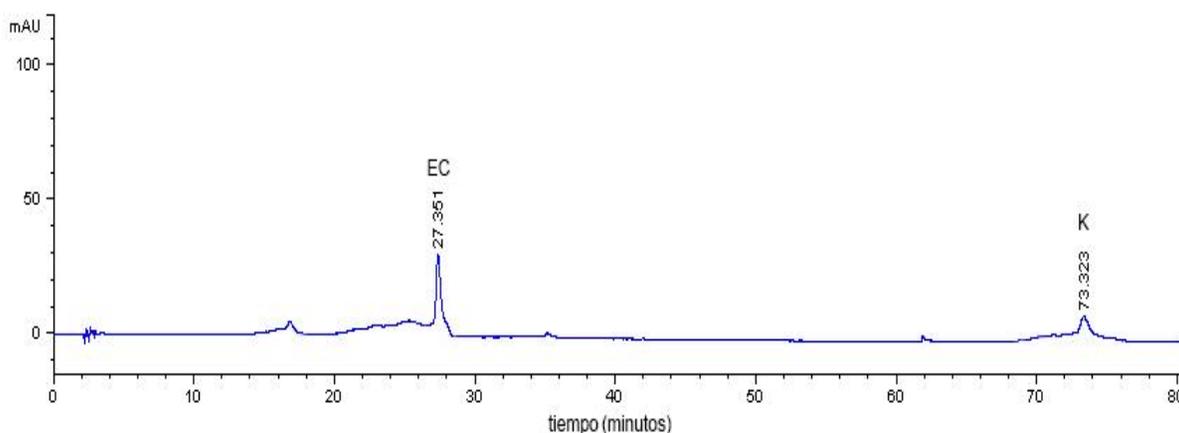


Figura 12. Cromatograma de la mezcla polifenólica de K y EC obtenido mediante HPLC-DAD.

Efecto de EC sobre la viabilidad de células AGS ante infección de *H. pylori*

Con el propósito de determinar si la actividad antibacteriana del EC sobre *H. pylori* tiene un efecto protector en la infección sobre el epitelio gástrico, se realizaron ensayos de co-cultivo con una línea celular proveniente de epitelio gástrico humano: células AGS y *H. pylori*.

Evaluación de la infección de *H. pylori* y el efecto de los polifenoles sobre la viabilidad de las células AGS

En este ensayo, se evaluó el efecto de la infección con *H. pylori* 43504 sobre la actividad de las reductasas mitocondriales (MTT) de las células AGS, la cual es un reflejo de la viabilidad celular. Para ello, se infectó un cultivo de células AGS con distintas multiplicidades de infección (MOI) durante 24 h. En la Figura 13A se muestra que en respuesta al incremento de la MOI de *H. pylori* ocurrió una disminución gradual de la viabilidad de las células AGS respecto de las células sin infectar, observándose una sobrevida de un 40% a una MOI de 500.

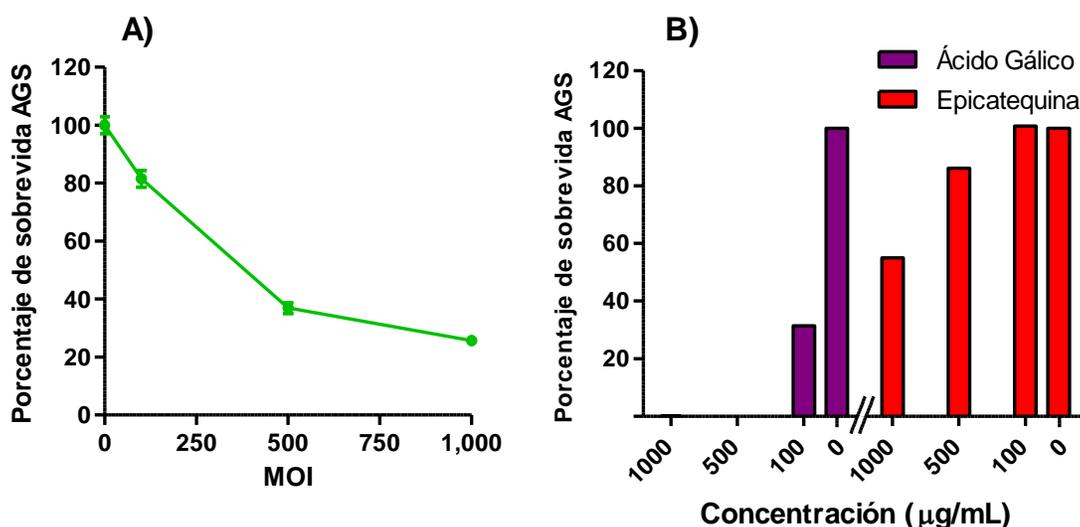


Figura 13. (A) Infección de *H. pylori* 43504 sobre un cultivo de células AGS en medio DMEM **(B)** Pruebas de calibración de AG y EC sobre células AGS.

Por otro lado, para evaluar el efecto de la EC sobre la viabilidad de las células AGS, se colocaron concentraciones crecientes de este polifenol (100-1000 µg/mL) y de ácido gálico (AG) (Díaz, 2011). En la Figura 13B se puede observar que en presencia de AG hubo una alta mortalidad de células. Sin embargo, en presencia de 100 y 500 µg/mL EC se produjo una leve disminución de la viabilidad de las células (alrededor del 10%).

Efecto de la EC sobre el daño celular producido por *H. pylori*

Para evaluar el efecto protector de la EC sobre las células AGS ante la infección por *H. pylori* se realizaron ensayos en medio líquido en microplacas de 90 pocillos, a dos concentraciones del flavanol (250 y 500 µg/mL) y una MOI de 500. En la Figura 14, se muestra que las células AGS en presencia de una MOI 500, la viabilidad de estas disminuye a un 40% mientras que al colocar 500 µg/mL de EC la viabilidad de AGS alcanza un valor de 110%. Es interesante mencionar que las células AGS en presencia conjunta de *H. pylori* (MOI 500) y 500 µg/mL de EC, disminuyen su viabilidad a un 75%.

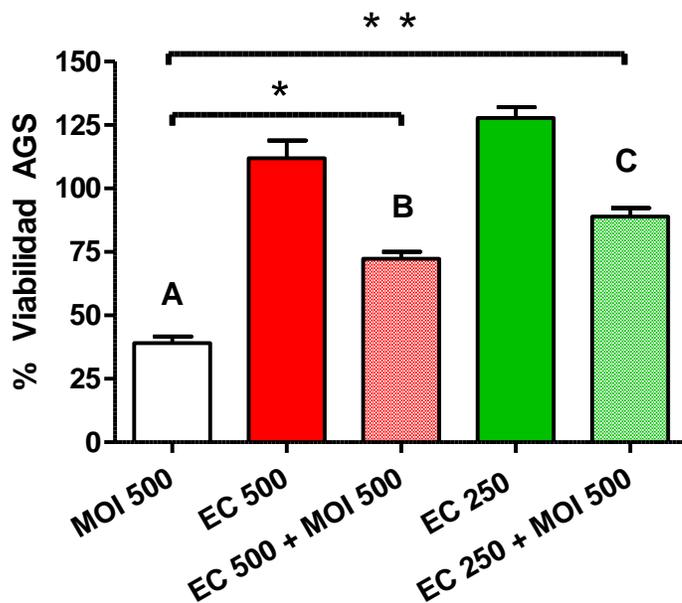


Figura 14. Efecto de EC ante la infección de *H. pylori* 43504 sobre la viabilidad de las células AGS. EC 500: 500 ug/mL de EC; EC 250: 250 ug/mL de EC; MOI: multiplicidad de infección de *H. pylori*. Letras iguales indican diferencias estadísticamente no significativas entre tratamientos con diferentes dosis del polifenol (prueba de Tukey, $p \geq 0,05$). (*); (**) Indican diferencias estadísticas significativas respecto al control ($p < 0,05$)

Además se observa, que al disminuir la concentración de EC a 250 $\mu\text{g/mL}$, la viabilidad de las células AGS es aún mayor, siendo cercana al 90%. Es importante destacar que no se observa un efecto inhibitorio de la EC sobre el crecimiento de las células AGS a las concentraciones probadas.

DISCUSION

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de sustancias más abundantes en el reino vegetal. Estos compuestos se han asociado a importantes propiedades sensoriales, taxonómicas, nutricionales y farmacológicas de los alimentos (Monagas *et al.*, 2005). Diversos autores, han demostrado el efecto bactericida de los polifenoles presentes en plantas y alimentos sobre *H. pylori* y *E. coli*, bacterias asociadas a un gran número de patologías gastrointestinales (Brenner *et al.*, 1999; Murray *et al.*, 2002; Moretro y Daeschel, 2004; Papadopoulou *et al.*, 2005; Eydelnant y Tufenkji, 2008). La mayoría de estos estudios, utilizan matrices polifenólicas composicionalmente complejas tales como aceite de oliva (Castro *et al.*, 2012), cranberry (Vattem *et al.*, 2005), uva de mesa (Brown *et al.*, 2009; 2011) y vino (Daroch *et al.*, 2001) entre otros, por lo que existe limitada información acerca del efecto individual y aditivo de estos compuestos.

Dentro de los compuestos fenólicos individuales más estudiados, el resveratrol, el ácido gálico, la quercetina, catequina y epigallocatequina galato han presentado efectos antibacterianos contra *H. pylori* y *E. coli* (Mabe *et al.*, 1999; Mahady *et al.*, 2003; Yanagawa *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2005; Díaz, 2011; Paulo *et al.*, 2011). Aunque el mecanismo de la actividad antibacteriana no han sido dilucidado completamente, estudios previos han vinculado a los polifenoles con la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Mori *et al.*, 1987) y daño por perforación de la membrana (Ikaigai *et al.*, 1993). Otros polifenoles menos estudiados son la EC y el K que destacan por su alta concentración en algunos alimentos tales como la uva y el vino (Monagas *et al.*, 2005; Adams, 2006). A pesar de la relevancia de estos dos polifenoles, existe limitada información acerca del efecto antibacteriano individual y sinérgico sobre *H. pylori* y *E. coli*. Es por ello, que en este estudio se evaluó el efecto antibacteriano individual y en conjunto de K y EC sobre *H. pylori* y *E. coli*.

La EC es un compuesto fenólico perteneciente a la familia de los flavonoides que puede alcanzar concentraciones de hasta 1,4 g/Kg en algunos alimentos (Obreque-Slier, 2010) y ha sido descrito como un importante agente antibacteriano (Mabe *et al.*, 1999; Baba *et al.*, 2001; Alberto *et al.*, 2002; Takabayashi *et al.*, 2004). En este estudio, se observó que cantidades crecientes de este compuesto provocaron una disminución evidente de las UFC/mL y un aumento del diámetro del halo de inhibición tanto en *H. pylori* como *E. coli*. Estas observaciones, sugerirían que la EC posee un efecto significativo sobre el crecimiento de ambas bacterias.

En el caso de *E. coli*, estas observaciones coinciden fuertemente con lo descrito por Rodríguez *et al.* (2007), quienes utilizaron (+)-catequina (esteroisómero de la (-)-epicatequina). Por el contrario, Díaz (2011) bajo similares condiciones, no evidenció un efecto significativo en la aplicación de (+)-catequina sobre la viabilidad de *E. coli*. Esta última observación sugeriría que ambos compuestos esteroisómeros afectarían diferencialmente la viabilidad de *E. coli*.

En el caso de las cepas de *H. pylori* las observaciones descritas coinciden con los estudios de Yee y Koo (2000) y Díaz (2011) quienes utilizando (+)-catequina encontraron que *H. pylori* afectaba fuertemente su viabilidad, pero con cantidades cuatro veces mayores que la utilizada en este estudio. Es interesante mencionar que Shin *et al.* (2005) encontraron que 0,05 mg/mL de epicatequina-3-O-galato eran suficientes para generar una inhibición del crecimiento de esta bacteria, lo que representa un valor casi diez veces menor que lo utilizado en este ensayo. Es importante señalar que, en líneas generales, entre ambas cepas de *H. pylori* no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Por otra parte, el K es un compuesto fenólico perteneciente a la familia de los flavonoides, reportado en concentraciones de hasta 1,6 g/L en algunos alimentos (Castro, 2005) y se ha descrito previamente como un importante agente antibacteriano (Kataoka *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Santas *et al.*, 2010). En el presente estudio, se observó que al aplicar concentraciones

crecientes de este flavonol provocaron una disminución leve de las UFC/mL y un aumento significativo del diámetro del halo de inhibición, lo que fue más evidente sobre *H. pylori* que sobre *E. coli*. Lo anterior, sugeriría que el K posee una baja actividad antibacteriana sobre el crecimiento de *E. coli* y un efecto moderado sobre la viabilidad de *H. pylori*. En los estudios del K sobre *E. coli*, estas observaciones concuerdan con lo descrito por Rodríguez *et al.* (2007) quienes usando quercetina (compuesto de la familia de los flavonoles, al igual que el K) obtuvieron un bajo efecto inhibitorio. Por el contrario, Santas *et al.* (2010) no observó un efecto inhibitorio del K y la quercetina sobre *E. coli*, aunque sí obtuvo un efecto de K sobre otras bacterias como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. Estos antecedentes nos permiten sugerir que ambos compuestos podrían actuar de forma similar sobre *E. coli*, pero diferencialmente sobre otras bacterias.

En el caso de las cepas de *H. pylori* las observaciones descritas coinciden con los estudios de Zhang *et al.* (2008) y Brown *et al.* (2011), quienes encontraron un efecto inhibitorio de quercetina sobre la viabilidad de *H. pylori in vitro* a concentraciones similares a las probadas en este estudio. Además, Kataoka *et al.* (2001) y Brown *et al.* (2011) reportaron que existe un efecto protector de kaempferol (aislados de *Polygonum tinctorium* Lour.) y quercetina, respectivamente, sobre gerbos y ratones infectados con *H. pylori*, aunque a dosis elevadas. Lo anterior, confirma que existiría un efecto del K sobre ambas cepas de *H. pylori* tanto *in vitro* como *in vivo* y que la quercetina podría actuar de igual manera que el K sobre esta bacteria. Es importante señalar, que sólo se encontraron diferencias significativas entre las cepas en el ensayo en medio líquido, por lo que esta diferencia no sería concluyente en todos los casos.

Comparativamente, fue posible observar que fueron necesarias dosis mayores de K que de EC para lograr un efecto inhibitorio similar tanto en *H. pylori* como en *E. coli*. Esto indicaría que este flavan-3-ol sería más efectivo en el control del crecimiento de ambas bacterias. Asimismo, al comparar la sensibilidad de ambas

bacterias a la EC y K, se observó que *E. coli* presentó una mayor resistencia que *H. pylori* frente a ambos polifenoles. Esta última observación estaría estrechamente relacionada con el patrimonio genético de *E. coli*, el cual es tres veces mayor que el de *H. pylori*, lo que se traduciría en mayor cantidad de herramientas que la ayudarían a adaptarse o defenderse mejor ante distintas situaciones adversas (Blattner *et al.*, 1997; Tomb *et al.*, 1997).

Luego de comprobar el efecto inhibitorio de ambos polifenoles sobre la viabilidad de ambas bacterias, se procedió a evaluar la aplicación conjunta de EC y K sobre el crecimiento de *H. pylori* y *E. coli*. En el caso de *E. coli*, se observó que concentraciones crecientes de EC en presencia de una cantidad constante de K (EC/K*), provocaron una disminución gradual de la viabilidad de la bacteria en las pruebas de medio líquido. Sin embargo, esta disminución no sería relevante al compararla con el efecto individual de la EC. Curiosamente, al observar las pruebas en medio sólido, se observa un efecto aditivo en condiciones de EC/K* en al menos tres tratamientos. Según Santas *et al.* (2010), el K presenta una baja solubilidad en medio acuoso, lo cual podría modificar su propiedad inhibitoria bajo ciertas condiciones experimentales, como en el caso de las pruebas en medio sólido.

Contrariamente, cuando la bacteria fue sometida a concentraciones crecientes de K en presencia de una cantidad constante de EC (K/EC*), no se observaron diferencias importantes en comparación con el efecto individual del K. Esta observación es avalada por la relación experimental que establece que una diferencia de dos órdenes exponenciales de magnitud respecto al control, sería un indicador del 99% de inhibición del crecimiento. Al igual que en el caso anterior, es interesante notar que en las pruebas de medio sólido, se observó una disminución del halo de inhibición bajo condiciones de K/EC* comparado con los efectos individuales. Esta observación, sería fuertemente respaldada por la disminución de la solubilidad del K en la medida que aumenta su concentración en el medio (Wagner y Ulrich-Merzenich, 2009), lo que provocaría una alteración de su efecto

inhibitorio. Las observaciones descritas en ambas condiciones (EC/K* y K/EC*) son coincidentes con lo observado por Lee y Lee (2010), quienes utilizando una mezcla de polifenoles extraídos de hojas de olivo no encontraron un efecto sinérgico significativo sobre *Escherichia coli*.

En el caso de la bacteria *H. pylori*, inicialmente se utilizaron las dosis propuestas en los ensayos individuales de EC y K (0 a 1 mg/mL). Sin embargo, bajo estas condiciones, no se observó el crecimiento de ninguna cepa de *H. pylori* (datos no mostrados). Es por ello que se planteó un arreglo factorial de tratamientos con dosis de 0, 50, 100 y 150 µg/mL de cada compuesto como factor, para evaluar la interacción de estos compuestos sobre *H. pylori*.

Es interesante señalar que al utilizar dosis más bajas que las planteadas originalmente en las pruebas individuales, se observó un efecto inhibitorio evidente y sinérgico de ambos compuestos en las pruebas de medio líquido. Además, es importante notar que la sola presencia de un segundo polifenol (ya sea EC o K) provoca una disminución significativa de la viabilidad de esta bacteria, la cual fue coincidente en la mayoría de los tratamientos. Complementariamente, se realizaron pruebas en medio sólido, observándose que con dosis variables de un polifenol (0 a 1 mg/mL) en presencia de una dosis fija del otro fenol (0.4 mg/mL) el halo de inhibición, fue significativamente menor que comparado con el obtenido con ambos polifenoles aplicados individualmente. Es muy probable que ambos polifenoles posean distintas propiedades farmacológicas. Así, alguno de estos compuestos podría tener un efecto bactericida que impediría que el otro polifenol actúe, lo que provocaría una disminución del efecto sinérgico comparado con el efecto individual de ambos polifenoles. Asimismo, se ha propuesto que dos compuestos polifenólicos de distinta familia podrían tener un mecanismo de acción diferente, lo que implicaría una ausencia de un efecto aditivo (Lim *et al.*, 2007).

Luego de evaluar el efecto de la aplicación conjunta de ambos polifenoles, se procedió estudiar el efecto del tiempo de exposición sobre la viabilidad de ambas bacterias. Así, al evaluar el efecto de la aplicación en conjunto de EC y K sobre la

cinética de crecimiento de *H. pylori* y *E. coli*, fue posible observar una disminución paulatina de la viabilidad de ambas bacterias, en la medida que aumenta el tiempo de exposición. Éste decrecimiento fue evidente y significativo a partir de los 60 minutos, lo que indicaría que el efecto de la aplicación en conjunto de ambos polifenoles, estaría fuertemente relacionado con el tiempo de exposición, lo cual coincide con lo descrito previamente por Yanagawa *et al.* (2002).

Tomadas en su conjunto, las observaciones descritas indicarían que ambos polifenoles no tendrían un efecto aditivo o sinérgico sobre la viabilidad de *H. pylori* y *E. coli*. Esta aseveración es controversial con estudios realizados por otros autores, los que evaluaron el efecto de EC o K mezclados con otras drogas (rutina, quercetina, teaflavina, clindamicina y eritromicina) y sobre otras bacterias (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Propionibacterium acnes*, *Salmonella enteridis*) (Arima y Danno, 2002; Lim *et al.*, 2007; Betts *et al.*, 2012). Además, Yanagawa *et al.* (2002) encontraron efectos aditivos al combinar epigallocatequina galato (EGCg) con metronidazol y cloranfenicol sobre cepas *H. pylori* resistentes a estos antibióticos.

Luego de determinar el efecto antibacteriano de ambos polifenoles sobre la viabilidad de *H. pylori* y *E. coli in vitro*, se procedió a evaluar el efecto de los flavonoides sobre el co-cultivo de células AGS y *H. pylori*. De los dos compuestos estudiados, se escogió la EC para estas pruebas, ya que las propiedades de solubilidad del K no permitieron su uso en esta metodología (datos no mostrados). Así, se observó que *H. pylori* a una MOI de 500 provoca una disminución de la sobrevivencia de estas células. Además se observa, que una concentración de 250 µg/mL de EC (una concentración baja para los ensayos *in vitro*) presentó un efecto protector sobre las células epiteliales infectadas con *H. pylori*, efecto que fue mayor que el observado para 500 µg/mL de EC ante la misma MOI de infección. Este novedoso antecedente es de alta relevancia, ya que a pesar que diversos autores han reportado el rol protector de extractos polifenólicos de distintos tejidos de las plantas y de algunos compuestos individuales sobre las células AGS ante la

infección de *H. pylori* (Brown *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009; Jang *et al.*, 2012), no existían antecedentes acerca de la propiedad protectora de la EC sobre las células AGS o como causante de la disminución de la viabilidad de estas células en dosis altas. Esta última observación, indicaría que concentraciones utilizadas en este estudio que producirían un efecto antibacteriano *in vitro*, podrían producir daño en las células del epitelio gástrico.

Los antecedentes anteriormente expuestos permiten mencionar que la viabilidad de *H. pylori* y *E. coli* estará fuertemente relacionada con el tipo y concentración del compuesto fenólico presente, tiempo de exposición, presencia de otros compuestos, ambiente en que crece la bacteria y la interacción de estos componentes.

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de este estudio es posible concluir que tanto el K como la EC tienen un efecto significativo sobre el crecimiento *H. pylori* y *E. coli*, el cual está estrechamente asociado a la dosis utilizada. Aunque en el caso del K este efecto no es microbiológicamente significativo, hubo una disminución del crecimiento de ambas bacterias al aplicar cada compuesto individualmente. Comparativamente, a una misma dosis individual, el efecto de la EC sobre el crecimiento de ambas bacterias fue mayor que el observado con el uso del K.

Por otro lado, con el uso de las dosis más bajas en el medio líquido, ambos compuestos presentaron una actividad antibacteriana aditiva sobre *H. pylori*. Sin embargo, con el aumento de la dosis no se observa ni actividad sinérgica ni aditiva en ambos medios de cultivos. En el caso de *E. coli*, al aplicar los polifenoles en conjunto se observa una actividad aditiva, la cual es fuertemente dependiente de la dosis de EC.

En todos los ensayos se observó que *H. pylori* es más sensible a ambos polifenoles que *E. coli*.

Finalmente, se observó que la EC tendría un rol protector sobre las células AGS ante la infección de *H. pylori*, la cual dependería de la dosis del flavanol, ya que altas dosis provocan daño en dichas células.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, D. 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 57(3):249-256.

ADAMSSON, I., C.E. NORD, P. LUNDQUIST, S. SJOSTEDT Y C. EDLUND. 1999. Comparative effects of omeprazole, amoxicillin plus metronidazole versus omeprazole, clarithromycin plus metronidazole on the oral, gastric and intestinal microflora in *Helicobacter pylori* infected patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 44:629-40.

ADENIYI, B. A. Y F. M. ANYIAM. 2004. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* potential of methanol extract of *Allium ascalonicum* Linn. (Liliaceae) leaf: susceptibility and effect on urease activity. *Phytotherapy Research* 18:358–361.

AIYEGORO, O.A. y A.I. OKOH. 2009. Use of bioactive plant products in combination with standard antibiotics: implications in antimicrobial chemotherapy. *Journal of Medicinal Plants Research* 3:1147-1152

ALBERTO, M. R., M. E. FARÍAS, Y 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.

ANÓNIMO. 2002. Cancer facts and figures. American Cancer Society, Inc. EE. UU. Disponible en: <http://www.cancer.org> Leído el 8 de enero de 2012.

ARIMA H. Y G. DANNO. 2002. Isolation of antimicrobial compounds from guava (*Psidium guajava* L.). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 66:1727–1730

ARTS, I.C.W., B. vandePUTTE, P.C. HOLLMAN. 2000. Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. 1. Fruits, vegetables, staple foods, and processed foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48:1746-51.

BABA, S., N. OSAKABE, M. NATSUME, Y. MUTO, T. TAKIZAWA y J. TERAO. 2001. *In vivo* comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. *Journal of Nutrition* 131:2885-91

BAE, E.A., M.J. HAN, N.J. KIM Y D.H. KIM. 1998. Anti-*Helicobacter pylori* activity of herbal medicines. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 21(9):990-2.

BAZZANO, L.A., J. HE, L.G. OGDEN, C.M. LORIA, S. VUPPUTURI, L. MYERS y P.K. WHELTON. 2002. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. *American Journal of Clinical Nutrition* 76:93-99.

BETTS, J., C. MURPHY, S. KELLY Y S. HASWELL. 2012. Minimum Inhibitory and bactericidal concentrations of kaempferol and quercetin against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 1(5): 1250-1258.

BHAMARAPRAVATI, S., S. L. PENDLAND Y G. B. MAHADY. 2003. Extracts of spice and food plants from Thai traditional medicine inhibit the growth of the human carcinogen *Helicobacter pylori*. *In vivo* 17:541–544.

BLASER, M.J. Y J.C. ATHERTON. 2004. *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *Journal of Clinical Investigation* 113(3):321–33.

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

BRENNER, H., D. ROTHENBACHER, G. BODE Y G. ADLER. 1999. Inverse graded relation between alcohol consumption and active infection with *Helicobacter pylori*. *American Journal of Epidemiology* 149:571-6.

BRISKIN, D.P. 2000. Medicinal plants and phytomedicines: Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology* 124:507-14

BROWN, J.C., J. WANG, L. KASMAN, X. JIANG Y V. HALEY-ZITLIN. 2011. Activities of muscadine grape skin and quercetin against *Helicobacter pylori* infection in mice. *Journal of applied microbiology* 110(1): 139-46

BROWN, J.C., G. HUANG, V. HALEY-ZITLIN Y X.P. JIANG. 2009. Antibacterial effects of grape extracts on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* 75:848–852.

CARBONNEAU, M.A., C.L. LEGER, L. MONNIER, C. BONNET, F. MICHEL, G. FOURET *et al.* 1997. Supplementation with wine phenolic compounds increases the antioxidant capacity of plasma and vitamin E of low-density lipoprotein without changing the lipoprotein Cu²⁺-oxidizability: possible explanation by phenolic location. *European Journal of Clinical Nutrition* 51(10):682–90.

CASTRO, A. 2005. Efecto del Momento de Cosecha de Uva cv. Merlot sobre la Composición Química y Sensorial de los Vinos en el Valle del Maipo. Memoria para optar al Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 108p.

CHOI, O., K. YAHIRO, N. MORINAGA, M. MIYAZAKI Y M. NODA. 2007. Inhibitory effects of various plant polyphenols on the toxicity of Staphylococcal alpha-toxin. *Microbial pathogenesis* 42:215-224.

COOPER, K.A., E. CAMPOS-GIMENEZ, D.J. ÁLVAREZ, K. NAGY, J.L. DONOVAN y G. WILLIAMSON. 2007. Rapid reversed phase ultra-performance liquid chromatography analysis of the major cocoa polyphenols and interrelationships of their concentrations in chocolate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 55:2841-47

CORREA, P., E.T. FONTHAM, J.C. BRAVO, L.E. BRAVO, B. RUIZ, G. ZARAMA *et al.* 2000. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *Journal of the National Cancer Institute* 92(23):1881–8.

CORREIA, R., P. MCCUE, D.A. VATTEM, M. MAGALHÃES, G. MACÊDO Y K. SHETTY. 2004. Amylase and *Helicobacter pylori* inhibition by phenolic extracts of Pineapple wastes bioprocessed by *Rhizopus oligosporus*. *Journal of Food Biochemistry* 28:419-434.

COWAN, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12:564–582.

CUEVAS, R. 2004. Caracterización polifenólica de hollejos de las variedades cv. Cabernet sauvignon, Merlot, Cabernet franc y Carménère durante el periodo de maduración. Memoria para optar al Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 71p.

CZOCHANSKA, Z., L.Y. FOO, R.H. NEWMAN Y L.J. PORTER. 1979. Polymeric proanthocyanidins: Stereochemistry, structural units, and molecular weight. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* 1:2278–2286.

DAROCH, F., M. HOENEISEN, C.L. GONZALEZ, F. KAWAGUCHI, F. SALGADO, H. SOLAR *et al.* 2001. *In vitro* antibacterial activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori*. *Microbios* 104(408):79–85.

DÍAZ, R. 2012. Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli*. Memoria para optar al Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas. Santiago, Chile. 36p.

DIXON, R. A., P. M. DEY Y C. J. LAMB. 1983. Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology* 55:1–69.

DUNN, B.E., H. COHEN Y M.J. BLASER. 1997. *Helicobacter pylori*. *Clinical Microbiology Reviews* 10:720-41.

ELATTAR, T.M. Y A.S. VIRJI. 1999. The effect of red wine and its components on growth and proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Anticancer Research* 19(6B):5407–14.

EYDELNANT, I. Y N. TUFENKJI. 2008. Cranberry derived proanthocyanidins reduce bacterial adhesion to selected biomaterials. *Langmuir* 24: 10273-10281.

FAHEY, J. W., X. HARISTOY, P. M. DOLAN, T. W. KENSLER, I. SCHOLTUS, K. K. STEPHENSON, P. TALALAY Y A. LOZNIEWSKI. 2002. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *Helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:7610–7615.

FERREIRA, R., G. SELLÉS y J. VALENZUELA. 2002. Para modificar cualidades del vino. *Tierra adentro* 42:13-15.

FIGUEROA, G., R. ACUÑA, M. TRONCOSO, D.P. PORTELL, M.S. TOLEDO Y J. VALENZUELA. 1997. *Helicobacter pylori* Infection in Chile. *Clinical Infectious Diseases* 25:983-9.

FLANZY, C. 2000. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. AMV. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 783 p.

FOX, J.G. Y T.C. WANG. 1997. *Helicobacter pylori*—not a good bug after all. *The New England Journal of Medicine* 345(11):829–32.

FUKAI, T., A. MARUMO, K. KAITOU, T. KANDA, S. TERADA Y T. NOMURA. 2002. Anti-*Helicobacter pylori* flavonoids from licorice extract. *Life Sciences* 71:1449–1463.

GARCIA-CLOSAS, R., C.A. GONZALEZ, A. AGUDO Y E. RIBOLI. 1999. Intake of specific carotenoids and flavonoids and risk of gastric cancer in Spain. *Cancer Causes Control* 10:71–75.

GERMAN, J.B. Y R.L. WALZEM. 2000. The Health Benefits of Wine. *Annual Review of Nutrition* 20: 561-93.

GHISELLI A., M. NARDINI, A. BALDI Y C. SCACCINI. 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an italian red wine. *American Chemical Society* 42(2): 361-367.

GRAHAM, D. Y. 1994. Benefits from elimination of *Helicobacter pylori* infection include major reduction in the incidence of peptic-ulcer disease, gastric-cancer, and primary gastric lymphoma. *Preventive Medicine* 23(5):712–716.

GU, L.W., S.E. HOUSE, X.L. WU, B.X. OU y R.L. PRIOR. 2006. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 54:4057-61

HÄKKINEN, S., M. HEINONEN, S. KARENLAMPI, H. MYKKANEN, J. RUUSKANEN Y R. TORRONEN. 1999. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International* 32:345-353.

HARBORNE, J.B., H. BAXTER Y G.P. MOSS. 1999. *Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants*. 2ª Ed. Taylor & Francis, Londres.

HEMAISWARYA, S., A.K. KRUTHIVENTI y M. DOBLE. 2008. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine* 15:639-652

HENNING, S.M., Y.T. NIU, N.H. LEE, G.D. THAMES, R.R. MINUTI, *et al.* 2004. Bioavailability and antioxidant activity of tea flavanols after consumption of green tea, black tea, or a green tea extract supplement. *American Journal of Clinical Nutrition* 80:1558-64

HERMOSIN, I., E. SÁNCHEZ-PALOMO, A. VICARIO. 2005. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wine made from cultivars Cabernet sauvignon, Sensible and Syrah. *Food Chemistry* 92:269-283.

HERTOG, M.G.L., E.J.M. FESKENS Y D. KROMHOUT. 1997. Antioxidant flavonoids and coronary heart disease risk. *The Lancet* 349, 699.

HIDALGO, J. 2003. *Tratado de Enología volumen 2*. Editorial Mundi-prensa. Madrid, España.752 p.

HUNG, H.C., K.J. JOSHIPURA, R. JIANG, F.B. HU, D. HUNTER, S.A. SMITH-WARNER, G.A. COLDITZ, B. ROSNER, D. SPIEGELMAN Y W.C. WILLETT. 2004. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. *Journal of the National Cancer Institute* 96:1577-1584.

IKAIGAI, H., T. NAKAE, Y. HARA y T. SHIMAMURA. 1993. Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1147:132-136.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). 1994. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Schistosomes, Liver Flukes, and *Helicobacter pylori*. Vol 61. Lyon:LARC. p177-240.

ISWALDI, I., A.M. GOMEZ-CARAVACA, D. ARRÁEZ-ROMÁN, J. UBEROS, M. LARDÓN, A. SEGURA-CARRETERO, A. FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ. 2012. Characterization by HPLC-DAD coupled to time-of-flight mass spectrometry of the phenolic fraction in cranberry syrup used to prevent urinary tract diseases, together with a study of its antibacterial activity. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 58:34-41

JANG, S. H., J.W. LIM, T. MORIO Y H. KIM. 2012. Lycopene inhibits *Helicobacter pylori*-induced ATM/ATR-dependent DNA damage response in gastric epithelial AGS cells. *Free radical biology and medicine* 52(3): 607-615

KATAOKA, M., K. HIRATA, T. KUNIKATA, S. USHIO, K. IWAKI, K. OHASHI, M. IKEDA Y M. KURIMOTO. 2001. Antibacterial action of tryptanthrin and kaempferol, isolated from the indigo plant (*Polygonum tinctorium* Lour.), against *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Journal of gastroenterology* 36:5-9

KELI, S.O., M.G.L. HERTOOG, E.J.M. FESKENS Y D. KROMHOUT. 1996. Dietary flavonoids, antioxidant vitamins, and incidence of stroke. The Zutphen study. Archives of Internal Medicine 156:637-642.

KENNEDY, J., C. SAUCIER e Y. GLORIES. 2006. Grape and wine phenolics: history and perspective. American Journal of Enology and Viticulture 57(3):239-248.

KNEKT, P., R. JARVINEN, A. REUNANEN Y J. MAATELA.1996. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland; a cohort study. British Medical Journal 312:478-481.

KRAUSSE, R., J. BIELENBERG, W. BLASCHEK Y U. ULLMANN. 2004. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Extractum liquiritiae*, glycyrrhizin and its metabolites. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 54:243–246.

LAURENT, C., P. BESANÇON y B. CAPORICCIO. 2007. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an *in vitro* digestion/caco-2 cell culture model. Food Chemistry 100:1704-12

LEE, O-H. Y B-Y. LEE. 2010. Antioxidant and antimicrobial activities of individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. Bioresource technology 101(10), 3751-3754

LEE, J-H., J.S. SHIM, M-S. CHUNG, S-T. LIM Y K.H. KIM. 2009. *In vitro* Anti-Adhesive Activity of Green Tea Extract against Pathogen Adhesion. PHYTOTHERAPY RESEARCH 23: 460-466

LEE, K.W., Y.J. KIM, D.-K. KIM, H.J. LEE Y C.Y. LEE. 2003. Major Phenolics in Apple and Their Contribution to the Total Antioxidant Capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51:6516-6520.

LIM, Y-H., I-H KIM Y J-J. SEO. 2007. *In vitro* activity of kaempferol isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with erythromycin or clindamycin against *Propionibacterium acnes*. *Journal of microbiology* 45(5): 473-477

LIU, M.-H., N. OTSUKA, K. NOYORI, S. SHIOTA, W. OGAWA, T. KURODA, T. HATANO Y T. TSUCHIYA. 2009. Synergistic effect of kaempferol glycosides purified from *Laurus nobilis* and fluoroquinolones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 32(3): 489-492

LÓPEZ DE LACEY, A., B. GIMÉNEZ, E. PÉREZ-SANTÍN, R. FAULKS, G. MANDALARI, M. LÓPEZ-CABALLERO y P. MONTERO. 2012. Bioaccessibility of green tea polyphenols incorporated into an edible agar film during simulated human digestion. *Food Research International* 48(2):462-469.

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.

MANN, J. 1978. *Secondary Metabolism*. Oxford Chemistry Series, Clarendon Press, Oxford.

MARSHALL, B.J. 1993. Treatment strategies for *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology Clinics of North America*, 22(1):183–198.

MARTIN, K.W., Y E. ERNST. 2003. Herbal medicines for treatment of bacterial infections: a review of controlled clinical trials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51:241–246.

MARTINI, S., C. D'ADDARIO, D. BRACONI, G. BERNARDINI, L. SALVINI, C. BONECHI *et al.* 2009. Antibacterial activity of grape extracts on *cagA*-positive and -negative *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Journal of Chemotherapy* 21(5):507–513.

MATSUBARA, S., H. SHIBATA, F. ISHIKAWA, T. YOKOKURA, M. TAKAHASHI, T. SUGIMURA Y K. WAKABAYASHI. 2003. Suppression of *Helicobacter pylori* induced gastritis by green tea extract in Mongolian gerbils. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310:715–719.

MAZZA, G. 1995. Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35:341-371.

MILLER, K.B., D.A. STUART, N.L. SMITH, C.Y. LEE, N.L. McHALE, *et al.* 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.L.T., M.J. CORTESIA, L.E. ROSENTHAL Y B.D. JONES. 1988. Characterization of urease from *Campylobacter pylori*. *Journal of Clinical Microbiology* 26(5):831–836.

MOBLEY, H. Y P. FOXALL. 1997. Differentiation of *H. pylori* strains using PCR RFLP. En: Clayton C., H. Mobley (Ed.). *Helicobacter pylori* protocols. Human Press, New Jersey, USA. 275p.

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(2):85-118.

MONTECUCCO, C. Y R. RAPPUOLI. 2001. Living dangerously: how *Helicobacter pylori* survives in the human stomach. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2(6):457–66.

MORETRO, T., Y M.A. DAESCHEL. 2004. Wine is bactericidal to foodborne pathogens. *Journal of Food Science* 69(9):251–257.

MORI, A., C. NISHINO, N. ENOKI y S. TAWATA. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry* 26: 2231-2234.

MORINAGA, N., Y. IWAMARU, K. YAHIRO, M. TAGASHIRA, J. MOSS Y M. NODA. 2005. Differential activities of plant polyphenols on the binding and internalization of cholera toxin in VERO cells. *Journal of Biological Chemistry* 280: 23303 - 23309.

MURRAY, L.J., A.J. LANE, I.M. HARVEY, J.L. DONOVAN, P. NAIR, R.F. HARVEY. 2002. Inverse relationship between alcohol consumption and active *Helicobacter pylori* infection: the bristol *Helicobacter* project. *American Journal of Gastroenterology* 97(11):2750–5.

NARIMAN, F., F. EFTEKHAR, Z. HABIBI, Y T. FALSAFI. 2004. *Anti-Helicobacter pylori* activities of six Iranian plants. *Helicobacter* 9:146–151.

NEGRO, C., L. TOMMASI y A. MICELI. 2003. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology* 87:41-44.

NEILSON, A. y M. FERRUZZI. 2011. Influence of Formulation and Processing on Absorption and Metabolism of Flavan-3-Ols from Tea and Cocoa. *Annual Review of Food Science and Technology* 2:125–51

NETO, C., J. AMOROSO y A. LIBERTY. 2008. Anticancer activities of cranberry phytochemicals: An update. *Molecular Nutrition & Food Research* 52:18–27

NOHYNEK, L.J., H. L. ALAKOMI, M.P. KÄHKÖNEN, M. HEINONEN, I.M. HELANDER, K-M. OKSMAN-CALDENTY Y R.H. PUUPPONEN-PIMIÄ. 2006. Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action against Severe Human Pathogens. *Nutrition and Cancer* 4(1):18-32

OBREQUE-SLIER, E. 2010. Caracterización fenólica de uvas del cultivar Carménère y su relación con la sensación de astringencia. Tesis Doctoral, Departament de Bioquímica i Biotecnologia Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, España. 240p.

OBREQUE-SLIER, E., A. PEÑA-NEIRA, R. LÓPEZ-SOLIS, C. RAMÍREZ-ESCUADERO Y F. ZAMORA-MARÍN. 2009. Phenolic characterization of commercial enological tannins. *European Food Research and Technology* 229:859-866.

O'CONNOR, A., J. GISBERT Y C. O'MORAIN. 2009. Treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 14:46–51.

O'GARA, E.A., 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.

PAPADOPOULOU, C., K. SOULTI Y I.G. ROUSSIS. 2005. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Food Technology and Biotechnology* 43(1):41–46.

PARSONNET J. 1998. *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut* 43(1):6–9.

PAULO, L., M. OLEASTRO, E. GALLARDO, J.A. QUEIROZ Y F. DOMINGUES. 2011. Anti-*Helicobacter pylori* and urease inhibitory activities of resveratrol and red wine. *Food Research International* 44 (4): 964-969

PELLICANO R, S. FAGOONEE, M. RIZZETTO Y A. PONZETTO. 2003. *Helicobacter pylori* and coronary heart disease: which directions for future studies? *Critical Reviews in Microbiology* 29(4):351–9.

PENSTON, J.G. Y K. MCCOLL. 1997. Eradication of *Helicobacter pylori*: an objective assessment of current therapies. *British Journal of Clinical Pharmacology* 43:223-43.

RAMOS, S., M. ALIA, L. BRAVO Y L. GOYA. 2005. Comparative effects of food-derived polyphenols on the viability and apoptosis of a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53:1271–1280.

REGUANT, C., A. BORDONS, L. AROLA Y N. ROZÉS. 2000. Influence of phenolic compounds on the physiology of *Oenococcus oeni*. *Journal of Applied Microbiology* 88:1065–1071.

ROBY, G., J. HARBERTSON, D. ADAMS y M. MATTHEW. 2004. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10:100-107

RODRÍGUEZ, M., M. ALBERTO Y M. MANCA DE NADRA. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. *Food Control* 18:93-101.

ROMERO C., E. MEDINA, J. VARGAS, M. BRENES y A. DE CASTRO. 2007. *In vitro* activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 680-686.

ROSS, J.A. Y C.M. KASUM. 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* 2(22):19–34.

RUGGIERO, P., S. PEPPOLONI, D. BERTI, R. RAPPUOLI Y G. DEL GIUDICE. 2002. New strategies for the prevention and treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 11:1127–1138.

RUGGIERO, P., G. ROSSI, F. TOMBOLA, L. PANCOTTO, L. LAURETTI, G. DEL GIUDICE *et al.* 2007. Red wine and green tea reduce *Helicobacter pylori*- or *vacA*-induced gastritis in a mouse model. *World Journal of Gastroenterology* 13(3):349–354.

SALEEM, A., M. HUSHEEM, P. HARKONEN Y K. PIHLAJA. 2002. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of *Terminalia chebula* retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology* 81:327–336.

SAMBROOK, J., E. FRITSCH Y T. MANIATIS. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2da Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Press. New York.

SANTAS, J., M.P. ALMAJANO Y R. CARBÓ. 2010. Antimicrobial and antioxidant activity of crude onion (*Allium cepa*, L.) extracts. International Journal of Food Science and Technology 45(2):403-409

SHETTY, K. 1997. Biotechnology to harness the benefits of dietary phenolics; Focus on *Lamiaceae*. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition 6:162-171.

SHIN, J-E., J-M. KIM, E-A. BAE, Y-J. HYUN, D-H. KIM. 2005. *In vitro* inhibitory effect of flavonoids on growth, infection and vacuolation of *Helicobacter pylori*. Planta medica 71(3): 197-201

SPAYD, S., J. TARARA, D. MEE, J. FERGUSON. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. American Journal of Enology and Viticulture 53:171-181.

STALMACH, A., W. MULLEN, H. STEILING, G. WILLIAMSON, M.E.J. LEAN y A. CROZIER. 2010. Absorption, metabolism, and excretion of green tea flavan-3-ols in humans with an ileostomy. Molecular Nutrition & Food Research 54:323-34

SUN, C.T. Y V.L. SINGLETON. 1969. Identification of three flavan-3-ols from grapes. Phytochemistry 8:1553–1558.

SUSSMAN, M. 1997. *Escherichia coli*: mechanisms of virulence. Cambridge University Press, UK. 639 p.

TAKABAYASHI, F., N. HARADA, M. YAMADA, B. MUROHISA Y I. OGUNI. 2004. Inhibitory effect of green tea catechins in combination with sucralfate on *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. Journal of Gastroenterology 39:61–63.

TAVARES, L., I. FIGUEIRA, D. MACEDO, G.J. McDOUGAL, M.C. LEITAO, H.L.A. VIEIRA, D. STEWART, P. ALVES, R. FERREIRA y C.N. SANTOS. 2012. Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry* 131:1443-1452.

TAYLOR, D.N., Y M.J. BLASER. 1991. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiology Review* 13:42-59.

TAYLOR, D.N. Y J. PARSONNET. 1995. Epidemiology and natural history of *H. pylori* infections of the gastrointestinal tract. En: BLASER, M.J., P.F. SMITH, J. RAVDIN, H. GREENBERG Y R.L. GUERRANT (Ed). New York: Raven Press, 551-564 p.

TOMB, J.F., O. WHITE, A. KERLAVAGE, R. CLAYTON, G. SUTTON, R. FLEISCHMANN, K. KETCHUM, ET AL. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature* 388: 539-547

TOMBOLA, F., S. CAMPELLO, L. DE LUCA, P. RUGGIERO, G. DEL GIUDICE, E. PAPINI Y M. ZORATTI. 2003. Plant polyphenols inhibit VacA, a toxin secreted by the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *FEBS Letters* 543:184–189.

TSUCHIYA, H., M. SATO, T. MIYAZAKI, S. FUJIWARA, S. TANIGAKI, M. OHYAMA, T. TANAKA Y M. IINUMA. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Ethnopharmacology* 50:27–34.

UEMURA, N., S. OKAMOTO, S. YAMAMOTO, N. MATSUMURA, S. YAMAGUCHI, M. YAMAKIDO *et al.* 2001. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *New England Journal of Medicine* 345(11):784–9.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). 2003. Agricultural Research Service: USDA database for the flavonoid content of selected foods. Washington, DC, EE.UU.

VALLEJOS, C., O. CERDA, M. VALENZUELA Y H. TOLEDO. 2003. Resistencia antimicrobiana en *Helicobacter pylori*: aspectos clínicos y moleculares. Revista Médica de Chile 131:1313-1320.

VATTEM, D. A., Y.-T. LIN, R. GHAEDIAN Y K. SHETTY. 2005. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. Process biochemistry (40):1583-1592.

WAGNER, H Y G. ULRICH-MERZENICH. 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. Phytomedicine 16: 97–110

WEISSE, M. E., B. EBERLY Y D.A. PERSON. 1995. Wine as a digestive aid: Comparative antimicrobial effects of bismuth salicylate and red and white wine. British Medical Journal 311(7021):1657–1660.

WU, H., X.D. SHI, H.T. WANG, J.X. LIU. 2000. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxycillin. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 46:121-3.

XIA, E.Q., G-F. DENG, Y-J GUO Y H-B LI. 2010. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. International Journal of Molecular Sciences 11:622-646

YAMADA, M., B. MUROHISA, M. KITAGAWA, Y. TAKEHIRA, K. TAMAKOSHI, N. MIZUSHIMA *et al.* 1998. Effects of tea polyphenols against *Helicobacter pylori*. En: SHIBAMOTO, T., J. TERAOKA, T. OSAWA (Ed). Functional foods for disease prevention I, fruits, vegetables, and teas. ACS Symposium Series, vol. 701. Cary: Oxford University Press. 217–38p.

YAMAOKA, Y. 2008. Roles of the plasticity regions of *Helicobacter pylori* in gastroduodenal pathogenesis. *Journal of Medical Microbiology* 57:545–553.

YEE, Y-K. Y M.W-L. KOO. 2000. Anti-*Helicobacter pylori* activity of Chinese tea: *in vitro* study. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 14: 635-638.

YANAGAWA, Y., Y. YAMAMOTO, Y. HARA Y T. SHIMAMURA. 2003. A Combination Effect of Epigallocatechin Gallate, a Major Compound of Green Tea Catechins, with Antibiotics on *Helicobacter pylori* Growth *In vitro*. *Current Microbiology* 47(3): 244-249

YEE Y.K. Y M.W. KOO. 2000. Anti-*Helicobacter pylori* activity of Chinese tea: *in vitro* study. *Alimentary pharmacology and therapeutics* 14(5):635–638.

YOON S., H. JEONG, S. KWON Y J. KIM. 2009. Genomics, biological features and biotechnological applications of *Escherichia coli* B: “Is B for better?” En: LEE, S.(Ed). *System biology and biotechnology of Escherichia coli*. Springer, Korea. 462p.

ZAFRA-STONE, S., T. YASMIN, M. BAGCHI, A. CHATTERJEE, J. VINSON Y D. BAGCHI. 2007. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition & Food Research* 51:675 – 683.

ZHANG, L., Y. KONG, D. WU, H. ZHANG, J. WU, J. CHEN, J. DING, L. HU, H. JIANG y X. SHEN. 2008. Three flavonoids targeting the β -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase from *Helicobacter pylori*: Crystal structure characterization with enzymatic inhibition assay. *Protein Science* 17:1971-1978