

Subproductos de la industria enológica como herramientas en

el control del patógeno humano *Helicobacter pylori*

J. M. Silván¹, M. Martínez-Miranda¹, S. Baeza Labrador¹, T. Alarcón Cavero²,
M. Prodanov¹, A. J. Martínez-Rodríguez¹

1-Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL)
C/ Nicolás Cabrera, 9, 28049, Madrid.

2- Hospital Universitario de la Princesa. C/ Diego de León 62, 28006, Madrid.

E-mail: adolfo.martinez@csic.es



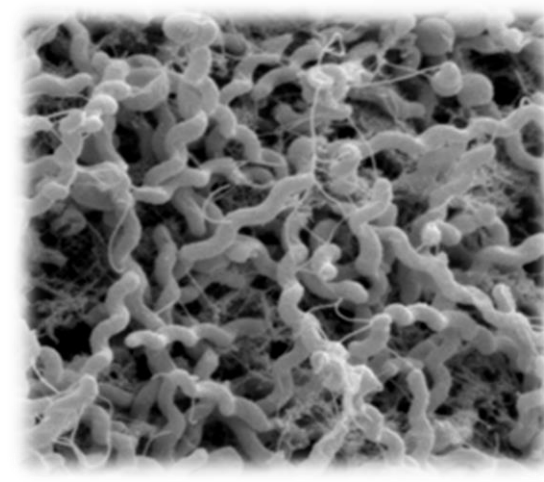
RESUMEN

Helicobacter pylori (*H. pylori*) es uno de los principales patógenos humanos y afecta aproximadamente al 50% de la población mundial¹. Habitualmente se ha utilizado una terapia basada en diferentes antibióticos para su control. Sin embargo, en los últimos años se han incrementado de forma significativa las cepas resistentes, por lo que se requieren nuevas herramientas terapéuticas para su tratamiento². En el presente trabajo, se ha evaluado el efecto antimicrobiano de un extracto de semilla de uva preparado a partir de subproductos de vinificación, y se pudo comprobar que el extracto fue capaz de inhibir el crecimiento de todas las cepas estudiadas en un rango entre 4 y 8 log UFC/mL, lo que pone en evidencia su potencialidad como antimicrobiano frente a *H. pylori*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

- ✓ Cepas Hp1-Hp5: Aislamientos clínicos realizados a partir de biopsias de estómago.
- ✓ Medio líquido utilizado: Brucella Broth (BB) suplementado con suero de caballo (10%).
- ✓ Medio sólido utilizado: Agar Mueller Hinton suplementado con sangre de cordero (5%).
- ✓ Condiciones de cultivo: Reactivación de las cepas en MHB e incubación durante 48 h a 37°C en condiciones de microaerofilia utilizando un incubador de atmósfera variable (VAIN) (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂).



2. Determinación de la Resistencia/Sensibilidad a los antibióticos más utilizados

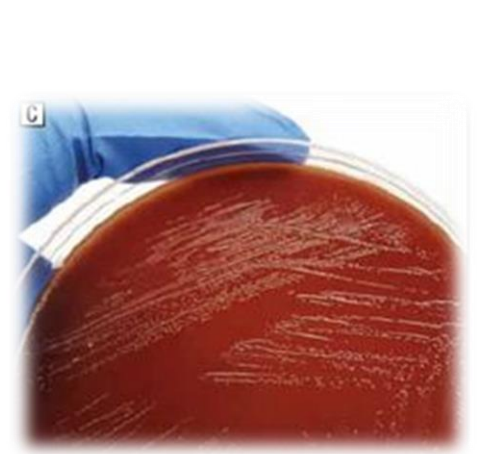
- ✓ Se estudió la sensibilidad antibiótica utilizando el E-test (Biomérieux).
- ✓ Se analizaron los siguientes antibióticos (Amoxicilina (AMX), claritromicina (CLA), rifampicina (RIF), levofloxacino (LEV), tetraciclina (TET) y metronidazol (MTZ).
- ✓ La tira de E-test contiene 15 diluciones seriadas desde 0,016 µg/ml hasta 256 µg/ml para AMX, CLA, TET y MTZ y desde 0,002 µg/ml hasta 32 µg/ml para LEV y RIF.
- ✓ Las placas se incubaron durante 3-5 días a 37°C en el VAIN. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se calculó como el valor obtenido en el punto donde intersecciona el extremo de la elipse de inhibición con la tira de E-test.
- ✓ Se siguieron los puntos de corte recomendados por el Comité Europeo de Análisis de la Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST, 2018).



3. Actividad antibacteriana

Ensayo:

- 1 mL del extracto disuelto en BB (control crecimiento)
- 4 mL BB
- 50 µL del inóculo bacteriano (1x10⁸ UFC/mL)
- Incubación durante 24 h a 37°C, 130 rpm, en condiciones de microaerofilia (VAIN)
- Siembra en placa de diluciones seriadas decimales en agar MHB – Incubación en VAIN 72-96h
- Determinación de la capacidad inhibitoria del extracto (1 mg/mL) por recuento de las UFC/mL



4. Caracterización de la composición fenólica por HPLC-MS

- ✓ El método de HPLC se llevó a cabo según las condiciones descritas por Avila et al. (2009) [3].
- ✓ El método de HPLC-MS se llevó a cabo según las condiciones descritas por Silván et al. (2013) [4].

RESULTADOS

Estudio de la resistencia a antibióticos de las cepas utilizadas:

Tabla 1: Estudio de la resistencia de las 5 cepas estudiadas a los antibióticos más utilizados frente a *H. pylori*.

Cepas de <i>H. pylori</i>	MTZ	CLA	AMX	TET	LEV	RIF
Hp1	R	R	S	S	S	R
Hp2	R	R	S	R	S	R
Hp3	R	R	R	S	S	R
Hp4	R	R	S	S	R	R
Hp5	R	S	S	S	S	S

MTZ: metronidazol; CLA: claritromicina; AMX: amoxicilina; TET: tetraciclina; LEV: levofloxacino; RIF: rifampicina

El presente trabajo reveló que todas las cepas estudiadas fueron resistentes a 3 o más antibióticos de los utilizados habitualmente en el tratamiento de *H. pylori*, por lo que pueden considerarse cepas multiresistentes. Los antibióticos más efectivos fueron la amoxicilina, la tetraciclina y el levofloxacino.

Actividad antibacteriana del extracto obtenido a partir de subproductos de vinificación

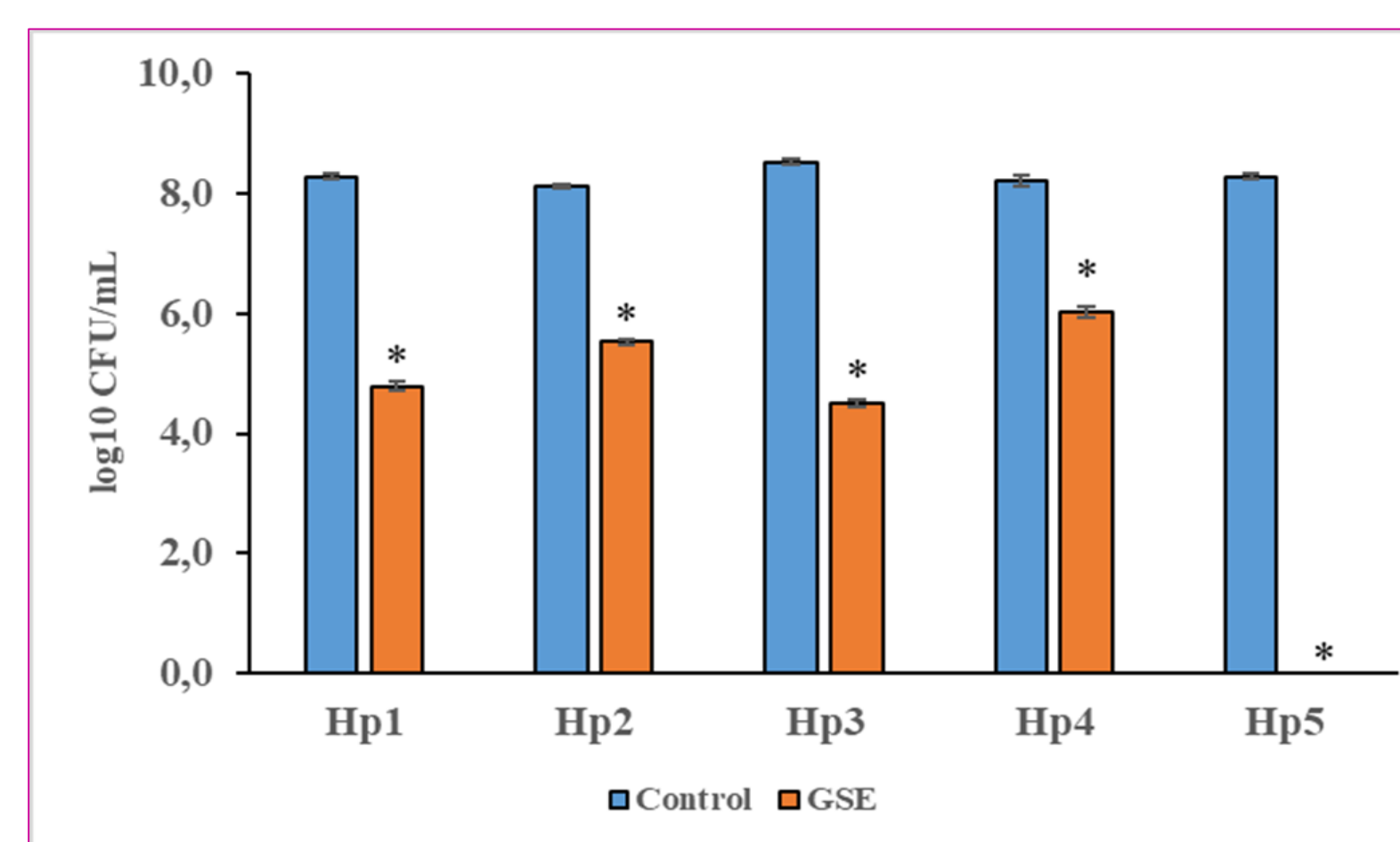


Fig 1. Efecto del extracto antibacteriano obtenido a partir de subproductos de vinificación (GSE) (1 mg/mL) sobre la viabilidad de 5 cepas diferentes de *H. pylori*. Los resultados representan los valores medios ± la desviación estándar (n=3). *Diferencias significativas (p<0,05) respecto al control experimental.

El extracto obtenido a partir de subproductos de vinificación y utilizado en este trabajo presentó actividad antibacteriana sobre las cinco cepas estudiadas, provocando una reducción aproximada entre 4 y 8 log en dependencia de la cepa analizada.

Caracterización de la composición fenólica del extracto

Tabla 2: Composición en fenoles individuales del extracto utilizado (mg/L de extracto)

Compuestos fenólicos	mg/L
Flavonoles	
Quercetina	37,9 ± 1,1
Quercetina-3-rutinosido	24,0 ± 0,3
Quercetina-3-glucosido	94,4 ± 0,7
Quercetina-3-rhamnosido	89,4 ± 0,5
Quercetina-3-glucuronido	70,3 ± 0,6
Miricetina-3-glucosido	47,6 ± 0,4
Kämpferol	15,2 ± 2,1
Koempferol-3-rutinosido	10,1 ± 0,1
Koempferol-3-glucosido	28,0 ± 0,5
Ácidos Fenólicos	
Ácido Gálico	26,0 ± 1,3
Ácido Siríngico	20,4 ± 0,4
Flavonoles	
Catequina	88,0 ± 6,6
Epicatequina	156,7 ± 12,2
Procianidina B1	83,3 ± 4,3
Procianidina B2	110,2 ± 9,0
Procianidina (dímero)	18,1 ± 0,2
Procianidina (trímero)	96,1 ± 10,4
Galato de Epicatequina	25,9 ± 1,5
Antocianinas	
Delphinidina-3-glucosido	23,1 ± 0,3
Peonidina-3-glucosido	71,3 ± 0,6
Malvidina-3-glucosido	125,7 ± 0,8
Malvidina-3-glucosido-acetato	1,8 ± 0,1
Estilbenos	
t-Resveratrol	7,2 ± 0,0
t-Piceido	27,9 ± 0,7
Concentración de Fenoles Totales (mg GAE/L)	2060,2 ± 104,3

Los flavonoles (catequinas y proantocianidinas) fueron los compuestos fenólicos mayoritarios, representando alrededor del 75,4% de los compuestos fenólicos totales presentes en el extracto. Detrás se ubicaron los flavonoles (32,4%). Las antocianinas, los ácidos fenólicos y los estilbenos estuvieron en menor proporción.



CONCLUSIONES

- ✓ Existe un gran número de cepas resistentes a las principales opciones terapéuticas utilizadas en el tratamiento de la infección por *H. pylori*, lo que indica la importancia de encontrar alternativas a los antibióticos más utilizados.
- ✓ Los subproductos de la industria enológica constituyen una fuente económica de compuestos bioactivos que por sus propiedades antimicrobianas podrían ser de utilidad como opción terapéutica frente a *H. pylori*, contribuyendo también a aliviar el problema medioambiental de gran impacto ecológico que representan estos vertidos.
- ✓ Dentro de los componentes bioactivos del extracto, los compuestos fenólicos han demostrado ser particularmente efectivos, lo que los convierte en una herramienta económica y accesible en la búsqueda de alternativas antimicrobianas frente a *H. pylori*.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos AGL 2013-47694-R y AGL 2017-89566-R.

REFERENCIAS: [1] Parreira et al. (2016). *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 94-105. [2] Thung et al. (2016). *Alimen. Pharmacol. Ther.*, 43, 514-533. [3] Avila et al. (2009). *Food Res. Int.*, 42, 1453-1461. [4] Silván et al. (2013). *Food Control*, 29, 25-31.