

## INFORME CIENTÍFICO FINAL

### BECA DE ENTRENAMIENTO 2013

#### COMISIÓN DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS DE LA PCIA. DE BUENOS AIRES

## **POLIFENOLES SALUDABLES EN PAPA: SU POSIBLE USO COMO AGENTES ANTIMICROBIANOS**

**DIRECTORA DE BECA: DRA. ADRIANA B. ANDREU**

**LUGAR DE TRABAJO: INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS (IIB) E INSTITUTO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGÍA (INE) “DR. J HARA”**

### RESUMEN

La papa (*Solanum tuberosum*) es el tercer cultivo de importancia alimentaria en el mundo. Es un alimento muy nutritivo debido a su alto contenido de almidón, vitaminas hidrosolubles, minerales y fibras. También posee sustancias antioxidantes beneficiosas para la salud como los polifenoles (ácido clorogénico, flavan-3-oles y antocianinas). El presente trabajo tuvo por objetivo determinar la potencial actividad bactericida de dichos polifenoles sobre *Escherichia coli*.

Se trabajó con extractos polifenólicos de piel y pulpa de tubérculos de variedades de papa de las subespecies *tuberosum* (de consumo masivo) y *andigena* (con mayor contenido de polifenoles), seleccionadas por tener diferente composición de compuestos polifenólicos. Se realizaron ensayos *in vitro* en los que se registró el desarrollo de colonias en suspensiones bacterianas sometidas a distintas dosis de extractos. El agente antimicrobiano se incorporó a los tubos conteniendo medio líquido y el inóculo bacteriano, de manera que en cada uno haya una concentración de polifenoles diferente. Se utilizaron dos técnicas distintas para determinar el crecimiento bacteriano resultante en cada tubo. Se observó actividad bacteriostática (inhibición de la proliferación bacteriana) en extractos de piel de tubérculo de la variedad andina CL 658 con la cepa de colección *E. coli* ATCC 29522. Además, extractos de piel de la variedad industrial Summerside y de pulpa de la variedad andina CCS 1307, mostraron actividad bactericida (inviabilización permanente del microorganismo) contra la cepa de colección antes mencionada.

Dado el alto consumo de papa, el impacto de los resultados radica tanto en la contribución para futuros criterios de selección y mejoras genéticas del producto, como en la revalorización de la papa como alimento funcional o nutraceutico.

### PALABRAS CLAVE

polifenoles, papa, actividad antimicrobiana, bactericida, bacteriostático.

### INTRODUCCIÓN

#### La papa como alimento funcional

La papa es un alimento nutritivo que desempeña funciones energéticas debido a su alto contenido de almidón, y funciones regulatorias por su elevado contenido de vitaminas hidrosolubles, minerales y fibras (Buckenhusk, 2005). Además, algunas variedades poseen cantidades significativas de sustancias antioxidantes, metabolitos secundarios del grupo de los polifenoles como por ejemplo ácido clorogénico, flavan-3-oles y antocianinas. Los niveles de polifenoles aumentan en papa y otros tejidos vegetales como protección contra el daño mecánico, defensa de patógenos y herbívoros (Friedman, 1997). Además, en los últimos años han cobrado gran interés en la salud humana por sus propiedades beneficiosas como agentes antioxidantes (Camire et al., 2009) y antimicrobianos. Estas propiedades nutraceuticas (“nutra” deriva de nutrición y “céutica” de farmacéutico) propias de los polifenoles y presentes en la papa, convierten a ésta en un alimento funcional (definido como alimento que puede proporcionar beneficios de salud más allá de su valor básico nutritivo).

La cantidad y actividad antioxidante de los polifenoles saludables en la papa son variables entre las diferentes variedades y pueden ser hasta cinco veces menores que en otros vegetales (Camire et al., 2009). Sin embargo, su elevado consumo hace que la papa aporte gran cantidad de polifenoles a la dieta humana. Además, existen aproximadamente 4000 variedades de papa en todo el mundo, muchas de las cuales contienen niveles elevados de polifenoles saludables.

### Polifenoles antimicrobianos

La actividad antimicrobiana de los polifenoles de origen natural frente a una amplia gama de microorganismos ha sido extensamente estudiada. Los polifenoles que mostraron una mayor actividad antimicrobiana fueron los ácidos fenólicos (cafeico y cumárico) (Aires et al., 2013), flavonoides (flavonas, flavononas y flavonoles) y taninos (Quideau et al., 2011). Las propiedades antimicrobianas de ciertas clases de polifenoles han sido propuestas para desarrollar nuevos conservantes para alimentos (Rodríguez Vaquero et al., 2010). Esto surge por un lado, debido a la presión de los consumidores cada vez mayor en la industria alimentaria para evitar conservantes sintéticos, y por otro lado para el desarrollo de terapias innovadoras en el tratamiento de diversas infecciones microbianas (Jayaraman et al., 2010), teniendo en cuenta el aumento de la resistencia microbiana convencional en la terapia con antibióticos.

El mecanismo general de la actividad antimicrobiana puede incluir: daño sobre la membrana citoplasmática causada por perforación y/o reducción de la fluidez, desestabilización del medio intracelular y consecuente muerte celular; inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Mori et al., 1987), causada por inhibición de la topoisomerasa e inhibición metabólica, causada por inhibición de la NADH-citocromo c reductasa (Plaper et al., 2003)

En lo que respecta a los polifenoles saludables, el ácido clorogénico es conocido por tener una fuerte actividad antibacteriana y antifúngica (Davidson & Branen, 1981). La porción activa del ácido clorogénico es el ácido cafeico (Grodzinska-Zachwieja & Kahl, 1966), que pertenece a los ácidos de la serie cinámica y presentan efectos antimicrobianos frente a varios microorganismos, incluyendo a *E. coli* (Almeida et al., 2006). Los flavan-3-oles como las catequinas, conocidas a partir de la década del 90 cuando se demostró que estos compuestos se encuentran presentes en el té verde, inhiben el crecimiento *in vitro* de especies bacterianas como *Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Campilobacter jejuni*, *Clostridium perfringens* y *E. coli* (Isogai et al., 1998). Más recientemente, se demostró que las catequinas operan a niveles nanomolares contra otras bacterias patógenas transmitidas por los alimentos, como *Bacillus cereus*. La mayoría de estos compuestos fueron más activos que los antibióticos, tales como tetraciclina o vancomicina, a concentraciones comparables. Esto sugirió que las catequinas del té podrían ejercer un efecto positivo contra las enfermedades gastrointestinales (Friedman et al., 2006).

### Polifenoles saludables y Síndrome Urémico Hemolítico

*E. coli* es un microorganismo comensal presente en la flora intestinal del ser humano. No obstante, algunas cepas son patógenas y pueden producir infecciones entéricas como diarrea, disentería, colitis hemorrágica y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) (Paton & Paton, 1998; Walker et al., 2012). Las cepas de *E. coli* productoras de diarrea pueden clasificarse en dos grandes tipos: STEC (productoras de toxina Shiga), y no STEC (enterotoxigénica, enteroinvasiva, enteropatogénica y enteroagregativa), las cuales presentan diferentes mecanismos patogénicos (Caprioli et al., 2005).

Las STEC son parte de la microbiota intestinal de un amplio grupo de animales. El reservorio más importante para las infecciones humanas lo constituyen bovinos y porcinos, y por tanto es una infección zoonótica. Este microorganismo se adquiere fundamentalmente a través del consumo de alimentos contaminados. También, se puede transmitir en forma directa desde una persona infectada a otra porque la dosis infectante es baja (< 200 UFC) (Beutin & Martin, 2012). Las STEC producen verotoxinas que actúan en el colon.

La colitis hemorrágica producto de cepas *E. coli* tipo STEC puede derivar en una falla aguda del riñón o en SUH en el 5 % de los infectados. Este síndrome es la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños menores de 5 años, causando la muerte en un 3 a 5 % de los que lo padecen o dejando secuelas para toda la vida como insuficiencia renal crónica, hipertensión arterial y alteraciones neurológicas. En Argentina, se informa que hay alrededor de 400 casos de SUH por año en niños menores de 5 años,

constituyendo el país de mayor incidencia en cantidad de casos por habitante en el mundo. Los antibióticos en general no son efectivos para el tratamiento del SUH, y aumentan la gravedad del cuadro, posiblemente por una mayor liberación y absorción de las citotoxinas, ya que son potentes inductores de la expresión del gen de la shiga-toxina 2 e incrementan el nivel de toxina en intestino (Córdoba et al., 2007). En consecuencia, la actividad antibacteriana de los polifenoles saludables sobre *E. coli* tipo STEC podrían ser de utilidad como terapia alternativa para el tratamiento del SUH.

En base a lo expuesto, en nuestro grupo de investigación se demostró que extractos polifenólicos de pulpa y piel de las variedades industriales Summerside, Halifax y Sagitta, con perfiles de metabolitos diferentes (Tabla 1), tienen actividad antimicrobiana sobre la cepa de *E. coli* ATCC 25922. No se encontró actividad sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 en ninguna de las variedades estudiadas (Negrin et al., 2013). A su vez, extractos polifenólicos de la variedad andina CL658 (con elevados niveles de polifenoles saludables, Tabla 1) mostraron actividad inhibitoria sobre la cepa de *E. coli* ATCC 25922, con un valor de CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) de 256 µg/ml ácido clorogénico equivalentes (Damiano, pasantía de Investigación UNMDP- OCA 1978/13. Director: Lanteri Tutor: Lavayén). Estos antecedentes constituyeron una base para la continuidad de dichos estudios, en los que se pretende profundizar en el conocimiento de la actividad antimicrobiana de extractos polifenólicos de distintas variedades de papa frente a cepas de *E. coli* relevantes a nivel sanitario.

Tabla 1. Descripción del contenido de metabolitos en piel y pulpa de las variedades de papa utilizadas/mencionadas en este trabajo según Valiñas et al. 2011.

Variedades Industriales	Variedades Andinas
Summerside: contenido intermedio fenoles totales en pulpa, intermedios a altos en piel. Baja relación fenoles totales piel/pulpa. Halifax: elevado contenido fenoles totales en pulpa y piel. Baja relación fenoles totales piel/ pulpa. Sagitta: bajo contenido fenoles totales en pulpa, intermedios a altos en piel. Elevada relación fenoles totales piel/ pulpa.	CL 658: elevados niveles de fenoles totales, antocianinas y flavan-3-oles en pulpa y piel. CCS 1307: bajos niveles de fenoles totales en pulpa y altos en piel. Bajos niveles de flavan-3-oles en pulpa e intermedios en piel. Altos niveles de antocianinas en piel. Ausencia de antocianinas en pulpa.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### Preparación de extractos polifenólicos

Se trabajó con piel y pulpa de las variedades Summerside (industrial), y de las variedades CL 658 y CCS 1307 (andinas, Figura 1). La extracción se realizó a partir de 1 gramo de tejido, el cual se pulverizó en N<sub>2</sub> líquido y se homogeneizó con 25 ml de metanol 90 %, se vortexó durante 30 s y se agitó durante 60 min a 4 °C en la oscuridad. Después de centrifugar a 6000 rpm durante 20 min a 4 °C, el sobrenadante se concentró en rotavapor hasta obtener 300 µl y se agregó 700 µl de agua bidestilada. Se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min, se recuperó el sobrenadante y se filtró en flujo laminar utilizando una membrana Millex-LG de 0,22 µm (Millipore).



Figura 1. Variedades de papa utilizadas.

### Determinación de fenoles totales

A partir de los extractos polifenólicos se determinó espectrofotométricamente el contenido de ácidos fenólicos totales según la reacción de Folin-Ciocalteu, expresándose en µg de ácido clorogénico equivalentes/ml.

### Actividad Antimicrobiana

Con el fin de determinar la actividad antimicrobiana de los polifenoles presentes en las diferentes variedades de papa, se utilizó como modelo la cepa de colección *E. coli* ATCC 29522 (ver Nota), tanto por poseer un fenotipo de referencia como por los resultados previos del grupo (Negrin et al, 2013). Se realizaron ensayos *in vitro* en los que se sometió a una suspensión bacteriana de concentración conocida a distintas dosis de extracto polifenólico. El agente antimicrobiano se incorporó a una serie de tubos con medio líquido (Caldo Müller Hinton) de manera que contuvieran concentraciones diferentes de polifenoles. A cada uno de estos tubos se incorporó un inóculo de  $5.10^5$  UFC/ml (concentración final) de la cepa a estudiar, ajustado mediante la escala turbidimétrica de Mac Farland. Se procesaron de igual manera controles negativos con medio de cultivo o solvente de extracción, y controles positivos con ácido clorogénico comercial o el antibiótico gentamicina.

Dos protocolos diferentes fueron ensayados con el fin de detectar el crecimiento bacteriano.

El primero es el estándar para la determinación de CIM (Concentración Inhibitoria Mínima) y CBM (Concentración Bactericida Mínima) recomendado por el manual del Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), según el cual se observó, luego de 24 hs de incubación a 37 °C, la presencia de turbidez en los tubos en relación a un blanco sin inocular. La CIM se determinó entonces como la mínima concentración de extracto polifenólico que no producía turbidez en el tubo, entendida como ausencia de crecimiento bacteriano. Para determinar la CBM, se inocularon 100 µl de los tubos sin evidencia de desarrollo microbiano en un medio sólido y nutritivo como el Agar Sangre. Las placas se incubaron a 37 °C y luego de 24 hs se observó la formación de colonias. La CBM representó la menor concentración de extracto en la que el crecimiento microbiano fue nulo.

El segundo protocolo consistió en incubar tubos conteniendo distintos tratamientos durante distintos tiempos (8, 24 y 32 hs) a 37 °C. A continuación, se realizó el recuento de colonias mediante inoculación en medio sólido nutritivo (Agar Sangre) e incubación durante 24 hs a 37 °C (Cho et al., 2007). Esta técnica permitió cuantificar el efecto bactericida de los extractos estudiados.

*Nota: La cepa de E. coli de colección ATCC 25922 fue provista por el Laboratorio de Bacteriología del Instituto Nacional de Epidemiología (INE) "Dr. Juan H Jara". La extracción y cuantificación de polifenoles se realizó en el laboratorio Biología Comparativa en Solanáceas, mientras que el análisis antibacteriano se llevó a cabo en el INE.*

### Caracterización analítica de extractos polifenólicos

A partir de los extractos polifenólicos se cuantificaron los niveles de ácido clorogénico, ácido cafeico, ácido cumárico y ácido ferúlico, mediante DAD-HPLC. La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo utilizando un sistema Agilent 1100 equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de arreglo de diodos. Se utilizó una velocidad de flujo de 1 ml/ min. Se inyectaron 20 µl de las muestras en una columna C-18 Phenomenex Luna (250 x 4,6 mm diámetro interno; 5 µm de tamaño de partícula). Las fases móviles fueron (A) acetonitrilo y (B) buffer pH 2,3 (agua de calidad HPLC acidificada con H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). El gradiente de solventes fue el siguiente: gradiente lineal de 20 % - 100 % entre 0 - 20 min, luego nuevamente a 20 % 25 min y se mantuvo hasta 30 min. La identificación de los metabolitos de interés se realizó por comparación de los tiempos de retención y los espectros de absorción de estándares disponibles comercialmente (Sigma) corridos bajo las mismas condiciones cromatográficas. El contenido de ácidos fenólicos se expresó en µg g<sup>-1</sup> PF (peso fresco).

## **RESULTADOS**

### Determinación de fenoles totales

Se determinó espectrofotométricamente el contenido de ácidos fenólicos totales de los extractos obtenidos según la reacción de Folin-Ciocalteu. En la Tabla 2 se muestran los rendimientos de fenoles totales obtenidos para cada variedad en función del peso fresco. Se observa que la mayor concentración de fenoles por gramo de tejido se obtiene en los extractos de piel de la variedad andina CL 658, seguido por los extractos de piel de Summerside y de pulpa de CCS 1307.

Tabla 2. Contenidos de fenoles totales expresados en  $\mu\text{g}$  ácido clorogénico equivalentes  $\text{g}^{-1}$  PF obtenidos mediante la reacción de Folin-Ciocalteu.

	Extracto		
	Piel CL 658	Piel Summerside	Pulpa CCS 1307
Fenoles totales ( $\mu\text{g}$ ác. clorogénico equivalentes/g PF)	309	138	101

#### Actividad antimicrobiana

Mediante el protocolo estándar para la determinación de actividad antibacteriana, se encontró un valor de CIM de 256  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ácido clorogénico equivalentes tanto para el extracto de piel de la variedad andina CL 658 como para el control positivo con ácido clorogénico comercial (Tabla 3). El valor de CIM para el antibiótico gentamicina fue de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , coincidente con lo reportado en bibliografía. La CBM para el ácido clorogénico comercial fue de 512  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , y para gentamicina fue de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Este dato no pudo obtenerse para el extracto de piel de CL 658 (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de CIM y CBM para distintos antimicrobianos, obtenidos con el protocolo estándar recomendado por el manual del Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), en *E. coli* ATCC 25922. (-) Dato no obtenido.

Antimicrobiano	CIM ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	CBM ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
Gentamicina	1	2
Ácido clorogénico comercial	256	512
Extracto de piel de CL 658	256	(-)

La Figura 2 muestra fotos del ensayo realizado con los controles ácido clorogénico comercial (A) y gentamicina (B). Se observa limpieza (correspondiendo a la CIM) a partir de la dosis 256  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para ácido clorogénico, y de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para gentamicina.

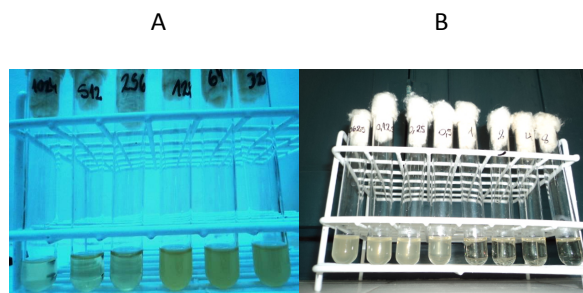


Figura 2. Determinación de la CIM para ácido clorogénico comercial (A) y gentamicina (B) en *E. coli* ATCC 25922. (A) Dosis de ácido clorogénico de izquierda a derecha: 1024  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 512  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 256  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 128  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 64  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 32  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . (B) Dosis de gentamicina de izquierda a derecha: 0,0625  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0,125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  y 8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos con el segundo protocolo. Como se esperaba, los controles negativos con Caldo Müller Hinton y solvente de extracción no tuvieron efecto sobre el crecimiento bacteriano. El control positivo de gentamicina 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  resultó en un efecto bactericida total en los tres tiempos estudiados, mientras que las concentraciones 512 y 1024  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ácido clorogénico comercial mostraron el mismo efecto luego de 24 y 32 hs de incubación. Sorprendentemente, el extracto de piel de CL 658 carece de efecto bactericida hacia *E. coli* ATCC 29522 a todos los tiempos ensayados (Tabla 4). Sin embargo, el extracto de piel de la variedad industrial Summerside mostró un efecto bactericida parcial (disminución del número de colonias respecto del control sin tratar) luego de 8 hs de incubación a 256 y 512  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ácido clorogénico equivalentes, y un efecto bactericida total (ausencia de

desarrollo de colonias) a una concentración de 1024 µg/ ml ácido clorogénico equivalentes en los tres tiempos estudiados (Tabla 4). El extracto de pulpa de la variedad andina CCS 1307 tuvo también un efecto bactericida total a una concentración de 1024 µg/ ml ácido clorogénico equivalentes (Tabla 4).

Tabla 4. Recuento de colonias (UFC/ ml) para cada tratamiento luego de 0, 8, 24 y 32 hs de incubación. (-) Dato no obtenido.

		Tiempo de incubación (hs)			
		0	8	24	32
UFC/ ml	Caldo Müller Hinton	203.333	>2.000.000	>2.000.000	>2.000.000
	Solvente de extracción (Metanol 30 %)	203.333	>2.000.000	>2.000.000	>2.000.000
	Gentamicina (1 µg/ ml)	203.333	0	0	0
	Ácido clorogénico (256 µg/ ml)	203.333	180.000	(-)	1.320.000
	Ácido clorogénico (512 µg/ ml)	203.333	(-)	0	0
	Ácido clorogénico 1024 µg/ml	203.333	(-)	0	0
	Piel CL 658 (128 µg/ ml)	203.333	>2.000.000	>2.000.000	>2.000.000
	Piel CL 658 (256 µg/ ml)	203.333	>2.000.000	>2.000.000	>2.000.000
	Piel CL 658 (512 µg/ ml)	203.333	>2.000.000	>2.000.000	>2.000.000
	Piel CL 658 (1024 µg/ ml)	203.333	>2.000.000	>2.000.000	>2.000.000
	Piel Summerside (128 µg/ml)	203.333	>2.000.000	>2.000.000	>2.000.000
	Piel Summerside (256 µg/ml)	203.333	990.000	>2.000.000	>2.000.000
	Piel Summerside (512 µg/ml)	203.333	120.000	>2.000.000	>2.000.000
	Piel Summerside (1024 µg/ml)	203.333	0	0	0
	Pulpa CCS 1307 (128 µg/ml)	203.333	(-)	>2.000.000	>2.000.000
	Pulpa CCS 1307 (256 µg/ml)	203.333	(-)	>2.000.000	>2.000.000
	Pulpa CCS 1307 (512 µg/ml)	203.333	(-)	>2.000.000	>2.000.000
Pulpa CCS 1307 (1024 µg/ml)	203.333	(-)	0	0	

En resumen, se demostró frente a la cepa *E. coli* ATCC 29522, el efecto bacteriostático del extracto de piel de la variedad andina de papa CL 658 (CIM 256 µg/ ml ácido clorogénico equivalentes), y los efectos bactericidas del extracto de piel de la variedad comercial Summerside y del extracto de pulpa de la variedad andina CCS 1307; así como también se confirmaron ambos efectos, reportados para el ácido clorogénico comercial (Figura 3).

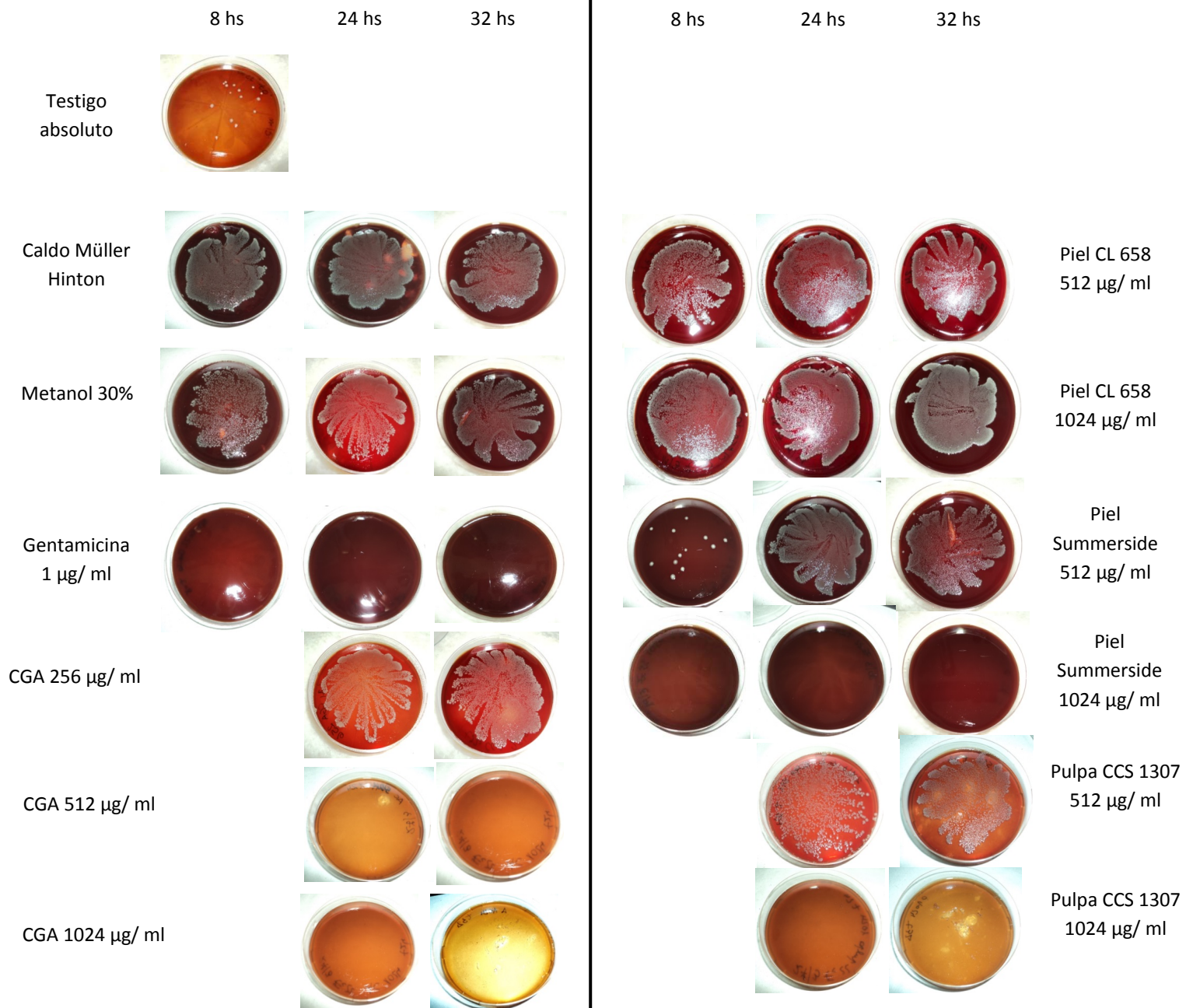


Figura 3. Crecimiento en medio sólido (Agar Sangre) de *E. coli* ATCC 25922 sometida a distintos tratamientos por distintos tiempos.

### Caracterización analítica de extractos polifenólicos

Considerando que los extractos de piel de Summerside y CL 658, y de pulpa de CCS 1307 mostraron actividad antimicrobiana se llevó a cabo un análisis cuali y cuantitativo de los ácidos fenólicos presentes en los mencionados extractos mediante DAD-HPLC. Como se observa, el extracto de piel de la variedad andina CL 658 posee los mayores niveles de todos los ácidos fenólicos evaluados, seguido del extracto de piel de Summerside y finalmente del extracto de pulpa de la variedad CCS 1307 (Tabla 5). Los resultados muestran que el ácido clorogénico es el ácido fenólico mayoritario en todos los extractos (78,8 a 92,5 %), siendo componentes minoritarios los ácidos cafeico, p-cumárico y ferúlico (0,4 % a 11,6 %) (Tabla 5). La piel de la variedad CL 658 es la de mayor contenido de ácido clorogénico relativo, mientras que el ácido cumárico y el ácido cafeico representan más del 10 % en piel de Summerside y en pulpa de CCS 1307, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Contenido de ácidos fenólicos en extractos de pulpa o de piel de tubérculos determinados por DAD-HPLC. Los valores se encuentran en  $\mu\text{g g}^{-1}$  PF. Los números entre paréntesis indican el porcentaje de cada metabolito con respecto a la suma total.

Extracto	Ácido Clorogénico	Ácido Cafeico	Ácido Cumárico	Ácido Ferúlico
Piel CL 658	119,74 (92,5)	7,45 (5,8)	0,56 (0,4)	1,71 (1,3)
Piel Summerside	4,95 (78,8)	0,43 (6,8)	0,69 (11,0)	0,21 (3,4)
Pulpa CCS 1307	1,45 (80,1)	0,21 (11,6)	0,06 (3,3)	0,09 (5,0)

## DISCUSIÓN

El ácido clorogénico es conocido por tener una fuerte actividad antibacteriana y antifúngica (Davidson & Branen, 1981), siendo activo frente a *E. coli* (Almeida et al., 2006). En el presente trabajo se demostró que el ácido clorogénico comercial posee actividad bacteriostática a 256  $\mu\text{g/ ml}$  y bactericida a 512  $\mu\text{g/ ml}$  frente a la cepa de *E. coli* ATCC 25922. Además, extractos polifenólicos de piel de la variedad andina CL 658 (alto contenido de antocianinas) mostraron actividad bacteriostática, con una CIM de 256  $\mu\text{g/ ml}$  ácido clorogénico equivalentes. Por su parte, extractos de piel de la variedad industrial Summerside (bajo contenido de antocianinas) y de pulpa de la variedad andina CCS 1307 (ausencia de antocianinas), tuvieron efectos bactericidas frente a *E. coli* ATCC 25922. Contrastando estos efectos con el análisis de los datos obtenidos por DAD-HPLC, se observa que la actividad bactericida coincide con los extractos con menor contenido relativo de ácido clorogénico y mayor contenido relativo de ácido cumárico o cafeico. Es decir, extractos con composiciones diferentes de ácidos fenólicos poseen diferente actividad biológica frente a *E. coli*. Por otra parte, podría sugerirse que la ausencia de actividad bactericida en la variedad coloreada CL 658 se correlaciona con su alto contenido de antocianinas.

El mecanismo general de la actividad antimicrobiana puede incluir: daño sobre la membrana citoplasmática causada por perforación y/o reducción de la fluidez, desestabilización del medio intracelular y consecuente muerte celular (Oroojalian et al., 2010); inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, causada por inhibición de la topoisomerasa e inhibición de la energía metabólica, o causada por inhibición de la NADH-citocromo c reductasa (Plaper et al., 2003). Por lo tanto, nos proponemos como objetivo dilucidar cuál o cuáles de estos mecanismos explican los efectos bactericidas observados.

Es de nuestro interés continuar el estudio de la actividad antimicrobiana en cepas de *E. coli* causantes de SUH como el serotipo O:157 H:7, principal causante de dicha patología; como así también conocer el contenido de otros metabolitos de interés tales como los flavan-3-oles (catequina y epicatequina) y las antocianinas (petunidina, cianidina, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina) presentes en los tejidos pigmentados. Con estos resultados se podrá determinar el metabolito responsable de dicha actividad para estudios farmacológicos.

Finalmente, se proyecta ahondar en la patogénesis del SUH y su interacción con los extractos de papa estudiados mediante: i) determinación de la respuesta inflamatoria del colon frente a cepas STEC en



ausencia o presencia de extractos polifenólicos y ii) cuantificación de la producción de Shiga toxina por dichas cepas en presencia o ausencia de extractos polifenólicos.

Teniendo en cuenta que se trata de una patología en la que el cuadro clínico empeora ante la administración de antibióticos, los resultados obtenidos podrían ser un aporte en la búsqueda de una posible terapéutica alternativa en estos casos.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Luciana Lanteri, Investigador Asistente del CONICET, perteneciente al grupo de investigación de la UINMDP “Biología Comparativa en Solanáceas” del IIB, por su constante guía y apoyo durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Adriana Andreu, Investigador Independiente del CONICET, por su permanente interés y predisposición para el análisis de resultados y de nuevas ideas.

Al Grupo de Biología Comparativa en Solanáceas en su totalidad, por las permanentes sugerencias, adiestramiento y palabras de aliento, aún a costa de restar tiempo de sus respectivos trabajos.

Al Dr. Osvaldo Uez, director de Investigación del INE, por permitirme realizar este trabajo en el mencionado instituto.

A la Lic. Silvina Lavayén y al Tco. Marcelo Zotta, del Servicio de Bacteriología del INE, por adiestrarme en las técnicas microbiológicas, por sus permanentes sugerencias y principalmente por brindarme su invaluable calidad humana en el trabajo diario.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aires A, Marques E, Carvalho R, Rosa EAS, MJ Saavedra. 2013. Evaluation of biological value and appraisal of polyphenols and glucosinolates from organic baby-leaf salads as antioxidants and antimicrobials against important human pathogenic bacteria. *Molecules*, 18: 4651-68.
- Almeida AA, Farah A, Silva DA, Nunan EA, MB Glória. 2006. *J Agric Food Chem*, 54(23):8738-43.
- Beutin L, A Martin. 2012. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J Food Prot*, 75(2):408-18
- Buckenhushkes HJ. 2005. Nutritionally relevant aspects of potatoes and potato constituents. En: *Potato in progress: Science and Meets Practice*. Eds. Haverkort, Struik
- Camire ME, Kubow S, Donnelly DJ. 2009. Potatoes and human health. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 49:823-40.
- Caprioli A, Morabito S, Brugère H, E Oswald. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res*. 36(3):289-311.
- Córdoba B, Blanco AR, Malawka Henain JS, V Ojeda. 2007. SINDROME UREMICO HEMOLITICO: Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina - N° 166: 25-31.
- Cho YS, Schiller NL, Kahng HY, KH Oh. 2007. Cellular responses and proteomic analysis of *Escherichia coli* exposed to green tea polyphenols. *Curr Microbiol*, 55(6): 501-6.
- Davidson PM, AL Branen. 1981. Antimicrobial activity of non-halogenated phenolic compounds. *J Food Prot*, 44: 623–32.
- Friedman M. 1997. Chemistry, biochemistry, and dietary role of potato polyphenols. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 1523-40.
- Friedman M, Henika PR, N Kozukue. 2006. Antimicrobial activities of tea catechins and the aflavins and tea extracts against *Bacillus cereus*. *J Food Prot*, 69: 354-61.
- Grodzinska-Zachwieja Z, W Kahl. 1966. Bacteriostatic action of chicory (*Cichorium intybus* L.) II. The action of chlorogenic and isochlorogenic acid. *Acta Biologica Cracoviensia Serie Botanica*, 9: 87-95.
- Isogai E, Isogai H, Takeshi K, T Nishikawa. 1998. Protective effect of Japanese green tea extract on gnotobiotic mice infected with an *Escherichia coli* O157:H7 strain. *Microbiol Immunol*, 42(2):125-8.
- Jayaraman P, Sakharkar MK, Lim CS, Tang TH, KR Sakharkar. 2010. Activity and interactions of antibiotic and phytochemical combinations against *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Int J Biol Sci*, 6: 556-68.
- Mori A, Nishino, C Enoki, N, S Tawata. 1987. Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoides against *Proteus vulgaris* and *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26: 2231-4.
- Negrin LM, Valiñas M, Suarez PA, de Lasa C, Caldiz D, Iurlina M, AB Andreu. 2013. “Compuestos fenólicos, actividad antioxidante y antimicrobiana en variedades de papa para industria cultivadas en la Argentina”. En: Vinculación

Tecnológica: De la Universidad Nacional de Mar del Plata al Medio Socio-Productivo” vol III. Eds. Malizia A.I., Belmonte J. y Mendez J. Pág. 35-39 Ed. EUDEM. Mar del Plata

- Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M, MR Bassami. 2010. Phytochemical composition of the essential oils from three Apiaceae species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 120: 765-770.
- Paton JC, AW Paton. 1998. Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev*, 11: 450-79.
- Plaper A, Golob M, Hafner I, Oblak M, Solmajer T, R Jerala . 2003. Characterization of quercetin binding site on DNA gyrase. *Biochem Biophys Res Com*, 306: 530-6.
- Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, L Pouysegu. 2011. Plant polyphenols. Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Chem Int Ed*, 50: 586-621.
- Valiñas M, Suarez PA, Digilio A, Clausen A, ten Have A, AB Andreu. 2011. Antioxidant-polyphenols in Andean potato varieties of the argentinean northwest. XLVII SAIB. Publicado en BIOCELL 35, pág 74. 30 de octubre y el 2 de noviembre, San Luis. ARGENTINA.
- Walker CL, Applegate JA, RE Black. 2012. Haemolytic-uraemic syndrome as a sequela of diarrhoeal disease. *J Health Popul Nutr*, 30(3): 257-61.