



**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo A.C.**

**INHIBICIÓN DE LA ADHESIÓN DE *Listeria*  
*monocytogenes* EN SUPERFICIES DE INTERÉS  
ALIMENTARIO APLICANDO EXTRACTOS DE RAQUIS DE  
UVA**

---

**Por:**

**I.I.A. FRANCISCO JAVIER VÁZQUEZ ARMENTA**

**TESIS APROBADA POR LA:**

**COORDINACIÓN DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS DE ORIGEN VEGETAL**

Como requisito parcial para obtener el grado de

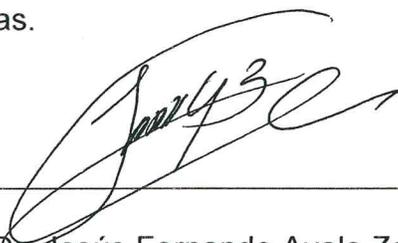
**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**Hermosillo, Sonora**

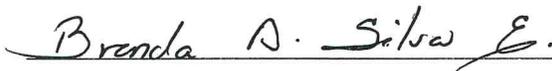
**Agosto de 2015**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis del I.I.A. Francisco Javier Vázquez Armenta, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.



Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala  
Director de Tesis



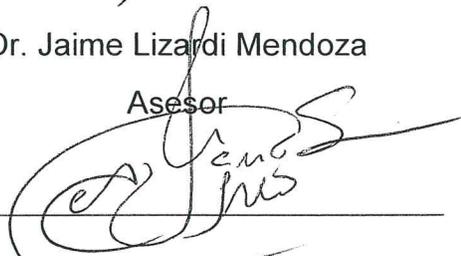
M. C. Brenda Adriana Silva Espinoza

Asesor



Dr. Jaime Lizardi Mendoza

Asesor



Dr. Gustavo Adolfo González Aguilar

Asesor



M. C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela

Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el apoyo económico brindado durante la realización de mis estudios de posgrado.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C.** por permitirme realizar mis estudios de maestría y poder alcanzar una meta importante en mi formación.

A la **Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal (CTAOV)**, por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de investigación en esta área, facilitándome sus equipos e instalaciones, así mismo para el personal que labora en esta coordinación.

A mi director de tesis el **Dr. Jesús Fernando Ayala Zavala**, por su gran apoyo, amistad y disposición para la realización de este proyecto.

A los miembros del comité de tesis: **M.C. Brenda A. Silva Espinoza, Dr. Gustavo A. González Aguilar, Dr. Jaime Lizardi Mendoza y M.C. Manuel Reynaldo Cruz Valenzuela** por su apoyo y asesoría en el transcurso de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Tecnologías Emergentes: **Melissa, Thalía, Rosy, Dalila, Luis, Melvin y Julián**, por los momentos compartidos, su amistad y su ayuda.

## DEDICATORIA

A mis padres **Lorena Armenta** y **Francisco Juárez**, por ser mi mayor motivación en esta etapa de mi vida, por todas sus enseñanzas y amor incondicional.

A mis hermanos **Humberto** y **Roel**, por todos los años de convivencia y brindarme siempre su apoyo.

A **Lizbeth Beltrán**, por brindarme su amor, compañía y su apoyo para alcanzar juntos esta meta.

Dedico en especial este trabajo a la memoria de mi abuela **Alicia Vizcarra (02/Febrero/1936 - † 01/Mayo/2014)**, por darnos siempre su amor, por su fortaleza y carácter único. Siempre estará en nuestros corazones, que en paz descanse.

## CONTENIDO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE CUADROS.....</b>	<b>x</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>xi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xii</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>4</b>
Adhesión de <i>L. monocytogenes</i> a Superficies Abióticas; un Problema de Inocuidad en la Industria Alimentaria.....	4
<b>Etapas de la adhesión de <i>L. monocytogenes</i> a superficies en contacto con alimentos y principales factores que afectan este proceso.....</b>	<b>6</b>
<b>Compuestos fenólicos como alternativas para el control de la adhesión de <i>L. monocytogenes</i> a superficies en contacto con alimentos.....</b>	<b>10</b>
Subproductos del Procesamiento de la Uva como Fuente de Compuestos Fenólicos con Actividad Antiadhesión.....	13
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos.....	21
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
Materia Prima.....	22
Obtención de Extractos de Raquis de Uva ricos en Compuestos Fenólicos.....	22
Identificación y Cuantificación de Compuestos Fenólicos en los Extractos de Raquis de Uva.....	23

## CONTENIDO (continuación)

<b>Contenido de Fenoles Totales.....</b>	<b>23</b>
<b>Contenido de Flavonoides Totales.....</b>	<b>23</b>
<b>Identificación y Cuantificación de los Compuestos Fenólicos en el extracto de Raquis de Uva Red Globe por UPLC-DAD.....</b>	<b>24</b>
<b>Identificación de los Compuestos Fenólicos en el Extracto de Raquis de Uva Carigan por HPLC-DAD.....</b>	<b>25</b>
Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Extractos de Raquis de Uva y sus Compuestos Fenólicos para <i>L. monocytogenes</i> .....	25
Efecto de los Extractos de Raquis de Uva sobre la Adhesión de <i>L. monocytogenes</i> en Superficies de Acero Inoxidable y Polipropileno.....	26
Efecto de los Extractos de Raquis de Uva sobre la Motilidad de <i>L. monocytogenes</i> .....	27
Energía Libre de Adhesión de <i>L. monocytogenes</i> expuesta a los Extractos de Raquis de Uva.....	28
<b>Determinación de la energía superficial de la solución salina (<math>\gamma^M</math>) y las superficies de acero inoxidable 304 y polipropileno (<math>\gamma^{SV}</math>).....</b>	<b>29</b>
<b>Determinación de la energía superficial de <i>L. monocytogenes</i> (<math>\gamma^{bV}</math>).....</b>	<b>29</b>
Efecto de los Compuestos Fenólicos Identificados en los Extractos de Raquis de Uva sobre la Adhesión de <i>L. monocytogenes</i> en Superficies de Acero Inoxidable.....	31
Análisis Estadístico.....	32
<b>RESULTADOS Y DISCUSIONES.....</b>	<b>33</b>
Contenido de Compuestos Fenólicos en los Extractos de Raquis de Uva.....	33
Efecto de los Extractos de Raquis de Uva sobre la Adhesión de <i>L. monocytogenes</i> en Superficies de Acero Inoxidable y Polipropileno.....	35
Efecto de los Extractos de Raquis de Uva en la Motilidad tipo <i>Swimming</i> de <i>L. monocytogenes</i> .....	40

## CONTENIDO (continuación)

Efecto de los Extractos de Raquis de Uva sobre la Energía Superficial y el Potencial de Adhesión de <i>L. monocytogenes</i> .....	43
Identificación de los Compuestos Fenólicos en los Extractos de Raquis de Uva.....	50
Efecto de los Compuestos Fenólicos Sobre la Adhesión de <i>L. monocytogenes</i> a Acero Inoxidable.....	54
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>60</b>
<b>RECOMENDACIONES Y ESTUDIOS FUTUROS</b> .....	<b>61</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>62</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Proceso de adhesión de <i>L. monocytogenes</i> a superficies en contacto con alimentos.....	7
2. Estructura química de los compuestos fenólicos con actividad antiadhesión de bacterias patógenas.....	14
3. Adhesión de <i>L. monocytogenes</i> (2 h a 25 °C) a superficies de acero inoxidable 304 (A) y polipropileno (B) en presencia de los extractos de raquis de uva Red Globe y Carigan. Los valores son medias de dos experimentos independientes $\pm$ el error estándar.....	37
4. Efecto del extracto de raquis de uva A) Red Globe y B) Carignan sobre la motilidad tipo <i>swimming</i> de <i>L. monocytogenes</i> durante 72 h de incubación a 30 °C.....	41
5. Energía superficial de <i>L. monocytogenes</i> expuesta a los extractos de raquis de uva. A) Control; B) Red Globe; C) Carignan. Los triángulos rojos y círculos azules representan los valores de la primera y segunda corrida experimental respectivamente.....	44
6. Correlación entre el número de células adheridas y la diferencia de energía superficial de <i>L. monocytogenes</i> y las superficies de acero inoxidable ( $\blacktriangle$ ) y polipropileno ( $\bullet$ ) ( $ \gamma^{bv} - \gamma^{sv} $ ).....	49
7. Estructuras de algunos compuestos fenólicos identificados en ambos extractos de raquis de uva.....	55
8. Adhesión de <i>L. monocytogenes</i> a superficies de acero inoxidable en presencia de compuestos fenólicos identificados en los extractos de raquis de uva (2 h a 25 °C). Los valores son medias de dos experimentos independientes $\pm$ el error estándar.....	57

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Número de casos, hospitalizaciones y muertes ocasionadas por listeriosis en Estados Unidos debido al consumo de alimentos contaminados de 2011 a 2015. Fuente: CDC.....	5
2. Efecto de compuestos fenólicos sobre la adhesión de bacterias patógenas .....	12
3. Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos de raquis de uva.....	34
4. Potencial de adhesión ( $\Delta F_{adh}$ ) entre <i>L. monocytogenes</i> expuesta a extractos de raquis de uva y las superficies de acero inoxidable y polipropileno. Los valores mostrados son el promedio de dos experimentos independientes.....	47
5. Compuestos fenólicos identificados en el extracto de raquis de uva Red Globe.....	51
6. Compuestos fenólicos identificados en el extracto de raquis de uva Carignan.....	52
7. Concentraciones mínimas inhibitorias del crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> de los compuestos fenólicos identificados en los extractos de raquis de uva.....	56

## RESUMEN

La adhesión de *Listeria monocytogenes* a superficies en contacto con alimentos es una de las principales causas de contaminación cruzada en la industria alimentaria. Una de las estrategias para prevenir la adhesión bacteriana es el uso de compuestos fenólicos, ya que podrían interferir en factores clave en el proceso de adhesión como la motilidad y propiedades fisicoquímicas de la bacteria. Por lo que el presente trabajo plantea que la presencia de extractos de raquis de uva, afectan la motilidad y la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable y polipropileno. Como resultados se observó que el extracto de raquis de uva Red Globe presentó mayor contenido de fenoles ( $68.38 \pm 2.38$  mg EAG/g) y flavonoides totales ( $98.07 \pm 2.60$  mgEQ/g), comparado con el extracto del cultivar Carignan también evaluado. En ambos extractos se observó una disminución en la adhesión de *L. monocytogenes* de 0.7703 – 2.215 Log UFC/cm<sup>2</sup> en acero inoxidable y de 0.71 – 2.38 Log UFC/cm<sup>2</sup> en polipropileno; y una inhibición total de la motilidad a partir de 4.5 y 5 mg/mL del extracto Red Globe y Carignan, respectivamente. Así mismo, ambos extractos la energía superficial de *L. monocytogenes* después de 2 h de contacto, afectando de esta manera el potencial de adhesión de la bacteria a ambas superficies. Por otra parte, los ácidos elágico, cafeico, protocateico, ferúlico y gálico, así como catequina, epicatequina y rutina (presentes en ambos extractos) a 10 mM, reducen la adhesión de *L. monocytogenes* en 0.208 – 1.603 UFC/cm<sup>2</sup>. Con lo que se demuestra el potencial de los extractos de raquis de uva Red Globe y Carignan para inhibir la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable y polipropileno, así como de inhibir la motilidad y modificar el potencial de adhesión de esta bacteria.

**Palabras clave:** Subproductos de uva; compuestos fenólicos; adhesión bacteriana; *L. monocytogenes*; antimicrobianos naturales.

## ABSTRACT

The adhesion of *Listeria monocytogenes* to food contact surfaces is a major cause of cross-contamination in the food industry. One strategy to prevent this adhesion is the use of phenolic compounds that could interfere with key factors of this process, such as bacterial motility and physicochemical properties of the bacterial surface. For this reason, the present study stated that the presence of grape stems extracts, rich in phenolic compounds, could affect motility and adhesion of *L. monocytogenes* to stainless steel and polypropylene surfaces. As results, grape stems extract from Red Globe variety showed a higher content of total phenolics ( $68.38 \pm 2.38$  mgGAE/g) and flavonoids ( $98.07 \pm 2.60$  mgQE/g), compared with the stem extract from Carignan variety. In addition, both extracts reduced adhesion of *L. monocytogenes* on stainless steel (0.7703 – 2.215 Log CFU/cm<sup>2</sup> reduction) and polypropylene (0.71 – 2.38 Log CFU/cm<sup>2</sup> reduction); and completely inhibited bacterial motility at 4.5 and 5 mg/mL of Red Globe and Carignan extracts, respectively. Similarly, both extracts decreased the surface energy of *L. monocytogenes* after 2 h contact, affecting their potential adhesion to both surfaces. On the other hand, ellagic, caffeic, protocatechuic, ferulic and gallic acids, as well as, catechin, epicatechin and rutin, presented in both extracts, reduced the adhesion of *L. monocytogenes* to stainless steel (0.208 – 1.603 Log CFU/cm<sup>2</sup> reduction) at 10 mM. These results, demonstrated that extracts from Red Globe and Carignan grape stems inhibited the adhesion of *L. monocytogenes* to stainless steel and polypropylene by inhibiting motility and modifying its adhesion potential.

**Keywords:** Grape byproducts; phenolic compounds; bacterial adhesion; *L. monocytogenes*; natural antimicrobials.

## INTRODUCCIÓN

*Listeria monocytogenes* es una bacteria causante de listeriosis, una enfermedad transmitida por alimentos con una alta tasa de mortalidad, además este patógeno es considerado persistente en la industria alimentaria. Se estima que *L. monocytogenes*, es responsable de alrededor del 19% de las muertes directamente relacionadas con el consumo de alimentos contaminados con patógenos en Estados Unidos (Scallan et al., 2011). *L. monocytogenes* ha sido aislada en diversas plantas procesadoras de alimentos como pescado, queso, vegetales congelados y de alimentos listos para su consumo (Almeida et al., 2012; Vongkamjan et al., 2013; Zhao et al., 2013). Su presencia ha sido relacionada con su habilidad de adherirse y crecer en superficies que están en contacto con los alimentos como cintas transportadoras, plásticos, acero inoxidable, caucho entre otras (Veluz et al., 2012). Lo que resalta la importancia de conocer e investigar más a fondo los procesos de adhesión de *L. monocytogenes* a superficies abióticas.

El proceso de adhesión de *L. monocytogenes* a superficies abióticas se generaliza al igual que en otras bacterias patógenas, y se puede describir como un proceso de dos fases. La fase inicial (fase I) es instantánea y físicamente reversible e involucra un balance entre las fuerzas atractivas de Van der Waals y las fuerzas electroestáticas, en función de la distancia entre las dos entidades (bacteria y superficie) (AlAbbas et al., 2012). Sin embargo, en *L. monocytogenes* se ha establecido que la motilidad mediada por flagelos también es un factor crítico en la fase inicial de adhesión (Lemon et al., 2007). Mientras que la segunda fase (fase II) es considerada una interacción celular y molecular que involucra la

síntesis de sustancias poliméricas extracelulares llamadas adhesinas (Wan et al., 2013). Estas estructuras forman un puente entre la célula bacteriana y la superficie de contacto permitiendo una asociación irreversible que le confiere una mayor resistencia para su remoción (Katsikogianni y Missirlis, 2004; Li et al., 2012).

Los métodos comúnmente utilizados para reducir o eliminar la presencia de bacterias patógenas en superficies de contacto con alimentos son los procedimientos de limpieza y desinfección utilizando compuestos químicos sintéticos (Li et al., 2014; Mørretrø et al., 2012; Silva et al., 2010). Sin embargo, se ha observado que las bacterias adheridas son menos susceptibles a los desinfectantes en comparación con sus contrapartes planctónicas (Riazi y Matthews, 2011). Aunado a esto, se encuentra la percepción de los consumidores sobre el riesgo a la salud que representa el uso de compuestos sintéticos (Ayala-Zavala et al., 2011). Lo que despierta el interés de la búsqueda de antimicrobianos naturales que tengan la habilidad de inhibir la adhesión de las bacterias patógenas a superficies en contacto con alimentos (Villa y Cappitelli, 2013).

Por otro lado, las plantas sintetizan un gran número de metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas. Un ejemplo son los compuestos fenólicos, que son reconocidos por sus propiedades antibacterianas sobre un amplio rango de patógenos incluyendo, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *L. monocytogenes* y *Bacillus subtilis* entre otras (Ravichandran et al., 2011; Sánchez-Maldonado et al., 2011; Xiao et al., 2014). Además, a concentraciones subletales han mostrado inhibir la adhesión de bacterias patógenas a superficies abióticas mediante diversos mecanismos de acción. Estos pueden ser: (i) la inhibición de la motilidad bacteriana (Lee, Park, et al., 2013), (ii) la modificación de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de la célula (Borges et al., 2012), y (iii) la inhibición de la síntesis de material exopolimérico (Lee, Park, et al., 2013). Lo que los hace excelentes candidatos

para su uso y aplicación en la industria alimentaria para inhibir la adhesión de bacterias patógenas en superficies de contacto con los alimentos.

Los compuestos fenólicos se encuentran ampliamente distribuidos en alimentos de origen vegetal (Ignat et al., 2011). Sin embargo, se prefiere la extracción de estos compuestos de fuentes de bajo costo como los subproductos agroindustriales (Ayala-Zavala et al., 2011). Una fuente importante de compuestos fenólicos es el raquis de uva, que es la estructura vegetativa que soporta directamente las bayas y sirve como un sistema de conducción de nutrientes y agua (Gonzalez-Centeno et al., 2012). Este subproducto es descartado al inicio del proceso de vinificación y en el procesamiento mínimo de uva y su contenido de fenoles totales es mayor que otros subproductos como el orujo (cáscaras y semillas) (Gonzalez-Centeno et al., 2012). Los extractos de raquis de uva, ricos en compuestos fenólicos, han mostrado actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes* (Anastasiadi et al., 2009). Sin embargo, su uso para inhibir la adhesión de este patógeno a superficies de interés alimenticio no ha sido estudiado.

Por lo anteriormente descrito, el presente trabajo de tesis se plantea que la aplicación de extractos de raquis de uva puede inhibir la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies abióticas en contacto con alimentos como acero inoxidable y polietileno de alta densidad.

## ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

### Adhesión de *L. monocytogenes* a Superficies Abióticas; un Problema de Inocuidad en la Industria Alimentaria

*Listeria monocytogenes* es la bacteria causante de listeriosis, una enfermedad transmitida por alimentos con una alta tasa de mortalidad (20-30%) que se puede presentar de forma gastrointestinal o invasiva (Vera et al., 2013). Esta última se caracteriza por su adhesión e invasión a células epiteliales y una subsecuente translocación a distintos órganos, teniendo como consecuencia una infección sistémica en el hospedero (Vera et al., 2013). En México no se cuenta con un registro adecuado de brotes ocasionados por *L. monocytogenes*, sin embargo; no significa que éste no sea un problema. Por otra parte, en el Cuadro 1 se muestra el número de casos, hospitalizaciones y muertes ocasionadas por listeriosis en Estados Unidos de América de 2011 a 2015, debido al consumo de alimentos contaminados (CDC, 2015). Sin embargo, pueden existir subestimaciones ya que el diagnóstico de *L. monocytogenes* es complicado debido a su ciclo de vida intracelular (Blum-Menezes et al., 2013). Además sus infecciones no necesariamente se manifiestan clínicamente con una respuesta inmune típica de una infección bacteriana (Blum-Menezes et al., 2013).

*L. monocytogenes* es considerada una bacteria persistente en la industria alimentaria y ha sido aislada en diversas plantas procesadoras de alimentos como pescado, queso, vegetales congelados y de alimentos listos para su consumo (Almeida et al., 2013; Vongkamjan et al., 2013; Zhao et al., 2013).

**Cuadro 1.** Número de casos, hospitalizaciones y muertes ocasionadas por listeriosis en Estados Unidos debido al consumo de alimentos contaminados de 2011 a 2015. Fuente: CDC.

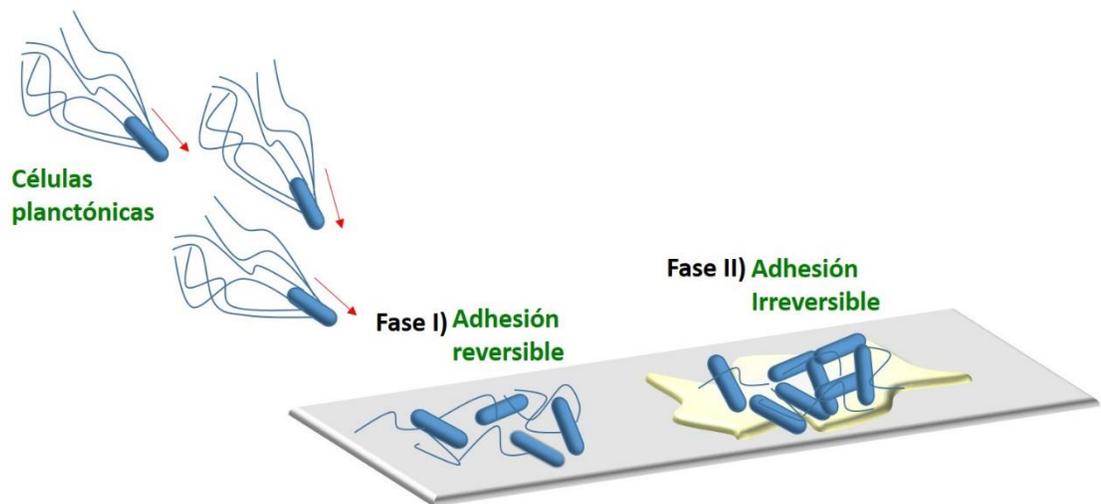
<b>Año</b>	<b>Producto</b>	<b>Número de casos</b>	<b>Hospitalizaciones/muertes</b>
2015	Productos de heladería	10	10/3
	Manzanas caramelizadas	35	34/7
2014	Germinados de soya	5	5/2
	Queso	5	4/1
	Queso fresco	8	7/1
2013	Queso	6	6/1
2012	Queso ricota	22	20/4
2011	Melón entero	147	142/33

*L. monocytogenes* es una bacteria facultativa Gram-positiva, psicotrófica, capaz de multiplicarse a temperaturas cercanas a los 0 °C, además de crecer a pH entre 4.6 y 9.5, así como en actividades de agua de 0.92 (Carpentier y Cerf, 2011). Además, su presencia en las plantas procesadoras de alimentos se relaciona con su habilidad de adherirse y formar biopelículas en superficies abióticas (Martins et al., 2010).

Las superficies abióticas se pueden definir como cualquier superficie que no está asociada o proviene de algún organismo vivo. Esta definición involucra materiales como acero inoxidable, polipropileno, poliestireno, vidrio, entre otras, los cuales son abundantes en la industria alimentaria (Abban et al., 2012). Con estos materiales se fabrican una gran número de equipos de procesamiento y superficies que están en contacto con los alimentos como cintas transportadoras, tablas de corte, tuberías, tanques de almacenamiento entre otras (Veluz et al., 2012).

### **Etapas de la Adhesión de *L. monocytogenes* a Superficies en Contacto con Alimentos y Principales Factores que Afectan este Proceso**

El proceso de adhesión de *L. monocytogenes* a superficies en contacto con alimentos ocurre en dos fases (Figura 1) (Katsikogianni y Missirlis, 2004). La primera etapa (fase I) ocurre cuando la bacteria se aproxima a la superficie; en este punto la bacteria necesita vencer una barrera de energía para establecer contacto directo con ésta. Esta etapa involucra un balance entre las fuerzas atractivas de Van de Waals, las fuerzas repulsivas electroestáticas y fuerzas ácido-base de Lewis, las cuales están en función de la distancia entre las dos entidades (AlAbbas et al., 2012). Por ello, la primera etapa de adhesión se considera reversible y mediada por interacciones inespecíficas (AlAbbas et al., 2012).



**Figura 1.** Proceso de adhesión de *L. monocytogenes* a superficies en contacto con alimentos. La adhesión comienza una vez que las bacterias que son transportadas a las superficies abióticas y hacen contacto directo dando lugar a la adhesión reversible (fase I). Enseguida comienza la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares que refuerzan la unión entre la bacteria y la superficie (fase II).

Los mecanismos por los cuales las bacterias son transportadas a las superficies pueden incluir el movimiento Browniano, la sedimentación o la transferencia de masa por convección debido al movimiento del medio en suspensión (Habimana et al., 2014). Además, en *L. monocytogenes* se ha establecido que la motilidad mediada por flagelos es crítica en el proceso de adhesión (Lemon et al., 2007). Se ha observado que cepas de *L. monocytogenes* carentes de flagelos ( $\Delta flaA$ ) y con flagelos disfuncionales (*motBD23A*) se adhieren en menor proporción a acero inoxidable y a vidrio en comparación con las cepas silvestres (Lemon et al., 2007). Esto se ha observado, de manera similar, en otras bacterias como *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium y *Pseudomonas aeruginosa* (Almeida et al., 2012; Strehmel y Overhage, 2013). Por lo que, la inhibición de la motilidad mediada por flagelos podría interferir en el proceso de adhesión a las superficies de contacto con alimentos.

Una vez que *L. monocytogenes* vence las fuerzas de repulsión de la superficie y entra en contacto con ella ocurren cambios fenotípicos como la pérdida de motilidad tipo *swimming* (Verstraeten et al., 2008). Posteriormente, comienza la síntesis de sustancias poliméricas extracelulares (SPE), que pueden ser proteínas, polisacáridos y material genético, lo que permite la asociación irreversible (fase II) entre la bacteria y la superficie (Li et al., 2012). Se ha observado que para algunas bacterias la capacidad de adhesión depende de la síntesis de SPE. Esto se puede ver reflejado en el estudio de Tian et al. (2014) que demuestra que los exopolisacáridos Pel y Psl están involucrados en la adhesión inicial de *P. aeruginosa* PAO1 a superficies abióticas, ya que las cepas donde se silenciaron los genes responsables de la síntesis de estos exopolisacáridos ( $\Delta pel/\Delta psl$ ) mostraron el menor coeficiente de adhesión en comparación con la cepa silvestre.

En *L. monocytogenes*, las proteínas de la superficie celular son uno de los principales factores en el proceso de adhesión y formación de biopelículas, especialmente los flagelos y algunas proteínas aún no identificadas (Renier et al., 2014). También el ADN extracelular juega un papel importante en la adhesión y

en etapas tempranas del desarrollo de biopelículas en ciertas condiciones de cultivo (Harmsen et al., 2010). Para el caso de los polisacáridos, recientemente se ha determinado que consiste en unidades repetidas de N-acetilmanosamina y galactosa, sin embargo, se desconoce su papel en la formación de biopelículas de *L. monocytogenes* (Köseoğlu et al., 2015). Además, las SPE también contribuyen a la adhesión o reclutamiento de otras células bacterianas (Liu et al., 2007). Por lo que la inhibición de la producción de SPE se puede considerar como uno de los blancos para la inhibición de la adhesión de las bacterias a superficies en contacto con alimentos.

Dentro de otros factores que intervienen en el proceso de adhesión de *L. monocytogenes* a las superficies en contacto con los alimentos se incluyen factores ambientales (temperatura, tiempo de exposición, concentración bacteriana, etc.), así como las características de la bacteria (hidrofobicidad y energía superficial) y las características del material o superficie (composición química, topografía, rugosidad, hidrofobicidad, presencia de proteínas, etc.) (Katsikogianni y Missirlis, 2004). Por ejemplo, para *L. monocytogenes* a mayor temperatura, mayor el número de células adheridas (35 vs 4 °C) (Zeraik y Nitschke, 2012). En cuanto a las características de la bacteria, se ha reportado que *L. monocytogenes* tiene mayor afinidad a solventes no polares que a solventes polares, lo que indica que su superficie es mayormente hidrofóbica y el grado de hidrofobicidad se correlaciona positivamente ( $r = 0.87$ ) con su adherencia inicial a superficies de cloruro de polivinilo (PVC) (Takahashi et al., 2010).

En lo referente a las propiedades de las superficies abióticas se ha observado que la topografía y rugosidad puede proporcionar nichos y sitios de anclaje para la adhesión de bacterias patógenas. Sin embargo, se ha observado que *L. monocytogenes* se adhiere en igual número a superficies de acero inoxidable independientemente de su topografía y rugosidad (Guobjoernsdottir et al., 2005). De igual manera, en un estudio llevado a cabo por Rodríguez et al. (2008), no se encontraron diferencias en el número de células de *L. monocytogenes* en acero

inoxidable con diferentes acabados; mecánicamente pulido ( $6.7 \log \text{ UFC/cm}^2$ ) y electropulido ( $6.7 \log \text{ UFC/cm}^2$ ), los cuales presentan diferentes valores de rugosidad. Lo que indica que para *L. monocytogenes* estos parámetros no son de mucha relevancia. En cambio, se ha observado que la hidrofobicidad de la superficie de contacto influye en la adherencia en *L. monocytogenes*. Veluz y col (2012) encontraron que *L. monocytogenes* y *Salmonella* spp. se adhieren en mayor medida a materiales poliméricos como diferentes plásticos en comparación con superficies de acero inoxidable. De manera general, las superficies de plástico se consideran hidrofóbicas mientras que las de acero inoxidable se consideran hidrofílicas (Veluz et al., 2012). Resultados similares se han reportado por Sinde y Carballo (2000) y Midelet y Carpentier (2002).

### **Compuestos fenólicos como Alternativas para el Control de la Adhesión de *L. monocytogenes* a Superficies en Contacto con Alimentos**

Riazi y Matthews (2011) observaron que las bacterias adheridas son menos susceptibles a los desinfectantes en comparación con sus contrapartes planctónicas; además también reportan que el hipoclorito de sodio, digluconato de clorhexidina y cloruro de benzalconio a 128 ppm, reducen la carga bacteriana de *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *P. aeruginosa* en el orden de 2 a 3 logaritmos cuando se encuentran adheridas a acero inoxidable, mientras que en células en suspensión se alcanza una reducción de 8 logaritmos con la misma concentración de los agentes desinfectantes. De igual manera, da Silva Meira et al. (2012) evaluaron la efectividad del ácido paracético (30 ppm) e hipoclorito de sodio (250 ppm), mostrando que estos desinfectantes no son efectivos para eliminar totalmente las células de *S. aureus* adheridas a polipropileno y acero inoxidable. Por lo que, una solución a este problema es prevenir la formación de biopelículas mediante la inhibición de la adhesión de bacterias patógenas a las superficies en contacto con alimentos.

En este contexto, surge un nuevo enfoque en considerar el uso de compuestos naturales puedan interferir en los procesos de adhesión, comunicación y formación de biopelículas de las bacterias patógenas (Villa y Cappitelli, 2013). Las plantas son capaces de sintetizar una gran diversidad de metabolitos secundarios con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias como es el caso de los compuestos fenólicos (Daglia, 2012). Los compuestos fenólicos o polifenoles son compuestos orgánicos que poseen al menos un anillo aromático unido con uno o más grupos funcionales hidroxilo (Sánchez-Maldonado et al., 2011). Constituyen uno de los grupos más numeroso de metabolitos secundarios de plantas y pueden ser clasificados de acuerdo a su estructura química en ácidos fenólicos (ej. ácido gálico, ferúlico, cafeico, clorogénico, vanílico, etc.), flavonoides (ej. quercetina, kaempferol, catequina, naringenina, apigenina, etc.), estilbenos (ej. *cis*- y *trans*-resveratrol), así como taninos condensados e hidrolizables (ej. proantocianidinas B2 y B3) (Sánchez-Maldonado et al., 2011; Vázquez-Flores et al., 2012).

Los compuestos fenólicos presentan propiedades antimicrobianas sobre un amplio rango bacterias patógenas como *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *S. aureus*, *L. monocytogenes* y *B. subtilis* entre otras (Ravichandran et al., 2011; Schieber et al., 2001; Xiao et al., 2014). El efecto antibacteriano puede ser mediante diversos mecanismos de acción como el daño a la membrana citoplasmática, la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, la inhibición de la síntesis de la pared celular, así como la inhibición de la síntesis de la membrana celular (Xiao et al., 2014).

Por otra parte, a concentraciones subletales han mostrado inhibir la adhesión de bacterias patógenas a superficies abióticas y de esta manera prevenir la formación de biopelículas (Lee y Park, et al., 2013; Luís et al., 2013; Vandeputte et al., 2010). En el Cuadro 2 se resumen los estudios donde se ha evaluado el efecto de compuestos fenólicos sobre la adhesión de bacterias patógenas. En

Cuadro 2. Efecto de compuestos fenólicos sobre la adhesión de bacterias patógenas

Compuesto (µg/mL)	Temperatura y tiempo de incubación	Bacteria	Reducción de la adhesión (%)	Mecanismo de acción evaluado			Referencia
				Inhibición de la motilidad (%)	Energía de adhesión	Otro	
Resveratrol (10)	37 °C, 24 h	<i>E. coli</i> O157:H7	93	-	-	Reducción en la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas extracelulares, motilidad y comunicación célula-célula.	Lee et al., 2013
ε-viniferina (10 – 25)	37 °C, 24 h	<i>P. aeruginosa</i>	70	-	-	-	Cho et al., 2013
		<i>E. coli</i> O157:H7	98	-	-	-	
		<i>E. coli</i>	64	41.1 ( <i>swimming</i> ) 10 ( <i>swarming</i> )	Disminución	-	
Ácido gálico (1000)	30 °C, 24 h	<i>P. aeruginosa</i>	85	62.5 ( <i>swimming</i> ) 19.2 ( <i>swarming</i> )	Incremento	-	Borges et al., 2012
		<i>S. aureus</i>	70	64.7	Incremento	-	
		<i>L. monocytogenes</i>	99	70.5 ( <i>swimming</i> )	Incremento	-	
		<i>E. coli</i>	8.9	52.9 ( <i>swimming</i> ) 10 ( <i>swarming</i> )	Disminución	-	
Ácido ferúlico (1000)	30 °C, 24 h	<i>P. aeruginosa</i>	82	52.9 ( <i>swimming</i> ) 10 ( <i>swarming</i> )	Incremento	-	Borges et al., 2012
		<i>S. aureus</i>	5	100	Incremento	-	
Vainillina (180)	25 °C, 24 h	<i>A. hydrophila</i>	97	-	-	Reducción de biomasa y proteínas totales	Kappachery et al., 2010
Quercetina (1)	37 °C, 24 h	<i>S. aureus</i>	>80	-	-	Inhibición de la expresión de genes asociados a la adhesión intercelular, comunicación célula-célula y factores de virulencia.	Lee et al., 2013
Luteolina (20)	37 °C, 24 h	<i>S. aureus</i>	40	-	-		
Kaempferol (20)	37 °C, 24 h	<i>S. aureus</i>	60	-	-		
Catequina (13.7)	37 °C, 18 h	<i>P. aeruginosa</i>	30	-	-	Inhibición de la expresión de genes asociados a la comunicación célula-célula.	Vandeputte et al., 2010

la Figura 2 se muestran las estructuras químicas de estos compuestos. Por otro lado, al igual que la acción antibacteriana, las propiedades antiadhesión involucran diversos mecanismos de acción que pueden ser: la inhibición de la motilidad bacteriana (Lee, Cho, et al., 2013), la modificación de las propiedades fisicoquímicas de la superficie de la célula (Borges et al., 2012), y la inhibición de la síntesis de material exopolimérico (Lee, Cho, et al., 2013). Por lo que se puede considerar su aplicación en la industria de los alimentos como estrategia en la prevención de la adhesión de bacterias patógenas a superficies en contacto con alimentos.

Una fuente atractiva y de bajo costo para la obtención de compuestos fenólicos son los subproductos agroindustriales (semillas, cáscaras, raíces, tallos y hojas) que son generados durante el procesamiento de frutos y vegetales en la industria de los alimentos (Ayala-Zavala et al., 2011; Cruz-Valenzuela et al., 2013).

#### Subproductos del Procesamiento de la Uva como Fuente de Compuestos Fenólicos con Actividad Antiadhesión

La uva (*Vitis vinifera* L.) es considerada uno de los cultivos frutícolas más grandes del mundo, con una producción global alrededor de  $67.06 \times 10^6$  toneladas en 2012 (FAOSTAT, 2014). En México, el Estado de Sonora es considerado el principal productor con alrededor de 271 mil toneladas al año, lo que representa el 77.5% de la producción nacional. De los cuales cerca del 88% se destina para su consumo en fresco (uva mesa), mientras que el resto se destina para su uso industrial, principalmente para la elaboración de vinos de mesa y jugos, y en menor medida para la producción de uva pasa (SIAP, 2013). Desde el punto de vista nutricional, la uva es considerada una fuente importante de compuestos fenólicos, los cuales son responsables de su capacidad antioxidante (Almela et al., 2014).

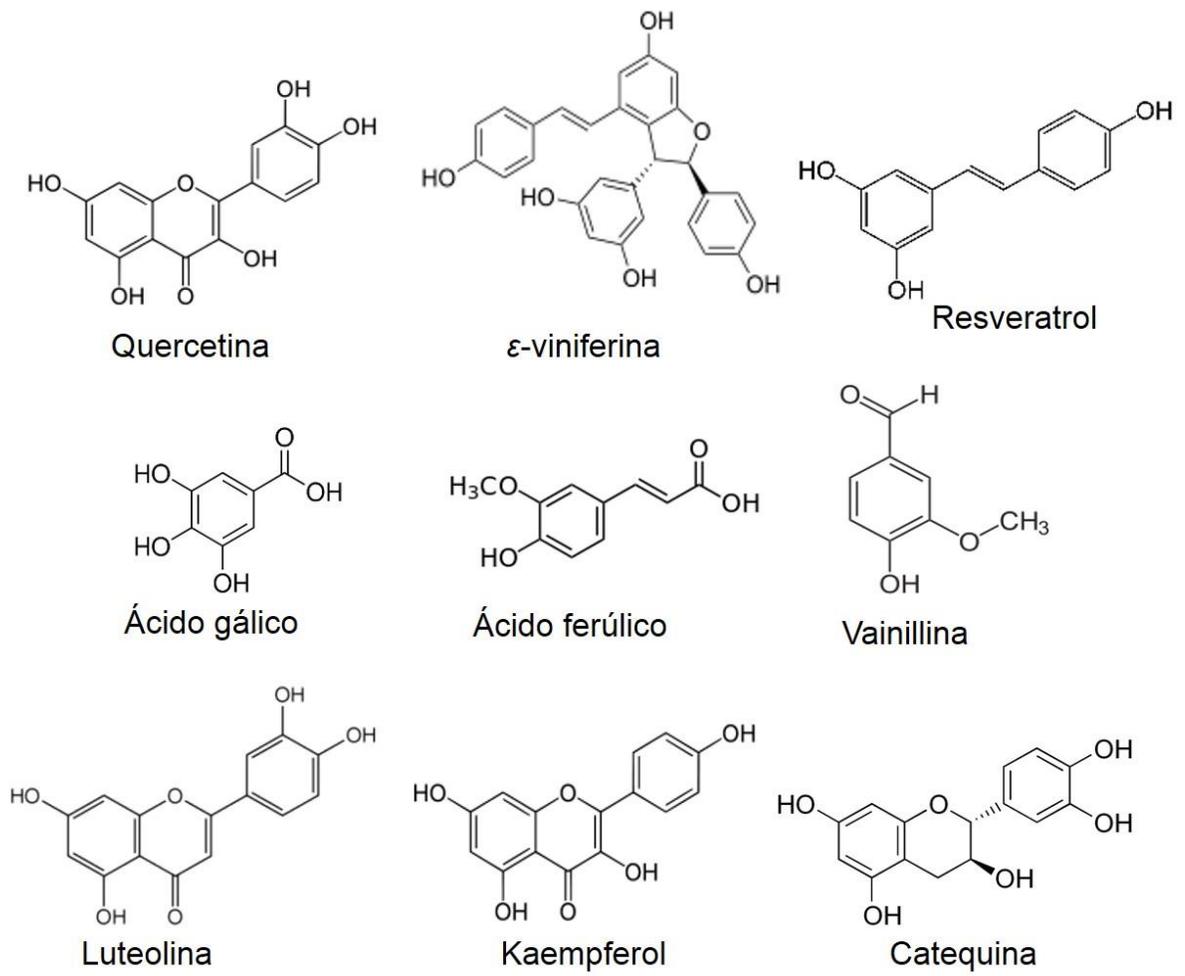


Figura 2. Estructura química de los compuestos fenólicos con actividad antiadhesión de bacterias patógenas.

Comúnmente la uva se comercializa en racimos, sin embargo, el creciente interés de los consumidores por productos listos para su consumo, la ha introducido en el mercado de los productos mínimamente procesados debido a su facilidad de consumo y practicidad (Almela et al., 2014; Shiri et al., 2011). En el procesamiento mínimo de uva, así como en el proceso de elaboración de vino y destilados, se genera una gran cantidad de residuos sólidos. Estos residuos consisten en raquis, que es la parte leñosa de los racimos de uva (Shiri et al., 2011) y el orujo, que es una mezcla de cáscaras y semillas remanente del proceso del prensado en la elaboración de vinos. Estos subproductos son considerados una fuente importante de compuestos fenólicos (Llobera y Cañellas, 2007).

Existen pocos estudios sobre la composición y cuantificación de compuestos fenólicos en raquis de uvas de mesa, sin embargo, este enfoque se ha llevado a cabo en raquis procedentes del proceso de vinificación. Llobera y Cañellas (2007) reportan que el contenido de fenoles totales (CFT), expresado en equivalentes de ácido gálico (EAG), en raquis de uva variedad Manto Negro es de 11.6 g EAG/100 g ps, cuatro veces mayor que en el orujo (mezcla de cáscaras y semillas) (2.63 g EAG/100 g ps). De manera similar, el CFT y contenido de proantocianidinas totales de 10 diferentes cultivares de *V. vinifera* (Cabernet Sauvignon, Callet, Chardonnay, Macabeu, Manto Negro, Merlot, Parellada, Premsal blanc, Syrah y Tempranillo) se ha reportado que varía entre 4.7 y 11.52 g EAG/ 100 g ps, y de 0.079 a 0.202 g de taninos/100 g ps, respectivamente (González-Centeno et al., 2012). Mientras que el CFT de orujos de uva de los cultivares Chardonnay, Macabeu, Parellada y Premsal blanc varían entre 3.09 a 4.65 g EAG/100 g ps, y el contenido de proantocianidinas totales de 0.05 a 0.092 g taninos/100 g ps (González-Centeno et al., 2013). Las diferencias observadas en el contenido de fenoles y proantocianidinas totales entre subproductos, pueden ser atribuidas al hecho de que el raquis de las uvas destinadas a la producción de vino es descartado al inicio del proceso; de esta manera la composición original de compuestos fenólicos se conserva casi intacta (Brahim et al., 2014).

Los extractos de subproductos de la industria vinícola (semillas, cáscaras y raquis) han mostrado actividad antibacteriana contra patógenos como *S. aureus*, *B. cereus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp. y *L. monocytogenes* en estado planctónico, y dicha actividad ha sido atribuida al tipo y contenido de compuestos fenólicos (Katalinic et al., 2013; Oliveira et al., 2013; Sagdic et al., 2011). Sin embargo, no se ha probado su efecto a concentraciones subletales donde pudieran interferir en los procesos celulares e inhibir la adhesión a superficies abióticas que están en contacto con alimentos.

No obstante, en raquis de uva se han identificado compuestos fenólicos que han demostrado inhibir la adhesión de bacterias patógenas. Por ejemplo, se ha observado que el *trans*-resveratrol, un estilbeno, reduce significativamente en *E. coli* O157:H7 la expresión de genes relacionados con la síntesis de proteínas fibrosas asociadas a la superficie de la bacteria (*csgA* y *csgB*), motilidad (*fimA*, *fimH*, *flhD*, *fliA*, *motB*, *qseB*, y *qseC*) y de genes relacionados con la comunicación célula-célula (*lsrA*, *luxS*, y *luxR*) (Lee, Cho, et al., 2013). Este efecto se ve reflejado en la inhibición de la adhesión y formación de biopelículas en superficies de poliestireno, así como en la inhibición de la motilidad y en la reducción de la síntesis de fimbrias (Lee, Cho, et al., 2013). El *trans*-resveratrol, se ha cuantificado en concentraciones de 149 mg/kg ps y 113 mg/kg ps, en raquis de variedades de uva roja y blanca respectivamente (Anastasiadi et al., 2012). Además, su dímero  $\epsilon$ -viniferina, que se encuentra presente en concentraciones de 314 mg/kg ps en raquis de variedades de uva roja y 288 mg/kg ps en uva blanca (Anastasiadi et al., 2012), ha demostrado prevenir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* PA14, y a concentraciones de 10  $\mu$ g/mL, inhibe la formación de biopelículas de *E. coli* O157:H7 en un 98% (Cho et al., 2013).

De igual manera, en extractos de raquis de uva se han identificado ácidos fenólicos como el ácido gálico, caftárico, *trans*-cafeico y (Schieber et al., 2001). El ácido gálico a 1000  $\mu$ g/mL ha mostrado un efecto preventivo en la adhesión y formación de biopelículas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* en superficies de poliestireno en condiciones estáticas, con

valores de porcentajes de reducción de biomasa de aproximadamente 60, 85, 75 y 100%, respectivamente (Borges et al., 2012). En el caso particular de *L. monocytogenes* se observó un cambio en el potencial de adhesión y una reducción de la motilidad tipo *swimming* en un 70% (Borges et al., 2012). De igual manera, el ácido gálico a 4 mg/mL redujó en un 40% la formación de biopelículas de cepas de *S. aureus* incluyendo cepas resistentes a meticilina, mientras que el ácido cafeico y clorogénico a la misma concentración redujeron la cantidad de biomasa adherida en un 80% (Luís et al., 2013).

Otros ácidos fenólicos con propiedades antiadhesión son el ácido ferúlico y salicílico que a concentraciones de 1 mg/mL, solos y en combinación, mostraron una reducción moderada ( $\approx 13 - 35\%$ ) en la formación de biopelículas simples y de doble especie de *P. fluorescens* y *B. cereus* en superficies de poliestireno en condiciones estáticas (Lemos et al., 2014). Por otra parte, el ácido vanílico a concentraciones de 0.18 mg/mL inhibió la adhesión de *Aeromonas hydrophila* a membranas de osmosis inversa (material compuesto de poliamida) en sistemas dinámicos reduciendo la cobertura de la bacteria en la superficie, el promedio de grosor de la biopelícula, así como la biomasa y proteína total alrededor de un 93, 97, 96 y 97%, respectivamente. Sin embargo, el ácido vanílico no mostró un efecto sobre biopelículas preformadas de 24 h, indicando que este compuesto puede afectar la adhesión inicial de *A. hydrophila* en la superficie (Kappachery et al., 2010). El ácido ferúlico y vanílico se han identificado posteriormente en racimos de uva de diferentes cultivares (Bruno y Sparapano, 2006) por lo que pudieran estar presente en extractos de raquis destinados al uso en la prevención de la adhesión de bacterias patógenas en superficies en contacto con alimentos.

Otra familia de compuestos fenólicos que se han aislado en muestras de raquis son los flavonoides como proantocianidina B3 y B2, catequina, epicatequina, galato de epilogalocatequina, quercetina y kaempferol, así como glucósidos derivados de quercetina, como quercetina-3-O-galactósido, quercetina-3-O-glucósido y quercetina 3-O-ramnosido (Schieber et al., 2001). Estos compuestos también han sido reportados por Spatafora et al. (2013) en extractos etanólicos

de raquis de uva de cultivares sicilianos y en raquis de uvas de la variedad Zalema (González-Centeno et al., 2013).

Algunos flavonoides han presentado actividades antiadhesión, por ejemplo, los resultados obtenidos por Lee et al. (2013) muestran que la quercetina, luteolina, kaempferol y el ácido tánico reducen la formación de biopelículas de *S. aureus* de manera dependiente de la concentración, mediante la represión de la expresión de genes asociados a la adhesión intercelular (*icaA* e *icaD*), a la comunicación célula-célula (*agrA*) y factores de virulencia (*sigB*). Además, se ha observado que la catequina interfiere con la comunicación célula-célula en *P. aeruginosa* PAO1, ya que afecta negativamente la expresión de genes regulados por este sistema de señalización (*lasB* y *rhIA*), indicando que este compuesto puede interferir con la percepción de las moléculas señal (butanoyl-L-homoserina lactona) (Vandeputte et al., 2010). Por otra lado, los resultados de Trentin et al. (2013) muestran que una mezcla compleja de proantocianidinas, obtenida de extractos de diversas plantas medicinales brasileñas (*Anadenanthera colubrina*, *Commiphora leptophloeos* y *Myracrodruon urundeuva*), compuesta principalmente por profisetinidina, prorobinetinidina y taninos hidrolizables inducen daños en *P. aeruginosa* a concentraciones subletales, provocando efectos bacteriostáticos e inhibiendo la adhesión en superficies de poliestireno.

Los trabajos antes mencionados muestran la capacidad que tienen los compuestos fenólicos identificados en extractos de raquis de uva, para modificar las propiedades fisicoquímicas de las superficies bacterianas, inhibir su motilidad y regular los genes relacionados con la síntesis de SPE. Sin embargo, la mayoría de los estudios muestran el efecto de los compuestos fenólicos individuales. Por lo que se deja de lado el posible efecto sinérgico que pudiera existir entre los componentes de los extractos ricos en compuestos fenólicos (Anastasiadi et al., 2009).

Por lo anterior descrito, el presente estudio plantea que la aplicación de un extracto de raquis de uva, rico en compuestos fenólicos, puede inhibir la adhesión de *L. monocytogenes*, a superficies abióticas en contacto con alimentos como

acero inoxidable y polietileno de alta densidad mediante la inhibición de la motilidad y/o modificación del potencial de adhesión.

## HIPÓTESIS

La aplicación de extractos de raquis de uva, ricos en compuestos fenólicos, inhiben la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable y polipropileno, afectando la motilidad y modificando el potencial de adhesión bacteriano.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Inhibir la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable y polipropileno aplicando extractos de raquis de uva ricos en compuestos fenólicos.

### Objetivos Específicos

- Obtener y caracterizar extractos de raquis de uva ricos en compuestos fenólicos.
- Cuantificar la inhibición de la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable y polipropileno mediante la aplicación de los extractos de raquis de uva.
- Cuantificar los cambios en la motilidad y el potencial de adhesión de *L. monocytogenes* expuesta a los extractos de raquis de uva.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia Prima

El raquis de uva se obtuvo a partir de racimos de uva (*V. vinifera*) de las variedades Red Globe y Carignan. Las uvas de la variedad Red Globe se adquirieron con un proveedor local en la ciudad de Hermosillo, Sonora, y se transportaron al laboratorio donde se llevó a cabo la separación manual de las bayas para obtener el raquis. Por otra parte, el raquis de uva Carignan fue proporcionado por una empresa local dedicada a la elaboración de destilados de uva, inmediatamente después de la separación mecánica de las bayas. De igual manera se transportó al laboratorio.

### Obtención de Extractos de Raquis de Uva ricos en Compuestos Fenólicos

Para la obtención de extractos de raquis de uva ricos en compuestos fenólicos se llevó a cabo la metodología descrita por (Vega-Vega et al., 2013). Para ello, se pesaron 10 g de raquis de uva de cada variedad y se colocaron en recipientes conteniendo 100 mL de etanol: agua (7:3 v/v). Las muestras se dejaron macerar en la oscuridad por 10 días a 25°C. Después de este tiempo, los extractos se filtraron y el etanol del filtrado se evaporó a sequedad utilizando un rotavapor a 63 rpm, presión reducida y temperatura de 45 °C. El residuo se sometió a hidrólisis alcalina (10 mL de NaOH 4 M), durante 4 h en oscuridad. Posteriormente, el extracto hidrolizado se acidificó añadiendo HCl 4 M hasta

alcanzar un pH de 2. Por último, el extracto hidrolizado se congeló a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se liofilizó para obtener el extracto en polvo el cual se utilizó para análisis posteriores.

## Identificación y Cuantificación de Compuestos Fenólicos en los Extractos de Raquis de Uva

### **Contenido de Fenoles Totales**

El contenido de fenoles totales en los extractos de raquis de uva se determinó de acuerdo al método de Singleton y Rossi (1965) con algunas modificaciones. En un pozo de microplaca se agregaron  $75\text{ }\mu\text{L}$  de reactivo de Folin-Ciocalteu [1:10],  $15\text{ }\mu\text{L}$  de extracto de cada variedad de raquis y por último,  $60\text{ }\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 7.5 %. Esta mezcla se incubó en la oscuridad durante 30 min. Después de la incubación, se leyó la absorbancia a una longitud de onda de  $765\text{ nm}$  en un lector de microplacas (Fluostar Omega, BMG Labtech). Por otra parte, se realizó una curva de calibración de ácido gálico para expresar los resultados como mg equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto en peso seco (mg EAG/g p. s.). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

### **Contenido de Flavonoides Totales**

La determinación de flavonoides totales se realizó de acuerdo al método colorimétrico del cloruro de aluminio ( $\text{AlCl}_3$ ) descrito por Zhishen et al. (1999) con algunas modificaciones. En viales de 2 mL se agregaron  $100\text{ }\mu\text{L}$  del extracto (a la concentración adecuada) y se mezclaron con  $430\text{ }\mu\text{L}$  de la solución A ( $1.8\text{ mL}$

de  $\text{NaNO}_2$  al 5% con 24 mL de agua destilada) y se dejó reposar durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3$  al 10% y se dejó reposar por 1 min. Por último, se añadieron 440  $\mu\text{L}$  de la solución B (12 mL de  $\text{NaOH}$  1 M con 14.4 mL de agua destilada). De esta reacción se tomaron 150  $\mu\text{L}$  y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 496 nm en un lector de microplacas (Fluostar Omega, BMG Labtech). Se elaboró una curva de calibración con quercetina y los resultados se expresaron como mg de equivalentes de quercetina por gramo de extracto de peso seco (mg EQ/g p.s.). Todas las determinaciones se hicieron por triplicado.

### **Identificación y Cuantificación de los Compuestos Fenólicos en el Extracto de Raquis de Uva Red Globe por UPLC-DAD**

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos en el extracto de raquis de uva Red Globe se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de ultra desempeño (UPLC). Se utilizó un sistema ACQUITY Ultra Performance LCTM (Waters) acoplado simultáneamente a un detector de arreglo de diodos DAD2996 (Waters) a una longitud de onda de 280 nm. El equipo se controló con el programa Empower (Waters) para la adquisición y análisis de datos. Las corridas analíticas se realizaron a 30°C con una columna de fase reversa (BEH C18, 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 100 mm; Waters). Las fases móviles utilizadas fueron: 7.5 mM ácido acético (A) y acetonitrilo 100 % (B) con un flujo de 250  $\mu\text{L}/\text{min}$ . La elución de gradiente comenzó con 5 % del solvente B por 8 min, 5-20 % del solvente B por 5.2 min, de manera isocrática 20 % del solvente B por 0.5 min, 20-30 % del solvente B por 2.3 min, 50-100 % solvente B por 1 min, 100 % solvente B isocrático por 1 min y finalmente 100-5 % solvente B por 0.5 min. Al final de la secuencia, la columna se equilibró bajo las condiciones iniciales por 2.5 min. El rango de presión fue desde 6,000 a 8,000 psi durante la corrida cromatográfica (Fратиanni et al., 2011). El volumen de inyección fue de 10  $\mu\text{L}$ . La identificación de

los compuestos fenólicos se realizó por la comparación de espectros UV, utilizando una base de datos previamente realizada con compuestos de referencia. La cuantificación se realizó utilizando curvas estándar de los compuestos correspondientes y se reportó como mg del compuesto/g de peso seco.

### **Identificación de los Compuestos Fenólicos en el Extracto de Raquis de Uva Carigan por HPLC-DAD**

La identificación de los compuestos fenólicos del extracto de raquis de uva Carigan se realizó por la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se utilizó un equipo HP (1100), con una bomba cuaternaria HP acoplado a un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 280 nm. El equipo se controló con el programa ChemStation para la adquisición y análisis de datos. Las corridas analíticas se realizaron con una columna nucleosil 120 C-18 de dimensiones 25 x 0.4 cm, y un tamaño de partícula de 5 micras. Las fases móviles utilizadas fueron: ácido fórmico 1 % (A) y acetonitrilo 100 % (B), con un gradiente escalonado iniciando con 98% de ácido fórmico y 2 % de acetonitrilo, alcanzando el 100 % de acetonitrilo en 60 min a un flujo de 0.5 mL/min. El tiempo de corrida fue 75 min y el volumen de inyección de 20 µL de muestra (0.3 mg) (Vega-Vega et al., 2013). De igual manera, la identificación de los compuestos fenólicos se realizó por la comparación de espectros UV, utilizando una base de datos previamente realizada con compuestos de referencia.

### **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Extractos de Raquis de Uva y sus Compuestos Fenólicos para *L. monocytogenes***

Se determinó la capacidad antibacteriana de los extractos etanólicos de raquis de uva y sus principales compuestos fenólicos contra *L. monocytogenes* ATCC

7644, empleando la técnica de microdilución en caldo. A partir de cultivos en fase exponencial (18 h en caldo Mueller Hinton), se preparó un inóculo ajustando la densidad óptica (600 nm) a 0.1 unidades, lo que equivale a 0.5 unidades en la escala de McFarland ( $10^8$  UFC/mL). Por separado, se prepararon diferentes concentraciones del extracto de raquis en caldo Mueller Hinton en el rango de 5 a 25 mg/mL. En el caso de los compuestos fenólicos se prepararon diferentes concentraciones de cada compuesto (ácido cafeico, ácido clorógeno, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido gálico, catequina, epicatequina y rutina) en un rango de 0.125 a 7 mg/mL. Posteriormente, se tomaron 5  $\mu$ L del inóculo y 295  $\mu$ L de cada dilución del extracto y se colocaron en pozos de microplaca (Costar, 96-pozos) para obtener una concentración final de la bacteria de  $\approx 10^6$  UFC/pozo, y se incubó durante 24 h a 37 °C. La concentración más baja del extracto en la que no se observó crecimiento visible se consideró como la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Alvarez et al., 2014).

#### Efecto de los Extractos de Raquis de Uva sobre la Adhesión de *L. monocytogenes* en Superficies de Acero Inoxidable y Polipropileno

La inhibición de la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable y polipropileno se llevó a cabo mediante el método descrito por Jadhav et al. (2013) con algunas modificaciones. Previamente los cupones de acero inoxidable 304 (lados: 1.0 x 1.0 y grosor: 0.1 cm) se colocaron en acetona y se sometieron a un baño de ultrasonido durante 30 min. Posteriormente se lavaron con agua destilada y se secaron a 50 °C durante 30 min en estufa. En cuanto a los cupones de polipropileno (lados: 1.0 x 1.0 y grosor: 0.1 cm) se colocaron en etanol y se sometieron a baño de ultrasonido durante 30 min y llevó a cabo el mismo procedimiento que los cupones de acero inoxidable. Por último, ambos cupones se esterilizaron en una autoclave a 121 °C y 15 psi durante 15 min. En condiciones estériles, los cupones de acero inoxidable y polipropileno se colocaron en tubos de ensayo y se agregó el extracto de raquis de uva a

concentraciones de 0, 0.125, 0.25, 0.5 y 1 veces la CMI. Enseguida se agregó la suspensión bacteriana para obtener una concentración final de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. El inóculo se preparó a partir de un cultivo en fase exponencial (18 h a 30 °C en caldo Mueller Hinton). Los tubos de ensayo con los cupones se incubaron durante 2 h a 24 °C. Posteriormente, los cupones se retiraron y lavaron con solución salina para remover las células no adheridas. Posteriormente, los cupones se colocaron en 3 mL de solución salina y se sometieron a un baño de ultrasonido durante 5 min con la finalidad de desprender las células adheridas. A partir de la suspensión bacteriana obtenida después de la sonicación, se realizaron diluciones seriadas para determinar el número de bacterias adheridas por unidad de área (Log UFC/cm<sup>2</sup>) mediante conteo en placa en agar Mueller Hinton después de 24 h de incubación a 37° C.

#### Efecto de los Extractos de Raquis de Uva sobre la Motilidad de *L. monocytogenes*

Para observar el efecto del extracto de raquis en la motilidad tipo *swimming* de *L. monocytogenes*, se utilizó el método propuesto por Borges et al. (2012) con algunas modificaciones. A partir de cultivos en fase exponencial (18 h a 30 °C en caldo Mueller Hinton), se preparó un inóculo ajustando la densidad óptica (a 600 nm) a 0.1 unidades, lo que equivale a 0.5 unidades en la escala de McFarland ( $10^8$  UFC/mL). Posteriormente, 10 µL del inóculo se colocaron en el centro de cajas Petri con agar suave (0.3 % agar) en presencia de los extractos. Los extractos de raquis de uva Red Globe y Carignan se incorporaron al medio (a 45 °C) a una concentración de 0 (testigo), 0.125, 0.25, 0.5 y 1 veces la CMI. Por último, se incubaron las cajas Petri a 30 °C y se midió el diámetro (mm) de los halos producidos por la motilidad de la bacteria a las 24, 48 y 72 h de incubación. Cada experimento se realizó por duplicado.

## Energía Libre de Adhesión de *L. monocytogenes* expuesta a los Extractos de Raquis de Uva

El proceso de adhesión de las bacterias a superficies abióticas se puede predecir mediante un enfoque termodinámico calculando el cambio en la energía libre de adhesión ( $\Delta F_{adh}$ ) (Absolom et al., 1983). El cambio en la energía de adhesión es un potencial termodinámico donde valores negativos nos indican que el proceso de adhesión entre la bacteria y la superficie es favorable, mientras que valores positivos indican condiciones desfavorables. El  $\Delta F_{adh}$  se puede calcular a partir de la siguiente ecuación:

$$\Delta F_{adh} = \gamma^{bs} - \gamma^{bl} - \gamma^{sl} \quad (1)$$

Donde  $\gamma^{bs}$ ,  $\gamma^{bl}$  y  $\gamma^{sl}$  es la energía libre de las interfaces del sistema, bacteria-superficie, bacteria-líquido, y superficie-líquido, respectivamente. Esta energía interfacial se puede calcular a partir de sus correspondientes energías superficiales ( $\gamma^{bv}$ ,  $\gamma^{lv}$  y  $\gamma^{sv}$ ). Utilizando la ecuación de estado de Neumann,  $\gamma^{bs}$ ,  $\gamma^{bl}$  y  $\gamma^{sl}$  se pueden expresar de la siguiente manera:

$$\gamma^{bs} = \gamma^{bv} + \gamma^{sv} - 2\sqrt{\gamma^{bv}\gamma^{sv}} e^{-\beta (\gamma^{bv} - \gamma^{sv})^2} \quad (2)$$

$$\gamma^{bl} = \gamma^{bv} + \gamma^{lv} - 2\sqrt{\gamma^{bv}\gamma^{lv}} e^{-\beta (\gamma^{bv} - \gamma^{lv})^2} \quad (3)$$

$$\gamma^{sl} = \gamma^{sv} + \gamma^{lv} - 2\sqrt{\gamma^{sv}\gamma^{lv}} e^{-\beta (\gamma^{sv} - \gamma^{lv})^2} \quad (4)$$

Siendo  $\beta$  una constante empírica con valor de  $0.0001247 \text{ (mJ/m}^2\text{)}^{-2}$  (Kwok y Neumann, 1999).

Si sustituimos las ecuaciones 2 – 4 en la ecuación 1, entonces:

$$\Delta F_{adh} = 2\sqrt{\gamma^{bv}\gamma^{lv}} e^{-\beta (\gamma^{bv} - \gamma^{lv})^2} + 2\sqrt{\gamma^{sv}\gamma^{lv}} e^{-\beta (\gamma^{sv} - \gamma^{lv})^2}$$

$$- 2\sqrt{\gamma^{bv}\gamma^{sv}} e^{-\beta(\gamma^{bv}-\gamma^{sv})^2} - 2\gamma^{lv} \quad (5)$$

Por lo tanto, a partir de la ecuación 5, la energía de adhesión se puede estimar a partir de la energía superficial de la bacteria ( $\gamma^{bv}$ ), la superficie de adhesión ( $\gamma^{sv}$ ), y del medio donde se lleve a cabo este proceso ( $\gamma^{lv}$ ) (el superíndice  $v$  representa la fase vapor en la cual se determina la energía superficial).

### **Determinación de la Energía Superficial de la Solución Salina ( $\gamma^{lv}$ ) y las Superficies de Acero Inoxidable 304 y Polipropileno ( $\gamma^{sv}$ )**

La energía superficial de la solución salina ( $\gamma^{lv}$ ) utilizada en los experimentos de adhesión, se determinó con un tensiómetro (CSC – Du Nouy, No. 70535), y fue de 65.3 mJ/m<sup>2</sup>. Mientras que la energía superficial del acero inoxidable 304 y el polipropileno se tomó de la literatura, siendo de 50.3 y 40.8 mJ/m<sup>2</sup> respectivamente (Mafu et al., 1991).

### **Determinación de la Energía Superficial de *L. monocytogenes* ( $\gamma^{bv}$ )**

La energía superficial de *L. monocytogenes* se determinó mediante el método espectrofotométrico descrito por Zhang et al. (2015), con algunas modificaciones. El principio de este método se basa en el análisis de la estabilidad coloidal de suspensiones bacterianas. De acuerdo a la teoría DLVO clásica (llamada así por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) que explica la tendencia de los coloides a aglomerarse o permanecer separados, la estabilidad coloidal de una suspensión bacteriana depende del balance entre las fuerzas de atracción de van der Waals y electroestáticas de repulsión. Un mínimo de atracción de van der Waals se puede obtener dispersando las células en un líquido con una tensión superficial cercana a la energía superficial de las células. En estas condiciones

se espera un mínimo de agregación y sedimentación de las células. Por lo tanto, cuando se dispersan células en una serie de líquidos con valores de tensión superficial conocidos, la tensión superficial del líquido con el máximo nivel de dispersión debe ser igual a la energía superficial de las células. El nivel de dispersión de las células en el líquido se puede determinar midiendo la densidad óptica de la suspensión ya que a mayor densidad óptica, menor sedimentación y mayor dispersión (Zhang et al., 2014).

Para el procedimiento experimental, primeramente se preparó un inóculo de *L. monocytogenes* a partir de un cultivo en fase exponencial (18 h a 30 °C en caldo Mueller Hinton). El cultivo se centrifugó a 3600 x g durante 3 min y el pellet se lavó con solución salina (3 lavados). Enseguida las células bacterianas se resuspendieron en solución salina seguido de 1 min de agitación en vortex y 1 min de sonicación, para obtener una suspensión homogénea con aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  UFC/mL (Zhang et al., 2015).

Por otra parte, se prepararon mezclas binarias de etanol y agua a diferentes proporciones (de 100:0 a 0:100; v:v) para obtener valores de tensión superficial de 23 a 76 mJ/m<sup>2</sup>. La tensión superficial de estas soluciones se determinó con un tensiómetro (CSC – Du Nouy, No. 70535). Posteriormente, se tomaron 100 µL de la suspensión de *L. monocytogenes* y se agregaron a 500 µL de cada solución, se agito en vortex y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 20 min. Seguido de esto, las suspensiones se centrifugaron a 200 x g durante 6 min para separar el sedimento del sobrenadante. Por último, se tomaron 150 µL de cada suspensión y se transfirieron a pozos de microplaca (Costar 96-Well) y se leyó su absorbancia a una longitud de onda de 600 nm en un lector de microplacas (Fluostar Omega, BMG Labtech). La densidad óptica de las suspensiones se graficó contra sus respectivos valores de tensión superficial y el valor máximo de dispersión se determinó con un ajuste polinomial de tercer orden. Las lecturas de absorbancia se realizaron por triplicado mientras que el experimento completo se repitió dos veces.

Para observar el efecto de los extractos de raquis de uva sobre la energía de adhesión de *L. monocytogenes*, la suspensión bacteriana se puso en contacto con cada uno de los extractos a 0.5 CMI durante 2 h. Enseguida se procedió con la metodología antes descrita para obtener los parámetros de energía superficial.

A partir de la energía superficial de la bacteria (expuesta o no a los extractos) ( $\gamma^{bv}$ ), la superficie de adhesión (acero inoxidable y polipropileno) ( $\gamma^{sv}$ ), y del medio donde se lleve a cabo este proceso (solución salina) ( $\gamma^{lv}$ ) se calculó el potencial de adhesión entre la bacteria y las superficies seleccionadas utilizando la ecuación 5.

#### Efecto de los Compuestos Fenólicos Identificados en los Extractos de Raquis de Uva sobre la Adhesión de *L. monocytogenes* en Superficies de Acero Inoxidable

Para ver el efecto de los principales compuestos fenólicos identificados en los extractos de raquis de uva sobre la adhesión de *L. monocytogenes*, se llevó a cabo la conversión de los valores de la CMI expresada como mg/mL a concentración molar (mM). A partir de las concentraciones molares se seleccionó la concentración 10 mM ya que se encuentra por debajo de todas las CMI, por lo tanto se elimina la posibilidad de algún efecto bactericida en el ensayo. Enseguida, se llevó a cabo el ensayo de adhesión de *L. monocytogenes* a acero inoxidable, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. De igual manera, se reportaron como resultados el número de células adheridas (Log UFC/cm<sup>2</sup>).

## Análisis Estadístico

Se realizó un diseño experimental completo al azar para todos los experimentos. Para la caracterización del extracto el factor a evaluar fue la variedad de la uva (Red Globe o Carignan) y las variables de respuesta fueron el rendimiento de la extracción y el contenido de fenoles y flavonoides totales. Para los ensayos de inhibición de adhesión el factor fue la concentración del extracto (1.0, 0.5, 0.25, 0.125 y 0 veces la CMI) para cada superficie (acero inoxidable o polipropileno) y para cada extracto y la variable de respuesta fue las células adheridas (Log UFC/cm<sup>2</sup>). Por otro lado, en los ensayos de inhibición de motilidad los factores fueron las concentraciones de cada extracto (1.0, 0.5, 0.25, 0.125 y 0 veces la CMI) y el tiempo de incubación (24, 48 y 72 h), y la variable de respuesta fue el porcentaje de inhibición de motilidad. Por último, para el potencial de adhesión los factores fueron la exposición a cada extracto y el tipo de superficie. La variable de respuesta fue la energía libre de adhesión de *L. monocytogenes* para cada superficie. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y en donde se encontraron diferencias se realizó una comparación múltiple de medias por el método de Tukey-Kramer a un 95% de confianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

### Contenido de Compuestos Fenólicos en los Extractos de Raquis de Uva

En el presente trabajo se obtuvieron extractos de raquis de uva de las variedades Red Globe y Carignan, subproductos de la industria de procesamiento mínimo y de la obtención de destilados de uva, respectivamente. El contenido de fenoles y flavonoides totales de los extractos se muestran en el Cuadro 3. Se puede observar que el extracto de raquis de uva Red Globe presentó  $\approx 2.5$  y  $\approx 2.0$  veces más ( $p < 0.05$ ) contenido de fenoles y flavonoides totales en comparación con el extracto de raquis Carignan.

Existen pocos reportes sobre la cuantificación de compuestos fenólicos en raquis de variedades de uva de mesa como la Red Globe, sin embargo existen diversos estudios donde se ha evaluado el contenido de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de raquis de variedades de uva para vinificación. En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con los datos reportados en la literatura, que señalan que los extractos de raquis de uva son una fuente importante de compuestos fenólicos. Por ejemplo, de Sá et al. (2014) reportan que el contenido de fenoles y flavonoides totales presentes en extractos de raquis de uva de la variedad Fernão Pires varía de 17.0 a 19.0 mg EAG/g p.f. y de 20.0 a 40.0 mg EC/g p.f., respectivamente; y además, se correlaciona ( $r = 0.89$ ) con su capacidad antioxidante ( $EC_{50} = 0.052 - 0.090$  mg/mM de DPPH'). De manera similar, el contenido de fenoles y proantocianidinas totales presentes en raquis de uvas de 10 variedades

**Cuadro 3.** Contenido de fenoles y flavonoides totales en los extractos de raquis de uva.

<b>Variedad</b>	<b>Fenoles totales (mg EAG/g p.s.)</b>	<b>Flavonoides totales (mg EQ/g p.s.)</b>
Red Globe	68.38±2.38*	98.07±2.60*
Carignan	27.84±1.3	55.85±0.46

\* Diferencia ( $p < 0.05$ ) entre valores de la misma columna. Los valores son media de tres repeticiones  $\pm$  el error estándar.

(Cabernet Sauvignon, Callet, Chardonnay, Macabeu, Manto Negro, Merlot, Parellada, Premsal blanc, Syrah y Tempranillo) se ha reportado que varía de 47.04 a 115.25 mg EAG/g y de 79.1 a 202.3 mg taninos/g, reportando también una actividad antioxidante de 99.7 – 253.2, 145.4 – 378.6, 65.4 – 170.1 y 101.9 – 282.1 mg ET/g, determinada por los métodos ABTS, CUPRAC, FRAP y ORAC, respectivamente (González-Centeno et al., 2012).

Los estudios en donde se ha llevado a cabo la caracterización de los compuestos fenólicos en el raquis de uva, se han enfocado en la obtención de extractos ricos en estos compuestos, con miras a ser utilizados como antioxidantes en la industria cosmética y farmacéutica (Anastasiadi et al., 2012), así como ingredientes con propiedades bioactivas para la elaboración de nutracéuticos y/o alimentos funcionales que aporten beneficios a la salud humana (Barros et al., 2014; González-Centeno et al., 2012). Sin embargo, se deja de lado el potencial antimicrobiano de estos extractos y su posible efecto sobre el proceso de adhesión de las bacterias patógenas a superficies de interés alimentarios.

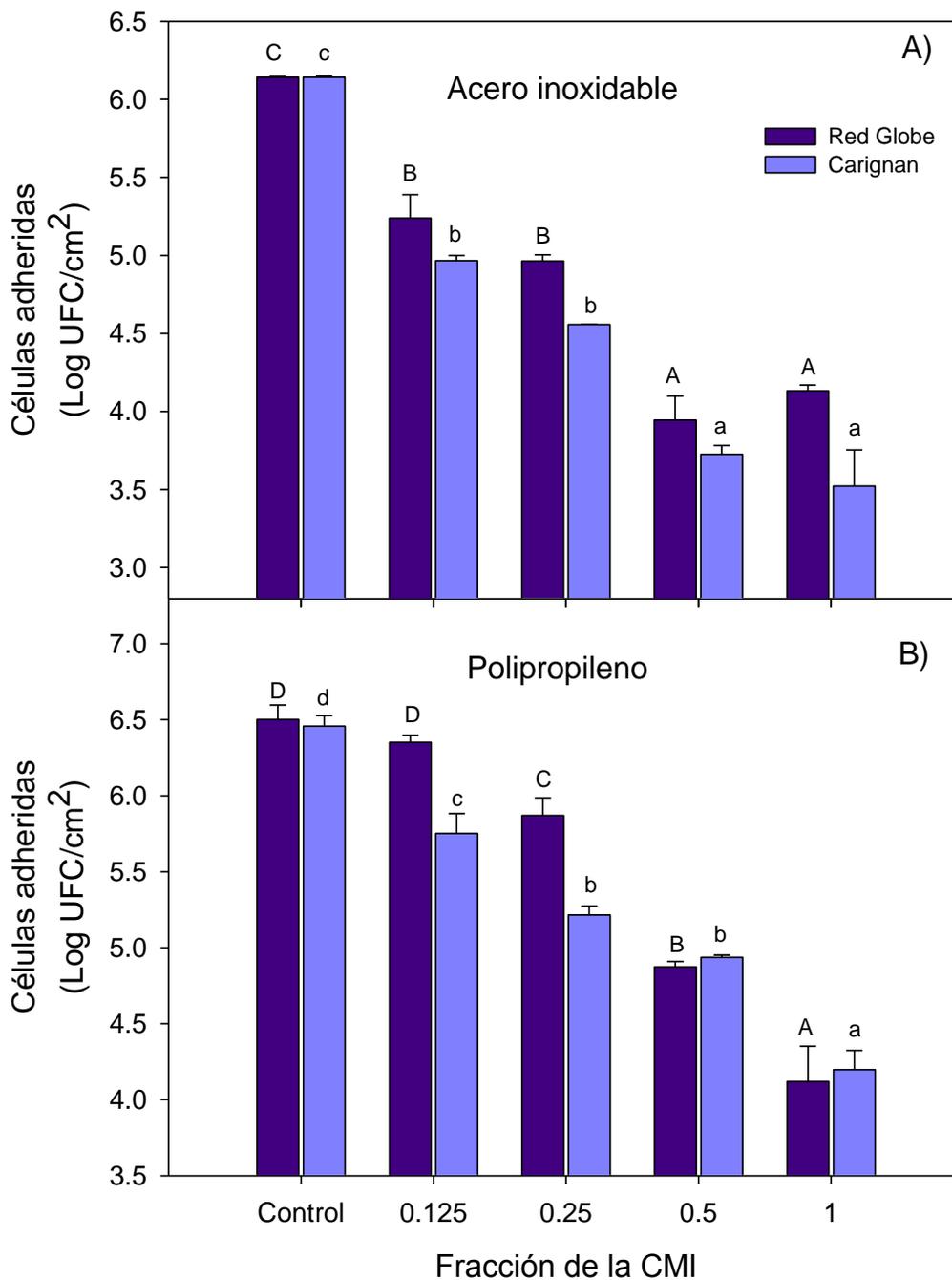
#### Efecto de los Extractos de Raquis de Uva sobre la Adhesión de *L. monocytogenes* en Superficies de Acero Inoxidable y Polipropileno

En el presente trabajo se seleccionaron acero inoxidable 304 y polipropileno como modelo de estudio para el proceso de adhesión, ya que son materiales ampliamente utilizados para la elaboración de superficies en contacto con alimentos. Para llevar a cabo los experimentos de adhesión en las superficies seleccionadas, primeramente se evaluó el potencial antibacteriano de los extractos obtenidos contra *L. monocytogenes*, con la finalidad de definir el rango de concentraciones a evaluar en las cuales no se afecte la viabilidad celular. La concentración mínima inhibitoria del crecimiento (CMI) fue de 18 y 20 mg/mL para el extracto de raquis Red Globe y Carignan, respectivamente. Mientras que la concentración mínima bactericida fue mayor a 24 mg/mL para ambos extractos,

indicando un efecto bacteriostático en este rango de concentraciones. Con base en estos resultados se evaluó el efecto de los extractos de raquis de uva a sus respectivas CMI y fracciones 0.5, 0.25 y 0.125 veces la CMI sobre la adhesión de *L. monocytogenes* a acero inoxidable y polipropileno.

El número de bacterias adheridas a las superficies de acero inoxidable en ausencia de los extractos de raquis de uva (testigo) fue de 6.14 Log UFC/cm<sup>2</sup>. En la Figura 3.A se muestra el número de bacterias adheridas a acero inoxidable en presencia de los extractos de raquis de uva Red Globe y Carignan a diferentes concentraciones. Comparado con el testigo, ambos extractos redujeron ( $p < 0.05$ ) la adhesión de *L. monocytogenes* dependiendo de la concentración utilizada. La mayor inhibición ( $p < 0.05$ ) de la adhesión se observó en las concentraciones de 1.0 y 0.5 veces la CMI, que corresponde a 18 y 9 mg/mL para el extracto de Red Globe y 20 y 10 mg/mL para Carignan, con una reducción entre 2.001 y 2.2148 Log UFC/cm<sup>2</sup> para ambos extractos. Sin embargo, la diferencia entre estas concentraciones no fue significativa ( $p > 0.05$ ). Por otra parte, no se encontró diferencia ( $p > 0.05$ ) entre la concentración de 0.25 y 0.125 veces la CMI para ambos extractos, las cuales mostraron una reducción en la adhesión ( $p < 0.05$ ) de *L. monocytogenes* de 0.7703 – 1.1801 Log UFC/cm<sup>2</sup>.

De igual manera, en la Figura 3.B se observa el efecto de los extractos de raquis de uva sobre la adhesión de *L. monocytogenes* en superficies de polipropileno. El número de células adheridas en las superficies de polipropileno fue de 6.47 Log UFC/cm<sup>2</sup>. Así mismo, se observó una reducción ( $p > 0.05$ ) en la adhesión de *L. monocytogenes* a esta superficie de hasta 2.38 y 2.26 Log UFC/cm<sup>2</sup> en presencia de los extractos de raquis de uva Red Globe y Carignan, respectivamente (a 1.0 CMI). Para el extracto de raquis de uva Carignan no se encontraron diferencias ( $p > 0.05$ ) en la reducción (1.24 – 1.52 Log UFC/cm<sup>2</sup>) a concentraciones de 0.5 y 0.25 veces la CMI. Mientras que para el extracto de



**Figura 3.** Adhesión de *L. monocytogenes* (2 h a 25 °C) a superficies de acero inoxidable 304 (A) y polipropileno (B) en presencia de los extractos de raquis de uva Red Globe y Carignan. Los valores son medias de dos experimentos independientes  $\pm$  el error estándar.

raquis de uva Red Globe la reducción fue mayor ( $p < 0.05$ ) a 0.5 que a 0.25 veces la CMI (1.63 vs. 0.63 Log UFC/cm<sup>2</sup>). Por otra parte, a 0.125 veces la CMI el extracto de raquis Red Globe no afectó ( $p < 0.05$ ) la adhesión de la bacteria, mientras que con el extracto de raquis de uva Carignan la reducción fue de 0.71 Log UFC/cm<sup>2</sup>. Estos resultados son de gran importancia ya que la adhesión de *L. monocytogenes* se correlaciona con su habilidad para formar biopelículas (a menor número de células adheridas, menor formación de biopelícula) (Takahashi et al., 2010).

El número de células adheridas a la superficie de acero inoxidable sin presencia de los extractos de raquis de uva es mayor al observado por Sinde y Carballo (2000), quien reporta que la adhesión de tres cepas de *L. monocytogenes* sobre acero inoxidable (1 h de contacto a 25 °C) varía entre 5.08 y 5.49 Log UFC/cm<sup>2</sup>, mientras que en superficies de caucho y politetrafluoroetileno fue de 5.278 – 5.78 y 5.47 – 5.824 Log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente. De igual manera, fue mayor al reportado por Ganegama-Arachchi et al. (2013), donde se observó una adhesión de tres cepas de *L. monocytogenes* entre 4.6 y 5.2 Log UFC/cm<sup>2</sup> en acero inoxidable. Comparado con otras especies, también es mayor que *Salmonella* Enteritidis ( $\approx 5.25$  Log UFC/cm<sup>2</sup>, en acero inoxidable) (Chorianopoulos et al., 2010), *Enterobacter sakazakii* (3.71 – 5.11 Log UFC/cm<sup>2</sup>) (Kim et al., 2006), *E. coli* (5.37 Log UFC/cm<sup>2</sup>) (Hui y Dykes, 2012), y similar a *P. aeruginosa* (6.38 Log UFC/cm<sup>2</sup>) y *S. aureus* (6.39 Log UFC/cm<sup>2</sup>) (Hui y Dykes, 2012). Las diferencias entre el número de bacterias adheridas a las superficies de acero inoxidable pueden deberse a diversos factores como la concentración inicial del inóculo, la cepa utilizada, el tiempo de incubación y la temperatura, entre otros. Sin embargo, estos resultados demuestran la habilidad de *L. monocytogenes* para adherirse a superficies comúnmente utilizadas en la industria de los alimentos.

De acuerdo al estado del arte, no existen estudios donde se evalúe el efecto de extractos de subproductos del procesamiento de uva para inhibir la adhesión de patógenos como *L. monocytogenes* a superficies de interés alimentario. Sin embargo, este enfoque se ha llevado a cabo utilizando diversos extractos

naturales y otras superficies. Por ejemplo, se ha reportado que extractos metanólicos de romero (*Rosmarinus officinalis*), equinácea (*Echinacea angustifolia*), tomillo (*Thymus vulgaris*) y menta (*Mentha piperita*) a 1 mg/mL inhiben la adhesión y desarrollo de biopelículas de *L. monocytogenes* en superficies de cloruro de polivinilo (PVC) en 78, 77, 77 y 74% respectivamente en comparación al control (Sandasi et al., 2010). Sin embargo en este estudio no se evaluó la composición de los extractos utilizados.

Por otro lado, compuestos terpénicos como el *trans*-cinamaldehído, carvacrol, timol y eugenol, presentes en aceites esenciales de plantas, inhiben la adhesión de *L. monocytogenes* en acero inoxidable con una reducción de  $\approx 2.5 - 3.7$  log UFC/mL a una concentración de 0.3 – 2.5 mM (Upadhyay et al., 2013). De igual manera, el aceite esencial de milenrama (*Achillea millefolium*), una planta con usos medicinales, aplicado a la CMI (3.13%), inhibe la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable y polietileno de alta densidad en 3.34 y 2.24 Log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente (Jadhav et al., 2013). Este efecto es atribuido a sus principales componentes, como el  $\beta$ -pineno, 1,8-cineol, terpineno-4-ol y cariofileno (Jadhav et al., 2013).

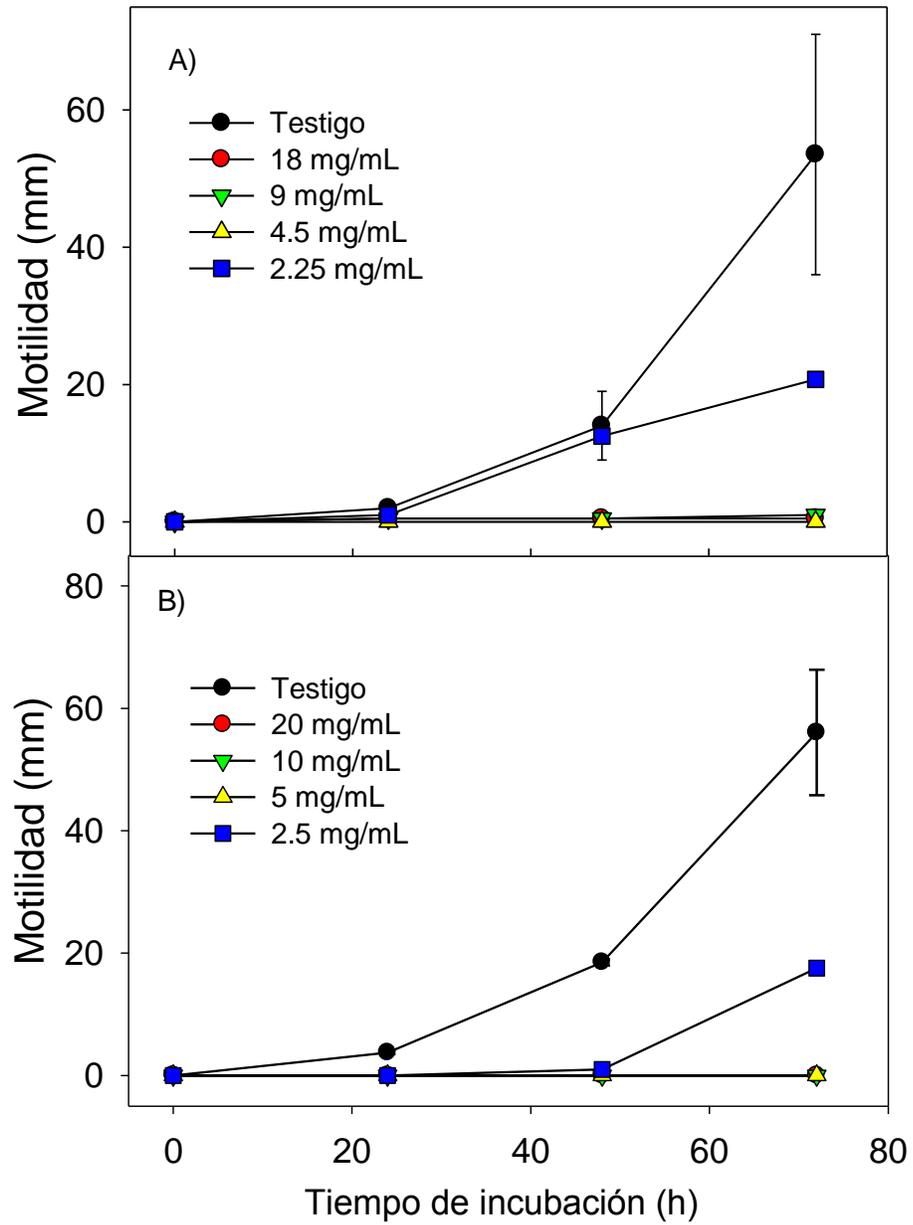
Es importante resaltar que en los estudios antes mencionados se han utilizado extractos y aceites esenciales de plantas utilizadas comúnmente para fines culinarios y/o medicinales, así como compuestos volátiles presentes en este tipo de plantas contra la adhesión de *L. monocytogenes*. Mientras que en nuestro estudio se utilizaron extractos de subproductos agroindustriales, haciendo más atractiva su aplicación para fines similares, debido a su bajo costo, fácil obtención y el aprovechamiento sustentable que se realiza.

Por otra parte, debido a la naturaleza del material vegetal utilizado y la extracción dirigida, obtuvimos extractos ricos en compuestos fenólicos. Estudios previos han evaluado el efecto de extractos ricos en compuestos fenólicos sobre la adhesión de otras bacterias patógenas, por ejemplo, se ha reportado que extracto de hoja de té negro (0.5 %), rico en catequinas, inhibe en un 92.3% la adhesión *Streptococcus mutans* a superficies de vidrio mediante la inhibición de enzimas

relacionadas con la síntesis de SPE (Limsong et al., 2004). De manera similar, se ha reportado que un extracto comercial de arándano, rico en antocianinas, inhibe la adhesión de cepas clínicas de *E. coli* a superficies de poliestireno en aproximadamente 56% respecto al control a una concentración de 28.5 mg/mL (Wojnicz et al., 2012). Así mismo, los resultados de Trentin et al. (2013) muestran que una mezcla compleja de proantocianidinas, obtenida de extractos de diversas plantas medicinales brasileñas (*Anadenanthera colubrina*, *Commiphora leptophloeos* y *Myracrodruon urundeuva*), compuesta principalmente por profisetinidina, prorobinetinidina y taninos hidrolizables, inducen daños en *P. aeruginosa* a concentraciones subletales, provocando efectos bacteriostáticos e inhibiendo la adhesión en superficies de poliestireno. Por lo que los resultados observados en nuestro estudio pudieran deberse a la presencia de compuestos fenólicos en los extractos de raquis de uva.

#### Efecto de los Extractos de Raquis de Uva en la Motilidad tipo *Swimming* de *L. monocytogenes*

Con el propósito de investigar con más detalle el efecto inhibitorio de los extractos de raquis de uva Red Globe y Carignan sobre la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de interés alimentario, se evaluó el efecto de estos extractos sobre la motilidad. En este sentido, en la Figura 4 se muestra el efecto del extracto de raquis de uva Red Globe (A) y Carignan (B) sobre la motilidad tipo *swimming* de *L. monocytogenes* durante 72 h de incubación a 30 °C. Se puede observar que a las 24 h de incubación *L. monocytogenes* presenta un ligero desplazamiento sobre la superficie del agar suave (de 0 a 2 mm). Sin embargo, a las 48 h se observó un incremento ( $p < 0.05$ ) en la de 53



**Figura 4.** Efecto del extracto de raquis de uva A) Red Globe y B) Carignan sobre la motilidad tipo *Swimming* de *L. monocytogenes* durante 72 h de incubación a 30 °C.

9 y 4.5 mg/mL (1.0, 0.5 y 0.25 veces la CMI, respectivamente) afectó la capacidad de *L. monocytogenes* para desplazarse sobre la superficie de agar suave, ya que no se observó ningún incremento ( $p>0.05$ ) en el halo respecto al superficie cubierta por la bacteria siendo de 14 mm, mientras que a las 72 h fue mm. Por otra parte, la presencia del extracto de raquis de uva Red Globe a 18, día cero (0 mm). Mientras que a 2.25 mg/mL se observó un aumento en el halo de motilidad a partir de 24 h de incubación, llegando a 20.7 mm a las 72 h de incubación.

En cuanto al efecto del extracto de raquis de uva Carignan, de igual manera en el testigo (0 mg/mL) se observó un halo de motilidad a partir de 24 h de incubación, llegando a 56 mm a las 72 h. Mientras que la presencia del extracto a 20, 10 y 5 mg/mL afectó ( $p>0.05$ ) la motilidad de *L. monocytogenes* observándose un 100% de inhibición. Para la concentración de 2.5 mg/mL, se observó un ligero desplazamiento (1 mm) a las 48 h, mientras que a las 72 h el desplazamiento fue de 17.5 mm. Estos resultados nos indican que ambos extractos tienen la capacidad de inhibir por completo motilidad tipo *swimming* en *L. monocytogenes* a partir de 0.25 veces la CMI.

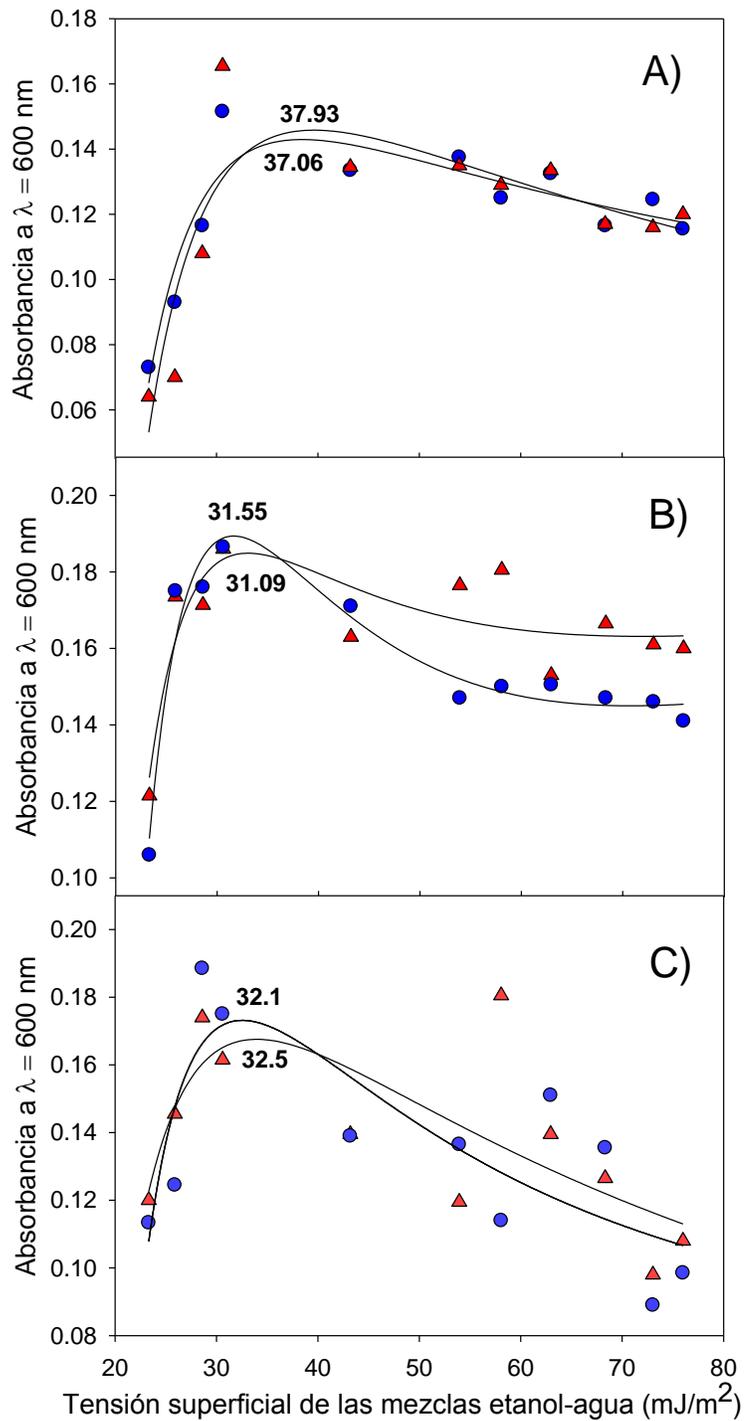
Previamente se ha establecido que la motilidad en *L. monocytogenes* es mediada por flagelos y es crítica en el proceso de adhesión a superficies abióticas (Lemon et al., 2007). Esto se ha observado, de manera similar, en otras bacterias como *E. coli*, *S. Typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa* (Almeida et al., 2012; Strehmel y Overhage, 2013). Además, también es considerada un factor importante en la adhesión y colonización de tejidos vegetales (Gorski et al., 2003). Se ha propuesto que el principal papel de los flagelos durante la adhesión es proveer la fuerza necesaria para vencer las fuerzas repulsivas que pueden existir entre la bacteria y la superficie (Todhanakasem y Young, 2008). Por lo que la inhibición de la motilidad mediada por flagelos podría estar relacionada con la inhibición de la adhesión a acero inoxidable descrita previamente.

El mecanismo exacto mediante el cual los extractos ricos en compuestos fenólicos afectan la motilidad bacteriana sigue siendo desconocido. Sin embargo, en un estudio realizado por Hidalgo et al. (2011), se observó que cuando *E. coli* crece en presencia de extractos de arándano, se suprime la regulación del gen que codifica para flagelina (*fliC*), una proteína estructural del flagelo bacteriano. También se observó en el mismo estudio que la disminución en la expresión de *fliC* limita la síntesis de flagelos, lo cual impide la motilidad tipo *swimming* y *swarming* en *E. coli* (Hidalgo et al., 2011). Sin embargo, es necesario investigar más a detalle si los compuestos fenólicos presentes en los extractos de raquis de uva tienen un efecto similar en *L. monocytogenes*.

#### Efecto de los Extractos de Raquis de Uva sobre la Energía Superficial y el Potencial de Adhesión de *L. monocytogenes*

En la Figura 5 se muestra el efecto de los extractos de raquis de uva Red Globe y Carignan sobre la energía superficial de *L. monocytogenes* determinada por el método espectrofotométrico. Se puede observar que a pesar de la variación en la dispersión de la bacteria en las diferentes suspensiones, el valor máximo de absorbancia cae en el mismo rango de tensión superficial en ambas corridas experimentales de todos los tratamientos (Figura 5.A, B y C). En la Figura 5.A podemos ver que la energía superficial de *L. monocytogenes* es de  $37.49 \pm 0.43$  mJ/m<sup>2</sup>, considerando que el valor máximo de absorbancia se da cuando la energía superficial de la bacteria es igual a la tensión superficial del líquido donde se encuentra suspendida. Así mismo, se puede observar que los extractos de raquis de uva Red Globe y Carignan disminuyen ( $p < 0.05$ ) la energía superficial de *L. monocytogenes* mostrando valores de  $32.30 \pm 0.20$  y  $31.32 \pm 0.23$  mJ/m<sup>2</sup>, respectivamente. Sin embargo, no se observó diferencia ( $p > 0.05$ ) entre estos valores.

La energía superficial puede ser considerada como una medida de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana. A menor energía superficial, mayor



**Figura 5.** Energía superficial de *L. monocytogenes* expuesta a los extractos de raquis de uva. A) Control; B) Red Globe; C) Carignan. Los triángulos rojos y círculos azules representan los valores de la primera y segunda corrida experimental respectivamente.

hidrofobicidad (Sinde y Carballo, 2000). La energía superficial que mostró *L. monocytogenes* es menor que la reportada para bacterias como *E. coli* (65.1 mJ/m<sup>2</sup>), *S. Typhimurium* (49.5 mJ/m<sup>2</sup>) y *Enterococcus faecalis* (64.5 mJ/m<sup>2</sup>), las cuales son consideradas de carácter hidrofílico (Zhang et al., 2015). En el caso de *L. monocytogenes*, la hidrofobicidad depende de la temperatura de crecimiento. Por ejemplo, Carballo y Araújo (2012) reportan que la energía superficial de *L. monocytogenes* es de 65.89 – 66.34 mJ/m<sup>2</sup> cuando crece a 37 °C. Así mismo, Briandet et al. (1999) reportó que la superficie de *L. monocytogenes* es hidrofílica cuando crece a 37 °C; sin embargo, cuando crece a temperaturas menores (20, 15 u 8 °C), se vuelve hidrofóbica. De igual manera, Takahashi et al. (2010) reportan que *L. monocytogenes* es de carácter hidrofóbico a 20 °C. Este cambio en las propiedades de la bacteria se relaciona con la síntesis de flagelos, la cual se inhibe a 37 °C (Briandet et al., 1999).

Por otra parte, a partir de los valores de energía superficial de *L. monocytogenes* ( $\gamma^{bv}$ ), la solución salina ( $\gamma^{lv} = 65.3 \text{ mJ/m}^2$  y las superficies de acero inoxidable 304 ( $\gamma^{sv} = 50.3 \text{ mJ/m}^2$ ), y polipropileno ( $\gamma^{sv} = 40.8 \text{ mJ/m}^2$ ), se calculó el potencial de adhesión ( $\Delta F_{adh}$ ) entre *L. monocytogenes* y las superficies, así como el efecto de los extractos de raquis de uva (a 0.5 veces la CMI) sobre este parámetro (Cuadro 4). El  $\Delta F_{adh}$  entre *L. monocytogenes* y la superficie de acero inoxidable 304 fue de -14.38 mJ/m<sup>2</sup>, mientras que para la superficie de polipropileno fue de -23.06 mJ/m<sup>2</sup>. Los valores negativos de  $\Delta F_{adh}$  nos indican que la adhesión entre *L. monocytogenes* y ambas superficies es termodinámicamente favorable. Además, nos indican que la adhesión de *L. monocytogenes* a polipropileno es más favorable que en acero inoxidable, lo cual concuerda con lo determinado experimentalmente donde se observó que el número de células adheridas fue mayor en polipropileno que en acero inoxidable (6.5 y 6.14 Log UFC/cm<sup>2</sup>, respectivamente).

Comparando con otras bacterias patógenas, el potencial de adhesión ( $\Delta F_{adh}$ ) indica condiciones favorables para la adhesión de *Pseudomonas putida* y *S. Typhimurium* a vidrio ( $\Delta F_{adh} = -22.0$  y  $-10.0 \text{ mJ/m}^2$ , respectivamente) y de *P.*

*aeruginosa* a poliestireno ( $\Delta F_{adh} = -2.9 \text{ mJ/m}^2$ ) (Borges et al., 2012; Zhang et al., 2015). Mientras que este parámetro indica condiciones termodinámica mente desfavorables para *E. coli*, *S. aureus* y *L. monocytogenes* a poliestireno ( $\Delta F_{adh} = 4.7, 3.1$  y  $5.4 \text{ mJ/m}^2$ , respectivamente) a pesar de que la adhesión sí se lleva a cabo (Borges et al., 2014). Estas discrepancias se deben a que el proceso de adhesión bacteriana a superficies abióticas no sólo depende de factores fisicoquímicos. En este proceso, además influyen factores ecológicos y ambientales, así como propiedades intrínsecas de la bacteria como la motilidad y la presencia de estructuras extracelulares (Borges et al., 2012).

Por otro lado, la exposición de *L. monocytogenes* a ambos extractos resultó en una disminución ( $p > 0.05$ ) del  $\Delta F_{adh}$  para las superficies de acero inoxidable (Red Globe:  $-16.72 \text{ mJ/m}^2$ ; Carignan:  $-16.38 \text{ mJ/m}^2$ ) y polipropileno (Red Globe  $\text{mJ/m}^2$ :  $-27.19$ ; Carigan:  $-26.58 \text{ mJ/m}^2$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias ( $p < 0.05$ ) entre el efecto de ambos extractos. De igual manera, valores negativos nos indican condiciones favorables para la adhesión entre la bacteria y las superficies. No obstante, el número de células adheridas a ambas superficies fue menor en presencia de los extractos de raquis de uva Red Globe y Carignan ( $3.7 - 3.9$  y  $4.8 - 4.9 \text{ Log UFC/cm}^2$ , respectivamente) a 0.5 veces la CMI. Lo que puede indicar que los extractos de raquis de uva tienen efectos sobre las propiedades fisicoquímicas de la bacteria que hacen que su adhesión sea más favorable desde el punto de vista termodinámico, sin embargo, también pudieran interfiere con los mecanismos biológicos de adhesión bacteriana más específicos como por ejemplo la síntesis de SPE durante la fase de adhesión irreversible.

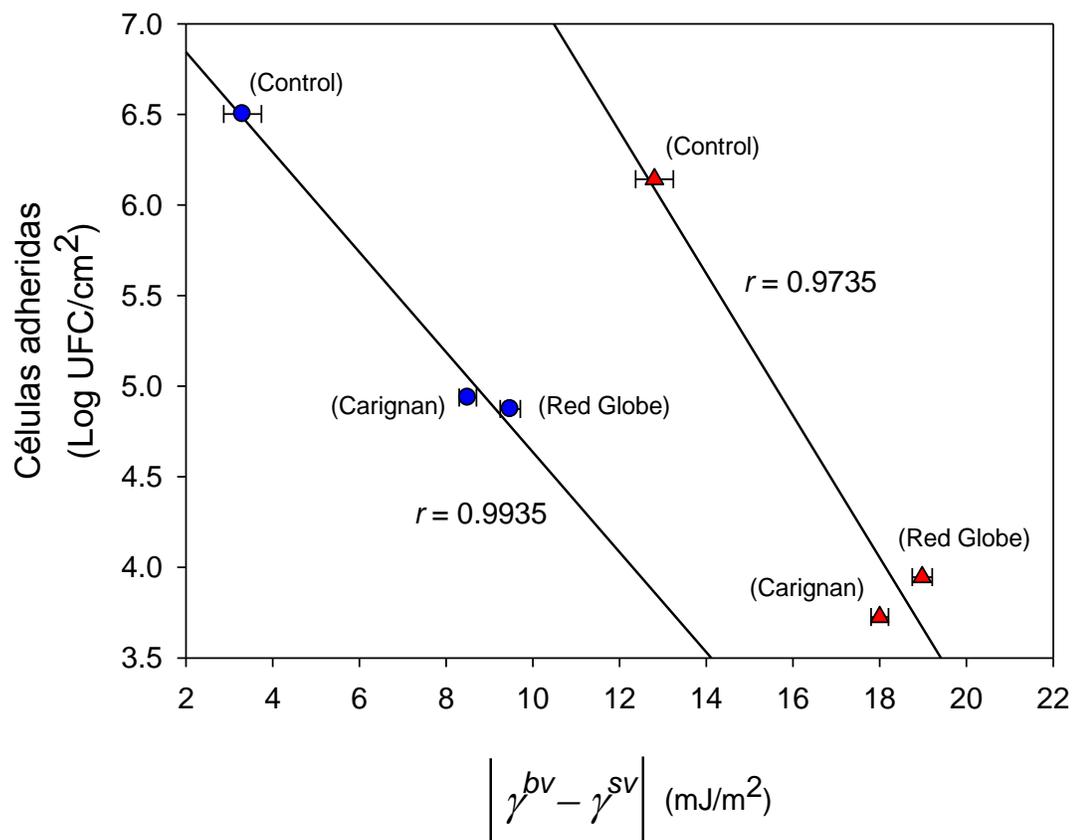
**Cuadro 4.** Potencial de adhesión ( $\Delta F_{adh}$ ) entre *L. monocytogenes* expuesta a extractos de raquis de uva (0.5 CMI) y las superficies de acero inoxidable y polipropileno. Los valores mostrados son el promedio de dos experimentos independientes.

Tratamiento	$\Delta F_{adh}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	
	Acero inoxidable 304	Polipropileno
Testigo	-14.38 a*	-23.06 a
Red Globe	-16.72 b	-27.19 b
Carignan	-16.38 b	-26.58 b

\* Literales diferentes expresan diferencias ( $p < 0.05$ ) entre los valores de la misma columna.

Por otra parte, el  $\Delta Fadh$  sólo indica si la adhesión bacteriana es favorable o no en las condiciones dadas, sin embargo, no se pueden hacer análisis cuantitativos. Por esta razón, Zhang et al. (2015) proponen el uso del valor absoluto de la diferencia entre la energía superficial de la bacteria y la superficie de adhesión ( $|\gamma^{bv} - \gamma^{sv}|$ ) para predecir cuantitativamente la adhesión bacteriana. En este sentido, en la Figura 6, se muestra el número de células de *L. monocytogenes* adheridas en función de la diferencia de energía superficial entre la bacteria y las superficies de acero inoxidable y polipropileno. Podemos observar que el grado de adhesión bacteriana se correlaciona negativamente con la disminución en la diferencia de la energía superficial en ambas superficies (acero inoxidable:  $r = - 0.9935$ ; polipropileno:  $r = - 0.9735$ ), es decir a mayor diferencia, menor adhesión. A partir de esto, se puede inferir que *L. monocytogenes* se adhiere en mayor medida en superficies con similar energía superficial. Lo que concuerda con lo reportado en la literatura donde se menciona que las bacterias con mayor energía superficial tendrán mayor afinidad por sustratos con mayor energía superficial y viceversa (Ábalos, 2005).

En el caso particular del presente estudio, la disminución en la energía superficial o aumento en la hidrofobicidad de *L. monocytogenes* es ocasionada por la exposición de la bacteria a los extractos de raquis de uva Red Globe y Carignan (Figura 6.B y C). Una disminución en la hidrofobicidad se ha asociado con la destrucción de estructuras extracelulares como adhesinas, fimbrias o flagelos (altamente hidrofóbicos) por compuestos fenólicos como los taninos (Voravuthikunchai y Suwalak, 2009). Mientras que un aumento de la hidrofobicidad generalmente se asocia a un incremento de estructuras extracelulares (Hui y Dykes, 2012). En *L. monocytogenes*, se ha observado que la inducción de la síntesis de exopolisacáridos a través del mensajero C-di-GM, inhibe su motilidad e interfiere en el proceso de adhesión y formación de biopelículas (Chen et al., 2014). En el presente estudio no se cuantificó la producción de exopolisacáridos, por lo que resulta interesante evaluar en un futuro si la inhibición de motilidad, la reducción en la adhesión y el aumento en



**Figura 6.** Correlación entre el número de células adheridas y la diferencia de energía superficial de *L. monocytogenes* y las superficies de acero inoxidable (▲) y polipropileno (●) ( $|\gamma^{bv} - \gamma^{sv}|$ ).

la hidrofobicidad de *L. monocytogenes* expuesta a los extractos de raquis de uva se debe a una inducción en la síntesis de exopolisacáridos.

#### Identificación de los Compuestos Fenólicos en los Extractos de Raquis de Uva

Con la finalidad de conocer qué compuestos son los responsables del efecto antimicrobiano, la inhibición de la adhesión y la inhibición de la motilidad de los extractos contra *L. monocytogenes*, se llevó a cabo la identificación y cuantificación de los principales compuestos fenólicos en ambos extractos. Los compuestos fenólicos presentes en el extracto de raquis de uva Red Globe se identificaron y cuantificaron mediante Cromatografía Líquida de Ultra-alta Resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos (UPLC-DAD). En el Cuadro 5 se muestra que los principales compuestos fueron rutina (212.57 µg/g p.s.), ácido gálico (184.10 µg/g p.s.), ácido clorogénico (173.26 µg/g p.s.), ácido cafeico (50.59 µg/g p.s.), catequina (34.31 µg/g p.s.) y ácido ferúlico (8.19 µg/g p.s.). Mientras que para el extracto de raquis de uva Carignan, se identificaron los compuestos fenólicos mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD). En el Cuadro 6. se muestra que los principales compuestos identificados en este extracto son ácido gálico, los flavonoides rutina y apigenina, así como ácido protocateico, ácido elágico, ácido cafeico y epicatequina.

Se ha reportado que extractos de raquis de uva de diferentes cultivares son fuente importante de flavonoides, incluyendo catequina, epicatequina, epicatequina-3-O-galato, proantocianidinas, quercetina y sus derivados glicósidos, entre otros (González-Centeno et al., 2012; Vivas et al., 2004). Spatafora et al. (2013) reportan que la catequina (12.11 – 19.95 mg/g) y

**Cuadro 5.** Compuestos fenólicos identificados y cuantificados mediante UPLC-DAD en el extracto de raquis de uva Red Globe.

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración (<math>\mu\text{g/g p.s.}</math>)</b>
Ácido gálico	184.10
Ácido clorogénico	173.26
Catequina	34.31
Ácido cafeico	50.59
Rutina	212.57
Ácido ferúlico	8.19

**Cuadro 6.** Compuestos fenólicos identificados mediante HPLC-DAD en el extracto de raquis de uva Carignan.

<b>Compuesto</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>	<b>% Área bajo la curva</b>
Ácido gálico	4.24	61.96
Ácido protocateico	6.72	2.09
Ácido cafeico	20.13	1.09
Epicatequina	22.01	0.28
Ácido elágico	27.49	1.79
Rutina	27.96	20.80
Apigenina	60.97	11.98

Procianidina B1 (6.19 – 13.73 mg/g) son los compuestos fenólicos más abundantes en raquis de cultivares Sicilianos (Nerello Mascalese y Nero d'Avola). Barros et al. (2014) describe el contenido de compuestos fenólicos de raquis provenientes de uvas blancas y rojas, siendo la quercetina-3-O-glucurónido, algunos derivados de malvidina y epicatequina los principales metabolitos presentes en los cultivares analizados, representando entre un 54 y 75% del total de compuestos fenólicos. En cuanto al contenido de ácidos fenólicos, el ácido gálico ha sido considerado como el principal ácido hidroxibenzoico en el raquis de uva, mientras que los ácidos hidroxicinámicos, como el *p*-cumárico, ferúlico, cafeico y sus derivados, son reportados sólo en cantidades traza (Anastasiadi et al., 2012).

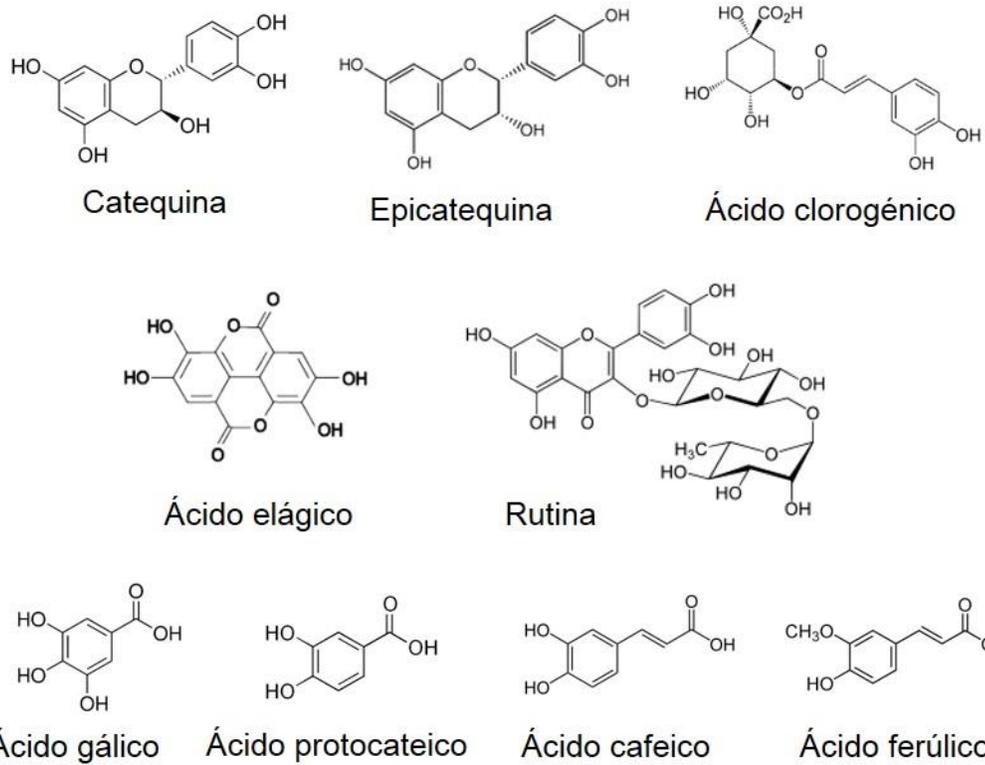
Por otra parte, el efecto antibacteriano de los extractos de raquis de uva Red Globe y Carigan se puede asociar a la presencia de compuestos fenólicos. Se ha reportado por ejemplo, que rutina (presente en ambos extractos) promueve selectivamente la escisión de la topoisomerasa IV, una enzima esencial en la supervivencia de *E. coli* (Bernard et al., 1997). También, la actividad antibacteriana de la quercetina se ha atribuido parcialmente a la inhibición de la enzima ADN girasa (Cushnie y Lamb, 2005). En cuanto a los ácidos fenólicos, se ha reportado que el ácido gálico provoca daños en la membrana externa de *Salmonella* spp., debido al efecto quelante de cationes divalentes presentes en la membrana (Nohynek et al., 2006). De igual manera, se ha propuesto que los ácidos hidroxicinámicos (como el ácido ferúlico y cafeico) pueden interactuar mejor con la membrana celular debido a su grupo alifático que los hace menos polares en comparación con los ácidos hidroxibenzoicos (Nohynek et al., 2006).

## Efecto de los Compuestos Fenólicos Sobre la Adhesión de *L. monocytogenes* a Acero Inoxidable

Una vez identificados los principales compuestos fenólicos en ambos extractos, se seleccionaron algunos de estos (Figura 7.) y se evaluó su efecto sobre la adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable siguiendo el procedimiento antes descrito. Primeramente se llevó a cabo la determinación de la concentración mínima inhibitoria del crecimiento, evaluando un rango de 7 – 1 mg/mL. Estos resultados se muestran en el Cuadro 7. Se puede observar que *L. monocytogenes* es más susceptible a los ácidos fenólicos ferúlico, cafeico, protocateico, gálico y clorógeno (CMI = 3 – 6 mg/L) que otros compuestos como catequina, epicatequina, rutina y ácido elágico (CMI >7 mg/mL).

Para llevar a cabo una comparación entre los principales compuestos sobre la adhesión de *L. monocytogenes*, se llevó a cabo la conversión de los valores de la CMI expresada como mg/mL a concentración molar (mM). A partir de las concentraciones molares se seleccionó la concentración 10 mM ya que se encuentra por debajo de todas las CMI, por lo tanto se elimina la posibilidad de algún efecto bactericida en el ensayo.

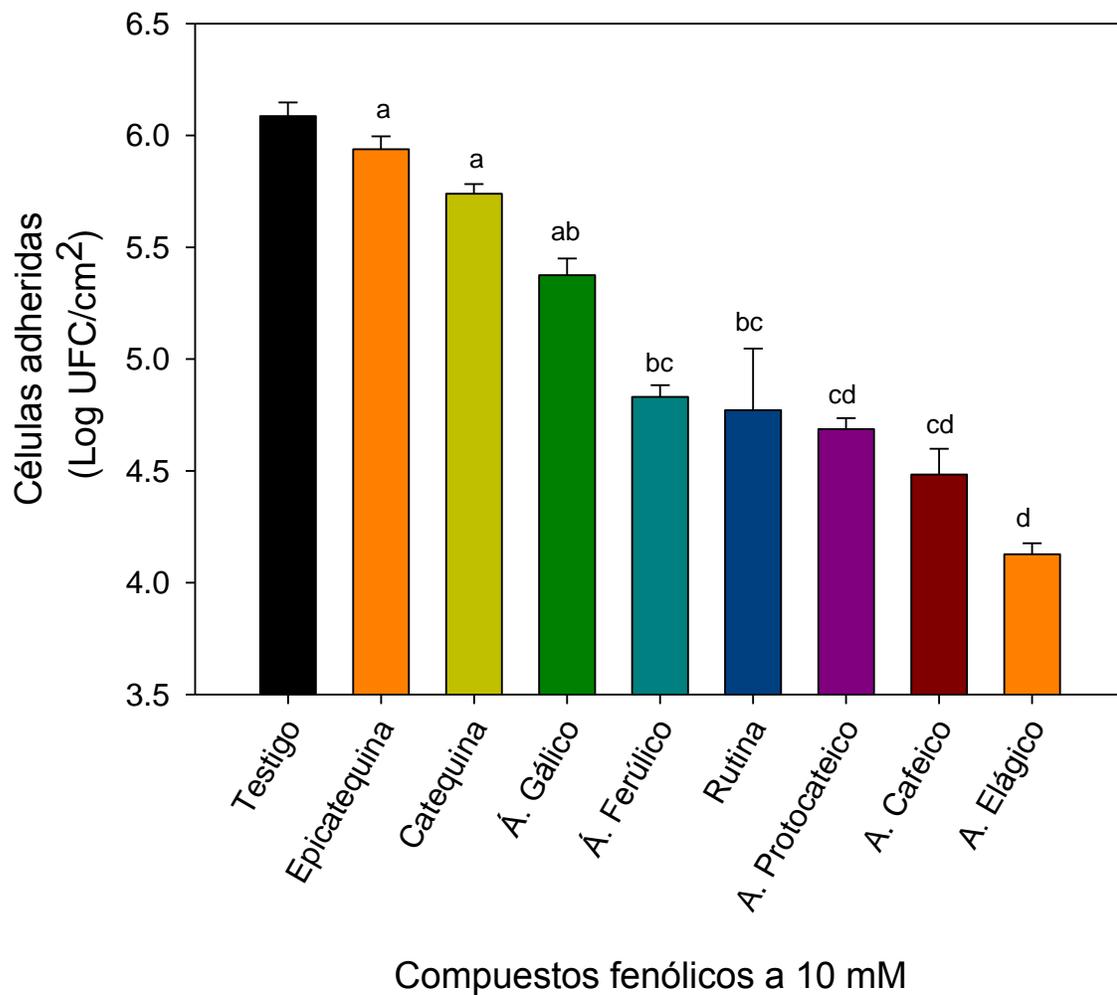
En la Figura 8. se observa el efecto de los compuestos fenólicos selectos sobre la adhesión de *L. monocytogenes* a acero inoxidable a las mismas condiciones en las que se evaluaron los extractos de raquis de uva Red Globe y Carignan (2 h, 25 °C). De igual manera, el número de bacterias adheridas en el control fue de 6.08 Log UFC/cm<sup>2</sup>. A partir de este valor, se calculó la reducción logarítmica en la adhesión de cada compuesto. De manera general, todos los extractos mostraron una reducción ( $p < 0.05$ ) en la adhesión. Siendo el ácido elágico el más efectivo con una reducción de 1.96 Log UFC/cm<sup>2</sup>. Mientras que no se encontró diferencia ( $p > 0.05$ ) entre los ácidos cafeico, protocateico, rutina y ácido ferúlico con una reducción entre 1.255 – 1.603 Log UFC/cm<sup>2</sup>. A su vez, la reducción de la adhesión observada en presencia de rutina y ácido ferúlico fue igual estadísticamente ( $p > 0.05$ ) a la observada en presencia de ácido gálico



**Figura 7.** Estructuras de algunos compuestos fenólicos identificados en ambos extractos de raquis de uva.

**Cuadro 7.** Concentraciones mínimas inhibitorias del crecimiento de *L. monocytogenes* de los compuestos fenólicos identificados en los extractos de raquis de uva.

<b>Compuesto</b>	<b>CMI (mg/mL)</b>
Catequina	>7
Epicatequina	>7
Rutina	>7
Ácido elágico	>7
Ácido clorógeno	6
Ácido gálico	4
Ácido protocateico	3
Ácido cafeico	3
Ácido ferúlico	3



**Figura 8.** Adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable (2 h a 25 °C) en presencia de compuestos fenólicos identificados en los extractos de raquis de uva. Los valores son medias de dos experimentos independientes  $\pm$  el error estándar.

(0.711 Log UFC/cm<sup>2</sup>). Por último, la catequina y epicatequina fueron los compuestos que mostraron la menor reducción en la adhesión de *L. monocytogenes* a acero inoxidable con valores de 0.208 - 0.347 Log UFC/cm<sup>2</sup>.

Previamente, se ha reportado que algunos compuestos fenólicos inhiben la adhesión y formación de biopelículas de diferentes bacterias patógenas incluyendo *L. monocytogenes*. Uno de ellos es el ácido gálico (presente en ambos extractos), que se ha reportado que concentraciones de 1 mg/mL inhibe la adhesión *L. monocytogenes* en casi un 100% a superficies de polietileno, siendo esta reducción mayor a la observada en *E. coli* (41 %), *P. aeruginosa* (85 %) y *S. aureus* (70 %) (Borges et al., 2012). En este mismo estudio se observó que el ácido gálico inhibe la motilidad tipo *swimming* en *L. monocytogenes* en un 70.5% respecto al control.

Al contrario de lo observado en nuestros resultados, en un estudio llevado a cabo por Borges et al. (2012), no se observó efecto del ácido ferúlico sobre la adhesión y formación de biopelículas de *L. monocytogenes* en polietileno. Sin embargo, sí se observó una inhibición del 100% en la motilidad. Por otro lado Lemos et al. (2014), reportan que este mismo compuesto a 0.5 mg/mL, previene la formación de biopelículas de *B. cereus* y *P. fluorescens* (≈30 y 35 % de reducción de biomasa) y a 1 mg/mL, inhibe la motilidad tipo *swimming* de *B. cereus* y *P. fluorescens* en ≈92 y 96%, respectivamente. También hay reportes que mencionan que, el ácido cafeico y clorogénico sólo tienen efecto sobre la adhesión de *S. aureus* a concentraciones de 4 - 1 mg/mL (Luís et al., 2014).

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran que la inhibición de la adhesión de *L. monocytogenes* a acero inoxidable y polipropileno observada en presencia de los extractos de raquis de uva, se debe principalmente al efecto de los compuestos fenólicos. Por otra parte, a pesar de existir diferencias en cuanto al contenido de ácidos fenólicos y flavonoides entre ambos extractos, éstos presentaron un efecto similar contra la adhesión, motilidad y potencial de adhesión de *L. monocytogenes*. Esto se podría explicar en parte, a las posibles interacciones entre compuestos fenólicos en cada extracto. Estas interacciones

pueden ser sinérgicas, aditivas o antagónicas (Skroza et al., 2015). Por ejemplo, se ha observado que en mezclas de ácido gálico – ácido protocateico y ácido gálico – ácido cafeico, se observa un efecto sinérgico en la actividad antimicrobiana de estos compuestos contra *L. monocytogenes*, mientras que en mezclas de rutina y catequina se observa un efecto antagónico (Rodríguez Vaquero et al., 2011).

Mezclas con posible actividad sinérgica como ácido gálico – ácido cafeico, se pueden encontrar en el extracto de raquis de uva Red Globe. A la vez, podemos encontrar rutina – catequina, con efecto antagónico. Por otra parte, en el extracto de raquis de uva Carignan podemos encontrar combinaciones de ácido gálico – ácido protocateico/cafeico con posible efecto sinérgico, además de ácido protocateico – ácido cafeico, con posible efecto antagónico. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios más profundos con la finalidad de confirmar si estas combinaciones tienen efecto similar sobre la inhibición de la adhesión de *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable y polipropileno. Además de considerar combinaciones más complejas simulando condiciones más representativas de los extractos naturales. Con base en esto, nos limitamos a inferir que no sólo la presencia de compuestos fenólicos en los extractos naturales determina su actividad antiadhesión, sino el perfil de estos compuestos en el extracto.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran el potencial que tienen los extractos de raquis de uva de las variedades Red Globe y Carignan para inhibir el proceso de adhesión de *L. monocytogenes* a superficies de acero inoxidable y polipropileno, así como de inhibir la motilidad y modificar el potencial de adhesión de esta bacteria. Además se demuestra que el efecto sobre la adhesión es debido a los compuestos fenólicos presentes en ambos extractos.

## RECOMENDACIONES Y ESTUDIOS FUTUROS

Para futuros estudios se sugiere evaluar el efecto de los extractos de raquis de uva sobre la capacidad de *L. monocytogenes* de formar biopelículas. Además de caracterizar los cambios en las sustancias poliméricas extracelulares de las biopelículas formadas en presencia de los extractos. Es necesario también investigar a fondo el mecanismo de inhibición de la motilidad; por ejemplo, mediante el estudio de la expresión de genes relacionados con este proceso. Así mismo, se sugiere evaluar combinaciones de los compuestos fenólicos identificados en los extractos de raquis de uva, para poder corroborar si existen efectos sinérgicos, aditivos o antagónicos contra la adhesión de *L. monocytogenes* en las superficies estudiadas.

Por otra parte, es necesario evaluar el efecto de los extractos sobre la patogenicidad de *L. monocytogenes*.

## REFERENCIAS

- Ábalos, C., 2005. Adhesión bacteriana a biomateriales. *Avances en Odontostomatología* 21(1):347-353.
- Abban, S., Jakobsen, M., Jespersen, L., 2012. Attachment behaviour of *Escherichia coli* K12 and *Salmonella* Typhimurium P6 on food contact surfaces for food transportation. *Food Microbiology* 31(2):139-147.
- Absolom, D.R., Lamberti, F.V., Policova, Z., Zingg, W., van Oss, C.J., Neumann, A., 1983. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and environmental microbiology* 46(1):90-97.
- AlAbbas, F.M., Spear, J.R., Kakpovbia, A., Balhareth, N.M., Olson, D.L., Mishra, B., 2012. Bacterial attachment to metal substrate and its effects on microbiologically-influenced corrosion in transporting hydrocarbon pipelines. *Journal of Pipeline Engineering* 11(1):63.
- Almeida, C., Nóbrega, F., Kluskens, L., Azevedo, N., Keevil, C., Vieira, M., 2012. The role of flagellum and flagellum-based motility on *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* biofilm formation.
- Almeida, G., Magalhães, R., Carneiro, L., Santos, I., Silva, J., Ferreira, V., Hogg, T., Teixeira, P., 2013. Foci of contamination of *Listeria monocytogenes* in different cheese processing plants. *International journal of food microbiology* 167(3):303-309.
- Almela, C., Espert, M., Ortolá, M., Castelló, M., 2014. Influence of minimally processed grapes washing with lemon essential oil. *International Food Research Journal* 21(5):1851-1857.
- Alvarez, M.V., Ortega-Ramirez, L.A., Gutierrez-Pacheco, M.M., Bernal-Mercado, A.T., Rodriguez-Garcia, I., Gonzalez-Aguilar, G.A., Ponce, A., Moreira, M.d.R., Roura, S.I., Ayala-Zavala, J.F., 2014. Oregano essential oil-pectin edible films as anti-quorum sensing and food antimicrobial agents. *Frontiers in microbiology* 5:699.

Anastasiadi, M., Chorianopoulos, N.G., Nychas, G.J., Haroutounian, S.A., 2009. Antilisterial activities of polyphenol-rich extracts of grapes and vinification byproducts. *Journal of agricultural and food chemistry* 57(2):457-463.

Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A.-L., Haroutounian, S.A., 2012. Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *LWT - Food Science and Technology* 48(2):316-322.

Ayala-Zavala, J., Vega-Vega, V., Rosas-Domínguez, C., Palafox-Carlos, H., Villa-Rodríguez, J., Siddiqui, M.W., Dávila-Aviña, J., González-Aguilar, G., 2011. Agro-industrial potential of exotic fruit byproducts as a source of food additives. *Food Research International* 44(7):1866-1874.

Barros, A., Gironés-Vilaplana, A., Teixeira, A., Collado-González, J., Moreno, D.A., Gil-Izquierdo, A., Rosa, E., Domínguez-Perles, R., 2014. Evaluation of grape (*Vitis vinifera* L.) stems from Portuguese varieties as a resource of (poly)phenolic compounds: A comparative study. *Food Research International* 65:375-384.

Blum-Menezes, D., Deliberalli, I., Bittencourt, N.C., Couto, C.A.T.d., Barbosa, L.N., Santos, A.M.d., Pinto, G.G., 2013. Listeriosis in the far South of Brazil: neglected infection? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 46(3): 381-383.

Borges, A., Saavedra, M.J., Simões, M., 2012. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling* 28(7):755-767.

Borges, A., Simões, L.C., Saavedra, M.J., Simões, M., 2014. The action of selected isothiocyanates on bacterial biofilm prevention and control. *International Biodeterioration & Biodegradation* 86:25-33.

Brahim, M., Gambier, F., Brosse, N., 2014. Optimization of polyphenols extraction from grape residues in water medium. *Industrial Crops and Products* 52:18-22.

Briandet, R., Meylheuc, T., Maher, C., Bellon-Fontaine, M.N., 1999. *Listeria monocytogenes* Scott A: cell surface charge, hydrophobicity, and electron donor and acceptor characteristics under different environmental growth conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 65(12):5328-5333.

Bruno, G., Sparapano, L., 2006. Effects of three esca-associated fungi on *Vitis vinifera* L.: II. Characterization of biomolecules in xylem sap and leaves of healthy and diseased vines. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 69(4):195-208.

Carballo, J., Araújo, A.-B., 2012. Evaluation of the efficacy of commercial sanitizers against adhered and planktonic cells of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. *Food Science and Technology (Campinas)* 32:606-612.

Carpentier, B., Cerf, O., 2011. Review—Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International journal of food microbiology* 145(1):1-8.

Cruz–Valenzuela, M.R., Carrazco–Lugo, D.K., Vega–Vega, V., Gonzalez–Aguilar, G.A., Ayala–Zavala, J.F., 2013. Fresh–cut orange treated with its own seed by–products presented higher antioxidant capacity and lower microbial growth. *International Journal of Postharvest Technology and Innovation* 3(1):13-27.

Chen, L.-H., Köseoğlu, V.K., Güvener, Z.T., Myers-Morales, T., Reed, J.M., D'Orazio, S.E.F., Miller, K.W., Gomelsky, M., 2014. Cyclic di-GMP-dependent signaling pathways in the pathogenic firmicute *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 10(8):e1004301.

Cho, H.S., Lee, J.-H., Ryu, S.Y., Joo, S.W., Cho, M.H., Lee, J., 2013. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation by plant metabolite  $\epsilon$ -viniferin. *Journal of agricultural and food chemistry* 61(29):7120-7126.

Chorianopoulos, N.G., Giaouris, E.D., Kourkoutas, Y., Nychas, G.-J.E., 2010. Inhibition of the early stage of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis biofilm development on stainless steel by cell-free supernatant of a *Hafnia alvei* culture. *Applied and environmental microbiology* 76(6):2018-2022.

da Silva Meira, Q.G., de Medeiros Barbosa, I., Alves Aguiar Athayde, A.J., de Siqueira-Júnior, J.P., de Souza, E.L., 2012. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control* 25(2):469-475.

Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology* 23(2):174-181.

FAOSTAT, 2014. FAO Statistical Databases & Data-sets.

Fратиanni, F., Coppola, R., Nazzaro, F., 2011. Phenolic composition and antimicrobial and antiquorum sensing activity of an ethanolic extract of peels from the apple cultivar Annurca. *Journal of medicinal food* 14(9):957-963.

Ganegama-Arachchi, G., Cridge, A., Dias-Wanigasekera, B., Cruz, C., McIntyre, L., Liu, R., Flint, S., Mutukumira, A., 2013. Effectiveness of phages in the decontamination of *Listeria monocytogenes* adhered to clean stainless steel, stainless steel coated with fish protein, and as a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol* 40(10):1105-1116.

González-Centeno, M.a.R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., Teissedre, P.-L., 2013. Characterization of polyphenols and antioxidant potential of white grape pomace byproducts (*Vitis vinifera* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 61(47):11579-11587.

Gonzalez-Centeno, M.R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rossello, C., Teissedre, P.L., 2012. Proanthocyanidin composition and antioxidant potential of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of agricultural and food chemistry* 60(48):11850-11858.

Gorski, L., Palumbo, J.D., Mandrell, R.E., 2003. Attachment of *Listeria monocytogenes* to radish tissue is dependent upon temperature and flagellar motility. *Applied and Environmental Microbiology* 69(1):258-266.

Guobjoernsdottir, B., Einarsson, H., Thorkelsson, G., 2005. Microbial adhesion to processing lines for fish fillets and cooked shrimp: influence of stainless steel surface finish and presence of gram-negative bacteria on the attachment of *Listeria monocytogenes*. *Food Technology and Biotechnology* 43(1):55-61.

Habimana, O., Semião, A., Casey, E., 2014. The role of cell-surface interactions in bacterial initial adhesion and consequent biofilm formation on nanofiltration/reverse osmosis membranes. *Journal of Membrane Science* 454:82-96.

Harmsen, M., Lappann, M., Knöchel, S., Molin, S., 2010. Role of Extracellular DNA during Biofilm Formation by *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* 76(7):2271-2279.

Hidalgo, G., Chan, M., Tufenkji, N., 2011. Inhibition of *Escherichia coli* CFT073 fliC expression and motility by cranberry materials. *Applied and Environmental Microbiology* 77(19):6852-6857.

Hui, Y.W., Dykes, G.A., 2012. Modulation of cell surface hydrophobicity and attachment of bacteria to abiotic surfaces and shrimp by Malaysian herb extracts. *Journal of Food Protection*® 75(8):1507-1511.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I., 2011. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry* 126(4):1821-1835.

Jadhav, S., Shah, R., Bhave, M., Palombo, E.A., 2013. Inhibitory activity of yarrow essential oil on *Listeria* planktonic cells and biofilms. *Food Control* 29(1):125-130.

Kappachery, S., Paul, D., Yoon, J., Kweon, J.H., 2010. Vanillin, a potential agent to prevent biofouling of reverse osmosis membrane. *Biofouling* 26(6):667-672.

Katalinic, V., Mozina, S.S., Generalic, I., Skroza, D., Ljubenkovic, I., Klančnik, A., 2013. Phenolic profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of leaf extracts from six *Vitis vinifera* L. varieties. *International Journal of Food Properties* 16(1):45-60.

Katsikogianni, M., Missirlis, Y., 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells and Materials* 8:37-57.

Kim, H., Ryu, J.-H., Beuchat, L.R., 2006. Attachment of and biofilm formation by *Enterobacter sakazakii* on stainless steel and enteral feeding tubes. *Applied and environmental microbiology* 72(9):5846-5856.

Köseoğlu, V.K., Heiss, C., Azadi, P., Topchiy, E., Güvener, Z.T., Lehmann, T.E., Miller, K.W., Gomelsky, M., 2015. *Listeria monocytogenes* exopolysaccharide: origin, structure, biosynthetic machinery and c-di-GMP-dependent regulation. *Molecular microbiology* 96(4):728-743.

Kwok, D., Neumann, A., 1999. Contact angle measurement and contact angle interpretation. *Advances in colloid and interface science* 81(3):167-249.

Lee, J.-H., Cho, H.S., Joo, S.W., Chandra Regmi, S., Kim, J.-A., Ryu, C.-M., Ryu, S.Y., Cho, M.H., Lee, J., 2013. Diverse plant extracts and trans-resveratrol inhibit biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* O157:H7. *Biofouling* 29(10):1189-1203.

Lee, J.-H., Park, J.-H., Cho, H.-S., Joo, S.-W., Cho, M.-H., Lee, J., 2013. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling* 29(5):491-499.

Lemon, K.P., Higgins, D.E., Kolter, R., 2007. Flagellar motility is critical for *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of bacteriology* 189(12):4418-4424.

Lemos, M., Borges, A., Teodósio, J., Araújo, P., Mergulhão, F., Melo, L., Simões, M., 2014. The effects of ferulic and salicylic acids on *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens* single- and dual-species biofilms. *International Biodeterioration & Biodegradation* 86:42-51.

Li, G., Brown, P.J.B., Tang, J.X., Xu, J., Quardokus, E.M., Fuqua, C., Brun, Y.V., 2012. Surface contact stimulates the just-in-time deployment of bacterial adhesins. *Molecular Microbiology* 83(1):41-51.

Li, R., Kuda, T., Yano, T., 2014. Effect of food residues on efficiency of surfactant disinfectants against food related pathogens adhered on polystyrene and ceramic surfaces. *LWT - Food Science and Technology* 57(1):200-206.

Limsong, J., Benjavongkulchai, E., Kuvatanasuchati, J., 2004. Inhibitory effect of some herbal extracts on adherence of *Streptococcus mutans*. *Journal of Ethnopharmacology* 92(2-3):281-289.

Liu, Y., Yang, C.-H., Li, J., 2007. Influence of extracellular polymeric substances on *Pseudomonas aeruginosa* transport and deposition profiles in porous media. *Environmental science & technology* 41(1):198-205.

Luís, Â., Silva, F., Sousa, S., Duarte, A.P., Domingues, F., 2014. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids. *Biofouling* 30(1):69-79.

Llobera, A., Cañellas, J., 2007. Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape *Vitis vinifera*: pomace and stem. *Food chemistry* 101(2):659-666.

Mafu, A.A., Roy, D., Goulet, J., Savoie, L., 1991. Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* 57(7):1969-1973.

Martins, I.S., da Conceição Faria, F.C., Miguel, M.A.L., Dias, M.P.d.S.C., Cardoso, F.L.L., de Gouveia Magalhães, A.C., Mascarenhas, L.A., Nouér, S.A., Barbosa, A.V., Vallim, D.C., 2010. A cluster of *Listeria monocytogenes* infections in hospitalized adults. *American journal of infection control* 38(9):31-36.

Midelet, G., Carpentier, B., 2002. Transfer of microorganisms, including *Listeria monocytogenes*, from various materials to beef. *Applied and Environmental Microbiology* 68(8):4015-4024.

Møretrø, T., Heir, E., Nesse, L.L., Vestby, L.K., Langsrud, S., 2012. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International* 45(2):532-544.

Nohynek, L.J., Alakomi, H.-L., Kähkönen, M.P., Heinonen, M., Helander, I.M., Oksman-Caldentey, K.-M., Puupponen-Pimiä, R.H., 2006. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and cancer* 54(1):18-32.

Oliveira, D.A., Salvador, A.A., Smânia Jr, A., Smânia, E.F.A., Maraschin, M., Ferreira, S.R.S., 2013. Antimicrobial activity and composition profile of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts obtained by supercritical fluids. *Journal of Biotechnology* 164(3):423-432.

Ravichandran, M., Hettiarachchy, N.S., Ganesh, V., Ricke, S.C., Singh, S., 2011. Enhancement of antimicrobial activities of naturally occurring phenolic compounds by nanoscale delivery against *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in broth and chicken meat system. *Journal of Food Safety* 31(4):462-471.

Renier, S., Chagnot, C., Deschamps, J., Caccia, N., Szlavik, J., Joyce, S.A., Popowska, M., Hill, C., Knöchel, S., Briandet, R., Hébraud, M., Desvaux, M., 2014. Inactivation of the SecA2 protein export pathway in *Listeria monocytogenes* promotes cell aggregation, impacts biofilm architecture and induces biofilm formation in environmental condition. *Environmental Microbiology* 16(4):1176-1192.

Riazi, S., Matthews, K.R., 2011. Failure of foodborne pathogens to develop resistance to sanitizers following repeated exposure to common sanitizers. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65(2):374-378.

Rodriguez, A., Autio, W.R., McLandsborough, L.A., 2008. Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation. *Journal of food protection* 71(1):170-175.

Rodríguez Vaquero, M.J., Aredes Fernández, P.A., Manca de Nadra, M.C., 2011. Effect of phenolic compound mixtures on the viability of *Listeria monocytogenes* in meat model. *Food Technology and Biotechnology* 49(1):83-88.

Sagdic, O., Ozturk, I., Ozkan, G., Yetim, H., Ekici, L., Yilmaz, M.T., 2011. RP-HPLC–DAD analysis of phenolic compounds in pomace extracts from five grape cultivars: Evaluation of their antioxidant, antiradical and antifungal activities in orange and apple juices. *Food chemistry* 126(4):1749-1758.

Sánchez-Maldonado, A., Schieber, A., Gänzle, M., 2011. Structure–function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. *Journal of applied microbiology* 111(5):1176-1184.

Sandasi, M., Leonard, C.M., Viljoen, A.M., 2010. The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology* 50(1):30-35.

Scallan, E., Hoekstra, R.M., Angulo, F.J., Tauxe, R.V., Widdowson, M.-A., Roy, S.L., Jones, J.L., Griffin, P.M., 2011. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* 17(1):7-15.

Schieber, A., Stintzing, F., Carle, R., 2001. By-products of plant food processing as a source of functional compounds—recent developments. *Trends Food Sci Tech* 12(11):401-413.

Shiri, M.A., Ghasemnezhad, M., Bakhshi, D., Saadatian, M., 2011. Effects of ascorbic acid on phenolic compounds and antioxidant activity of packaged fresh cut table grapes. *Environmental, Agricultural and Food Chemistry* 10(7):2506-2515.

Silva, I.D., Careli, R.T., Lima, J.C., Andrade, N.J., 2010. Effectiveness of cleaning and sanitizing procedures in controlling the adherence of *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Enteritidis, and *Staphylococcus aureus* to domestic kitchen surfaces. *Food Science and Technology (Campinas)* 30(1):231-236.

Sinde, E., Carballo, J., 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology* 17(4):439-447.

Singleton, V.L., Rossi, J.A., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture* 16(3):144-158.

Skroza, D., Generalić Mekinić, I., Svilović, S., Šimat, V., Katalinić, V., 2015. Investigation of the potential synergistic effect of resveratrol with other phenolic compounds: A case of binary phenolic mixtures. *Journal of Food Composition and Analysis* 38:13-18.

Spatafora, C., Barbagallo, E., Amico, V., Tringali, C., 2013. Grape stems from Sicilian *Vitis vinifera* cultivars as a source of polyphenol-enriched fractions with enhanced antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology* 54(2):542-548.

Strehmel, J., Overhage, J., 2013. The sensor kinase PA4398 regulates swarming motility and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *YIN-Day 2013 Posters* 3.

Takahashi, H., Suda, T., Tanaka, Y., Kimura, B., 2010. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Letters in Applied Microbiology* 50(6):618-625.

Tian, L.L., Xu, S.P., Hutchins, W.C., Yang, C.H., Li, J., 2014. Impact of the exopolysaccharides Pel and Psl on the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to sand. *Biofouling* 30(2):213-222.

Todhanakasem, T., Young, G.M., 2008. Loss of flagellum-based motility by *Listeria monocytogenes* results in formation of hyperbiofilms. *Journal of bacteriology* 190(17):6030-6034.

Trentin, D.S., Silva, D.B., Amaral, M.W., Zimmer, K.R., Silva, M.V., Lopes, N.P., Giordani, R.B., Macedo, A.J., 2013. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. *PloS one* 8(6):66257.

Upadhyay, A., Upadhyaya, I., Kollanoor-Johny, A., Venkitanarayanan, K., 2013. Antibiofilm effect of plant derived antimicrobials on *Listeria monocytogenes*. *Food microbiology* 36(1):79-89.

Vandeputte, O.M., Kiendrebeogo, M., Rajaonson, S., Diallo, B., Mol, A., El Jaziri, M., Baucher, M., 2010. Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Applied and Environmental Microbiology* 76(1):243-253.

Vázquez-Flores, A.A., Álvarez-Parrilla, E., López-Díaz, J.A., Wall-Medrano, A., De la Rosa, L., 2012. Taninos hidrolizables y condensados: naturaleza química, ventajas y desventajas de su consumo. *Tecnociencia Chihuahua* 6(2):84-93.

Vega-Vega, V., Silva-Espinoza, B.A., Cruz-Valenzuela, M.R., Bernal-Mercado, A.T.a., González-Aguilar, G.A., Vargas-Arispuro, I., Corrales-Maldonado, C.G., Ayala-Zavala, J.F., 2013. Antioxidant enrichment and antimicrobial protection of fresh-cut mango applying bioactive extracts from their seeds by-products. *Food and Nutrition Sciences* 4(87):197-203.

Veluz, G.A., Pitchiah, S., Alvarado, C.Z., 2012. Attachment of *Salmonella* serovars and *Listeria monocytogenes* to stainless steel and plastic conveyor belts. *Poultry Science* 91(8):2004-2010.

Vera, A., González, G., Domínguez, M., Bello, H., 2013. Principales factores de virulencia de *Listeria monocytogenes* y su regulación. *Revista chilena de infectología* 30(4):407-416.

Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., Michiels, J., 2008. Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in microbiology* 16(10):496-506.

Villa, F., Cappitelli, F., 2013. Plant-derived bioactive compounds at sub-lethal concentrations: towards smart biocide-free antibiofilm strategies. *Phytochemistry Reviews* 12(1):245-254.

Vivas, N., Nonier, M.-F., de Gaulejac, N.V., Absalon, C., Bertrand, A., Mirabel, M., 2004. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 513(1):247-256.

Vongkamjan, K., Roof, S., Stasiewicz, M.J., Wiedmann, M., 2013. Persistent *Listeria monocytogenes* subtypes isolated from a smoked fish processing facility included both phage susceptible and resistant isolates. *Food microbiology* 35(1):38-48.

Voravuthikunchai, S.P., Suwalak, S., 2009. Changes in cell surface properties of shiga toxigenic *Escherichia coli* by *Quercus infectoria* G. Olivier. *Journal of food protection* 72(8):1699-1704.

Wan, Z., Brown, P.J.B., Elliott, E.N., Brun, Y.V., 2013. The adhesive and cohesive properties of a bacterial polysaccharide adhesin are modulated by a deacetylase. *Molecular Microbiology* 88(3):486-500.

Wojnicz, D., Sycz, Z., Walkowski, S., Gabrielska, J., Aleksandra, W., Alicja, K., Anna, S.-Ł., Hendrich, A.B., 2012. Study on the influence of cranberry extract Žuravit S· O· S® on the properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains, their ability to form biofilm and its antioxidant properties. *Phytomedicine* 19(6):506-514.

Xiao, Z.-T., Zhu, Q., Zhang, H.-Y., 2014. Identifying antibacterial targets of flavonoids by comparative genomics and molecular modeling. *Open Journal of Genomics* 3(1).

Zeraik, A.E., Nitschke, M., 2012. Influence of growth media and temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55(4):569-576.

Zhang, X., Jiang, Z., Li, M., Zhang, X., Wang, G., Chou, A., Chen, L., Yan, H., Zuo, Y.Y., 2014. Rapid spectrophotometric method for determining surface free energy of microalgal cells. *Analytical Chemistry* 86(17):8751-8756.

Zhang, X., Zhang, Q., Yan, T., Jiang, Z., Zhang, X., Zuo, Y.Y., 2015. Quantitatively predicting bacterial adhesion using surface free energy determined with a spectrophotometric method. *Environmental Science & Technology* 49(10):6164-6171.

Zhao, T., Podtburg, T.C., Zhao, P., Chen, D., Baker, D.A., Cords, B., Doyle, M.P., 2013. Reduction by competitive bacteria of *Listeria monocytogenes* in biofilms and *Listeria* bacteria in floor drains in a ready-to-eat poultry processing plant. *Journal of Food Protection* 76(4):601-607.

Zhishen, J., Mengcheng, T., Jianming, W., 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food chemistry* 64(4):555-559.