

## 19. Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones

### **Evaluación de la capacidad de compuestos provenientes del orujo de uva para inhibir bombas de expulsión presentes en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium**

Retamal Camila<sup>1</sup>, Mendoza Leonora<sup>2</sup>, Wilkens Marcela<sup>1</sup>, Sanhueza Loreto<sup>3</sup>

camila.retamal.p@usach.cl; leonora.mendoza@usach.cl; marcela.wilkens@usach.cl;

loreto.sanhueza@umayor.com

(1) Laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, CL

(2) Laboratorio de Micología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, CL

(3) Núcleo de Química y Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Santiago, CL

#### **Resumen**

Las bombas de expulsión participan en procesos de transporte de metabolitos y detoxificación intracelular, sin embargo, también presentan un rol importante en la multirresistencia bacteriana. En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium se han descrito distintas bombas de expulsión, como, por ejemplo, AcrAB-TolC y SmvA, capaces de expulsar compuestos nocivos para la bacteria. Debido a esto, se ha desarrollado como estrategia para contrarrestar la multirresistencia la búsqueda de inhibidores de bombas de expulsión (EPIs), más aún, aquellos de origen natural. Se ha descrito que flavonoides tales como: 5-metoxihidnocarpina, epigallocatequina presentan actividad inhibitoria contra estos sistemas de expulsión. El orujo de uva, residuo de la industria vitivinícola, es una buena fuente de este tipo de compuestos, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de extractos y compuestos provenientes del orujo de uva de inhibir las bombas de expulsión AcrAB-TolC y SmvA presentes en *S. Typhimurium*. Para esto, se trabajó con una cepa nativa y dos cepas mutantes ( $\Delta acrB$  y  $\Delta smvA$ ), y se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos de orujo de uva fraccionados con solventes de distinta polaridad; hexano, diclorometano y acetato de etilo, además de flavonoides previamente identificados en estos extractos (quercetina, (+)-catequina y (-)-epicatequina); presentando valores de MIC entre 690 a 3000  $\mu\text{g/mL}$ . Para evaluar la capacidad inhibitoria sobre bombas de expulsión de extractos y compuestos se realizaron ensayos de fluorescencia, utilizando bromuro de etidio como sustrato. El efecto se comparó con el CCCP (inhibidor control). Dentro de los resultados obtenidos, se determinó que los extractos fraccionados con hexano y diclorometano son capaces de inhibir las bombas de expulsión tanto en la cepa nativa y en la cepa que posee *smvA* ( $\Delta acrB$ ) de forma similar al CCCP (inhibidor control). Mientras que,

Universidad Nacional de Cuyo | Mendoza | Argentina 17, 18 y 19 de octubre de 2018  
dentro de los compuestos puros identificados, la quercetina fue la que presentó el mayor efecto inhibitorio superando significativamente al CCCP.

**Palabras clave:** multirresistencia bacteriana, bombas de expulsión, EPIs, orujo de uva.

### Introducción

Durante años los antibióticos han sido utilizados exitosamente para tratar infecciones bacterianas, sin embargo, esto se ha visto dificultado por la aparición de cepas multirresistentes (MDR) a estos fármacos. Uno de los mecanismos bacterianos responsables de esta resistencia, son las bombas de expulsión, las cuales son proteínas transportadoras que expulsan hacia el medio extracelular moléculas que resultan dañinas para la bacteria. Las bombas de expulsión descritas en bacterias pertenecen a las familias de proteínas transportadoras: *major facilitator* (MFS), *multidrug and toxic efflux* (MATE), *small multidrug resistance* (SMR), *ATP-binding cassette* (ABC) y *resistance nodulation cell division* (RND) (Nikaido y cols, 2011). En bacterias Gram negativo, las bombas de expulsión pertenecientes a la familia RND juegan un rol importante en la multirresistencia. Se ha descrito que la sobreexpresión de este tipo de bombas es el primer paso para que la bacteria sea completamente resistente (Nikaido y Pagès, 2012).

*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*), es un bacilo Gram negativo capaz de producir infección alimentaria, con una mortalidad

de entre 1 a 5% a nivel mundial (Feasey y cols, 2012); convirtiéndose en un problema de salud pública. Dentro de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en *S. Typhimurium* se encuentra la bomba de expulsión AcrAB-TolC. Esta bomba pertenece a la familia RND, está compuesta por un sistema tripartito que consiste en un transportador de membrana interna (AcrB), un canal de membrana externa (TolC) y una proteína adaptadora periplásmica (AcrA). AcrAB-TolC es capaz de expulsar un amplio espectro de sustratos al medio extracelular, lo que la hace preocupante desde el punto de vista clínico. Dentro de los sustratos de esta bomba se encuentran: antibióticos (como por ejemplo macrólidos, fluoroquinolonas, tetraciclina, rifampina y cloranfenicol), colorantes (como el bromuro de etidio y la acriflavina) y detergentes (como el SDS y Triton X-100) (Takatsuka y cols., 2010).

Además, se ha descrito que *S. Typhimurium* presenta otras bombas de expulsión poco estudiadas, como SmvA, perteneciente a la familia MFS, que también ha demostrado participación en la expulsión de compuestos nocivos, tales como acriflavina y compuestos de

amonio cuaternario, como el metil viológeno (Villagra y cols., 2008).

Debido a que la resistencia a antibióticos es un problema de salud pública que crece rápidamente, es que ha surgido la necesidad de buscar nuevas estrategias para combatir estos patógenos. Una de estas estrategias es la búsqueda de inhibidores de bombas de expulsión (EPIs). Los EPIs son moléculas que pueden interferir con el proceso de expulsión de las bombas a través de diversos mecanismos, entre los cuales se ha descrito la interferencia de la expresión génica de estos sistemas de expulsión, alteración en el ensamble de las proteínas que conforman la bomba, inhibición del sitio de unión al antibiótico, mediante el bloqueo de la porina o a través de la disipación de la energía requerida para el funcionamiento de la bomba (Askoura y cols, 2011). Si bien se han descrito diferentes EPIs, como, por ejemplo, el carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP); la mayoría resultan citotóxicos y neurotóxicos, por lo tanto, no pueden ser utilizados en tratamientos clínicos (Orlov y cols, 1994). Es por esta razón que se ha dirigido la búsqueda a EPIs de origen natural, siendo el orujo de uva una fuente de diversos metabolitos secundarios, como compuestos fenólicos y terpenos, de los cuales se ha informado que presentan actividad antibacteriana (Sanhueza y cols, 2014). Por lo tanto, el orujo de uva

podría ser una buena fuente de inhibidores de bombas de expulsión provenientes de fuentes naturales con un potencial valor biotecnológico para contrarrestar la resistencia a los antibióticos comúnmente utilizados en clínica contra el patógeno *S. Typhimurium*.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Evaluar la capacidad de compuestos provenientes del orujo de uva de inhibir bombas de expulsión presentes en *S. Typhimurium*.

### **Objetivos específicos**

- 1.- Determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos y compuestos identificados en el orujo de uva seleccionados como posibles inhibidores de bombas de expulsión en *S. Typhimurium*.
- 2.- Evaluar la capacidad de los extractos y compuestos identificados en el orujo de uva de inhibir bombas de expulsión presentes en *S. Typhimurium*.

## **Materiales y Métodos**

### **Determinación de la MIC de compuestos provenientes de orujo de uva seleccionados como posibles inhibidores de bombas de expulsión en *S. Typhimurium*.**

Para este objetivo se trabajó con extractos de orujo de uva (provenientes de la Viña Santa Rita) fraccionados con

solventes de distinta polaridad (hexano, diclorometano y acetato de etilo) disponibles en el Laboratorio de Microbiología Básica y Aplicada.

### Ensayos de susceptibilidad bacteriana

**a) Cepas bacterianas utilizadas.** Las cepas de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium estudiadas fueron, la cepa ATCC 1428s (nativa) y las cepas mutantes SC169 ( $\Delta acrB$ ) y SC106 ( $\Delta smvA$ ).

**b) Preparación de las disoluciones de extractos y compuestos.** Se prepararon soluciones stock de cada extracto y compuesto estudiado, y luego se realizaron diluciones seriadas en proporción 1:2 de los extractos obtenidos con hexano, diclorometano y acetato de etilo; así como para los compuestos puros previamente identificados en los extractos (-)-epicatequina, (+)-catequina y quercetina (Sanhueza y cols., 2017). Todas las diluciones fueron preparadas utilizando dimetilsulfóxido (DMSO).

**c) Determinación de la MIC de los extractos y compuestos fenólicos identificados en los extractos de orujo de uva.** Se inoculó la bacteria en caldo Tryptic Soy (TSB) y se dejó crecer overnight (ON). Luego se diluyó a un McFarland 0,5 ( $5 \times 10^8$  UFC/mL). Posteriormente, se determinó la MIC por el método de las microdiluciones,

descrito por el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI, <https://clsi.org/>). Para el cual se utilizaron placas estériles de 96 pocillos. En cada pocillo se agregaron 188  $\mu$ L de caldo Mueller-Hinton (MHB), junto con 10  $\mu$ L de las distintas disoluciones preparadas para los extractos y compuestos; y 2  $\mu$ L del inóculo bacteriano diluido a 0,5 unidades de Mc Farland. Se incluyeron controles de esterilidad, de crecimiento y de solvente. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h. Finalmente, se midió la absorbancia a 600 nm utilizando un lector de ELISA (Thermo Scientific, Multiskan GO). Los ensayos fueron realizados en duplicado.

Los resultados obtenidos fueron expresados en porcentaje de inhibición utilizando la Ecuación 1, (Sanhueza y cols., 2014), en donde  $TA_{600}$  corresponde a la absorbancia de la muestra,  $EA_{600}$  a la absorbancia del blanco y  $SA_{600}$  a la absorbancia del control de crecimiento

**Ecuación 1.** Cálculo del porcentaje (%) de inhibición

$$(\%) = (100 - ((100 \times (TA_{600} - EA_{600})) \times (SA_{600})^{-1}))$$

**Determinación de la capacidad de los extractos de orujo de uva y de flavonoides identificados en los extractos de inhibir bombas de expulsión presentes en *S. Typhimurium*.**

## Ensayos de inhibición de bombas de expulsión en *S. Typhimurium*

Para determinar la capacidad de los extractos y/o flavonoides de inhibir las bombas de expulsión presentes en *S. Typhimurium*, se evaluó la actividad de las bombas mediante un método fluorimétrico, descrito por Viveiros y cols. (2010), en el cual se utiliza bromuro de etidio (BrEt) como sustrato fluorescente. Cuando el BrEt ingresa a la célula bacteriana, emite una alta intensidad de fluorescencia, mientras que si se encuentra en un medio acuoso (fuera de la célula bacteriana) emite una intensidad de fluorescencia menor (Paixão y cols., 2009). Debido a la acción de las bombas de expulsión, normalmente, debería lograr expulsarse el BrEt que ingrese a la célula, manteniendo una fluorescencia baja, sin embargo, si los compuestos y extractos probados son capaces de inhibir las bombas de expulsión, el BrEt comenzará a ingresar a las células, emitiendo una intensidad de fluorescencia mayor.

**a) Preparación de los cultivos.** Para realizar estos ensayos, se cultivó la bacteria en caldo Luria Bertani (LB) hasta que alcanzó una absorbancia de 0,6 medida a una densidad óptica de 600 nm ( $DO_{600}$ ). Luego, el cultivo se centrifugó a 7500 rpm durante 7 minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con buffer fosfato

salino (PBS). Tras centrifugar, se ajustó la absorbancia de la muestra a 0,3, medida a una  $DO_{600}$ , utilizando PBS como blanco. Se adicionó glucosa, de forma de que la concentración final de esta fuera 0,4% (v/v). Por último, en una placa de 96 pocillos para medir fluorescencia se añadieron 95  $\mu$ L de la suspensión obtenida a cada pocillo.

**b) Ensayos de acumulación de bromuro de etidio.** Se realizaron diluciones seriadas de BrEt a partir de un stock, equivalentes a 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, y 1/32 de la MIC, detalladas en la Tabla 1. A cada pocillo con suspensión se añadieron 5  $\mu$ L de las diferentes disoluciones de BrEt. Luego, se midió la fluorescencia en un fluorímetro (Biotek, Synergy HT), a una longitud de onda de excitación en 520 nm y de emisión en 620 nm. La temperatura se fijó en 37°C y se midió la fluorescencia cada 5 minutos, durante 1 hora. Cada ensayo fue realizado en triplicado.

**c) Ensayos de inhibición de la bomba de expulsión presentes.** Realizando el mismo procedimiento descrito previamente, se obtuvo la suspensión bacteriana. Tras determinar la fluorescencia asociada a las concentraciones probadas de BrEt, se escogió aquella concentración sub-inhibitoria en la cual la intensidad de fluorescencia relativa fuera menor al límite de detección superior y se agregó

ésta a la suspensión obtenida. Luego, se realizó una solución stock de carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona (CCCP), empleado como inhibidor control, y a partir de esta se realizaron diluciones seriadas equivalentes a 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de la MIC de CCCP, las cuales se detallan en la Tabla 1. Tras adicionar 95 µL de la suspensión

obtenida a cada pocillo se agregó el CCCP y se midió la fluorescencia a 37 °C, cada 5 minutos durante 1 hora. La longitud de onda de excitación fue fijada en 520 nm y la longitud de onda de emisión en 620 nm. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado.

**Tabla 1. Concentración mínima inhibitoria de bromuro de etidio y CCCP en cepas de *S. Typhimurium***

Compuesto	MIC (µg/mL)		
	S. Typhimurium nativa	S. Typhimurium $\Delta acrB$	S. Typhimurium $\Delta smvA$
Bromuro de Etidio	100	50	100
CCCP	25	25	50

Posteriormente, se repitió el mismo procedimiento para los extractos de hexano, diclorometano y acetato de etilo obtenidos a partir de orujo de uva; así como para los flavonoides puros identificados en el extracto; (-)-epicatequina, (+)-catequina y quercetina. Se ensayaron concentraciones

equivalentes a 1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de la MIC, detalladas en la Tabla 2.

## Resultados y Discusión

### Concentración mínima inhibitoria (MIC) de extractos de orujo de uva y flavonoides identificados en los extractos en cepas de *S. Typhimurium*.

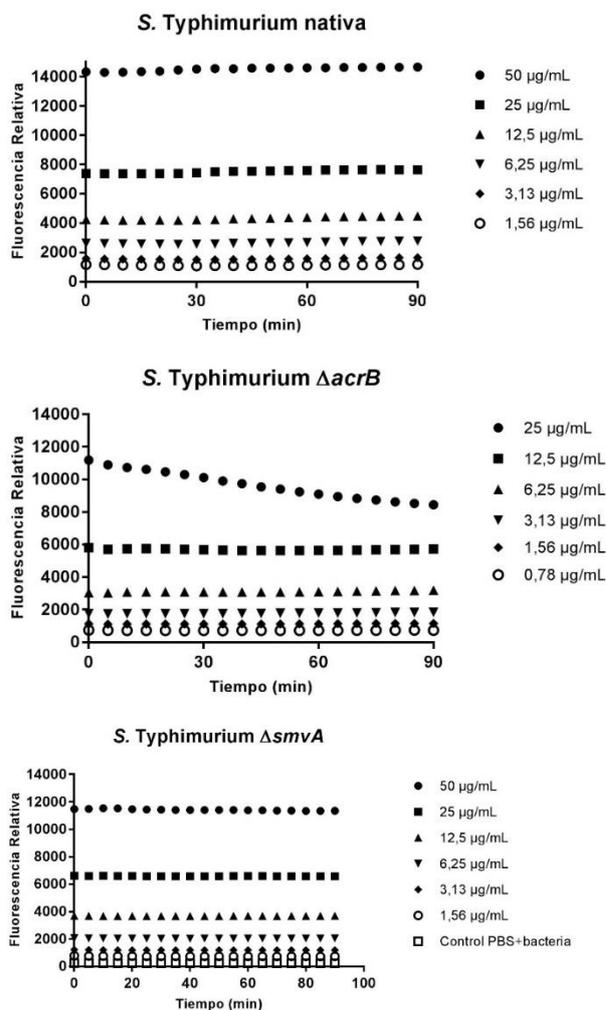
Con respecto a la MIC de los extractos de orujo de uva y flavonoides identificados, detalladas en la Tabla 2, estas fueron relativamente similares, presentando concentraciones entre los 600 y 3000 µg/mL.

**Tabla 2. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de orujo de uva y flavonoides identificados en cepas de *S. Typhimurium***

Extracto/ flavonoide identificado	MIC (µg/mL)		
	Silvestre	$\Delta acrB$	$\Delta smvA$
Hexano	2000	1800	2000
Diclorometano	2000	2000	2000
Acetato de etilo	2000	2000	2000
(-)-epicatequina	3000	3000	3000
(+)-catequina	2000	2000	2000
Quercetina	900	691	600

**Acumulación de bromuro de etidio en cepas de *S. Typhimurium*.** Utilizando concentraciones subinhibitorias de la MIC, se hicieron los ensayos para *S. Typhimurium* nativa y para *S.*

*S. Typhimurium*  $\Delta acrB$ . En la Figura 1 se logra observar que hay una relación directa entre la concentración de BrEt y la fluorescencia registrada, es decir, a mayor concentración de sustrato, se observa una mayor fluorescencia, en ambas cepas ensayadas. En base a estos resultados se puede decir que las bombas de expulsión presentes en estas cepas están activas, ya que hay una expulsión de este sustrato hacia fuera de las células bacterianas.



**Figura 1. Acumulación de bromuro de etidio realizados en cepas de *S. Typhimurium*.** La suspensión bacteriana fue incubada con concentraciones subinhibitorias de BrEt a 37°C. Se midió la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de excitación y de emisión de 520 nm y 620 nm, respectivamente, cada 5 minutos durante 90 minutos.

**Efecto inhibitorio de extractos de orujo de uva en cepas de *S. Typhimurium*.** Para evaluar el efecto de los extractos de orujo de uva sobre la capacidad de expulsión de las bombas presentes en las distintas cepas de *S. Typhimurium* (nativa,  $\Delta acrB$  y  $\Delta smvA$ ) se ensayaron distintas concentraciones subinhibitorias de los extractos (1/2, 1/4, 1/8 y 1/16 de la MIC) y se analizó la cinética de acumulación de BrEt basado en la intensidad de fluorescencia para ambas cepas estudiadas. La intensidad de fluorescencia obtenida en cada uno de los ensayos se comparó con la fluorescencia obtenida con el inhibidor control (CCCP).

En la Figura 2, en *S. Typhimurium* nativa, se puede observar que el hexano y diclorometano, los cuales poseen una polaridad similar, ejercen un efecto inhibitorio independiente de su concentración. Por otro lado, el acetato de etilo, que no produce una respuesta inhibitoria considerable, ejerce su máximo efecto a la concentración más baja probada (125  $\mu\text{g/mL}$ ). En la cepa nativa, los tres extractos producen una respuesta inhibitoria menor, con respecto al CCCP. Para *S. Typhimurium*  $\Delta acrB$ , en el caso del hexano y diclorometano también se observa una inhibición independiente de la concentración. Para el acetato de etilo, se observa que produce su mayor respuesta inhibitoria a

la mayor concentración ensayada (1000  $\mu\text{g/mL}$ ). En *S. Typhimurium*  $\Delta\text{acrB}$  se observa una respuesta inhibitoria muy similar a la respuesta producida por CCCP para los tres extractos, siendo esta la principal diferencia con respecto a los resultados obtenidos para *S. Typhimurium* nativa. En *S. Typhimurium*  $\Delta\text{smvA}$  no se observa un efecto inhibitorio.

**Efecto inhibitorio de flavonoides puros identificados en extracto de orujo en cepas de *S. Typhimurium*.** Al igual que para los extractos, se probaron concentraciones subinhibitorias de los flavonoides identificados en estos extractos. En la Figura 3, en la cepa *S. Typhimurium* nativa, se pudo observar que la (-)-epicatequina genera un efecto inhibitorio independiente de la concentración ensayada. La (+)-catequina produce un efecto similar a todas las concentraciones ensayadas. Por otro lado, la quercetina produce un efecto inhibitorio dependiente de la concentración, ejerciendo su mayor efecto a la mayor concentración ensayada (450  $\mu\text{g/mL}$ ). Este efecto inhibitorio es mayor que aquel producido por el resto de los flavonoides y por el CCCP.

Para *S. Typhimurium*  $\Delta\text{AcrB}$ , se observa que la (-)-epicatequina produce un efecto inhibitorio similar al producido por CCCP, y que este efecto es independiente de la

concentración. La (+)-catequina produce un efecto inhibitorio mayor que el CCCP, el cual es dependiente de la concentración ensayada, siendo mayor al utilizar una concentración de 1000  $\mu\text{g/mL}$  del flavonoide. La quercetina produce un mayor efecto inhibitorio que el CCCP a todas las concentraciones ensayadas, aunque su efecto es similar para todas las concentraciones experimentadas, el mayor efecto inhibitorio se observa a una concentración de 346  $\mu\text{g/mL}$ .

Por otro lado, en *S. Typhimurium*  $\Delta\text{smvA}$  no se observa un efecto inhibitorio considerable. Si bien, en la mayor concentración de quercetina ensayada en esta cepa (300  $\mu\text{g/mL}$ ) se puede observar un efecto inhibitorio mayor a aquel producido por el CCCP, los resultados no son concluyentes, debido a las variaciones en la desviación estándar registradas en cada experimento (representada por las barras de error).

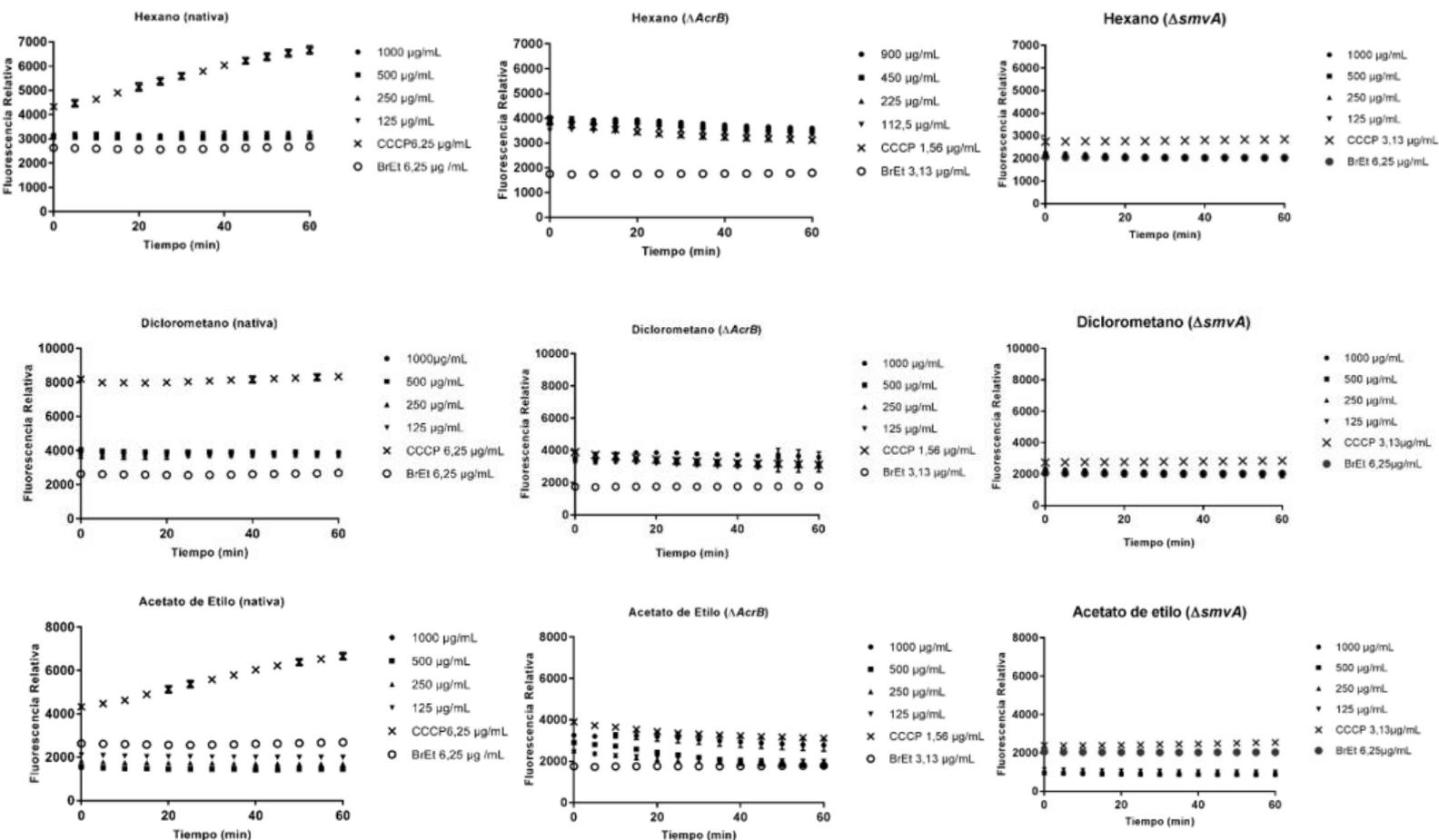
Con respecto al efecto inhibitorio de los extractos de orujo de uva, cabe destacar que los extractos obtenidos con hexano y diclorometano generan una respuesta similar, la cual puede deberse a que ambos solventes son de naturaleza apolar, por lo tanto, los compuestos y moléculas químicas presentes en estos extractos pueden ser similares. Por otro lado, el extracto obtenido con acetato de

etilo prácticamente no produce inhibición en la cepa nativa, sin embargo, en la cepa mutante se observa una pequeña inhibición cercana a aquella producida por el CCCP. A diferencia de los otros dos solventes, el acetato de etilo posee una alta polaridad, por lo tanto, los compuestos presentes en este extracto son muy diferentes a los presentes en los otros dos extractos. Aun así, los flavonoides puros utilizados (-)-epicatequina, (+)-catequina y quercetina, cuyos resultados se muestran en la Figura 3, son considerados compuestos polares (Morelo y cols., 2017), y aunque estos son capaces de producir un efecto inhibitorio, se esperaría que el extracto de acetato de etilo tuviera un efecto similar. Sin embargo, en los extractos hay un gran espectro de moléculas en diferente abundancia, lo cual puede enmascarar el efecto de algún compuesto que puede estar en muy baja cantidad en el extracto, pero que en su forma pura es capaz de producir un efecto inhibitorio. Según los resultados obtenidos para la cepa mutante  $\Delta acrB$  en la Figura 2 y 3, hay una inhibición en la expulsión de BrEt al tratar con los extractos y flavonoides, aun cuando esta cepa carece del gen *acrB* que codifica para parte de la bomba AcrAB-TolC, por lo tanto, esto podría sugerir la inhibición de otra bomba de expulsión presente en esta cepa. Debido a que en la cepa mutante  $\Delta smvA$  no se observa un efecto

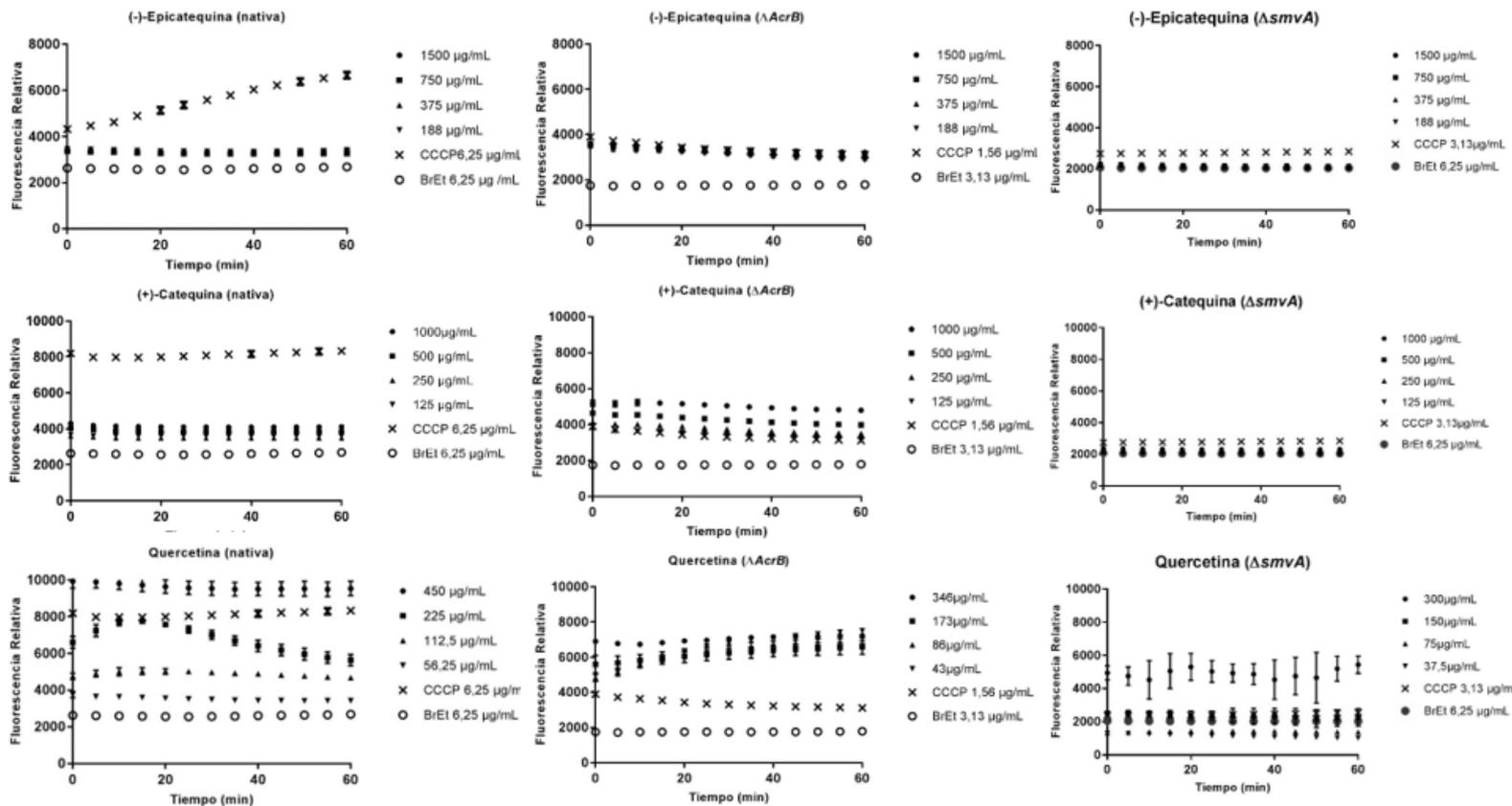
inhibitorio, es que se hipotetiza que el efecto inhibitorio observado en la cepa nativa y en  $\Delta acrB$  podría ser sobre la bomba de expulsión SmvA. Aunque esta bomba ha sido poco estudiada, también ha sido relacionada con la expulsión de compuestos nocivos, como desinfectantes en base a compuestos de amonio cuaternario (Villagra y cols., 2008; Santiviago y cols., 2002).

### Conclusiones

Los compuestos presentes en los extractos de orujo de uva obtenidos con hexano y diclorometano, así como los flavonoides identificados (-)-epicatequina, (+)-catequina y quercetina producen un efecto inhibitorio en la capacidad de expulsión de bombas presentes en una cepa nativa y en una cepa mutante ( $\Delta acrB$ ) de *S. Typhimurium*.



**Figura 2. Efecto de extractos de orujo de uva obtenidos con hexano, diclorometano y acetato de etilo en cepas de *S. Typhimurium*.** Se incubó la suspensión bacteriana con concentraciones subinhibitorias de los extractos, junto con BrEt a 37°C durante una hora. La intensidad de fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 520 nm y de emisión a 620 nm, cada 5 minutos. Se graficó CCCP como inhibidor control y BrEt como la fluorescencia basal de este sustrato a su determinada concentración.



**Figura 3. Efecto de flavonoides puros identificados en extractos de orujo de uva en cepas de *S. Typhimurium*.** Se probaron los flavonoides puros (-)-epicatequina, (+)-catequina y quercetina a diferentes concentraciones subinhibitorias, junto con BrEt a 37°C durante una hora. La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 520 nm y de emisión a 620 nm, cada 5 minutos. Se graficó CCCP como inhibidor control y BrEt como la fluorescencia basal de este sustrato a su determinada concentración.

## Bibliografía

- Askoura, M., Mattawa, W., Abujamel, T., Taher, I. (2011). Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *Libyan Journal of Medicine*, 6(1), 5870.
- Feasey, N., Dougan, G., Kingsley, R., Heyderman, R., Gordon, M. (2012). Invasive non-typhoidal salmonella disease: an emerging and neglected tropical disease in Africa. *Lancet*, 379(9835), 2489–2499.
- Greene, S., Stuart, A., Medalla, F., Whichard, J., Hoekstra, R., Chiller, T. (2008). Distribution of multidrug-resistant human isolates of MDR-ACSSuT *Salmonella* Typhimurium and MDR-AmpC *Salmonella* Newport in the United States, 2003–2005. *Foodborne pathogens and disease*, 5(5), 669-680.
- Mensor, L., Menezes, F., Leitão, G., Reis, A., Santos, T., Coube, C., Leitão, S. (2001). Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy research*, 15(2), 127-130.
- Morelo, G., Márquez-Ruiz, G., Holgado, F., Giménez, B., Robert, P. (2017). Design of flavonoid microparticles with channel forming properties to improve oxidative stability of sunflower oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*.
- Nikaido, E., Shirotsuka, I., Yamaguchi, A., Nishino, K. (2011). Regulation of the AcrAB multidrug efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to indole and paraquat. *Microbiology*, 157(3), 648-655.
- Nikaido, H., Pagès, J. (2012). Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 36(2), 340-363.
- Orlov, V. N., Antonenko, Y. N., Bulychev, A. A., Yaguzhinsky, L. S. (1994). Combination of the electrogenic ionophores, valinomycin and CCCP, can lead to non-electrogenic K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange on bilayer lipid membranes. *FEBS letters*, 345(2-3), 104-106.
- Paixão, L., Rodrigues, L., Couto, I., Martins, M., Fernandes, P., De Carvalho C., Monteiro G., Sansonetty F., Amaral L., Viveiros, M. (2009). Fluorometric determination of ethidium bromide

- efflux kinetics in *Escherichia coli*. *Journal of biological engineering*, 3(1), 18.
- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., Wilkens, M. (2017). Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS one*, 12(2).
- Sanhueza, L., Tello, M., Vivanco, M., Mendoza, L., Wilkens, M. (2014). Relation between antibacterial activity against food transmitted pathogens and total phenolic compounds in grape pomace extracts from Cabernet Sauvignon and Syrah varieties. *Advances in Microbiology*, 4(05), 225.
- Santiviago, C.A., Fuentes, J.A., Bueno, S.M., Trombert, A.N., Hildago, A.A., Socías, L.T., et al. (2002) The *Salmonella enterica* sv. Typhimurium *smvA*, *yddG* and *ompD* (porin) genes are required for the efficient efflux of methyl viologen. *Mol Microbiol* 46: 687–698.
- Takatsuka, Y., Chen, C., Nikaido, H. (2010). Mechanism of recognition of compounds of diverse structures by the multidrug efflux pump AcrB of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(15), 6559-6565.
- Villagra, N., Hidalgo, A., Santiviago, C., Saavedra, C., Mora, G. (2008). *SmvA*, and not *AcrB*, is the major efflux pump for acriflavine and related compounds in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(6), 1273-1276.

#### Financiamiento

Proyecto FDP-101182, Universidad Mayor.  
DICYT USACH