

Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*

[Antioxidant polyphenols extracted from Avocado epicarp (*Persea americana* var. Hass) inhibit *Helicobacter pylori* urease]

Felipe CHÁVEZ^{1*}, Mario ARANDA², Apolinaria GARCÍA³, Edgar PASTENE¹

¹Laboratorio de Farmacognosia, Departamento de Farmacia, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. ²Laboratorio de Estudios Avanzados en Fármacos y Alimentos. Departamento de Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile. ³Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Chile.
Contactos / Contacts: Felipe CHAVEZ E-mail address: felipechavez@gmail.com

Abstract

Chronic infection by *Helicobacter pylori* produce chronic gastritis leading to other more severe pathologies as peptic ulcer and gastric adenocarcinoma. New anti-*H. pylori* agents has been found in natural products, particularly polyphenols. The inhibition of enzymes such us urease appears to be an interesting strategy by which polyphenols could limit the colonization by *H. pylori*. From the exocarp of *Persea americana* (avocado fruit), we obtain a procyanidin-rich extract with a 77% of gallic acid equivalent (GAE). Such procyanidins derived from epicatechin. with a mean degree of polymerization DP_m = 6.10. The antioxidant capacity was assessed by different methods as TEAC-DPPH, TEAC-CUPRAC, TEAC-FRAP, TEAC-crocin. The extract shown inhibitory activity against *H. pylori* urease with an IC₅₀ = 1.02 µg GAE/mL. In order to obtain clusters of procyanidins with different molecular weights, avocado peel extract was fractioned. A clear relation between the molecular size of procyanidins and their urease inhibitory activity was observed.

Keywords: *Helicobacter pylori*, urease, Agro-industrial waste, functional foods, polyphenols, antioxidant capacity, *Persea* sp.

Resumen

La infección crónica por *Helicobacter pylori* produce gastritis crónica o patologías más severas como la úlcera péptica y adenocarcinoma gástrico. Nuevos agentes anti-*H. pylori* se han encontrado en los productos naturales, donde destacan los polifenoles. La inhibición de enzimas como la ureasa, resulta ser una estrategia interesante mediante la cual los polifenoles pueden limitar la colonización por *H. pylori*. A partir del epicarpio del fruto de *Persea americana* (palto) se obtuvo un extracto polifenólico (77 % de EAG), rico en procianidinas derivadas de epicatequina, con un grado de polimerización DP_m = 6.10. La capacidad antioxidante fue evaluada mediante TEAC-DPPH, TEAC-CUPRAC, TEAC-FRAP, TEAC-crocina. El extracto mostró una actividad inhibitoria de la ureasa de *H. pylori* con un IC₅₀ = 1.02 µg EAG/mL. El fraccionamiento de las procianidinas permitió agruparlas según su peso molecular, observándose una clara relación entre su tamaño y la capacidad de inhibir la ureasa.

Palabras Clave: *Helicobacter pylori*, ureasa, desechos agroindustriales, alimentos funcionales, polifenoles, antioxidante, *Persea* sp.

Recibido | Received: 17 de Marzo de 2011.

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 28 de Abril de 2011.

Publicado en línea | Published online: 30 de Mayo de 2011.

Declaración de intereses | Declaration of interests: F. Chávez y E. Pastene agradecen al Proyecto Financiamiento Basal PFB-27 (PFT-014), Unidad de Desarrollo Tecnológico, y DIUC 202.074.023-1.1, de la Universidad de Concepción. M. Aranda Agradece a FONDECYT, proyecto N° 11080165. A. García agradece al Proyecto DIUC 210.036.038-1.0.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: Felipe CHÁVEZ, Mario ARANDA, Apolinaria GARCÍA, Edgar PASTENE. 2011. Los polifenoles antioxidantes extraídos del epicarpio de Palta (*Persea americana* var. Hass) inhiben la ureasa de *Helicobacter pylori*. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(3): 265 – 280.

Listado de abreviaturas:

FRAP: Ferric Reducing Antioxidant Power; Poder antioxidante expresado como capacidad de reducción del ion férrico.

DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo

TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant capacity; Capacidad Antioxidante expresada como equivalentes de Trolox.

Trolox: ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

TPTZ: 2,4,6-tris(2-piridil)-1,3,5-triazina

CUPRAC: Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity; Capacidad Antioxidante expresada como reducción del ión cúprico.

ORAC: Oxygen Radical Absorbance Capacity; Capacidad de Absorción de Radicales del Oxígeno.

Kcx219: Lisina 219 carbamilada.

TFA: Ácido trifluoroacético.

DMACA: Dimetilaminocinamaldehído.

AAPH: 2,2'-azidobis-2-metil-propanimidamida diclorhidrato

VacA: Toxina vacuolante de *H. pylori*.

CagA: Citotoxina de 120-128 kDa asociada al gen *cagA*.

SabA: Adhesina de *H. pylori* que se une al ácido siálico.

BabA: Adhesina de *H. pylori* que se une al antígeno de grupo sanguíneo.

INTRODUCCIÓN

El gran desarrollo que en la actualidad ha alcanzado la actividad agroindustrial, ha repercutido negativamente en el medioambiente debido a la generación de residuos. Lo anterior, ha impulsado continuamente el perfeccionamiento e implementación de nuevas técnicas

o métodos para el aprovechamiento de dichos residuos. Potencialmente, cada uno de ellos podría ser aprovechado en otras aplicaciones industriales o para la obtención de ingredientes funcionales destinados a mejorar algunos alimentos para el consumo humano o animal. Hace ya una década la especie palto ocupa el segundo lugar en importancia dentro de las diferentes especies cultivadas. Dada la gran diversidad y volúmenes que se exportan, Chile se ha transformado en el principal exportador de frutas del hemisferio sur y el segundo mayor productor y exportador de paltas del mundo. Chile posee algo más de 40.000 mil hectáreas plantadas con paltos, siendo las zonas más productivas aquellas ubicadas entre las regiones Tercera y Octava (Región de Atacama y del Bío-Bío, respectivamente). En la temporada 1994-1995 los embarques de Palta Hass totalizaron 12.000 toneladas, mientras que en la temporada 2009-2010, superaron las 200.000 toneladas (Bravo, 2009). Existen distintas variedades de palta, entre ellas Bacon, Fuerte, Negra de la Cruz y Hass. Dentro de estas especies la variedad más conocida es la Hass y es la única que se produce durante todo el año. La Palta Hass conocida en muchas regiones del mundo también como aguacate Hass, es el nombre del fruto del palto Hass, una variedad del palto originada a partir de una semilla de raza guatemalteca en un huerto del Sr. R. G. Hass en la Habra, California en 1926, patentada en 1935 e introducida globalmente en el mercado en 1960.

Parte del volumen de este fruto es destinado a la elaboración de pasta o puré de palta. En el proceso se genera como subproducto, grandes cantidades de cáscara y carozos. Habitualmente, las cáscaras de muchos frutos concentran compuestos biológicamente activos como los polifenoles, los cuales poseen reconocidas propiedades antioxidantes, y por ello pueden ser empleados en el desarrollo de ingredientes funcionales. En efecto, esto ha llevado a la funcionalización de alimentos orientados a problemas de salud como lo son la obesidad, diabetes, e hipertensión (Hill y Peters, 2002; Gursevak, 2005; Sarkar, 2007; Yu y Slavin, 2008). Gran parte de los estudios se han realizado en el carozo de la palta, para el cual se ha identificado y evaluado la actividad de los derivados del ácido abscísico y sus componentes fenólicos (Ramos-Jeréz *et al.*, 2007; Ramos *et al.*, 2004).

Un problema de salud que afecta a gran parte de la población mundial se relaciona con la infección por la bacteria *Helicobacter pylori*. Su prevalencia

mundial es cercana al 50% y es mayor aún en los países subdesarrollados. Su importancia ha sido tal, que ya se conoce la secuencia de su genoma (Tomb *et al.*, 1997), se han descrito sus factores de virulencia y se acepta su participación en la causalidad de gastritis, úlcera péptica, linfoma de MALT e incluso se asocia el desarrollo del cáncer gástrico (Atherton *et al.*, 1997; Franco *et al.*, 2008). La búsqueda de los factores causantes de virulencia y promotores de la ulceración se ha intensificado en los últimos años, señalándose entre ellos a las adhesinas (BabA, SabA), hemaglutininas, toxina vacuolizante (VacA); CagA y a la ureasa. Esta última es de importancia vital al comienzo del proceso de colonización. El jugo gástrico normal posee un $\text{pH} < 3$, el cual le confiere un carácter bactericida capaz de eliminar a muchas de las bacterias que llegan al estómago con la ingesta de agua y alimentos. La colonización de la mucosa gástrica por *H. pylori* implica la capacidad de esta bacteria de sobrevivir en ese ambiente ácido. Así, la clave para la adaptación al pH gástrico reside en la producción de ureasa (Stingl *et al.*, 2002a; Stingl *et al.*, 2002b; Stingl *et al.*, 2002c). Esta enzima (urea amidohidrolasa) cataliza la hidrólisis de urea para proporcionar amonio y carbamato, el cual se descompone para producir otra molécula de amonio y ácido carbónico, con lo cual neutraliza el microambiente de las glándulas gástricas colonizadas. El efecto neto de esas reacciones es un aumento del pH. También explica el hecho de la asociación de la bacteria con los espacios intercelulares del epitelio gástrico, por los cuales se excreta urea. La ureasa es la enzima más estudiada de todos los productos génicos de *H. pylori*, y representa alrededor de un 5% del total de sus proteínas celulares. Se localiza en el citoplasma de la bacteria y en su superficie, aunque esta última localización puede tratarse de un mecanismo no específico para la exportación de la enzima, posee una masa molecular de 600 kDa y está codificada por siete genes denominados *ureA* a *ureG* (Mobley *et al.*, 1995). Por otra parte, el hidróxido de amonio generado durante la hidrólisis de urea contribuye significativamente al daño histológico asociado con esta infección, aunque debe enfatizarse que directamente el amonio no es tóxico, si no que el daño infringido es el resultado del ión hidróxido generado por el equilibrio del amonio con el agua. Éste desdobra el moco gástrico, haciéndolo más fluido, con lo cual la bacteria puede desplazarse más fácilmente para ganar los espacios intercelulares. Pero, en esta capa de moco funciona uno de los mecanismos que protegen la mu-

cosa del propio ácido, lo cual se conoce como el gradiente de bicarbonato, por lo tanto, al licuarse el moco se pierde parte de esa protección lo que colabora en la formación de la gastritis (Cover, *et al.*, 1992; Sidebotham *et al.*, 1990). La actividad de la ureasa también puede ser responsable indirectamente del daño tisular mediante su interacción con el sistema inmune, estimulando el estallido respiratorio de neutrófilos. Ello se ha demostrado experimentalmente con células intactas de *H. pylori*, las cuales son capaces de estimular e inclusive causar una activación directa del estallido respiratorio de leucocitos neutrófilos polimorfonucleares (PMN), monocitos y además, ejerce acción quimiotáctica sobre otras células inflamatorias mediante liberación de citoquinas proinflamatorias e intermediarios del oxígeno reactivo que colaboran con el proceso inflamatorio (Mooney *et al.*, 1991; Cover y Blaser, 1992). Por otra parte, los alimentos que se encuentran funcionalizados pueden ser destinados a la prevención de distintas enfermedades o pueden actuar como moduladores, entre otros, frente a distintos cuadros de origen bacteriano, como por ejemplo, la infección crónica por *H. pylori*. Es sabido que la ingesta de ciertos alimentos ricos en polifenoles, está asociada a beneficios para la salud atribuidos a sus propiedades como agentes antioxidantes y antiinflamatorios (Bazzano *et al.*, 2002; Hung *et al.*, 2004; Joshipura *et al.*, 1999). Tales compuestos, sin embargo, no sólo podrían actuar de la manera convencional sino, además, ejercer interesantes acciones antimicrobianas en determinadas porciones del tubo digestivo. En efecto, crecientes evidencias indican que el consumo de algunos alimentos particularmente ricos en dichos compuestos, contribuiría a la prevención, el manejo y/o la atenuación del daño a la mucosa gástrica asociado a la infección por *H. pylori* (Choi *et al.*, 2007; Morinaga *et al.*, 2005). Algunos constituyentes poseen actividad sobre *H. pylori*, ya sea como inhibidores de su multiplicación, o bien como agentes que dificultan o impiden su asentamiento en la mucosa gástrica (Pastene *et al.*, 2010c; González-Segovia *et al.*, 2008). Particularmente, la inhibición de enzimas como la ureasa resulta ser una estrategia interesante, mediante la cual las procianidinas y otros fitoconstituyentes pueden alterar la capacidad de colonización por *H. pylori* (Rohdewald y Beil; 2008; Pastene *et al.*, 2009b). El mecanismo anti-*H. pylori* de las procianidinas, no necesariamente implica un efecto bactericida que pueda afectar la microbiota normal del individuo, por lo que su empleo constituye una apro-

ximación ideal para la prevención y el manejo de la infección en la mayoría de la población. Las procianidinas son un tipo de flavonoides presente en muchos alimentos de origen vegetal, especialmente cereales y legumbres, y son particularmente abundantes en algunas frutas, zumos de frutas, vino tinto, té y chocolate. Basado en observaciones preliminares, dentro de varios productos con bajo valor agregado, se ha seleccionado al epicarpio de los frutos de *Persea americana* Var. Hass. (Palta Hass), como fuente para la obtención de extractos ricos en procianidinas. En la cáscara de palta solo hay un trabajo previo (Terasawa *et al.*, 2006), en el cual se evaluó la capacidad antioxidante de extractos acuosos e identificó catequina y epicatequina por HPLC, aunque no se entregan detalles de la variedad de palta utilizada en dicho estudio. Recientemente, se ha reportado ciertas propiedades antimicrobianas en el extracto del epicarpio de paltas maduras (Chia y Dykes, 2010). En este trabajo se plantea la posibilidad de aprovechar el gran volumen de este desecho agro-industrial como una oportunidad para obtener productos enriquecidos en polifenoles altamente bio-activos, particularmente en cuanto a sus propiedades antioxidantes y anti-*H. pylori*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal:

Las paltas maduras de la variedad Hass fueron adquiridas en supermercados locales de la ciudad de Concepción (VIII región del Bío-Bío, Chile).

Extracción:

El epicarpio de la palta fue removido cuidadosamente con un cuchillo de acero inoxidable y pesó 15 g. Posteriormente, se homogenizó en un blender con 1000 mL de agua a 80° C a 20.000 rpm durante 1 minuto. El extracto acuoso fue filtrado a través de una gasa de algodón y luego centrifugado a 3000 xg durante 30 min. Posteriormente, el extracto acuoso fue desgrasado con n-hexano en un embudo de decantación (500 mL x 3 veces). El n-hexano remanente fue removido por destilación al vacío. Mediante liofilización del remanente acuoso se logró obtener un polvo seco rico en polifenoles.

Determinación de polifenoles totales.

El extracto fue caracterizado en cuanto a su contenido de polifenoles totales mediante el índice de Folin-Ciocalteau (Singleton y Rossi, 1965). En una cubeta

de cuarzo se agregó 100 µL de la muestra (5 mg de extracto de Palta Hass disuelto en 1 mL de metanol: agua, 1:1 v/v), luego se añadió 200 µL de reactivo Folin-Ciocalteau, 2 mL de agua destilada y 1 mL de una solución de carbonato de sodio al 20%. Se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente, para luego leer a 765 nm en un espectrofotómetro (Jasco, Japón). Como estándar de calibración se usó ácido gálico (5-20 mg/L, concentración final). La ecuación de la curva de calibración para ácido gálico fue $y = 0.091x + 0.0229$ ($r^2 = 0.9951$) y los resultados fueron expresados como equivalentes de ácido gálico (EAG, miligramos de ácido gálico por gramo de muestra). Las muestras fueron analizadas en triplicado.

Ensayos antioxidantes.

Actividad atrapadora del radical DPPH (TEAC-DPPH).

Para determinar la capacidad del extracto de decolorar el radical DPPH se utilizó el protocolo de Bonoli et al., 2004. En breve, se agregó una alícuota de 100 µL del extracto a 2.9 mL de una solución de DPPH 0,1 mmol/L en metanol 80%. La decoloración del radical se monitoreó a 515 nm durante 30 min. El valor TEAC se obtuvo mediante una curva de calibración, empleando soluciones patrón de Trolox (20 – 200 µmol/L), de donde se calculó los equivalentes TEAC como µM de Trolox por gramo de extracto. Todas las mediciones fueron realizadas en triplicado.

Ensayo FRAP

Se utilizó un procedimiento previamente publicado con leves modificaciones (Prior y Cao, 1999). Se preparó el reactivo con una mezcla de buffer acetato 100 mmol/L (pH 3.6), TPTZ 10 mmol/L y cloruro férrico 20 mmol/L (10:1:1 v:v:v). A 900 µL del reactivo FRAP se le agregaron 90 µL de agua y 30 µL de la muestra. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 593 nm durante 10 min. La absorbancia final de cada muestra fue comparada con aquellas obtenidas de una curva de calibración con Trolox (10 - 100 µmol/L) y los resultados se expresaron como µmoles de Trolox por gramo de extracto. Todas las determinaciones fueron realizadas en triplicado.

Ensayo de blanqueamiento de Crocina (TEAC-crocina)

Este ensayo se utilizó con modificaciones menores al protocolo sugerido por Tubaro *et al.*, (1998). La crocina fue extraída y purificada desde azafrán de

acuerdo a método de Ordoudi *et al.*, (2006). Se preparó un stock de crocina en metanol, a partir de la cual, mediante dilución con buffer fosfato 0.1 mol/L, pH 7.0, se obtuvo la solución de trabajo con una concentración de crocina de 1.35×10^{-5} mol/L (el coeficiente de absorción molar de la crocina a 443 nm es 1.33×10^5 /mol/cm). Como iniciador, se preparó una solución stock de AAPH (250 mmol/L) en buffer fosfato (10 mmol/L; pH 7.0). Para el ensayo, se agregó los reactivos en el siguiente orden: 20 μ L de muestra (convenientemente diluida en agua o en estándar), 80 μ L de AAPH y finalmente 1000 μ L de solución de crocina. El grado de blanqueamiento de la crocina fue monitoreado a 442 nm y 40° C durante 25 minutos usando un espectrofotómetro Jasco V-500 (Easton, USA). El blanco se preparó con metanol al 80%. La capacidad antioxidante fue calculada utilizando las mismas expresiones adaptadas para la metodología del ORAC (Wang *et al.*, 2004). Así, las áreas bajo la curva de absorbancia relativa versus tiempo (ABC) de cada muestra se compararon con las obtenidas para curvas estándar de Trolox (3.5 - 60 μ mol/L) y los resultados fueron expresados como μ moles de Trolox por gramo de extracto. Todas las mediciones fueron realizadas en triplicado.

Ensayo CUPRAC

Se utilizó la metodología publicada previamente (Özyürek *et al.*, 2007). En un tubo de ensayo se agregó 1 mL de solución de CuCl_2 1×10^{-2} M, 1 mL de neocuproina 7.5×10^{-3} M, y una solución de acetato de amonio a pH = 7. Posteriormente se añadió los extractos preparados en agua (1,1 - X mL) de modo de completar un volumen final de 4,1 mL. Los tubos fueron tapados, y después de 30 minutos de incubación se registró su absorbancia a 450 nm contra un blanco de reactivo. Para la determinación de la equivalencia en unidades Trolox (μ moles por gramo de extracto) se utilizó un valor de $\epsilon_{\text{Trolox}} = 1.67 \times 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹.

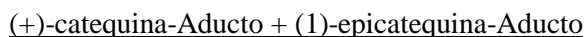
Cromatografía en Capa Fina de alta eficiencia (HPTLC)

Para el análisis por HPTLC, las muestras (1 mg/mL) se sembraron en placas de sílica gel HPTLC G-60 F₂₅₄ utilizando el aplicador ATS4 (Camag, Suiza). La cromatografía se realizó en cámaras de desarrollo

vertical empleando como solvente de arrastre tolueno: acetona: ácido fórmico (3:6:1 v/v) y se empleó como revelador una solución de 4-dimetilaminocinamaldehído (DMACA 0.6 g, 13 mL de HCl 37% y 187 mL de etanol). Las placas fueron reveladas por inmersión en Dipping Device (Camag) y después de secar durante 1 hora fueron foto-documentadas utilizando el sistema Reprostar 3.0 (Camag). Como estándares de comparación se incluyó catequina, epicatequina y un extracto enriquecido en procianidinas de manzana, el cual fue previamente caracterizado por HPLC-DAD-ESI/MS (Pastene *et al.*, 2009b).

Cromatografía en columna de fase reversa (RP-HPLC)

La composición y el grado de polimerización de las procianidinas extraídas, fue evaluada mediante degradación por floroglucinólisis, de acuerdo a procedimientos previamente publicados (Pastene *et al.*, 2009b). En un tubo plástico se disolvió 5 mg del extracto en 2 mL de una solución de HCl 0.1 M en metanol, la cual contiene 50 mg/mL de floroglucinol y 10 mg/mL de ácido ascórbico. La mezcla se incubó a 50° C por 20 minutos y luego se le adicionó 5 mL de una solución de acetato de sodio 40 mM. De esta solución se tomó 500 μ L y se llevó a 1 mL con metanol. Mediante RP-HPLC se analizó los productos de depolimerización. El sistema HPLC usado fue un Waters 600 (Milford, MA), equipado con una columna Kromasil KR100-5C18 (Eka Chemicals AB, Bohus, Suiza) de 250 x 4.6 mm, y 5 μ m tamaño de partícula. La separación se realizó bajo gradiente usando como solvente A (agua bidestilada con 0.1% TFA, v/v) y el solvente B (acetonitrilo con 0.1% TFA). El siguiente programa de gradiente fue usado: 0-25 min, 10-30% B; 25 - 30 min, 30 - 75% B; 30 - 35 min; 75 - 10% B con un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó por fluorescencia (Waters 2474) con una excitación a 280 nm y una emisión a 310 nm. Los compuestos fueron identificados por comparación de sus tiempos de retención con sustancias puras. El grado promedio de polimerización (DPM) se calculó utilizando la relación molar de la suma de los aductos formados con floroglucinol con las unidades de término formadas durante la degradación, restando el aporte en monómeros presentes en forma nativa en el extracto:



Cromatografía de interacción hidrofílica en columna de fase diol (HIC-NP-HPLC)

Mediante NP-HPLC se estableció la distribución oligomérica de las procianidinas presentes en los extractos de acuerdo a procedimientos previamente publicados (Pastene *et al.*, 2009a). El sistema HPLC usado fue un equipo Waters 600 (Milford, MA), equipado con una columna Lichrospher 100 Diol (Merck, Darmstadt, Alemania) de 250 x 4.6 mm, y 5 μ m tamaño de partícula. La fase móvil fue "A" (acetonitrilo: ácido acético 98:2 v/v) y "B" (metanol: agua: ácido acético 95:3:2 v/v). Las procianidinas, fueron eluidas con el siguiente gradiente: 0 - 35 min, 0 - 40% B; 35-55 min; isocrático 40% B; 55 - 60; 40 - 0% B con un periodo de 5 minutos para re-acondicionamiento de la columna y un flujo de 0.6 mL/min. La elución fue monitoreada por fluorescencia (Waters 2475) con una excitación a 280 nm y una emisión a 310 nm. La asignación del grado de polimerización de los picos se realizó tentativamente mediante comparación con datos de literatura y muestras de procianidinas de manzana.

Fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión por tamaño:

Para determinar la relación estructura-actividad de los polifenoles se empleó un sistema cromatográfico de exclusión por tamaño, equipado con columnas preparativas de Toyopearl HW40s (30 x 2.5 cm, Tosoh, Tokio). Se pesó 0.5 g de extracto y se disolvió en 5 ml de metanol, se centrifugó la mezcla a 4200 xg durante 5 minutos y el sobrenadante se aplicó a la columna con un flujo de 2.5 mL/min, utilizando elución con 100% de metanol y luego hasta 60% de acetona para remover el material polimérico retenido. Se recolectó las fracciones en forma automática (BioRad) cada un minuto, hasta un total de 100 fracciones. Se evaluó la absorbancia de cada fracción a 280 nm. Posteriormente, las fracciones fueron monitoreadas por HPTLC usando las condiciones cromatográficas descritas anteriormente para luego agruparlas de acuerdo a su similitud (R_f y grado de polimerización).

Cultivo de *Helicobacter pylori* y extracción de ureasa

Como enzima control se utilizó una ureasa comercial de Jack bean (Tipo IV, Sigma). La generación de amoniaco se evidenció mediante el ensayo del rojo fenol (Tanaka *et al.*, 2004). Este indicador de pH puede detectar cambios entre pH 6.8 a 7.7 lo que se

manifiesta como un viraje desde el color amarillo al rojo intenso. Desde el punto de vista espectroscópico, este cambio concuerda con la aparición de una banda de absorción intensa a 570 nm. La base del método considera que la ureasa al tener disponibilidad de urea a pH 6.8 (buffer fosfato), rápidamente puede generar amoniaco y elevar el pH hasta 7.7. Matemáticamente esta variación de la absorbancia en el tiempo (dA/dt), corresponde a la pendiente en la porción recta de cada curva, la que se relaciona linealmente con la actividad enzimática remanente en el medio de incubación (rango 0.0065-0.4 UI; $y = 0.0043x + 0.0066$, $r^2 = 0.9971$), lo que permite estimar los porcentajes de inhibición. La ureasa de *H. pylori* se extrajo de suspensiones bacterianas obtenidas de colonias desarrolladas en placas de agar sangre, las cuales se lavaron 3 veces con amortiguador fosfato frío (PBS). Los lisados se obtuvieron por centrifugación (14000 xg por 15 min) del producto de varios ciclos (8 en total) de congelamiento (-70° C)/descongelamiento y aplicación de ultrasonido (60 s). Los sobrenadantes reunidos fueron desalados mediante una columna de sephadex G-25 (1 x 5 cm) para luego ser concentrados por ultrafiltración usando una membrana de 300 kDa Amicom (Millipore) (Xiao *et al.*, 2007). Para estabilizar la ureasa, se agregó un volumen igual de glicerol y se almacenó a -20° C. La concentración de proteínas totales se determinó mediante el micro-método de Bradford (Bio-Rad), utilizando soluciones de BSA para la calibración. Para el ensayo de actividad de ureasa de *H. pylori*, se utilizó el método del rojo fenol sugerido por Schwartz *et al.*, (2006), con leves modificaciones. De las suspensiones o lisados de *H. pylori* (1.5 mg proteínas/mL) se tomó una alícuota de 10 μ L y se mezcló con 10 μ L de buffer o soluciones con distintas concentraciones de los extractos en placas de 96 pocillos. Posterior al periodo de preincubación (0 - 1 horas) se agregó 100 μ L de una solución que contiene urea 250 mM y 0,001 % de rojo fenol disueltos en tampón fosfato pH 6.8, EDTA 10 mM y se incubó a 37 °C por un máximo de 120 minutos. La inhibición se estimó procediendo de la misma manera que se describió para la enzima de Jack bean.

Ensayo cuantitativo de susceptibilidad: Concentración Mínima Inhibitoria

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de cáscara de Palta Hass contra *H. pylori* ATCC 43504 fue determinada usando el método de

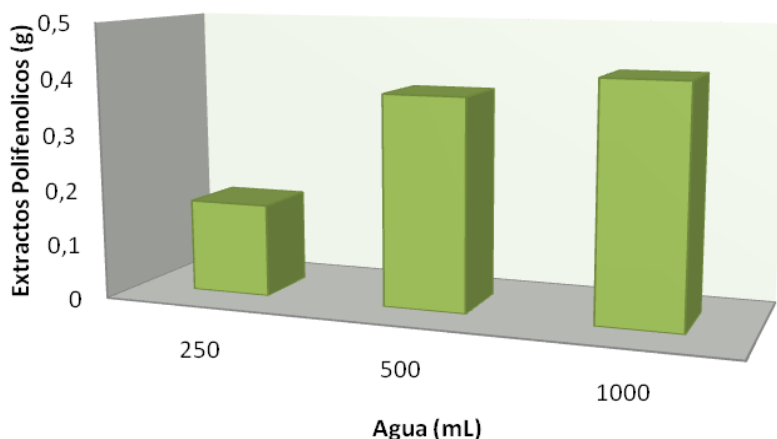
dilución en caldo Brucella. Para ello, un inóculo estandarizado de $\sim 10^7$ UFC/mL y el extracto de palta preparado en amortiguador fosfato (PBS 1X) a una concentración de 10 mg EAG/mL fueron agregados en las concentraciones adecuadas a un caldo Brucella suplementado con un 0,1 % de ciclodextrina. Los cultivos fueron incubados por 72 horas para luego extraer alícuotas de 10 μ L y sembrarlas en placas de agar. La CMI se definió como la concentración más baja de extracto de palta capaz de inhibir la multiplicación, cuando los cultivos fueron leídos después de 72 horas de incubación bajo condiciones de microaerofilia a 37° C. La concentración mínima bactericida (CMB) se definió como la concentración mínima de extracto de palta requerida para matar el

99,9 % de los organismos en el medio después de 72 horas de incubación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 1**, se observa que empleando 1000 mL de agua fue posible obtener 420 mg de extracto seco a partir de 15 g de cáscara fresca, lo que equivale a un rendimiento de extracción de 2.8 % en base húmeda. El aumento en la cantidad de muestra o el volumen de agua no mejoró significativamente el rendimiento. Después del proceso de secado del extracto de epicarpio de Palta Hass, se determinó un contenido de polifenoles totales de 77% de equivalentes de ácido gálico (EAG).

Figura 1. Rendimiento neto para los compuestos obtenidos de cáscara de Palta Hass empleando distintos volúmenes de agua.



Mediante HPLC en fase diol, se estableció la distribución oligomérica de las procianidinas presentes en el extracto. En la **Figura 2A y 2B**, se observan clusters de procianidinas coincidentes con los picos asignados por comparación con otros extractos como el de manzana (Pastene *et al.*, 2009b). Para objetivizar dicho aspecto, se utilizó el análisis RP-HPLC, mediante el cual se determinó la composición y grado de polimerización promedio (DPm) de éstos. Para obtener dicho valor, se sometió el extracto a floroglucinólisis, y los aductos formados entre el nucleófilo (floroglucinol) y el correspondiente flavan-3-ol fueron analizados por RP-HPLC. En primer lugar, los resultados indican claramente que éstas procianidinas están formadas principalmente por la unidad monomérica epicatequina. En segundo lugar,

el extracto posee procianidinas con un grado de polimerización DPm = 6.10 (**Tabla 1, Figura 2B**).

De forma paralela, mediante HPTLC se pudo confirmar la distribución del grado de polimerización del extracto, además de identificar el constituyente monomérico principal (**Figura 2C**). El posterior revelado con DMACA permitió comprobar la presencia de procianidinas y derivados de flavan-3-oles. No se observó la presencia de flavonoides ni otro tipo de polifenol.

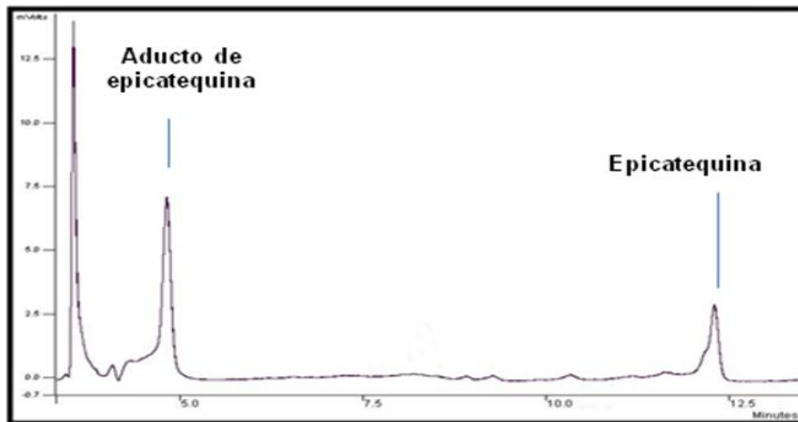
La capacidad antioxidante del extracto de Palta Hass se evaluó usando ensayos donde predomina el fenómeno de transferencia de electrones (DPPH, CUPRAC y FRAP) y a través de la neutralización de radicales libres por transferencia de un átomo de hidrogeno (TEAC-crocina). Este último ensayo utiliza

crocina (carotenoide) como reportero de oxidación, la cual permite detectar él o los agentes que compiten con el azo-radical AAPH, impidiendo su oxidación. Aun es controversial el hecho de que el grado de polimerización y el tipo de unidad monomérica que forman las procianidinas de un extracto puedan tener influencia sobre ciertos parámetros antioxidantes. Sin embargo, existen algunos reportes a favor de ésta hipótesis, los cuales señalan que la composición y el grado de polimerización de las procianidinas podrían estar vinculados con su capacidad antioxidante. En

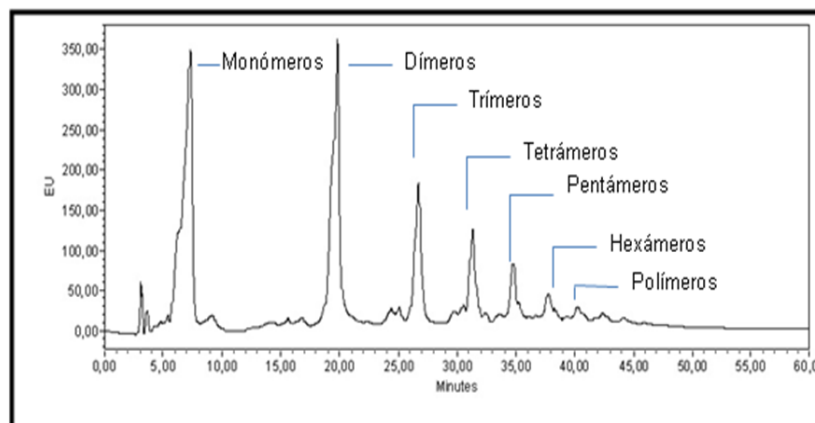
efecto, algunos autores establecen que a mayor grado de polimerización mayor capacidad antioxidante, no obstante lo anterior, se indica que el aumento de la capacidad antioxidante está ligado solo hasta cierto punto con el grado de polimerización. Así, llegando a cierto límite, por más que éste aumente, la capacidad antioxidante no sufre modificaciones (Lotito *et al.*, 2000; Counet y Collin, 2003; Iglesias *et al.*, 2010; Mitjans *et al.*, 2011).

Figura 2. Determinación de la naturaleza química de las procianidinas obtenidas de cáscara de Palta Hass.

(A) RP-HPLC de los productos de floroglucinólisis de las procianidinas de Palta Hass.



(B) NP-HPLC con la distribución oligomérica de las procianidinas.



(C)HPTLC del extracto de Palta Hass revelado con DMACA.

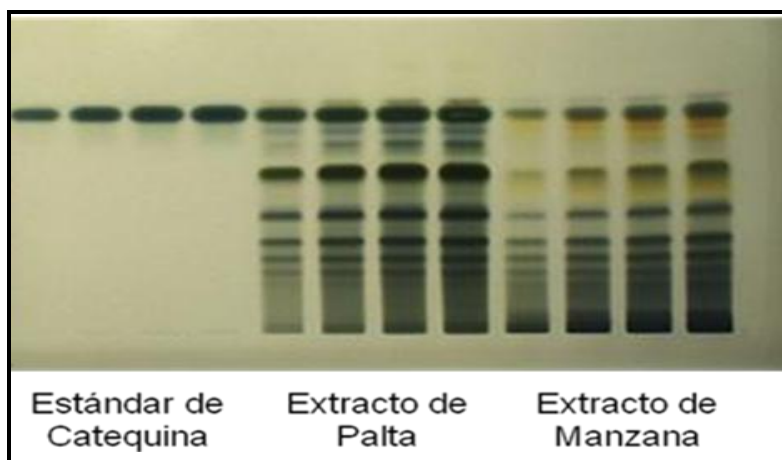


Tabla 1. Capacidad antioxidante, grado de polimerización y actividad anti-*H. pylori* del extracto de cáscara de Palta Hass.

| Índice | Extracto de Cáscara de <i>Persea americana</i> var Hass (Palta, aguacate) |
|---------------------------------------|---|
| Polifenoles totales mg EAG/g | 77.13 ± 2 |
| FRAP mmol Trolox/g | 3.65 ± 2 |
| TEAC _{DPPH} mmol Trolox/g | 3.83 ± 2 |
| TEAC _{crocina} mmol Trolox/g | 9.20 ± 2 |
| CUPRAC mmol Trolox/g | 6.40 ± 2 |
| <i>DPm</i> | 6.10 ± 0.3 |
| CMI (µg EAG/mL) | > 1500 |

Mediante el ensayo CUPRAC, un ensayo más selectivo, simple y robusto respecto a los otros análisis empleados, se corroboró la elevada capacidad antioxidante del extracto de Palta Hass. La diferencia entre los distintos valores TEAC de los ensayos DPPH y FRAP respecto al CUPRAC se debe principalmente que en el ensayo CUPRAC existe una reacción completa (punto final), en cambio en los otros ensayos la reacción no es completa y habitualmente se realiza las lecturas a un tiempo arbitrario (Revisado por Apak *et al.*, 2007). En efecto, si el tiempo final de los

ensayos DPPH y FRAP fuera de 5 horas, se obtendrían resultados similares a los del CUPRAC. En base a los ensayos realizados se puede caracterizar a ambos extractos como “chain breakers”, es decir moléculas que capturan radicales libres evitando que estos participen de reacciones en cadena; y así por ejemplo podrían ser útiles limitando el deterioro oxidativo de alimentos o sustratos biológicos susceptibles. La actividad anti-*H. pylori* fue evaluada mediante el ensayo de dilución en caldo de Brucella, encontrándose que el extracto de Palta Hass no afectó

la multiplicación de la bacteria (CMI > 1500 ug EAG/mL) en las concentraciones ensayadas (**Tabla 1**) La actividad anti-ureasa se midió en dos tipos de enzimas, una producida por *H. pylori* y otra producida por Jack bean (**Figura 3A y 3B**). Esta última se empleó porque presenta un sitio activo y una actividad catalítica similar a la de una ureasa de origen bacteriano. La estructura, número y tipo de subunidades, masa molecular y secuencia aminoácida de la ureasa depende de su origen (Mobley et al., 1995). Las ureasas en general contienen tres tipos de subunidades, α , β y γ . Sus masas moleculares están en el rango de 68–73 kDa (α), 8–17 kDa (β) y 8–12 kDa (γ). Las ureasas bacterianas generalmente están formadas por tres subunidades denominadas α , β , y γ . En contraste, la ureasa de *H. pylori* posee sólo dos de éstas subunidades: α (60–66 kDa) y β (26–31 kDa), las cuales se encuentran asociadas en forma no covalente. Tres de estas subunidades ($\alpha\beta$) se agregan para originar una unidad de mayor tamaño con forma de trébol. La asociación de cuatro de estas unidades mayores genera una estructura supramolecular tetraédrica con una estequiometría ($\alpha\beta$)₁₂. La masa molecular de éste dodecámero es de 1100 kDa (Benini et al., 1999; Jabri et al., 1995). La ureasa vegetal extraída de Jack bean es una molécula homohexamérica (α_6). La subunidad contiene 840 aminoácidos y su masa molecular es de 90.77 ± 0.05 kDa (Dunn y Phadnis, 1998). Independiente de sus diferencias estructurales, las secuencias aminoácidas de los sitios activos son básicamente similares en todas las ureasas conocidas. La consecuencia de ese hecho es que el mecanismo catalítico es el mismo. El sitio activo esta siempre localizado en la subunidad α y contiene un centro catalítico con dos átomos de níquel (II) separados por una distancia de 3,5 a 3,7 Å (Ciurli et al., 1999). En la ureasa de *H. pylori* (forma no inhibida), ambos átomos están coordinados por His136, His138, Kcx219, His248, His247, Asp362 y moléculas de agua, que se emplean en la reacción de hidrólisis. Como el mecanismo de catálisis es el mismo, el extracto de Palta Hass inhibió a la ureasa obtenida de Jack bean y *H. pylori*. Para ambas se observó una inhibición de tipo concentración-dependiente. El extracto manifestó un efecto inhibitorio rápido e independiente del tiempo de contacto con la enzima. Lo anterior sugeriría que algunos componentes interaccionan mediante mecanismos adicionales que llevan a una inhibición más eficaz de la enzima. Las ureasas son enzimas ricas

en tioles. Por ejemplo, el contenido total de tioles en la ureasa Jack bean ha sido estimado en 15 grupos por subunidad. Sin embargo, solo 6 de las 15 cisteínas son accesibles a reactivos selectivos para tioles. Una de esas 6 cisteínas, Cys⁵⁹², está localizada en el brazo móvil que cierra el sitio activo de la ureasa. Esta cisteína juega un papel crucial en la actividad catalítica (Takishima et al., 1988). Por otro lado, la unión de los polifenoles a la ureasa podría llegar a afectar su actividad sin alterar químicamente el centro catalítico. Bartolomé et. al., estudiaron el efecto de la unión de distintos polifenoles con albúmina bovina sérica (BSA) sobre su perfil de elución cromatográfica (en Sephadex G-50). Los investigadores observaron un aumento significativo en el volumen de elución de los complejos BSA-polifenol, en particular con las formas poliméricas de éstos y que poseen grupos –OH en posición orto (Bartolome et al., 2000). Interesantemente, se observó una elevada potencia y capacidad inhibitoria de la ureasa por parte de los polifenoles de Palta Hass. Lo anterior se vio reflejado en la concentración inhibitoria al 50 %, la cual se alcanzó un valor de 1.02 µg/mL. Para investigar la relación de estructura-actividad de los polifenoles de palta se usó la ureasa del Jack bean, la cual es más pura. Cuando se empleó polifenoles monoméricos puros (catequina) en el rango de concentración 20 a 8500 µg/mL, no se observó efecto inhibitorio sobre la ureasa de *H. pylori*. Esto contrasta con los resultados observados para la fracción monomérica de Palta Hass, lo que hace suponer la presencia de otras sustancias que co-eluyen con la epicatequina. Por el contrario, las fracciones de alto peso molecular mostraron un elevado efecto inhibitorio formando agregados inactivos con la enzima. Por otro lado, sin considerar la fracción monomérica de la Palta Hass, las otras fracciones mostraron una relación estructura-actividad positiva, donde las procianidinas de alto peso molecular tuvieron un efecto inhibitorio significativamente mayor que las de bajo peso molecular. En la composición del extracto de Palta Hass se determinó que el mayor porcentaje de inhibición de ureasa (61 %) se alcanzó con los polímeros de epicatequina, en efecto, a medida que aumenta la unión de monómeros formando dímeros, trímeros y polímeros, aumenta el porcentaje de inhibición de ureasa (**Figura 4A y 4B**). Obviamente, nuestros resultados no permiten extrapolar el efecto anti-ureasa a otro tipo de procianidinas como aquellas unidas por dos enlaces (tipo A). En efecto, las procianidinas tipo A pueden formar “clusters” con rotámeros cuya geometría espacial no

sigue el patrón de distribución de pesos moleculares habitualmente observado mediante la separación de éstas por NP-HPLC. Lo anterior ha sido descrito en otras especies como el cranberry, donde se ha observado la presencia de procianidinas del tipo A, las cuales poseen propiedades diferentes a las observadas para las del tipo B (presentes en la palta). Por ejemplo, las procianidinas del tipo A son más efectivas como agentes anti-adherencia de patógenos bacterianos como *E. coli* y el mismo *H. pylori* (Burger et al. 2002; Foo et al., 2000; Gotteland et al., 2008; Guay, 2009; Howell et al., 2005; Shmueley et al., 2007). Ese tipo de interacciones supramoleculares puede ser diferente dependiendo el tipo de procianidina. Muranaka et al., (2006) realizaron un interesante análisis del reconocimiento molecular de las procianidinas de manzana (tipo B, derivadas de epicatequina), con oxotitano de ftalocianina (TiOPc). Las procianidinas

de manzana están ligadas por enlaces 4 β -8 y 4 β -6, y frente al tratamiento con TiOPc adoptaron diferentes configuraciones dependiendo de su naturaleza. Mediante RMN, recientemente Pianet et al., (2010) demostraron la importancia de la conformación espacial de las procianidinas en su interacción con saliva. Así, ellos observaron que las conformaciones extendidas de estos polifenoles pueden interaccionar de mejor manera y en forma altamente específica con las proteínas de la saliva. La conformación extendida de las procianidinas habitualmente está en equilibrio con la conformación compacta y el predominio de una de ellas está supeditado al solvente en que se disuelven y si estas son homogéneas o heterogéneas desde el punto de vista de sus monómeros (Tarascou et al., 2006; Tarascou et al., 2007). Así, los resultados biológicos de nuestro trabajo resultan plausibles si se tiene presente estas consideraciones.

Figura 3. Inhibición de ureasa de Jack Bean (A) y de *Helicobacter pylori* (B) por extracto de Palta Hass expresado como EAG ($\mu\text{g/mL}$).

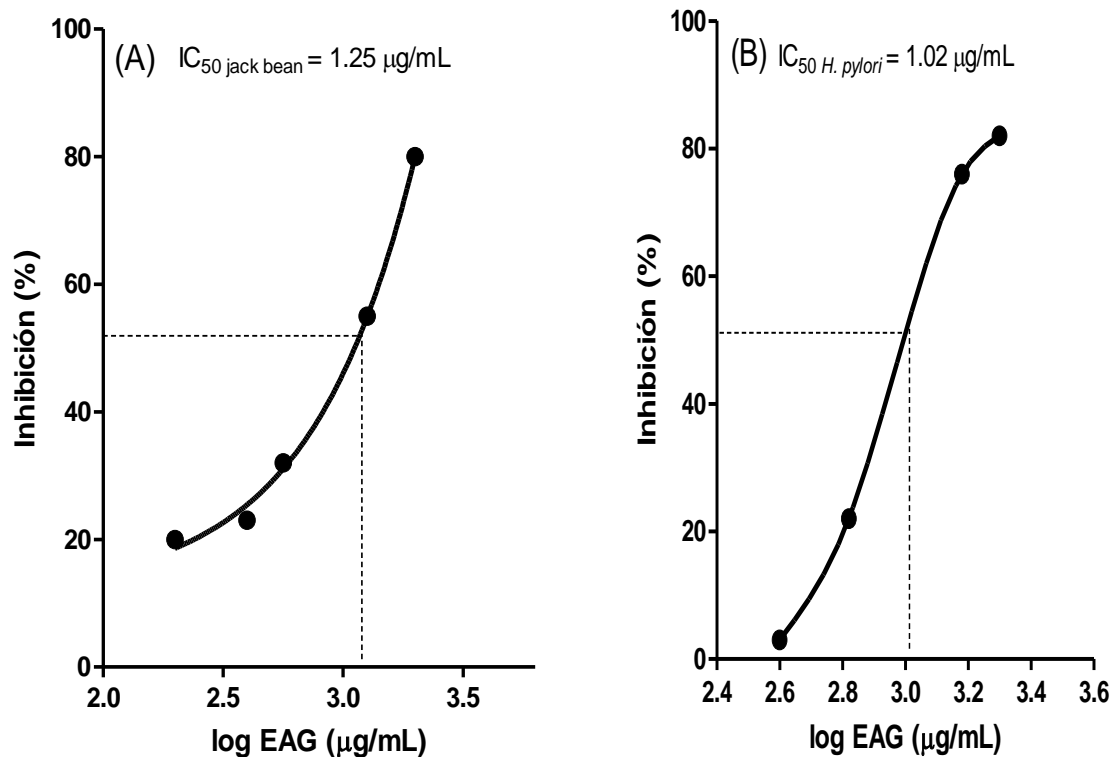
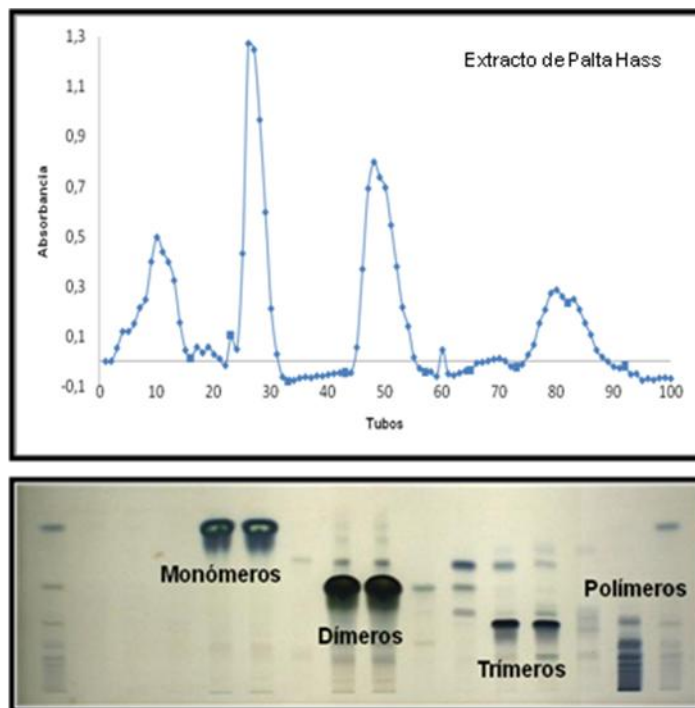
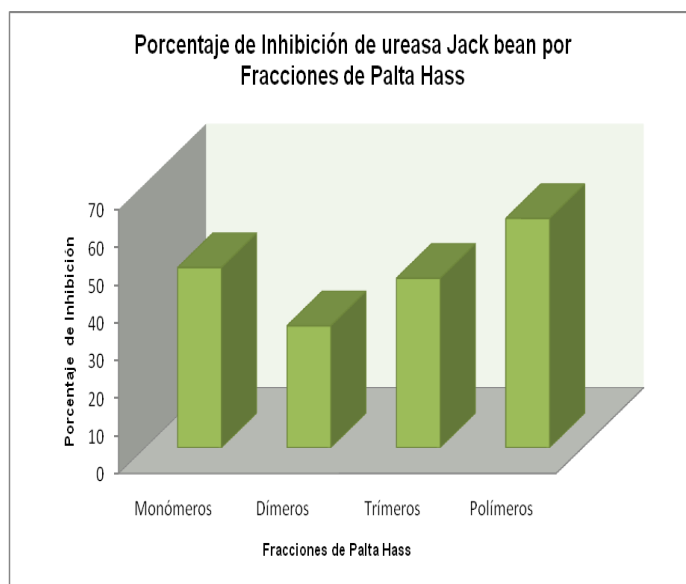


Figura 4. Inhibición de ureasa Jack bean empleando distintas fracciones de extracto de Palta Hass.

(A) Cromatograma representativo de la separación de procianidinas de Palta Hass mediante columna de Toyopearl HW40s y su análisis por HPTLC y detección con DMACA.



(B) Efecto inhibitorio de las fracciones de Palta Hass sobre la actividad de ureasa de Jack bean comparadas a la misma concentración (120 µg EAG/mL).



CONCLUSIONES

Se desarrolló un proceso de extracción de los polifenoles bio-activos a partir de epicarpio de *Persea americana* Var Hass (Palta Hass). Estos últimos actúan como potentes antioxidantes e inhibidores de la ureasa, uno de los factores de colonización más importantes de *H. pylori*. Así, en la elaboración de productos que contribuyan a prevenir o limitar las consecuencias patológicas asociadas a la presencia de la bacteria, se justificaría su inclusión como ingredientes funcionales en alimentos y nutraceuticos. Para comprender el alcance de la asociación entre el grado de polimerización y el efecto anti-ureasa, actualmente se están llevando a cabo estudios con procianidinas de distinta naturaleza a las identificadas en la cáscara de palta. Se concluye que un producto de bajo valor agregado como el epicarpio de Palta Hass puede ser utilizado como una fuente abundante de polifenoles bioactivos (procianidinas).

AGRADECIMIENTOS

F. Chávez y E. Pastene agradecen al Proyecto Financiamiento Basal PFB-27 (PFT-014), Unidad de Desarrollo Tecnológico, y DIUC 202.074.023-1.1, de la Universidad de Concepción. M. Aranda Agradece a FONDECYT, proyecto N° 11080165. A. García agradece al Proyecto DIUC 210.036.038-1.0.

REFERENCIAS

- Apak R, Guclu K, Demirata B, Ozyurek M, Celik SE, Bektasoglu B, Berker KI, Ozyurt D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules** 12: 1496 - 1547.
- Atherton JC, Peek Jr RM, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. 1997. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology** 112: 92 - 99.
- Bartolome B, Estrella I, Hernandez MT. 2000. Interaction of low molecular weight phenolics with proteins (BSA). **J Food Sci** 65: 617 - 621.
- Bazzano LA, He J, Ogden LG, Loria CM, Vupputuri S, Myers L, Whelton PK. 2002. Fruit and vegetable intake and risk of cardiovascular disease in US adults: the first National Health and Nutrition Examination Survey Epidemiologic Follow-up Study. **Am J Clin Nutr** 76: 93 - 99.
- Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, Miletti S, Ciurli S, Mangani S. 1999. A new proposal for urease mechanism based on the crystal structures of the native and inhibited enzyme from *Bacillus pasteurii*: why urea hydrolysis casts two nickels. **Structure** 7: 205 - 216.
- Bonoli M, Marconi E, Caboni MF. 2004. Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours: Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. **J Chromatogr A** 1057: 1 - 12.
- Burger O, Weiss E, Sharon N, Tabak M, Neeman I, Ofek I. 2002. Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric mucus by a high-molecular-weight constituent of cranberry juice. **Crit Rev Food Sci Nutr** 42: 279 - 284.
- Bravo J, 2009. Chile Potencia Alimentaria y Forestal. El mercado de las paltas 2009. **Oficina de estudios y políticas agrarias-ODEPA** - Agosto de 2009, p. 4.
- Ciurli S, Benini S, Rypniewski WR, Wilson KS, Miletti S, Mangani S. 1999. Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms. **Coord Chem Rev** 192: 331 - 355.
- Counet C, Collin C. 2003. Effect of the Number of Flavanol Units on the Antioxidant Activity of Procyanidin Fractions Isolated from Chocolate. **J Agric Food Chem** 51: 6816 - 6822.
- Cover TL, Blaser MJ. 1992. Purification and Characterization of the Vacuolating Toxin from *Helicobacter-Pylori*. **J Biol Chem** 267: 10570 - 10575.
- Chia TWR, Dykes GA. 2010. Antimicrobial activity of crude epicarp and seed extracts from mature avocado fruit (*Persea americana*) of three cultivars. **Pharm Biol** 48: 753 - 756.
- Choi O, Yahiro K, Morinaga N, Miyazaki M, Noda M. 2007. Inhibitory effects of various plant polyphenols on the toxicity of Staphylococcal alpha-toxin. **Microb Pathog** 42: 215 - 224.
- Dunn BE, Phadnis SH. 1998. Structure, function and localization of *Helicobacter pylori* urease. **Yale J Biol Med** 71: 63 - 73.
- Foo LY, Lu YR, Howell AB, Vorsa N. 2000. The

- structure of cranberry proanthocyanidins which inhibit adherence of uropathogenic P-fimbriated *Escherichia coli* in vitro. **Phytochemistry** 54: 173 - 181.
- Franco A, Johnston E, Krishna U, Y. Yamaoka, DA. Israel, Nagy T, Wroblewski L, Piazuolo M, Correa P. 2008. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. **Cancer Res** 2: 379 - 387.
- Gonzalez-Segovia R, Quintanar JL, Salinas E, Ceballos-Salazar R, Aviles-Jimenez F, Torres-Lopez J. 2008. Effect of the flavonoid quercetin on inflammation and lipid peroxidation induced by *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of guinea pig. **J Gastroenterol** 43: 441 - 447.
- Gotteland M, Andrews M, Toledo M, Muñoz L, Caceres P, Anziani A, Wittig E, Speisky H, Salazar G. 2008. Modulation of *Helicobacter pylori* colonization with cranberry juice and *Lactobacillus johnsonii* Lal in children. **Nutrition** 24: 421 - 426.
- Guay DRP. 2009. Cranberry and Urinary Tract Infections. **Drugs** 69: 775 - 807.
- Gursevak K. 2005. Functional foods and nutraceuticals in the management of obesity. **Nutr Food Sci** 35: 344 - 352.
- Hill J, Peters J. 2002. Biomarkers and functional foods for obesity and diabetes. **Br J Nutr** 88: 213 - 218.
- Howell AB, Reed JD, Krueger CG, Winterbottom R, Cunningham DG, Leahy M. 2005. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. **Phytochemistry** 66: 2281 - 2291.
- Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, Colditz GA, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. 2004. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. **J Natl Cancer Inst** 96: 1577 - 1584.
- Iglesias J, Pazos M, Lois S, Medina I. 2010. Contribution of galloylation and polymerization to the antioxidant activity of polyphenols in fish lipid systems. **J Agric Food Chem** 58: 7423 - 7431.
- Jabri E, Carr MB, Hausinger RP, Karplus PA. 1995. The crystal-structure of urease from *Klebsiella aerogenes*. **Science** 268: 998 - 1004.
- Joshipura KJ, Ascherio A, Manson JE, Stampfer MJ, Rimm EB, Speizer FE, Hennekens CH, Spiegelman D, Willett WC. 1999. Fruit and vegetable intake in relation to risk of ischemic stroke. **J Am Med Assoc** 282: 1233 - 1239.
- Lotito SB, Actis Goretta L, Renart ML, Caligiuri M, Rein D, Schmitz HH, Steinberg FM, Keen CL, Fraga CG. 2000. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. **Biochem Biophys Res Commun** 276: 945 - 951.
- Mitjans M, Ugartondo V, Martínez V, Touriño S, Torres JL, Vinardell MP. 2011. Role of galloylation and polymerization in cytoprotective effects of polyphenolic fractions against hydrogen peroxide insult. **J Agric Food Chem** 59: 2113 - 2119.
- Mobley HLT, Garner RM, Bauerfeind P. 1995. *Helicobacter pylori* nickel-transport gene nixA-synthesis of catalytically active urease in *Escherichia coli* independent of growth-conditions. **Mol Microbiol** 16: 97 - 109.
- Mooney C, Keenan J, Munster D, Wilson I, Allardyce R, Bagshaw P, Chapman B, Chadwick V. 1991. Neutrophil Activation by *Helicobacter pylori*. **Gut** 32: 853 - 857.
- Morinaga N, Iwamaru Y, Yahiro K, Tagashira M, Moss J, Noda M. 2005. Differential activities of plant polyphenols on the binding and internalization of cholera toxin in VERO cells. **J Biol Chem** 280: 23303 - 23309.
- Muranaka A, Yoshida K, Shoji T, Moriichi N, Masumoto S, Kanda T, Ohtake Y, Kobayashi N. 2006. Chiral recognition of apple procyanidins by complexation with oxotitanium phthalocyanine. **Org Lett** 8: 2447 - 2450.
- Ordoudi S, Tsimidou M. 2006. Crocin bleaching assay step by step: observations and suggestions for an alternative validated protocol. **J Agric Food Chem** 54: 1663 - 1671.
- Özyürek M, Çelik SE, Berker KI, Güçlü K, Tor I, Apak R. 2007. Sensitivity enhancement of CUPRAC and iron(III)-phenanthroline antioxidant assays by preconcentration of colored reaction products on a weakly acidic cation exchanger. **React Func Polym** 67: 1478 - 1486.
- Pastene E, Speisky H, Troncoso M, Alarcón J, Figueroa G. 2009a. *In vitro* inhibitory effect of apple peel extract on the growth of *Helicobacter pylori* and respiratory burst induced on human neutrophils. **J Agric Food Chem** 57: 7743 - 7749.

- Pastene E, Troncoso M, Figueroa G, Alarcón J, Speisky H. 2009b. Association between polymerization degree of apple peel polyphenols and inhibition of *Helicobacter pylori* urease. **J Agric Food Chem** 57: 416 - 424.
- Pastene E, Speisky F, Garcia A, Moreno J, Troncoso M, Figueroa G. 2010c. *In vitro* and *in vivo* effects of apple peel polyphenols against *Helicobacter pylori*. **J Agric Food Chem** 58: 7172 - 7179.
- Pianet I, Cala O, Fabre S, Dufourc E, Fouquet E, Laguerre M. 2010. Towards a molecular interpretation of astringency. Synthesis, 3D-structure, colloidal state and human saliva protein recognition of procyanidins. **Planta Med** 76: 1165 - 1165.
- Prior RL, Cao G. 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Rad Biol Med** 27: 1173 - 1181.
- Ramos-Jerz MD, Villanueva S, Deters AM. 2007. Influence of avocado seed fractions (*Persea americana* Mill.) obtained by HSCCC on human skin keratinocytes and fibroblasts: Differences of effects in regard of tested cell types. **Planta Med** 73: 975 - 975.
- Ramos MD, Jerz G, Villanueva S, Lopez-Dellamary F, Waibel R, Winterhalter P. 2004. Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass). **Phytochemistry** 65: 955 - 962.
- Rohdewald P, Beil W. 2008. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* growth and adherence to gastric mucosal cells by Pyenogenol (R). **Phytother Res** 22: 685 - 688.
- Sarkar S. 2007. Functional foods as self-care and complementary medicine. **Nutr Food Sci** 37: 160 - 167.
- Schwartz JT, Allen LAH. 2006. Role of urease in megasome formation and *Helicobacter pylori* survival in macrophages. **J Leukocyte Biol** 79: 1214 - 1225.
- Shmueli H, Yahav J, Samra Z, Chodick G, Koren R, Niv Y, Ofek I. 2007. Effect of cranberry juice on eradication of *Helicobacter pylori* in patients treated with antibiotics and a proton pump inhibitor. **Mol Nutr Food Res** 51: 746 - 751.
- Sidebotham RL, Baron JH. 1990. Hypothesis - *Helicobacter-pylori*, urease, mucus, and gastric-ulcer. **Lancet** 335: 193 - 195.
- Singleton V, Rossi J. 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am J Enol Vitic** 16: 144 - 158.
- Stingl K, Altendorf K, Bakker EP. 2002a. Acid survival of *Helicobacter pylori*: how does urease activity trigger cytoplasmic pH homeostasis? **Trends Microbiol** 10: 70 - 74.
- Stingl K, Altendorf K, Bakker EP. 2002b. The compartment buffered by the urease of *Helicobacter pylori*: cytoplasm or periplasm? Response from Stingl et al. **Trends Microbiol** 10: 218 - 219.
- Stingl K, Uhlemann EM, Schmid R, Altendorf K, Bakker EP. 2002c. Energetics of *Helicobacter pylori* and its implications for the mechanism of urease-dependent acid tolerance at pH 1. **J Bacteriol** 184: 3053 - 3060.
- Takishima K, Suga T, Mamiya G. 1988. The Structure of Jack Bean Urease - the Complete Amino-Acid Sequence, Limited Proteolysis and Reactive Cysteine Residues. **Eur J Biochem** 175: 151 - 165.
- Tanaka T, Kawase M, Tani S. 2004. alpha-hydroxyketones as inhibitors of urease. **Bioorg Med Chem** 12: 501 - 505.
- Tarascou I, Barathieu K, Simon C, Ducasse MA, Andre Y, Fouquet E, Dufourc EJ, de Freitas V, Laguerre M, Pianet I. 2006. A 3D structural and conformational study of procyanidin dimers in water and hydro-alcoholic media as viewed by NMR and molecular modeling. **Mag Res Chem** 44: 868 - 880.
- Tarascou I, Ducasse MA, Dufourc EJ, Moskau D, Fouquet E, Laguerre M, Pianet I. 2007. Structural and conformational analysis of two native procyanidin trimers. **Mag Res Chem** 45: 157 - 166.
- Terasawa N, Sakakibara M, Murata M. 2006. Antioxidative activity of avocado epicarp hot water extract. **Food Sci Technol Res** 12: 55 - 58.
- Tomb J, White O, Kerlavage A. 1997. The Complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. **Nature** 388: 339 - 547.
- Tubaro F, Ghiselli A, Rapuzzi P, Maiorino M, Ursini F. 1998. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. **Free Rad Biol Med** 24: 1228 - 1234.
- Wang CC, Chu CY, Chu KO, Choy KW, Khaw KS, Rogers MS, Pang CP. 2004. Trolox-equivalent

antioxidant capacity assay versus oxygen radical absorbance capacity assay in plasma.

Clin Chem 50: 952 - 954.

Xiao ZP, Shi DH, Li HQ, Zhang LN, Xu C, Zhu HL. 2007. Polyphenols based on isoflavones as inhibitors of *Helicobacter pylori* urease.

Bioorg Med Chem 15: 3703 - 3710.

Yu I, Slavin M. 2008. All natural whole-wheat functional foods for health promotion and disease prevention. **Funct Food Health** 993: 125 - 142.