

Actividad antiviral y estudio de citotoxicidad de vinos tintos Sauvignon

Antiviral activity and cytotoxicity study from Sauvignon red wines

LUISANA MARTINEZ¹, GRECIA M CORAO¹, JOSÉ ÁNGEL COVA², YACNELY REY¹

¹Laboratorio de Investigaciones en Cultivos Celulares. Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. ²Instituto de Inmunología Clínica. Universidad de Los Andes. Mérida-Venezuela. gmendez@ula.ve

RESUMEN

Una variada actividad farmacológica del vino, relacionada con sus polifenoles como antioxidantes y antiviral, ha sido reportada. Se evaluó la actividad antiviral, respecto a la cantidad de polifenoles y su activación como antioxidante por el sulfato ferroso. Las extracciones de tres vinos tintos mostraron un elevado contenido de polifenoles por afinidad con el azul de metileno. La actividad antiviral fue reconocida por la lisis de bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*. La electroforesis de poliacrilamida, mostró que los extractos de los vinos, con sulfato ferroso hidrolizaron las proteínas del fago. La toxicidad se evaluó en células mononucleares. La viabilidad de células mononucleares, fue superior a 76%, demostrando baja toxicidad y un posible uso para estudios en humanos.

PALABRAS CLAVE

Antiviral, vino tinto, polifenoles, bacteriófagos de *Pseudomonas aeruginosa*, electroforesis, toxicidad, células mononucleares, antioxidantes.

ABSTRACT

A variety of pharmacological activities of wine have been reported. This property is mainly related to polyphenols and their abilities to act as antioxidant and antiviral. Antiviral activity was evaluated analysing the content of polyphenols, with and without ferrous sulphate as antioxidant enhancer. The extractions from three red wines showed a high content of polyphenols through methylene blue affinity test. The antiviral activity was recognized by the lysis of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage. Polyacrilamide gel electrophoresis showed that extracts of wine hydrolysed phage proteins. Cytotoxicity was evaluated in mononuclear cells. Viability for the whole range, with or without ferrous sulphate, of

these cells were higher than 76%, showing a low toxicity of wine extracts. Possibly they could be used in human studies.

KEY WORD

Antiviral, red wines, polyphenols, *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage, electrophoresis, toxicity, mononuclear cell, antioxidant.

AGRADECIMIENTO

El presente trabajo fue posible gracias al financiamiento del Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela, (Proyecto N°: FA-259-01-03-C). Agradecemos altamente su contribución.

INTRODUCCIÓN

El vino ha sido parte de la cultura humana desde hace unos 6000 años y los antecedentes históricos relacionan al vino con la salud y la longevidad. En los últimos diez años han surgido estudios científicos que demuestran que el consumo moderado de vino es beneficioso para la salud, este fenómeno es denominado "paradoja francesa" (Estudio MONICA, 1994). Científicos escoceses determinaron la presencia y la cantidad de compuestos polifenólicos presentes en vinos, comparando sesenta y cinco vinos tintos provenientes de una docena de países, encontrando que los vinos chilenos presentan la mayor concentración de polifenoles medidos, destacándose los vinos tintos del tipo Merlot y Sauvignon (Lean *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 1998).

Los vinos tintos chilenos tipo Sauvignon fueron seleccionados para el presente estudio, por poseer la mayor cantidad de polifenoles, ser económicos, de fácil disponibilidad en el mercado, y además de servir como

modelo y punto de comparación con el vino tinto venezolano del tipo Sauvignon.

En el vino existen aproximadamente 500 compuestos conocidos de los cuales 160 son ésteres (Infante, 1997). Estos contienen sales minerales de: calcio, potasio, magnesio, silicio y también de zinc, flúor, cobre, manganeso, cromo y el anión mineral sulfato (Fiessinger, 2001). Los taninos o polifenoles presentes en los vinos son unos de los principales responsables del olor de los mismos y de sus propiedades astringentes. Las uvas utilizadas para la producción del vino tinto tipo Cabernet Sauvignon, es la uva *Vitis vinifera*. Los taninos son generados por estas plantas en su proceso de crecimiento y se encuentran repartidos por toda la materia que compone el vino (Serdio, 2001). Los polifenoles tienen un peso molecular relativamente alto, forman complejos con carbohidratos y proteínas (Harborne, 1989), se unen con iones metálicos, son fácilmente oxidables y forman polímeros (Harborne, 1980). Juegan un papel importante en la resistencia contra enfermedades de los vegetales (Antolovich *et al.*, 2000), y son utilizados por las plantas como protección contra infecciones producidas por hongos y parásitos (Marcano, 1991). La oxidación de lípidos, carbohidratos y ADN en diferentes tejidos y órganos puede generar daños irreversibles, que llevan a la muerte celular debido a la acción de los radicales libres. Frente al daño que produce la oxidación, el organismo despliega sistemas antioxidantes. Estos operan en parte a través de moléculas que protegen las estructuras biológicas impidiendo que sean oxidadas. Las vitaminas E y C así como los polifenoles son algunas de las sustancias que entregan sus electrones a los radicales libres poniendo fin a la cadena de oxidación. Cuando el equilibrio que existe entre antioxidantes y oxidantes se pierde a favor de los radicales libres, se cae en un estrés oxidativo y se produce una enfermedad (Zambrano, 2001). Los polifenoles son capaces de actuar a todos los niveles de la cadena radical y de esta manera impiden la oxidación de las células (Brenes *et al.*, 1992), eliminan la actividad de las especies del oxígeno y sus electrones, inhiben la nitrogenación y la formación de quelatos de los iones metálicos (Antolovich *et al.*, 2000). La actividad antioxidante de los polifenoles pareciera ser potenciada por soluciones de hierro. De esta manera Langley-Evans (Langley-Evans, 2000) reportaron que el té verde y el negro potencian su actividad antioxidante usando el poder reductor del hierro férrico. Se ha reportado que el consumo de jugo de cereza, incrementa la habilidad del plasma para reducir el disulfonato nitroso de potasio, Fe^{+3} , y el 2,4,6-tri (2-pyridil) -5 - triazina, que son compuestos oxidantes (Pedersen y Duthie., 2000). El vino tinto previene el daño oxidativo del ADN, causado por los radicales libres y la formación de quelatos de

hierro, agrupando a los mismos y eliminándolos (Casalini *et al.*, 1999; Lodovici, 2001). Un incremento del consumo de polifenoles en la dieta diaria disminuye el peligro de padecer enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis (Abou-Agag *et al.*, 2000), previenen y curan las mismas (Morton *et al.*, 2000) al bloquear la producción de endotelina, proteína vinculada a cardiopatías, responsable de la contracción de los vasos sanguíneos. El vino de tipo Cabernet Sauvignon es el que tiene mayor impacto sobre la endotelina (Corder, 1999).

Los compuestos fenólicos presentes en plantas, inhiben la reproducción de los virus de la influenza tipo A y tipo B, además del virus del Herpes simple (HSV). Estos compuestos inducen una inactivación parcial de las glicoproteínas virales, inhibiendo los estadios iniciales de la replicación viral (Serkedjieva y Manolova, 1992). El vino tinto podría atacar ciertos virus, entre ellos los de la poliomielitis y el HSV. Se han reportado dos nuevos taninos hidrolizables, de la *Shepherdia argentea*: Shephagenins A y B, que inhiben el virus de la inmunodeficiencia humana HIV-1. Esta actividad es más fuerte que la obtenida con el galato de epigallocatequina (Yhosida *et al.*, 1996). En un estudio realizado por Komowalchuk y Speirs (1976) se observó que las infusiones y extractos obtenidos de diferentes uvas inactivan el virus del polio, algunos virus entéricos y el HSV. Además al comparar el efecto de los vinos tintos y vinos blancos se demostró que los vinos tintos tienen mayor actividad antiviral que los vinos blancos. Daroch y colaboradores (2001) estudiaron la actividad antibacteriana de 16 vinos chilenos, en *Helicobacter pylori* obtenidos del cultivo de biopsias gástricas y demostraron que los vinos tintos chilenos poseían actividad antibacteriana contra *H. pylori* y que dicha actividad dependía de la presencia de resveratrol (compuesto polifenólico).

El uso de las propiedades líticas de los fagos utilizados en este trabajo, representa un modelo sencillo, rápido, económico, sensible, específico y comparable con modelos en virus humanos (Maillard *et al.*, 1995, 1996.) Otros pares fago-bacteria causantes de enfermedad en humanos, como es el caso de la tuberculosis usan este sistema (Graham, 1996). Por otra parte, en estudios preliminares, empleando la tecnología del ciclo lítico del fago, se ha demostrado que los polifenoles de la *Punica granatum* L., poseen actividad antiviral y esta es potenciada por el sulfato ferroso (Stewart *et al.*, 1998; Corao, 2001).

En este trabajo nos proponemos investigar la posible actividad antiviral sobre bacteriófagos que infectan a la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, de los polifenoles presentes en los extractos acuosos de dos vinos tintos chilenos comparados con uno venezolano, todos tipo

Sauvignon y evidenciar si dicha actividad es potenciada por soluciones de sulfato ferroso, así como explorar si los extractos potenciados o no son tóxicos para células monoclonares humanas.

Se seleccionó el fago de *Pseudomonas aeruginosa* por ser de fácil manipulación y ampliamente estudiado por Maillard *et al.*, (1995. 1996) brindando así una fácil comparación con nuestros estudios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos: Todos los medios y reactivos usados fueron de grado analítico. Las soluciones se prepararon con agua destilada y esterilizada en un autoclave a 121°C, bajo 15 libras de presión (psi) durante 15 minutos. Se prepararon los medios caldo triptosa fosfato (TPB; Oxoid) y Agar triptosa fosfato sólido siguiendo las recomendaciones del proveedor.

Células huésped y bacteriófagos: El bacteriófago 10116-195 que infecta al huésped *Pseudomonas aeruginosa* fueron adquiridos de la Colección de Cultivo Tipo Americano (ATCC) y donados a la Universidad de Los Andes por la Universidad de Brighton, UK.

Cultivo bacteriano: Se prepararon cultivos bacterianos de *Pseudomonas aeruginosa* en TPB. Una vez incubadas las bacterias por 18 horas, a 240 r.p.m. (37 °C), se sembraron en placas con agar Nutriente (NBA) conservados a 4 °C. Para realizar cada experimento, se tomó una colonia, se inoculó en 5 ml de medio y se incubó por 18 horas a 240 rpm (37 °C). El tamaño del inóculo se asumió que era aproximadamente de 10⁹ unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml).

Recolección y purificación del bacteriófago: El fago fue propagado en su bacteria huésped. A las placas que presentaron confluencia se les agregó 5ml de buffer lambda (1 M Tris pH 7,2; 2% w/v gelatina; Mg₂SO₄ 2,5grs pH 7,4) y se dejó toda la noche en refrigeración. El buffer fue colectado, se le agregó lentamente un volumen igual de cloroformo, y se dejó reposar en hielo durante 10 minutos. Luego se centrifugó (Centra CL3R Termo IEC) por 10 minutos a 6000 rpm (4 °C). El sobrenadante donde se encuentra el bacteriófago fue retirado cuidadosamente. Se le agregó cloruro de sodio NaCl 1M (5,84g por 100ml de cultivo), se disolvió agitando y se dejó en hielo durante una hora (para promover la disociación del bacteriófago de los restos bacterianos que no fueron removidos anteriormente). Estos restos fueron removidos por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min. a 4 °C. Al sobrenadante se le adicionó polietilenglicol (PEG 6000) a una concentración final de 10% (10g por 100ml de sobrenadante), éste se

disolvió con agitador magnético a temperatura ambiente, se colocó en hielo por una hora para precipitar el fago, que se recobró por centrifugación a 6000 rpm por 10 min (4 °C). Se resuspendió el fago con 3ml de buffer lambda, se le agregó un volumen igual de cloroformo mezclándose en un vortex RX³ (VELP CIENTÍFICA) por 30 seg. y se centrifugó a 3000 rpm por 15 min a 4 °C para separar la fase orgánica de la fase acuosa (donde se encuentra el fago). La concentración del fago se calculó por la propagación del mismo en la bacteria huésped y se cuantificó por la formación de placas. El título típico del fago fue de 10¹² unidades formadoras de placas por ml (ufp/ml) para *Pseudomonas aeruginosa*. (Miles *et al.*, 1938, Ausubel *et al.*, 1991).

Vinos: Se utilizaron vinos tipo Sauvignon, dos chilenos: Santa Carolina y Gato Negro, y un venezolano, Altigracia. Se emplearon tres botellas (700 ml c/u), de cada vino, a las que se le eliminó el alcohol y el agua por evaporación a presión reducida (Büchi), a 45 °C obteniéndose el extracto crudo. Una vez pesado, cada extracto se trató en autoclave (121 °C, 15 min) y se diluyó hasta obtener una concentración final de 1mg/mL. Esta fue la solución a partir de la cual se prepararon las diferentes diluciones usadas en todos los ensayos.

Prueba antiviral: El sondeo de la actividad antiviral se realizó por cuadruplicado mediante el tratamiento del fago con cada extracto esterilizado. Después del período de contacto del fago con el extracto, se añadió la bacteria huésped a las microplacas con caldo TPB y se incubaron por 18 horas a 37 °C. Los cultivos fueron monitoreados espectrofotométricamente (Miles *et al.*, 1938; Ausubel *et al.*, 1991), y por el novedoso método 96WMA (Corao, 2001). Se colocaron 10 µl de bacteriófago (título de 10¹⁰ ufp/ml) con 150 µl de la solución final (sulfato ferroso y vino) y se dejó actuar sobre el fago por 3 minutos. Se tomaron 100 µl de la suspensión bacteriana y se mezclaron con la solución anterior, se dejó reposar por 10 minutos. Se sembraron 28 µl de esta mezcla en 200 µl de medio (TPB) en microplacas de 96 pozos y se incubó por 18 horas a 37°C. Se prepararon los siguientes controles: Control 1: Medio de cultivo, para verificar que el mismo no estuviera contaminado. Control 2: Extracto del vino + bacteria, para descartar actividad antibacteriana. Control 3: Bacteria en sus medios apropiados, para detectar que las bacterias estuvieran viables. Control 4: Bacteria + FeSO₄, para descartar actividad antibacteriana por el sulfato ferroso. Control 5: Bacteria + bacteriófago, para detectar si los bacteriófagos estaban activos. Control 6: Bacteria + bacteriófago + FeSO₄, para descartar actividad antiviral del sulfato ferroso *per se*. La lectura fue realizada en un lector de microplacas Elx 800 (BIO-TEK

INSTRUMENTS INC), a una longitud de onda de 600 nm.

Actividad potenciadora del sulfato ferroso: Esta prueba se efectuó a todos los extractos, añadiendo sulfato ferroso para investigar si la actividad antiviral era potenciada por el sulfato ferroso. La solución de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) preparada a una concentración de 4,8 mmol L^{-1} , fue esterilizada por filtración a través de Acrodiscos (Gelman Sciences) de 0,22 μm de poro, usada inmediatamente después de su preparación y protegida de la luz. Las muestras se prepararon al mezclar el extracto con el sulfato ferroso o agua en una proporción de 2,3:1 (extracto:sulfato ferroso o extracto:agua, según el caso).

Relativa afinidad de los polifenoles por el azul de metileno: Este método sirvió para conocer el contenido de polifenoles debido a su afinidad con el azul de metileno. La correlación se basa en el coeficiente 0,84 encontrado sobre un rango extenso de 84 polifenoles: fenoles, flavonoides y taninos hidrolizables (Okuda *et al.*, 1985). A una solución patrón (2.0 ml) se le adicionó la solución problema que contiene 2,0 ml al $7,0 \times 10^{-5}$ M de azul de metileno (Merck) en agua destilada y 1,0 ml de solución buffer de fosfato (Sigma pH 7). La mezcla se agitó vigorosamente por 30 min. Luego se centrifugó por 10 min a 3000 r.p.m. y se leyó en un espectrofotómetro 6300 (Jenway) a 660 nm. La relativa afinidad por el azul de metileno es una medida de la concentración del ácido tánico presente en la muestra problema y es directamente proporcional a la disminución de la absorbancia de la muestra en relación a la absorbancia de la solución patrón de azul de metileno.

Electroforesis en Geles de Poliacrilamida: La Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12% poliacrilamida) se realizó a 10 μl de los fagos purificados de *P. aeruginosa* tratados con los extractos crudos de los vinos, con o sin sulfato ferroso, siguiendo la metodología del manual de Laemmli (1970), en un equipo de electroforesis vertical modelo PS251-1 (TECHWARE) a 200 V, realizándose la corrida del gel durante 80 min. y reveladas con azul de Coomassie.

Prueba de toxicidad: Las células mononucleares humanas (CMSP) fueron obtenidas de sangre periférica, por venopunción, diluidas v/v con buffer fosfato salina (PBS) y colocadas lentamente sobre un medio de separación de linfocitos (ficoll-hypaque) (Milteniyi, *et al.*, 1990; Hansel, *et al.*, 1991), centrifugadas a 2000 rpm durante 30 min a 18 °C. Se extrajo la capa media de la separación resultante la cual contenía las CMSP. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y centrifugadas

(1300 rpm por 10 min a 18 °C). Después del último lavado se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 5% de suero bovino fetal y antibióticos. Se realizó el conteo celular usando un microscopio invertido. Las células fueron resuspendidas en medio hasta una concentración final de 2×10^6 cel/ml. 100 μl de esta suspensión celular fueron colocados en cada pozo de una placa de poliestireno de 96 pozos. Cada ensayo se realizó por duplicado. Se incubaron las células con los extractos a concentraciones de 5 y 2.5 μg /pozo con y sin la adición de sulfato ferroso, por 48 horas. Finalizado el período de incubación se determinó la viabilidad celular por el método de exclusión con el colorante trypan blue (Coligan, *et al.*, 1995) y se comparó con el grupo control o células incubadas sin el extracto.

Análisis estadístico: Los resultados de cada experimento, por duplicado o triplicado según el caso, se les determino el promedio y las desviaciones estándares.

RESULTADOS

Propiedades físicas: Al contenido de cada botella de vino se les midió el pH y el grado de alcohol (alcoholímetro) previo a su rotaevaporación y antes de realizarle las pruebas antibacterianas y antivirales (tabla 1).

Tabla 1. Valores de pH, grado de alcohol, concentración de polifenoles y absorbancia en los extractos

Vino	pH	Grado alcohólico	Concentración de polifenoles mg/ml	Absorbancia a 600 nm
Gato Negro	3,85	10°	1,6	0,174
Santa Carolina	3,71	11°	1,4	0,202
Altigracia	3,70	10,5°	1,1	0,262
Azul de metileno	NE	NE	NE	0,589
Ácido tánico	NE	NE	1,0	0,292

NE: No Ensayado

Prueba de la relativa afinidad de los polifenoles por el azul de metileno: Esta prueba es para conocer la concentración aproximada de polifenoles en los extractos, usando un patrón de azul de metileno y una muestra de ácido tánico de concentración conocida (1mg/ml) para compararlo con las absorbancias obtenidas con los extractos. La prueba se realizó por triplicado y los valores reportados son el producto de la media aritmética de los mismos. (Tabla 1). En la relativa afinidad de los polifenoles por el azul de metileno debe haber una disminución del 50% de la absorbancia de la muestra con respecto a la absorbancia del patrón. En la tabla 1 se observa que el extracto crudo de los vinos Gato Negro, Santa

Carolina y Altagracia, presentaron una disminución de la absorbancia de 29,5, 35 y 44% respectivamente en relación al patrón, indicando que hay una alta concentración de polifenoles, siendo los vinos chilenos los que poseen una concentración ligeramente mayor que el vino venezolano. Entre los vinos chilenos el que posee una mayor concentración de polifenoles es el Vino Gato Negro.

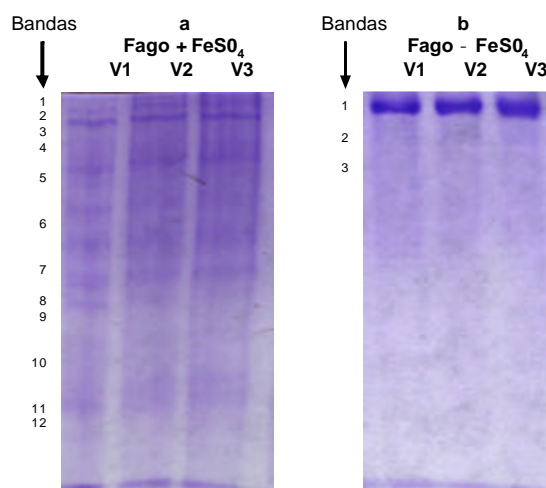
Prueba antiviral: Método de 96 WMA: Los resultados en absorbancia, de la prueba antiviral realizada en las microplacas de 96 pozos, se obtuvieron dos (2) lecturas, la primera lectura se realizó antes de incubar las microplacas; y la segunda, a las 18 horas de incubación a 37 °C. Al analizar los valores de absorbancia se encuentra que los valores del extracto del vino Gato Negro no presentan variaciones significativas entre las lecturas a tiempo inicial y final (0 y 18 horas) con o sin sulfato ferroso, sugiriendo una escasa actividad antiviral (Tabla 2). En el caso de los vinos Santa Carolina y Altagracia, las lecturas aumentaron considerablemente con o sin sulfato ferroso demostrando actividad antiviral, especialmente el vino Santa Carolina (Tabla 2).

Tabla 2. Absorbancia a 600 nm de los extractos de los vinos de las pruebas antivirales en microplatos de 96 pozos.

Extracto de vino	Absorbancia			
	Sin Sulfato ferroso		Con Sulfato ferroso	
	0 horas	18 horas	0 horas	18 horas
Gato Negro	2.851 (DE 0.159)	2.864 (DE 0.145)	2.999 (DE 0.129)	2.999 (DE 0.139)
Santa Carolina	1.214 (DE 0.148)	2.326 (DE 0.129)	2.334 (DE 0.150)	2.922 (DE 0.159)
Altagracia	2.252 (DE 0.209)	2.354 (DE 0.207)	2.567 (DE 0.207)	2.915 (DE 0.207)

DE = Desviación estándar

Electroforesis: Cuando el fago es tratado con el extracto de cada vino en ausencia de sulfato ferroso, los pozos muestran, una banda mayoritaria y dos pequeñas bandas, (Figura 1b) todas de elevado peso molecular (confirmado por su poca migración en el gel), mientras que cuando el sulfato ferroso esta presente, el fago es fraccionado en numerosas bandas (doce), de variado peso molecular (Figura 1a). El comportamiento de los tres vinos es similar.



Clave: Gato Negro (V1), Santa Carolina (V2) y Altagracia (V3), en presencia (a) o ausencia (b) de sulfato ferroso.

Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12% poliacrilamida, 200V, 100 mA, 80 min recorrido, 10 µL muestra por pozo), de los fagos de *P. aeruginosa* tratados con los extractos crudos de los vinos.

Estudio de citotoxicidad: El porcentaje de viabilidad celular de las células incubadas con los extractos con o sin sulfato ferroso fue superior a 76% para las concentraciones de 2.5 y 5 µg/pozo cuando se comparó con el control, siendo el vino venezolano el que mostró los valores más bajos (Figura 2). No hubo diferencias importantes en la toxicidad de los compuestos a las concentraciones usadas. La baja toxicidad de los extractos sobre las células mononucleares humanas, garantizan su uso en estudios en humanos sin riesgo tóxico.

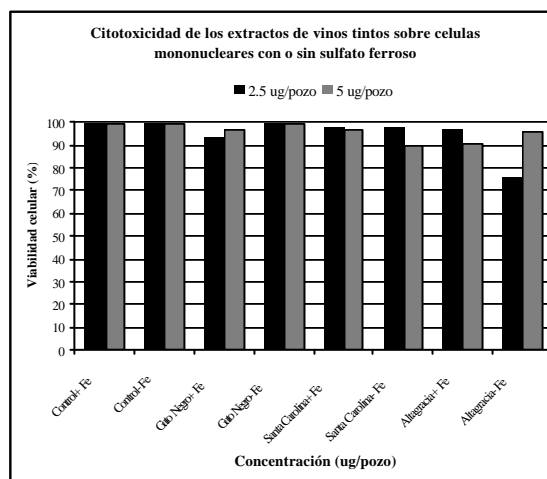


Figura 2. Porcentaje de viabilidad de células mononucleares humanas a dos concentraciones de los extractos acuosos de los vinos tintos Gato Negro, Santa Carolina y Altagracia en presencia o ausencia de soluciones de sulfato ferroso

DISCUSIÓN

Los vinos tintos tipo Cabernet Sauvignon que se usaron en el presente trabajo se escogieron por poseer la mayor cantidad de polifenoles (McDonald *et al.*, 1998), asumiendo que, al comparar los vinos chilenos con el venezolano, encontraríamos un mayor contenido de polifenoles en el venezolano, debido a la mayor cantidad de radiación solar (Lean *et al.*, 1998; McDonald *et al.*, 1998), propia de la región tropical y por lo tanto una mejor actividad antiviral, al actuar como barredores de radicales libres e impedir la oxidación (Brenes *et al.*, 1992), pero nos encontramos con el caso contrario.

Los extractos crudos de los vinos tintos tipo Sauvignon, exhibieron grados alcohólicos similares (promedio de 11° alcohólicos) y un pH ácido, siendo el Vino Altagracia el de mayor acidez (pH 3,70) y el Gato Negro el menos ácido (pH 3,85).

El extracto crudo del vino Gato Negro resultó con el mayor contenido de polifenoles, seguido por el Santa Carolina y de último el Altagracia. Pero cuando se realizó la prueba de actividad antiviral en microplacas, se encontró que en general los tres vinos fueron activos contra fagos de *P. aeruginosa*, y esta actividad no se potenciaba cuando el sulfato ferroso era añadido, indicando actividad antiviral de los extractos crudos *per se*, a pesar de que la literatura indica que los polifenoles poseen una poderosa protección anti-radical por su habilidad de eliminar la actividad de las especies del oxígeno y sus electrones, inhibir la nitrogenación y la formación de quelatos de los iones metálicos (Antolovich *et al.*; 2000, Pedersen y Duthie., 2000 y Langley-Evans, 2000), así como prevenir el daño oxidativo causado por los radicales libres y la formación de quelatos de hierro, uniéndose a los mismos y eliminándolos (Casalini *et al.*, 1999; Lodovici, 2001). Estos resultados sugieren que el extracto crudo de los vinos estudiados, posiblemente poseen suficientes metales, para actuar como quelantes. Igualmente, al buscar posibles daños en las proteínas del fago de *P. aeruginosa*, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se evidenció que cuando el fago era tratado con el extracto de cada vino en ausencia de sulfato ferroso, no se fragmentaron las proteínas, pero si en su presencia, contrastando los resultados de la electroforesis con los de la actividad antiviral en las microplacas donde hubo actividad antiviral en presencia o ausencia de sulfato ferroso, sugieren que la actividad antiviral no está relacionada con la fragmentación de las proteínas del fago.

CONCLUSIONES

Se concluye que el vino venezolano Altagracia tiene

menor concentración de polifenoles, pero esto no interfiere con sus propiedades antivirales. Cuando comparamos con los vinos chilenos, pareciera ser suficiente una concentración mayor de 0.5 mg/ml de polifenoles para presentar actividad antiviral y mayor de 1.1 mg/ml de polifenoles para provocar el fraccionamiento de proteínas del fago en presencia del sulfato ferroso, pero que esta fragmentación de proteínas no se relaciona directamente con la capacidad invasiva sobre las bacterias.

Así mismo, todos los extractos fueron inocuos para las células mononucleares humanas, a concentraciones de 5 y 2.5 µg/pozo mostrando una viabilidad superior a 76% en presencia o ausencia de la solución de sulfato ferroso, lo que es indicativo de una baja toxicidad.

REFERENCIAS

Abou- Agag, L., Aikens, M., Tabengwa, E., Benza, R., Shows, S., Grenett, H., Booyse, F. 2000. **Polyphenolic increase t-PA and u-PA gene Transcription in cultured human endothelial cells.** Alcohol Clinical Exp. Res. 25(2): 155-62.

Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D. 2000. **Sample separation in the determination of phenolic compounds in fruit.** The Analyst. 125: 989-1009.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G, Smith, J. A., y Struhl, K. 1991. **Growing Lambda-derived vectors. Current protocols in molecular biology.** Wiley Interscience, New York. P. 1121-1123.

Brenes, M., García, P., Dran, C. 1992. **Concentration of phenolic compounds change in storage brines of Ripe olives.** J. Food Science. 58;(2): 347-50.

Casalini, C., Lodovici, M., Briani, C., Paganelli, G., Remy, S. 1999. **Effects of complex polyphenols and tannins from red wine (WCPT) on chemical induced oxidative DNA damage in the rat.** Eur. J. Nutr. Aug; 38(4):190-95

Coligan, J., Kruisbeek, A., Margulie, D., Shevach, E., and Strober, W. 1995. **Current Protocols in Immunology.** Greene Publishing Associates, Inc. and John Willey & Sons, Inc. Vol. 3. P. A.3.3-A.3.4.

Corao, G. 2001. **Antiviral activity of ingredients in the fruit rind of Punica granatum L.** PhD Dissertation. School of Pharmacy and Biomolecular Sciences. University of Brighton. UK.

Corder, R. 1999. **Salud Cardiopatía.** www.alkimistas.com

Daroch, F., Hoeneisen, M., Gonzales, C., Kawaguchi, F., Salgado, F., Slar, H., Garcia, A., 2001. **In vitro antibacterial activity of Chilean red wines against Helicobacter pylori.** Microbios. 104(408):79-85.

Estudio MONICA o la relación entre antioxidantes y el riesgo de enfermedad coronaria. 1994. Antioxidantes

y calidad de vida. 0:15.

Fiessinger, L. 2001. **El Sommelier Responde todo sobre vinos**. Revista guía de vinos. www.vino.com

Graham, J. 1996. **Timely Test Spots TB "in hours"**. New Scientist. 151:21.

Hansel, T.T., De Vries, L.J., Iff, T. et al. 1991. **An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils**. J. Immunol. Methods. 145:105-110.

Harborne, J. B. 1980. **Phenolic Compounds**. B-online@botanik.uni-humburg.de.

Harborne, J. B. 1989. **Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plants analysis**. 3rd edn. Chapman & Hall, London.

Infante, R. 1997. **Polifenoles del vino y oxidabilidad de las lipoproteínas ¿Blanco o tinto?**. Clin. Invest. Aterioesclerosis. 9:19-22.

Komowalchuk, J., Speirs, J. 1976. **Virus inactivation by grapes and wine**. Appl. Environ Microbiol. 32 (6): 757-63.

Laemmli, U. K. 1970. **Polyacrylamide gel**. Nature, 227, 680.

Langley-Evans, S.C. 2000. **Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay**. Int J Food Sci Nutr. 51(3): 181-188.

Lean, M., Crozier, A., Mattheus, D. 1998. **El hallazgo de los escoceses**. Boletín Ciencia Vino y Salud. 2, (3):25-40.

Lodivici, M., Guglielmi, F., Casalini, C., Meoni, M., Cheyner, V., Dolara, P. 2001. **Antioxidant and radical scavenging properties in vitro of polyphenolic extracts from red wine**. Eur J Nutr. 40 (2): 74-7.

Marcano, D. 1991. **Fitoquímica orgánica**. Universidad Central de Venezuela Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. P. 118 - 125.

Maillard, J-Y., Beggs, T. S., Day, M. J., Hudson, R, A., y Russell, A. D. 1995. **The effect of biocides on the transduction of Pseudomonas aeruginosa PAO by F116 bacteriophage**. Letters in Applied Bacteriology. (21): 215-218.

Maillard, J-Y. 1996. Opinion. **Bacteriophages: A model system for human viruses**. Letters in Applied Bacteriology. (23): 273-274.

McDonald, M., Hughes, M., Burns, J., Lean, M., Crozier, A. 1998. **Survey of the free and Conjugated Myricetin and Quercetin content of red wines of different geographical origins**. J. Agric Food Chem. (46):368-375.

Miles, A.A., Misra, S. S. Irvin, J.O. 1938. **The estimation of the bactericidal power of the blood**. Journal of hygiene. (38): 732-749.

Milteniyi, S., Muller, W., Weichel, W. et al. 1990. **High gradient magnetic cell separation with MACS**. Cytometry. 11:231-238.

Morton, L., Abu-Amsha, R., Puddey, I., Croft K. (2000). **Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance of cardiovascular disease**. Clinical Exp. Pharmacol Physiol. 27(3):152-9.

Okuda, T., Mori, K., Hatano, T. 1985. **Correlation coefficient of phenols, flavonoids and hydrolysable tannins**. Chem. Pharm. Bull 32, 1424-1433.

Pedersen, C., Duthie, G. 2000. **Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of health female volunteers**. Eur. J. Clin. Nutr. 54 (5): 405-408.

Serdio, E. 2001. **La conexión tánica**. Enteresijos del vino. (2): 10-13

Serkedjieva, J., Manolova, N. 1992. **Antiviral Effects**. Plants Polyphenols. Ediciones plenum. London-England. Vol. 59. P. 450-460.

Stewart, G.S., Jassim, S.A, Denyer, S.P., Newby, P., Linley, K. and Dhir, V.K. 1998. **The specific and sensitive detection of bacterial pathogens within four hours using bacteriophage amplification**. J. Appl. Microbiol. 84:777-783.

Yhosida, T., Itho, H., Hataro, T., Kurata, M., Nakanishi, T., Inada, A., Murata, H., Inatomi, Y. 1996. **New hydrolysable tannins Shephagenins A and B from Shepherdia argentea as HIV-1 reverse transcriptase Inhibitors**. Chem. Pharm. Bull (Tokio). 44 (8): 1436-9.

Zambrano, J. 2001. **Vino y salud**. www.elbuencomer.com

PÁGINAS ELECTRONICAS:

(a) www.alkimistas.com

(b) www.vino.com

(c) B-online@botanik.uni-humburg.de.

(d) www.elbuencomer.com