



UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABI

FACULTAD CIENCIAS AGROPECUARIAS

**TESIS DE INVESTIGACIÓN COMO REQUISITO PREVIO PARA LA
OBTENCIÓN DEL TITULO DE**

INGENIERO AGROINDSUTRIAL

**“EFECTO INHIBITORIO DEL ÁCIDO GÁLICO EXTRAÍDO DE
LOS DESECHOS DE LA PRODUCCIÓN DE VINO Y NÉCTAR DE
UVA (*Vitis vinífera*) SOBRE EL *Staphylococcus aureus*”**

AUTORES

AGUILAR COVEÑA CRISTHIAN FERNANDO

REYES CEDEÑO NEY ALBERTO

TUTOR

ING. MIRABELLA LUCAS ORMAZA Mg.

MANTA- ECUADOR

2019

UNIVERSIDAD LAICA ELOY ALFARO DE MANABI
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

TESIS DE GRADO

“EFECTO INHIBITORIO DEL ÁCIDO GÁLICO EXTRAÍDO DE LOS DESECHOS DE LA PRODUCCIÓN DE VINO Y NÉCTAR DE UVA (*Vitis vinífera*) SOBRE EL *Staphylococcus aureus*”

Sometida a consideración del Honorable Tribunal Académico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias como requisito para obtener el título de

INGENIERO AGROINDUSTRIAL

Aprobado por el tribunal:

Ing. Ángel Prado Mg.

Ing. Sayonara Reyna Mg.

Ing. Ítalo Bello Mg.

CERTIFICACIÓN

Ing. Mirabella Lucas Ormaza. Mg. Docente de la facultad Ciencia Agropecuarias - Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí; certifico que los estudiantes egresados Aguilar Coveña Cristhian Fernando y Reyes Cedeño Ney Alberto realizaron bajo mi tutoría la tesis de grado intitulada: **“Efecto inhibitorio del ácido gálico extraído de los desechos de la producción de vino y néctar de uva (*Vitis vinífera*) sobre el *Staphylococcus aureus*”** la cual fue elaborada de forma sistémica, rigiéndose a las normas establecidas y cumpliendo las disposiciones establecidas para su efecto.

Ing. Mirabella Lucas Ormaza. Mg.

Director de tesis.

DECLARACION DE AUTORIA

La responsabilidad de la investigación, resultados y conclusiones de la tesis de grado titulada “**Efecto inhibitorio del ácido gálico extraído de los desechos de la producción de vino y néctar de uva (*Vitis vinífera*) sobre el *Staphylococcus aureus***” son exclusivamente de los autores.

Aguilar Coveña Cristhian Fernando

Reyes Cedeño Ney Alberto

AGRADECIMIENTO

Antes que nada agradezco a nuestro magnifico Creador Jehová Dios, el encargado de regalarnos la vida; él es digno de merecer la gloria, la honra y el poder, por ende merece nuestro más profundo respeto y amor por sobre todas las cosas. Mis más considerados agradecimientos a los tres pilares fundamentales de mi vida a mi mami (Yenny), papi (Wilter), hermana (Yennifer). Y no podrían faltar mis dos hermanos Alejandro y Javier. De cada uno de ellos eh aprendido algo. De mi querida y amorosa madre a ser luchador, oidor y aplicador de consejos y entrador en esta vida, es decir, no dejándome vencer por los obstáculos que se presenten en el camino. De mi papa aprendo la sabiduría y la precaución, siempre tomar decisiones sensatas que me conlleven al éxito. De mi querida hermana eh aprendido la bondad y la humildad, siempre ser autentico y original, dejando en cada una de las personas que me rodea una huella. En mi hermano Alejandro a la constancia y perseverancia en alcanzar mis sueños, tomando en cuenta que los sueños no se cumplen de la noche a la mañana. De mi ñaño Javier aprendo el ser ahorrativo y cuidar de mis ingresos, no malgastando dinero en cosas que con el pasar del tiempo dejara de ser útiles. Mi consideración y sincero afecto a la Ingeniera Mirabella Lucas Ormazza que sin los conocimientos teóricos y prácticos impartidos en mi recorrido como estudiante de la Uleam y en esta investigación no hubiera sido posible la finalización del mismo. Gracias por la paciencia, respeto y la amistad brindada a lo largo de toda esta jornada. Agradezco también al Ingeniero Hebert Vera, Ing. María Isabel Mantuano, Ing. José Luis Coloma, Ing. Ángel Prado, Ing. Sayonara Reyna, Ing. Cesar López (Encargado del Laboratorio de Análisis Físicos Químicos).... A todos ellos gracias por su metodología de impartir y enseñar dentro de las aulas de clases, yo sé que a veces nos recargaban con varias obligaciones, pero como estudiante estoy consciente que lo hacían para que estuviéramos preparados para la vida profesional. Gracias a mi Amiguita Manuelita y a Don Atilio. Gracias a mi hermoso y consentido hijo perruno Leito, siempre fiel y gentil acompañándome cuando me quedaba hasta tarde estudiando o haciendo deberes. A todos ellos muchas gracias.

Cristhian Aguilar Cobeña

AGRADECIMIENTO

Quiero expresar mi gratitud a Dios, quien con su bendición llena siempre mi vida y me brindo las fuerzas para continuar en este proceso de obtener uno de mis anhelos más deseados, a mis padres que han sabido darme su ejemplo de trabajo y honradez.

Mi profundo agradecimiento a la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, a los docentes de la carrera de ingeniería agroindustrial por haber compartido sus conocimientos a lo largo de la preparación de mi profesión.

Finalmente quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Ing.Mirabella lucas Ormaza.Mg, mi tutora de este proyecto quien con su dirección, conocimiento, enseñanza y colaboración permitió el desarrollo de este trabajo.

Ney Alberto Reyes Cedeño

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de investigación a mis queridos padres los cuales se han esforzado día a día para darme lo que necesito, ellos en ocasiones dejaban de complacerse para satisfacer mis deseos y necesidades. El haber sido criado en un hogar humilde me está enseñando hoy en día a tener buenas relaciones con las personas que me rodean. Nunca he sido alguien jactancioso que se deja llevar por lo que sabe o las aptitudes en las que resalta.

Sobre todo, dedico este trabajo a mi querida madrecita, siempre desviviéndose por nosotros sus hijos, me consta que es una excelente consejera y amiga;

Y bueno no podría faltar mí hermana que es como mi segunda hermana, nos llevamos tan bien porque somos casi idénticos.

A todos ellos dedico este Trabajo de Titulación.

Cristian Aguilar Cobeña

DEDICATORIA

El presente proyecto de tesis lo dedico principalmente a Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida.

A mis padres por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy, es un orgullo y privilegio ser su hijo.

A mis hermanos por estar siempre presentes acompañándome y brindándome apoyo moral a lo largo de esta etapa de mi vida.

A mi hija por ser mi más grande motivación para concluir con éxito este proyecto de tesis.

Ney Alberto Reyes Cedeño

Índice

I.- INTRODUCCION.....	1
1.1.- Vitis vinífera	3
1.1.1.- Taxonomía.....	3
1.2.- Composición de los residuos orgánicos del vino.....	3
1.2.1.- Compuestos fenólicos del vino	4
1.3.- Compuestos bioactivos en alimentos vegetales.....	6
1.3.1.- Ácido gálico	6
1.4.- Propiedades antimicrobianas de los compuestos fenólicos.....	7
1.5.- Staphylococcus aureus.....	8
1.6.- PROBLEMA	9
1.7.- JUSTIFICACIÓN	11
II.- HIPÓTESIS	12
III.- OBJETIVOS	13
3.1.-Objetivo general.....	13
3.2.-Objetivos específicos	13
IV.-METODOLOGÍA	14
4.1.-VARIABLES	14
4.1.1.-Variables independientes del Primer Diseño Experimental:	14
4.1.2.- Variables Dependientes del Primer Diseño Experimental:.....	15
4.1.3.-Variables independientes del segundo diseño experimental:.....	16
4.1.4.-Variable Deependiente del Segundo Diseño Experimental:	17
4.2.-MANEJO EXPERIMENTAL	17
4.2.1.- Obtención de las materias primas.....	17
4.2.2.- Extracción de compuestos fenólicos	18
4.2.3.- Cuantificación de compuestos fenólicos.....	18
4.2.4.- Aislamiento e identificación de Staphylococcus áureus.	19

4.2.5.- Evaluación de la actividad inhibidora del ácido gálico frente al <i>Staphylococcus aureus</i>	21
V.-RESULTADOS	23
5.1.- Resultados de compuestos fenólicos extraídos en las muestras de residuos de néctar y orujos del vino.....	23
5.2.- Resultados de diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de los residuos de néctar y orujos del vino sobre el <i>Staphylococcus áureos</i>	25
5.3.- Diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de los residuos de néctar sobre el <i>Staphylococcus áureos</i>	26
5.4.- Diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico orujos del vino sobre el <i>Staphylococcus áureos</i>	27
5.5.- Comparación del diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de orujos (vino) versus los residuos de néctar de uva sobre el <i>Staphylococcus áureos</i>	28
VI.- DISCUSION	30
VII.- CONCLUSIONES	33
VIII.- RECOMENDACIONES	34
IX.- BIBLIOGRAFÍA	35
ANEXOS	42

RESUMEN

Este proyecto de investigación se enfocó en la recuperación de las semillas y cascara de la uva en estado natural (proceso de néctar) y estado fermentado (orujos del vino) para la extracción de ácido gálico, con el objetivo de evaluar su efecto inhibitorio sobre el *S. aureus*. Se utilizó dos diseños experimentales, en el primer diseño se estableció las siguientes variables: el estado de las semillas de uva (natural y fermentado) y el método de extracción acuosa a 80°C, 90°C, 100°C durante una hora, para el segundo diseño se evaluó la mayor concentración por extracto y concentración del efecto mínimo inhibitorio. La cuantificación del compuesto fenólicos se realizó por medio del método Folin Ciocalteu, empleándose ácido gálico para la construcción de la curva de calibración. El que obtuvo contenido de compuestos fenólicos en el caso del néctar fue el tratamiento A₁B₁ y del orujo de vino fue el A₂B₃. En los resultados se observó que existe diferencia significativa entre tratamientos, esto dependió principalmente en la temperatura del solvente (agua), independientemente si fue residuo de néctar u orujo del vino. La inhibición en residuos de uva sobre *S. aureus* mostro que no existe diferencia significativa en concentraciones, mientras la inhibición para orujos del vino fue exactamente igual, a diferencia de la concentración que tuvo mayor efecto inhibitorio fue el tratamiento C₂D₁. Con los resultados que se obtuvo se pudo comprobar que el ácido gálico presente en las muestras de residuos de néctar y orujos de vino tiene poder inhibidor, y se recomienda la evaluación del compuesto extraído frente a otros patógenos es de interés en la Industria Alimenticia.

SUMMARY

This research project focused on the recovery of the seeds and husks of the grape in the natural state (nectar process) and fermented state (wine marc) for the extraction of gallic acid, with the aim of evaluating its inhibitory effect on the *S. aureus*. Two experimental designs were used, in the first design the following variables were established: the state of the grape seeds (natural and fermented) and the aqueous extraction method at 80oC, 90OC, 100OC for one hour, for the second design was evaluated the highest concentration by extract and concentration of the minimum inhibitory effect. The phenolic compound was quantified using the Folin Ciocalteu method, using gallic acid for the construction of the calibration curve. The one that obtained content of phenolic compounds in the case of nectar was the A1B1 treatment and the wine pomace was A2B3. In the results it was observed that there is a significant difference between treatments, this depended mainly on the temperature of the solvent (water), regardless of whether it was nectar residue or wine residue. The inhibition in residues of grapes on *S. aureus* showed that there is no significant difference in concentrations, while the inhibition for wine pomace was exactly the same, unlike the concentration that had the greatest inhibitory effect was the C2D1 treatment. With the results obtained it was possible to verify that the gallic acid present in the samples of nectar residues and wine pomace has inhibitory power, and it is recommended the evaluation of the extracted compound against other pathogens is of interest in the Food Industry

I.- INTRODUCCION

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU, señala que la conservación química, distingue conservantes naturales y conservantes artificiales, en los que se destacan tres grupos: agentes antimicrobianos (benzoatos, sorbitos, nitratos), antioxidantes (sulfito, la vitamina E, vitamina C) y los agentes quelantes (ácido cítrico, polifosfatos), algunos naturales y otros químicos, sin embargo muchos de los conservantes naturales son fabricados sintéticamente para abaratar costes (**Loring, 2017**).

Publicaciones como la de **Rodríguez (2003)** demuestran que actualmente la búsqueda de conservantes naturales ha llevado a buscar nuevas opciones como por el ejemplo el chile picante y el dulce, los cuales en la carne, tienen el efecto de prolongar significativamente la vida útil de la misma, coartando la oxidación, aumentando así su conservación.

Como lo manifiesta **Colivet (2006)**, otro aspecto interesante sobre los extractos naturales de frutas y hortalizas es el conocimiento de la medición de la actividad antimicrobiana de los mismos, lo cual actualmente se encuentra en auge, para ayudar a conservar los alimentos de una forma más natural. Este mismo autor afirmó que el ácido gálico y la catequina, presentaron actividad bactericida y antibacteriana sobre *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* en cultivo, y que el efecto sinérgico de los dos polifenoles es variable y está relacionado con los niveles de ácido gálico y catequina que se presenten.

Es así, que este efecto inhibitorio se mide comprobando la cantidad mínima del agente que se necesita para privar el desarrollo de un microorganismo control, valor que se conoce como concentración mínima inhibitoria (MIC) (**Madigan 2000**). Los compuestos fenólicos, tienen importantes características relacionadas con los alimentos, entre ellos: la uva y el vino; la importancia de estos compuestos se debe a la relación de la fruta y el producto antes mencionado con sus características sensoriales como el color, astringencia, amargor y aromas (**Monagas, et al. 2005**).

Así mismo, diversos estudios, señalan que los compuestos fenólicos ostentan un número extenso de beneficios para la salud, tales como: actividades antioxidantes, antialérgica, anticancerígena, antiinflamatoria y antimicrobiana esta última consiste en inhibir el crecimiento de algunas bacterias con incidencia sobre la salud, tales como *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* (**Díaz, 2012**).

1.-MARCO TEORICO

1.1.- Vitis vinífera

La vid o parra, cuyo nombre científico es *V vinifera*, es una planta semileñosa o trepadora que cuando se deja crecer libremente puede alcanzar más de 30 m, pero que, por la acción humana, podándola anualmente, queda reducida a un pequeño arbusto de 1 m. Su fruto, la uva, es comestible y materia prima para la fabricación de vino y otras bebidas alcohólicas. A veces se denomina a la vid con el nombre de parra, aunque en fruticultura se denomina parral o parra a un sistema de conducción de las plantas de vid en altura **(Coscarrelli, 2008)**.

1.1.1.- Taxonomía

Cuadro.1.- Taxonomía de especie Vitis Vinífera

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Vitales
Familia	Vitaceae
Genero	Vitis
Especie	<i>Vitis vinifera</i>

Fuente: Quintana, 2013, citado por Koehler, 2004

1.2.- Composición de los residuos orgánicos del vino

La producción de uva en el Ecuador, ocupa un área total donde se produce una cantidad pequeña, con apenas 300 hectáreas, la cual no logra abastecer un mercado que necesita aproximadamente entre 600 y 800 hectáreas, esto representa alrededor de 24 millones de kilos anuales. La mayoría de los residuos (orujos, lías, pieles, semillas, tallos) en el Ecuador genera la oportunidad de utilizarlos en distintas aplicaciones. En industria cosmética, farmacéutica, alimenticia **(Alvarado, 2015)**.

Castro (2014) comenta que los orujos del vino se producen durante el prensado de la uva, y está constituido por la piel y las semillas. El resto de residuos sin lías que se generan en el proceso de clarificación de la fermentación del vino; raspón, constituido por ramas y hojas de la vid, y los lodos del tratamiento de las aguas residuales.

Ruggieri (2009) mencionó que los residuos de vinificación son especialmente ricos en compuestos fenólicos entre los que se incluyen antocianos, flavonoles, ácidos hidroxicinámicos, y por tanto pueden ser utilizados como materia prima para la obtención de extractos que posteriormente pueden emplearse en la industria alimentaria como colorantes (rojo/purpura), antioxidantes naturales, conservantes o ingredientes funcionales.

1.2.1.- Compuestos fenólicos del vino

Las uvas son relativamente ricas en compuestos fenólicos con respecto a otros frutos comestibles. A medida que transcurre el tiempo y la tecnología mejora parece ser que la distribución de las distintas estructuras químicas presente en la uva depende de los genes de las distintas variedades, e contenido de los diferentes constituyentes fenólicos de la uva está condicionado por factores de orden agronómico (**Campos, 2002**).

Los compuestos fenólicos o polifenoles son constituyentes naturales de la uva y de los vinos. Con el nombre de polifenoles se agrupan numerosos compuestos con diferente estructura química: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, estilbenos, alcoholes, flavanoles, flavonoles, antocianos y taninos. Los polifenoles del vino también se asocian con los efectos fisiológicos beneficiosos derivados del consumo moderado de vino, además, la estructura de un compuesto fenólico determina su reactividad química y sus propiedades biológicas (**Almudena, et al. 2016**).

En la uva, los compuestos fenólicos son principalmente ácidos hidroxicinámicos, que se encuentran en las vacuolas de las células de la piel y de la pupa, bajo

forma de esteres tartáricos. En lo que se refiere a los ácidos benzoicos, la uva contiene principalmente ácido gálico, un compuesto fenólico con gran poder inhibidor sobre bacterias destructoras (**Venegas, 2012**).

Además, el estado de madurez de la uva va a condicionar la concentración de compuestos fenólicos que se extraiga del vino, dicha concentración suele aumentar durante toda la maduración, aunque no linealmente, así mismo, se ha constatado que dicha extracción no depende solo de la cantidad en la que estos se encuentren en la uva, más bien en la pared celular va a formar una barrera a la difusión de compuestos fenólicos (**Romero, 2008**).

A modo de resumen, en el (cuadro 2) **Villegas et al., 2015** recoge el rango de variación de las concentraciones de los principales compuestos fenólicos identificados en vinos tintos jóvenes. Por grupos de compuestos, los ácidos y derivados hidroxibenzoicos representarían el 6 % del total; los ácidos y derivados hidroxicinámicos, 1,1 %; los estilbenos, 0,5 %; los alcoholes, 3,8 %; los flavanoles, 15 %; los flavonoles, 3,6 %; y las antocianinas, 70 %. En proporción muy inferior se encuentran otros derivados antociánicos como los piranoantocianos.

Cuadro. 2.- Composición y rangos de contenido de compuestos fenólicos en vinos tintos jóvenes

Ácidos Hidroxibenzoicos		Flavonoles	
Ácido Gálico	10-37	(+)-Catequina	16-58
Ácido Protocatequico	1,2-4,7	(-)- Epicatequina	10-38
Ácido Siringico	4,2-5,8	Procianidinas B1, B2, B3, B4	14-33
Ácidos Hidroxicinámicos		Flavonoles	
Ácido Caftarico	0,7-46	Miricetin-3-glicosidos	1,6-22
Ácido Cutarico	0,7-11	Quercetin	1,3-34
Ácido Cafeico	0,3-33	Miricetina	1,7-8
Ácido p-cumarico	0,1-8	Quercetina	1,9-15
Estilbenos		Antocianinas	
Trans-resveratrol	0,4-2,5	Delfinidin	7-11
Trans-resveratrol-3-o-glucosido	0,1-3	Petunidin	14-25
Alcoholes		Malvidin	
Tirosol	7-26	Malvidin	23-108
Triptofol	Nd-4,5	Malvidin	3,5-5,6

Fuente: Villegas *et al.*, 2015

1.3.- Compuestos bioactivos en alimentos vegetales

En el reino vegetal podemos distinguir cuatro grandes grupos de compuestos fitoquímicos: sustancias fenólicas, sustancias terpenicas, sustancias azufradas y sustancias nitrogenadas (alcaloides). De estos cuatro grupos, son los tres primeros los que tienen mayor importancia como constituyentes de las frutas y hortalizas y los alimentos derivados con relevancia en la alimentación humana, y los polifenoles son los que se encuentran de forma general en todos los alimentos de origen vegetal. **(Barberán *et al.*, Acosta *et al.* 2016).**

Los polifenoles son un conjunto heterogéneo de moléculas con actividad antioxidante que incluye a los fenoles ácidos, la capacidad que tiene este antioxidante le confiere la actividad para prevenir falla cardiaca, aterosclerosis, enfermedad cardiovascular, entre otras. Además, a los polifenoles se les atribuye propiedades **(Barcia, 2011).**

Otro grupo interesante son los flavonoides que previenen la agregación plaquetaria e inducen a relajación muscular. Por ejemplo, la procianidina B1 y el resveratrol presentes en extractos de semillas de uva y en la uva respectivamente, pueden aumentar la capacidad cerebral **(Vicuña, 2011).**

1.3.1.- Ácido gálico

Según, **Gobea (2017)** los polifenoles se dividen en dos grandes grupos: taninos condensados y taninos hidrolizables. El ácido gálico es un polifenol, y pertenece precisamente al grupo de taninos hidrolizables. Esto quiere decir que es de fácil obtención porque es una molécula simple, es un anillo fenólico y gracias a la funcionalidad que tienen los grupos hidroxilos en su estructura, le confiere algunas características especiales.

El ácido gálico es un ácido orgánico que se encuentra en alimentos como los arándanos, manzanas, semillas de lino, hojas de té, corteza de roble, nueces, y berros. Entre sus propiedades físicas destaca que es un polvo orgánico blanco cristalino, soluble en agua, y tiene un punto de ebullición de 251°C. Mientras sus propiedades cosméticas se ha comprobado que es antifúngico, antiviral, astringente y antioxidante **(Roldan, 2017)**.

Es un antioxidante fenólico, y parece tener actividades antimicrobianas y anticancerígenas en estudios con animales. El ácido gálico es también parte de la estructura de otros, compuestos polifenólicos más grandes, las moléculas que comprenden múltiples grupos fenólicos. Común en las plantas, algunos tienen concentraciones particularmente grandes, incluidos los arándanos, corteza de roble, hojas de té, y uvas **(Contreras, 2016)**.

1.4.- Propiedades antimicrobianas de los compuestos fenólicos

Según **Palacios (2013)** el incremento de la resistencia de patógenos aislados de humanos y animales, en combinación con la creciente preocupación de los consumidores por la utilización de productos químicos como agentes conservantes, ha hecho que en los últimos años se evalúe el empleo de nuevos productos antimicrobianos eficientes sin efectos colaterales para la salud.

Recientemente **Gómez et al. (2013)** en investigaciones que han llevado a cabo se comprueba en medio de cultivo la actividad antimicrobiana de diferentes extractos fenólicos obtenidos a partir de productos enológicos como semillas de uva y vino blanco y tinto frente a bacterias patógenas. Se han descrito que los extractos con actividad antimicrobiana son más activos frente a bacterias que frente a levaduras, lo que sugiere una mayor resistencia de las levaduras a la acción de estos compuestos.

Para evaluar el efecto de un compuesto fenólico, es importante tener en cuenta la presencia de otros compuestos en el vino como el caso de proteínas, azúcares, y agentes oxidantes que pueden interactuar con el compuesto en

estudio, y por tanto, tener incidencia en su actividad. En cualquier caso, son necesarios estudios que tengan en cuenta todos estos factores **(Gálvez, 2013)**.

1.5.- Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus pertenece al género *Staphylococcus*, dentro de familia *Staphylococcaceae*, que incluye además otros cuatro géneros menos conocidos: *Jeotgalicoccus*, *Macrococcus*, *Nosocomiicoccus* y *Salinicoccus*. El género *Gemella*, que formaba parte de esta familia, se ha reclasificado en la familia *Bacillales XI* **(Becket et al., 2011; Euzéby et al. 2015)**.

S aureus es un microorganismo ubicuo, con predilección por la piel, glándulas cutáneas, y membranas mucosas de mamíferos. En el ser humano coloniza la piel y las mucosas de diferentes partes del cuerpo humano, el sitio de mayor colonización se encuentra en la parte anterior de las fosas nasales y de las axilas **(Mermel 2011)**.

El *S aureus* se encuentra habitualmente a nivel de la nasofaringe y de zonas húmedas como pliegues inguinales y axilas. Se estima que el índice de portación nasal en los adultos se encuentra aproximadamente del 20 a 30%. Expresado longitudinalmente, cerca del 30% de la población puede ser portador permanente, el 50% portador intermitente, y el 20% no es colonizado. **(Prieto et al. 2012)**.

En la población humana los más afectados son los que se encuentran laborando en centros de salud tratando pacientes diabéticos, en hemodiálisis, adictos a las drogas intravenosas. A pesar que el *S. Aureus* posee numerosos factores de virulencia, puede convivir sin ningún problema con la persona infectada sin causar algún tipo de daño. Sin embargo, este equilibrio se puede ver afectado ya que es posible que, desde las narinas, los portadores transfieran bacterias a diferentes sectores de la piel. **(Sabando, 2013)**.

1.6.- PROBLEMA

Las metodologías clásicas de conservación como son los tratamientos térmicos, están siendo complementadas con el empleo de antimicrobianos naturales que refuerzan la seguridad en los alimentos, prolongando su vida útil, debido a su efecto contra bacterias, hongos y virus, un ejemplo: expertos del Institute Food Technologist de EEUU (IFT), afirman que los frutos arándanos de manera natural tiene la capacidad de reducir en la carne el desarrollo de Salmonella, E.coli y otros tipos de bacterias **(Piki, 2006)**.

Por otro lado, la mayor amenaza para el consumidor procede del deterioro e inclusive lo toxico que puede llegar a ser un alimento, por acción nociva de microorganismos en su interior; la mayoría de estos organismos segregan toxinas peligrosas para la salud del mismo y que pueden llegar a ser mortales **(Méndez, 2018)**

Sin embargo, inconvenientes en efectos colaterales para el consumidor han hecho que las empresas agroalimentarias exceptúen el uso de ciertos conservantes ya que podrían ocasionar efectos negativos a la salud del consumidor, esto es un aspecto fundamental que debe ser tomado en cuenta ya que el empleo de estos pueden ocasionar un efecto nocivo en la digestión, alterando claramente, no solo la microbiota del intestino y el estómago, sino también la bucal, dificultando el proceso digestivo de las comidas y azúcares, debido a que algunos conservantes inhiben o destruyen las levaduras presentes en el organismo humano lo cual causa problemas en el colon y alergias en menores de edad **(Helena, 2015)**.

Día a día, se está aumentando el uso en la Unión Europea de antimicrobianos naturales que refuerzan la seguridad en los alimentos y prolongan la vida útil de estos frente a las bacterias, hongos y virus, existen plantas y frutas como el apio, la almendra, café y arándano, a los cuales se les atribuye ser antimicrobianos naturales que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos, también muchas hierbas y especias contienen aceites esenciales que son

antimicrobianos como: ajo, albacá, anís, canela, menta, mostaza, romero, otros, de origen vegetal contienen alto niveles de antibacterianos **(Rodríguez, 2011)**.

García (2012) Es así que actualmente se ha vuelto una problemática buscar nuevas alternativas para la conservación de alimentos, encontrando diversos estudios que han demostrado que polifenoles provenientes de alimentos como por el ajo, que tienen actividad anti-*Helicobacter pylori*. **Vattem (2013)**, utilizo extractos de té verde para medir el efecto antibacteriano en bajas dosis, y **Ghiselli (2011)** menciona que el ácido gálico (polifenol) se encuentra en el vino tinto en concentraciones cercanas a 320 mg por litros, lo que corresponde al compuesto flavonoide con mayor concentración en el mismo, sin embargo, el efecto antimicrobiano del ácido gálico ha sido poco estudiado.

Por otro lado, las bacterias estafilocócicas como el *S aureus* que son causantes de síntomas patogénicos se encuentran cada vez más presentes en nuestro medio; debido a una incorrecta manipulación de los alimentos ya sea de manera directa o indirecta, aproximadamente entre el 30% y 60% de los manipuladores de alimentos son portadores activos de esta bacteria, la misma que está sobreviviendo al tratamiento con antibióticos encontrando cepas de *S aureus* que son resistentes a la metilina, esto preocupa especialmente por el aumento de prevalencia en los enfermos graves hospitalizados **(Sánchez, 2014)**

En Latinoamérica y países como Ecuador, es de venta libre los antibióticos lo cual ha provocado un empleo desmedido para tratamiento de humanos y animales, representando un reto al momento de parar la formación de cepas bacterianas resistentes, un ejemplo de ello es el *S aureus*, un patógeno muy significativo a lo largo de la historia, por su amplia escala de infecciones, además se asegura que es responsable de gran parte de la morbimortalidad tanto a nivel hospitalario como comunitario **(Rivadeneira, 2014)**.

1.7.- JUSTIFICACIÓN

Basados en el problema, actualmente la población mundial demanda consumir alimentos saludables que contengan conservantes naturales y no artificiales debido a estos últimos que pueden ocasionar efectos adversos en el organismo; este hecho se vuelve una oportunidad para el aprovechamiento de residuos agroindustriales debido a que existen compuestos en las semillas, hojas y cascara de frutas y hortalizas las cuales contienen extractos a los que se les atribuye efecto inhibitorio frente a patógenos de interés para la salud **(Azua, 2006)**.

Es necesario mencionar que el procesado de la uva genera 20% de residuos sólidos, en concreto, según datos de la Organización Internacional del Vino (OIV), 100 kilos de uva generan unos 25 kilos de desechos, de los que el 50% son pieles de uva, el 25% tallos y el 25% restante semillas **(EcoNoticias, 2015)**

Además, como es de conocimiento el vino tinto es una bebida rica en polifenoles, compuestos biológicos con beneficios para la salud por contener propiedades antioxidantes, y el residuo que queda después de la fermentación del vino, denominado orujo o también conocido como borras, el cual consta de las semilla, tallos y pieles de la fruta, contiene altos niveles de polifenoles y podría ser de gran utilidad para las industrias farmacéutica, cosmética o alimentaria” **(LT10 2017)**

Por ello, se aprovechó las semillas y cascara de las uvas en estado natural (producto del residuo del néctar de uva) y en borras u orujos del vino (semillas y cascara de las uvas después de la fermentación primaria del vino) y se analizó el ácido gálico, además se valoró su efecto antimicrobiano frente al *Staphylococcus aureus* en ambos casos.

II.- HIPÓTESIS

Los residuos de la producción de vino y néctar de uva (*Vitis vinífera*), contiene el ácido gálico con efectos inhibitorios frente al *Staphylococcus aureus*, aislados de personas asintomáticas.

III.- OBJETIVOS

3.1.-Objetivo general

- Evaluar el efecto inhibitorio del ácido gálico extraído de los desechos de la producción de vino y néctar de uva (*Vitis vinífera*) sobre el *Staphylococcus aureus*.

3.2.-Objetivos específicos

- Comparar el contenido de compuestos fenólicos expresados en ácido gálico de los residuos de uva del proceso de obtención del néctar y orujos del vino.
- Valorar la actividad inhibitoria del compuesto fenólico (ácido gálico) obtenido de los extractos sobre el *Staphylococcus aureus*.
- Determinar el efecto mínimo inhibitorio del compuesto fenólico extraído de los desechos de la producción de néctar de uva y orujos del vino frente el *Staphylococcus aureus*.

IV.-METODOLOGÍA

La presente investigación se realizó en el laboratorio de análisis y talleres de procesos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí “ULEAM”, del Cantón Manta provincia de Manabí – Ecuador.

En esta investigación se empleó las borras u orujos (residuos de semillas y cáscara) procedentes de la fermentación primaria del proceso de elaboración de vino empleando uvas (*V vinífera*), y también en estado natural sin fermentar (residuos de semilla y cascara) procedentes de la elaboración de néctar; las cuales se seleccionaron escogiendo aquellas que no presentaron decoloración, daños por picaduras de insectos, mal olor ni degradación del tejido por factores mecánicos.

4.1.-VARIABLES

4.1.1.-Variables independientes del Primer Diseño Experimental:

A: Estado de las semillas de uvas

- A₁ – Residuos de la elaboración del néctar de uva.
- A₂ – Orujos de la elaboración de vino.

B: Método de extracción

- B₁ – Agua a 80°C por 1 hora
- B₂ – Agua a 90°C por 1 hora
- B₃ – Agua a 100°C por 1 hora

Tabla # 1: Tratamientos experimentales.

TRATAMIENTOS	CODIFICACIÓN	DESCRIPCION
1	A ₁ B ₁	Ácido Gálico extraído de los residuos de elaboración de néctar de uva con agua a 80°C por 1 horas.
2	A ₁ B ₂	Ácido Gálico extraído de los residuos de elaboración de néctar de uva con agua a 90°C por 1 horas.
3	A ₁ B ₃	Ácido Gálico extraído de los residuos de elaboración de néctar de uva con agua a 100°C por 1 horas.
4	A ₂ B ₁	Ácido Gálico extraído de los orujos de la elaboración de vino con agua a 80°C por 1 horas.
5	A ₂ B ₂	Ácido Gálico extraído de los orujos de la elaboración de vino con agua a 90°C por 1 horas.
6	A ₂ B ₃	Ácido Gálico extraído de los orujos de la elaboración de vino con agua a 100°C por 1 horas.
7	Testigo	Ácido Gálico en estado puro

Elaborado por: Aguilar, C; Reyes, N, 2019

Se planteó un diseño experimental completamente al azar 2x3 + 1 con 3 repeticiones para un total de 21 unidades experimentales. Los datos fueron tabulados con el programa Infostat empleando una Anova con probabilidad ($p < 0.05$), se encontró la diferenciación estadística empleando la prueba Tukey.

Tabla # 02: Esquema del análisis de varianza.

F. Variación	Formula	Total
Total		20
Factor A	(2-1)	6
Factor B	(3-1)	
Interacción A*B	(2-1)*(3-1)	
Testigo Vs Resto	1	
Repeticiones	(3-1)	2
Error Experimental		12

Elaborado por: Aguilar, C; Reyes, N, 2019

4.1.2.- VARIABLE DEPENDIENTE:

- Contenido de compuestos fenólicos expresados en ácido gálico.

4.1.3.-Variables independientes del segundo diseño experimental:

C: Mayor concentración por extracto

- C1: Néctar de Uva con mayor concentración de ácido gálico.
- C2: Orujo del Vino con mayor concentración de ácido gálico.

D: Concentración de efecto mínimo inhibitorio

- D1: 5 mg de Extracto
- D2: 3 mg de Extracto
- D3: 1 mg de Extracto

Tabla # 3: Tratamientos experimentales para el efecto mínimo inhibitorio

TRATAMIENTOS	CODIFICACIÓN	DESCRIPCION
1	C ₁ D ₁	Néctar de Uva con mayor concentración utilizando 5 mg de extracto
2	C ₁ D ₂	Néctar de Uva con mayor concentración utilizando 3 mg de extracto
3	C ₁ D ₃	Néctar de Uva con mayor concentración utilizando 1 mg de extracto
4	C ₂ D ₁	Orujos de Vino con mayor concentración utilizando 5 mg de extracto
5	C ₂ D ₂	Orujos de Vino con mayor concentración utilizando 5 mg de extracto
6	C ₂ D ₃	Orujos de Vino con mayor concentración utilizando 5 mg de extracto
7	Testigo	Ácido Gálico en estado puro

Fuente: Reyes, Ney; Aguilar, Cristian. 2018

Se planteó un diseño experimental completamente al azar 2x3 + 1 con 3 repeticiones para un total de 21 unidades experimentales. Los datos fueron tabulados con el programa Infostat empleando una Anova con probabilidad

($p < 0.05$), para encontrar la diferenciación estadística se empleará la prueba Tukey.

Tabla # 04: Esquema del análisis de varianza.

F. Variación	Formula	Total
Total		20
Factor A	(2-1)	6
Factor B	(3-1)	
Interacción A*B	(2-1)*(3-1)	
Testigo Vs Resto	1	
Repeticiones	(3-1)	2
Error Experimental		12

Elaborado por: Reyes, Ney; Aguilar, Cristian. 2018

4.1.4.-VARIABLE DEPENDIENTE:

- Efecto inhibitorio del extracto de compuesto fenólicos extraídos.

4.2.-MANEJO EXPERIMENTAL

4.2.1.- Obtención de las materias primas.

Para la extracción de los compuestos fenólicos se emplearon 5 libras de uva negra (*V. vinífera*) que fueron seleccionadas bajo parámetros de calidad separando aquellas con daños, de las uvas obtenidas se procedió a obtener el néctar y se recuperó las cascavas y semillas. Los orujos se obtuvieron de la fermentación primaria del Vino, que estaba siendo elaborado por los estudiantes del Sexto Semestre de la Carrera de Ingeniería Agroindustrial, en la materia de Frutas y Hortalizas.

Una vez obtenidas las materias primas fueron sometidas al proceso de extracción acuosa de compuestos fenólicos.

4.2.2.- Extracción de compuestos fenólicos.

Estos residuos de semillas y cascara, así como los orujos fueron sometidos a un proceso de extracción acuosa, con agua destilada empleando tres temperaturas: 80°C, 90°C y 100°C durante 1 hora, se empleó 100 ml de solvente por gramo de semilla utilizada, utilizando un tubo de ensayo de 15 ml basados en la investigación de **Paladino y Zuritz (2011)**

De los residuos recuperados (cascara y semilla) proveniente del néctar y orujos provenientes del vino, en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml se pesaron 10 g a los cuales se les agrego 100 ml de agua destilada esto se realizó por triplicado para llevar a temperaturas de 80°C, 90°C y 100°C, en el agitador magnético controlando la temperatura con un termómetro por un tiempo de una hora para cada una de las muestras.

Después cada una de las unidades experimentales, fueron colocadas en tres tubos de ensayo de 15 ml por cada muestra de orujo y cascara-semilla sometidas a cada temperatura, para ser centrifugadas a 2200 r.p.m por 20 minutos para luego recuperar el sobrenadante almacenándolo en botellas ámbar manteniéndolas en la oscuridad hasta realizar la cuantificación.

4.2.3.- Cuantificación de compuestos fenólicos.

La cuantificación se realizó de acuerdo al método presentado por **García et. al. (2015)**, del ETSIAMN, Universidad Politécnica de Valencia, en su documento titulado “Determinación de polifenoles totales por el método de Foin-Ciocalteu”, empleándose ácido gálico para construir la curva de calibración.

Para realizar la curva de calibración se realizaron disoluciones de ácido gálico de 0.0251 g/250 ml (disolución concentrada o madre), de esta disolución se prepararon disoluciones de concentraciones crecientes de ácido gálico entre 1 y 9 ppm.

Tabla # 05: Preparación de la curva patrón de ácido gálico a partir de una disolución concentrada de 0.0251 g/250 ml.

Reactivos	Concentración (mg/L) de la curva patrón de ácido gálico								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Acido gálico (ml)	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Agua (ml)	10	9	8	7	6	5	4	3	2

Elaborado por: Reyes, Ney; Aguilar, Cristian. 2018

Para la cuantificación de las unidades experimentales, se procedió a tomar 250 microlitros del sobrenadante obtenido del proceso de extracción de compuestos polifenólicos de los orujos y de los residuos del néctar, colocándose en matraces aforados de 25 ml. Luego con una pipeta de 10 ml se agregó 15 ml de agua destilada y 1,25 ml de Reactivo Folin Ciocalteu; se homogenizo el contenido de los matraces y se dejó reposar por 8 minutos, transcurrido este tiempo se añadió a cada uno de los matraces 3,75 ml de la disolución de carbonato sódico al 7,5% y se enraso de agua destilada a un volumen de 25 ml.

Las muestras se depositaron en un espacio oscuro durante 2 horas, para proceder a realizar la lectura de cuantificación de compuestos fenólicos en el Espectrofotómetro UV-VISIBLE, utilizando para ello cubetas de láminas de cuarzo de 3ml y se midió la absorbancia a 765 nm.

4.2.4.- Aislamiento e identificación de *Staphylococcus áureus*.

Para el aislamiento del *S áureus*, se obtuvo raspados cutáneos de la boca y fosas nasales de 10 individuos asintomáticos de entre 18 a 35 años, la incubación fue aerobia en medio Mannitol salt agar a 37°C por 48 horas, luego se realizó la tinción de gran para identificar la presencia de cocos gram positivos agrupados en racimos y las pruebas para su confirmación de coagulasa y catalasa (**Lazo de Jorgge y Soriano del Valle, 2016**).

El procedimiento se realizó preparando el agua de peptona pesando en la balanza analítica 3 g por litro de agua destilada, mezclándose correctamente,

esterilizándola en el autoclave a 121°C por 15 minutos. Posteriormente el agua de peptona ya esterilizada se colocó 10 ml en cada tubo de ensayos de 15 ml previamente esterilizados, y se tomaron las muestras de *Staphylococcus aureus* por triplicado de cada voluntario asintomático, efectuado raspados de boca, nariz y palma de las manos, para ello se utilizó un hisopo por cada muestra, depositando el hisopo en los tubos que se prepararon anteriormente.

Para la siembra se utilizó un medio de cultivo selectivo Agar Manitol Salt, disolviendo cuidadosamente 111 g por medio litro de agua de peptona, después se calentó a ebullición y esterilizo en la autoclave a 121°C durante 15 minutos, a continuación, se colocó en las respectivas cajas Petri 10 ml de medio, realizando la siembra con una micropipeta estéril 1000 micro litros de cada una de las muestras recolectadas por triplicado. Finalmente se dejó incubar la bacteria a una temperatura de 35 ± 2 °C durante 48 horas.

Para garantizar la presencia de *Staphylococcus áureos* en las siembras realizadas, se procedió a realizar las pruebas de tinción de gran y catalasa para confirmar la presencia del microorganismo, el cual debe responder a gran positivo y catalasa positiva.

- **Tinción de gram**

1. Se realizó la fijación del frotis, tomando una gota de agua destilada y colocándola en el portaobjeto, se esteriliza el asa de platino y se remueve un fragmento de la colonia de las cajas que mostraron presencia microbiana, se homogeniza la muestra y se la fija al calor de la flama evitando quemar la muestra.
2. Una vez que se ha fijado el frotis, se agregan dos gotas de cristal de violeta, se espera un minuto y se deja escurrir el exceso de colorante.
3. Se añade Lugol a la muestra el cual reaccionará con el primer colorante fijando de color las células y se flamea.
4. Se agrega el decolorante para lo cual se empleó una solución 1:1 de cetona y al alcohol añadiéndolo en el borde del portaobjeto manteniéndolo

inclinado para que fluya, cuando ya no fluye más color inmediatamente se lava la muestra con abundante agua destilada.

5. Se flamea la muestra y se agregan dos gotas de safranina, se escurre el exceso de colorante, se flamea una vez y luego se lava con agua destilada, se deja secar la muestra cerca al mechero **(Aquiahuati, 2004)**.

- **Prueba de catalasa**

1. Para esta prueba se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos de microscopio
2. Luego se toma con el aza de platino previamente estéril una porción de bacterias a prueba de la placa de agar manitol salt.
3. Agitar la colonia bacteriana en el peróxido de hidrógeno del portaobjeto y verificar la formación de burbujas **(Aquiahuati, 2004)**.

4.2.5.- Evaluación de la actividad inhibidora del ácido gálico frente al *Staphylococcus aureus*.

Para la determinación del halo de inhibición de crecimiento de *S aureus* se siguió la metodología propuesta por **Rodríguez et al. (2007)**, previo a la inoculación, se realizó tres pocillos de 3mm de diámetro en las placas de cultivo Agar Manitol Salt y por triplicado se colocó concentraciones seriadas y decrecientes del ácido gálico a 5mg, 3mg y 1mg en los pocillos; de cada uno de los extractos del orujo del vino obtenido a 100°C y de los residuos del néctar a 80°C que fueron los de mayor contenido fenólico de la extracción acuosa.

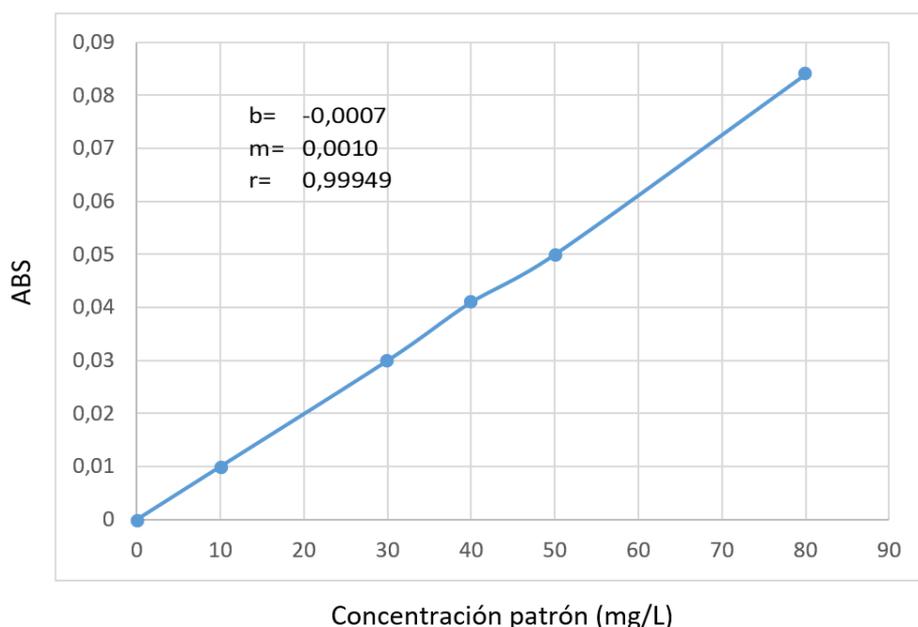
Las bacterias de *S áureus* fueron tomadas de las cajas petri que dieron positivo a la identificación del microorganismo para ello fueron suspendidas en 100 ml de suero fisiológico estéril 2.5×10^3 células viables de la bacteria., se agito en el vortex y se tomó una alícuota de 1000 micro litro de las bacterias suspendidas y se inocularon en las cajas Petri que se prepararon con los pocillos que contienen

el extracto fenólico de los orujos y residuos del néctar. Se incubaron las muestras a 37°C por 48 horas y se procedió a medir el halo de inhibición.

V.-RESULTADOS

Para evaluar el contenido de compuestos fenólicos de las muestras experimentales de residuos de néctar y orujos, primeramente, se preparó la curva patrón de ácido gálico a partir de una disolución concentrada de 0.0251 g/250 ml.

Gráfico # 01: Recta de calibración de la curva patrón



Elaborado por: Aguilar, C; Reyes, N, 2019

Una vez que se aplicó el análisis metodológico a las unidades experimentales propuestas, se obtuvieron los resultados del contenido de compuesto fenólico de las muestras de residuos de néctar y vino (orujos), los resultados fueron tabulados en el programa InfoStat y se describen a continuación.

5.1.- Resultados de compuestos fenólicos extraídos en las muestras de residuos de néctar y orujos del vino.

La extracción acuosa se realizó a temperaturas de 80°C, 90°C y 100°C, tal como se describió en la metodología, se procedió al respectivo análisis de absorbancia a 765 nm del compuesto fenólico, expresado en porcentaje de ácido gálico.

Como se observa en la (tabla 01) el coeficiente de variación fue de 6,44, los orujos del vino obtuvieron mayor absorbancia con el tratamiento A₂B₃ (Ácido Gálico extraído de los orujos de la elaboración de vino con agua a 100°C por 1 hora); y en los residuos de néctar de uva el tratamiento con mayor absorbancia fue el A₁B₁ (Ácido Gálico extraído de los residuos de elaboración de néctar de uva con agua a 80°C por 1 hora).

Tabla. 01.- Análisis de Varianza de la extracción acuosa de compuesto fenólico expresado en % Acido Gálico.

Variable	N	R	R (Aj)	CV	
mg (concentración) /100 ml	18	0,99	0,98	6,44	
F.V.	SC	gl.	CM	F	p-valor
Modelo	4,50E-03	7	6,40E-03	146,88	<0,0001
Tratamientos	4,50E-03	5	9,00E-04	205,27	<0,0001
Replicas	8,10E-06	2	4,10E-06	0,92	0,4283
Error	4,40E-05	10	4,40E-06	0,72	
Total	4,60E-03	17			

Elaborado por: Aguilar, C; Reyes, N, 2019

El análisis de Tukey (tabla 02) muestra que existe diferencia significativa entre tratamientos y no entre replicas (lo cual muestra que fueron realizadas de forma correcta las repeticiones), sobre todo el tratamiento A₂B₃ el cual es diferente del resto, la diferencia para la categorización está marcada por el 0,02%, todo esto con una p>0.05.

Como se observa en la (tabla 02) cabe destacar que la diferencia y similitud entre los tratamientos está marcada principalmente por la temperatura del solvente (agua) en el momento de la extracción independientemente si eran residuos de néctar o vino (orujos), mostrando que: son estadísticamente iguales los tratamientos A₂B₂ y A₁B₂, también comparten igualdad A₁B₁ y A₂B₁ que corresponden a la extracción de ácido gálico a 90°C y a 80°C respectivamente.

La tendencia anterior no se cumple en la extracción a 100°C; tal como se observa a la misma temperatura mencionada hay diferencia significativa entre los

residuos del néctar (A₁B₃) y los de orujo (A₂B₃), siendo los últimos los que obtuvieron mayor porcentaje de compuestos fenólicos.

Tabla. 02.- Prueba Tukey en tratamientos y replicas (0,05) del compuesto fenólico expresado en % Acido Gálico

Error: 0,0000		gl:	10	Alfa:	0.05	DMS:	0,00594
Tratamientos	Medias	n.	E.E.				
A2B3	0,06	3	1,2E-03	A			
A1B1	0,04	3	1,2E-03	B			
A2B1	0,04	3	1,2E-03	B			
A1B3	0,02	3	1,2E-03	C			
A2B2	0,02	3	1,2E-03	C			
A1B2	0,02	3	1,2E-03	C			

** Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

Error: 0,0000		gl:	10	ALFA:	0,05	DMS:	0,00332
Replicas	Medias	n	E.E.				
R3	0,03	6	8,60E-04	A			
R1	0,03	6	8,60E-04	A			
R2	0,03	6	8,60E-04	A			

** Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)*

Elaborado por: Aguilar, C; Reyes, N, 2019

5.2.- Resultados de diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de los residuos de néctar y orujos del vino sobre el *Staphylococcus aureus*

En el extracto fenólico del néctar se extrajo mayor contenido en el tratamiento A₁B₁, (Ácido Gálico extraído de los residuos de elaboración de néctar de uva con agua a 80°C por 1 hora), y en los residuos u orujos del vino fue el tratamiento A₂B₃ (Ácido Gálico extraído de los orujos de la elaboración de vino con agua a 100°C por 1 hora) es así que, según lo propuesto en el segundo diseño experimental, de estos dos tratamientos se realizó el estudio de inhibición del *S aureus* en concentraciones de 5, 3 y 1 mg del compuesto extraído a las diferentes temperaturas estudiadas.

Cabe destacar que en este diseño se empleó un testigo que corresponde a las mismas concentraciones estudiadas, pero con ácido gálico comercial en estado puro, además se tomó un blanco que corresponde al cultivo de *Staphylococcus aureus* sembrado en una caja con medio manitol Salt sin ningún inhibidor es decir no contenida ninguna concentración de los extractos ni del ácido gálico comercial.

Los halos de inhibición fueron observados a las 48 horas de sembradas las muestras, y se comparó su significancia estadística entre las concentraciones del compuesto extraídas del mismo residuo y entre ellas mismas.

5.3.- Diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de los residuos de néctar sobre el *Staphylococcus aureus*

Para el extracto fenólico obtenido de los residuos del néctar a 80°C se mostró que no hay diferencia significativa para el caso de las concentraciones de 5, 3 y 1 mg de residuos del néctar y tampoco para las réplicas mostrando la exactitud del proceso, el efecto inhibitorio se deja plasmado debido a que la muestra blanco presento número incontable de células viables y 0 mm de halo de inhibición cubriendo toda la superficie de la caja petri.

Tabla. 03.- Análisis de Varianza del diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de los residuos del néctar de uva.

Variable	N	R	R (Aj)	CV	
mm	9	0,48	0	58,22	
F.V.	SC	gl.	0,16	F	p-valor
Modelo	0,93	4	0,23	0,94	0,5246
Concentración	0,33	2	0,16	0,66	0,5642
Replicas	0,6	2	0,3	1,21	0,3881
Error	0,99	4	0,25		
Total	1,92	8			

Elaborado por: Aguilar, C; Reyes, N, 2019

Sin embargo, numéricamente se puede observar que el tratamiento C₁D₂ (concentración de 3 mg) tiene mayor halo de inhibición con un diámetro de 1.10

mm, los promedios de diferencia de milímetros en los halos de inhibición entre las concentraciones fueron de 0.23 aproximadamente, tal como se observa en el test de tukey $p > 0.05$ mostrado en la tabla 04.

Tabla. 04.- Tukey (0.05) del diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de los residuos del néctar de uva.

ALFA: 0,05		DMS:1,44959		
Error: 0,2481		gl:4		
Concentración	Medias	n	E.E.	
C ₁ D ₂	1,1	3	0,29	A
C ₁ D ₁	0,83	3	0,29	A
C ₁ D ₃	0,63	3	0,29	A

Elaborado por: Aguilar, C; Reyes, N, 2019

5.4.- Diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico orujos del vino sobre el *Staphylococcus aureus*

En el caso de los compuestos fenólicos de orujos del vino tampoco hubo diferencias significativas, mostrando que el efecto inhibitorio fue igual en todas las concentraciones estudiadas, comparando con la muestra blanco se puede expresar que si existe efecto inhibitorio debido al número incontable de células que cubrieron toda la superficie de la caja petri.

Tabla. 05.- Análisis de Varianza del diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de los orujos del vino.

Variable	N	R	R (Aj)	CV	
mm	9	0,74	0,48	25,94	
F.V.	SC	gl.	CM	F	p-valor
Modelo	0,6	4	0,15	2,85	0,1675
Concentración	0,51	2	0,26	4,85	0,0852
Replicas	0,09	2	0,04	0,85	0,499
Error	0,21	4	0,05		
Total	0,81	8			

Elaborado por: Aguilar, C; Reyes, N, 2019

En diferenciación al caso de las unidades experimentales de los compuestos fenólicos del extracto de residuos del néctar, como se observa en la (tabla 06) la

concentración que tuvo mayor efecto inhibitorio, en el caso de los orujos del vino fue el tratamiento C₂D₁ el cual corresponde a la concentración de 5 mg, con un halo de 1.22 mm, en este caso se deja de manifiesto que los tratamientos C₂D₃ y C₂D₂ son iguales numéricamente y que el tratamiento con mayor halo de inhibición los supera con 0.50 mm.

Tabla. 06.- Tukey (0.05) del diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de los de los orujos del vino.

ALFA:0,05		DMS:0,66813		
Error: 0,0527		gl:4		
Concentración	Medias	n	E.E.	
C ₂ D ₁	1,22	3	0,13	A
C ₂ D ₃	0,72	3	0,13	A
C ₂ D ₂	0,71	3	0,13	A

Elaborado por: Aguilar, C; Reyes, N, 2019

5.5.- Comparación del diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de orujos (vino) versus los residuos de néctar de uva sobre el Staphylococcus áureus

Tabulando los datos en conjunto, se puede observar que tampoco se encuentran diferencia significativa de halos de mayor inhibición de los tratamientos como fueron C₁D₂ y C₂D₁, obtuvieron un diámetro de 1.10 y 1.22 mm respectivamente, mostrando que inclusive matemáticamente la diferencia es mínima, esto se demuestra con el análisis de varianza mostrados en las tabla 04 y 06 respectivamente.

Se realizó un análisis comparativo de las concentraciones aplicadas de los dos compuestos fenólicos con mayor extracción del mismo, observando que a más de la no diferencia entre muestras de orujo y residuos de néctar, tampoco se encontró diferencia significativa en las dosis, mostrando como media de inhibición un halo promedio de 1.03 mm, tal como se indica en la (tabla 08).

Tabla. 07.- Análisis de Varianza del diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de orujos (vino) versus residuos del néctar de uva.

Variable	N	R	R (Aj)	CV	
mm	18	0,23	0	48,1	
F.V.	SC	gl.	CM	F	p-valor
Modelo	0,63	5	0,13	0,72	0,6182
Producto	4,00E-03	1	4,00E-03	0,02	8,83E-01
Concentración	0,38	2	0,19	1,08	0,3703
Replicas	0,25	2	0,13	0,72	0,5071
Error	2,1	12	0,18		
Total	2,74	17			

Elaborado por: Aguilar, C; Reyes, N, 2019

Cabe mencionar que esta comparación de Tukey (0.05), agrupa las concentraciones promediándolas en base al número de mm de halo inhibitorio mostrando que existe inhibición a pesar de no haber diferencias significativas entre ellas. Otro punto a tener en consideración es el hecho que se mencionó del blanco y testigo, mostrando que el blanco tuvo crecimiento total (incontable) del microorganismo y el testigo tuvo ausencia completa del mismo, mientras que las muestras evaluadas mostraron los resultados ya estudiados en las tablas, esto nos da fiabilidad en los mismos, demostrando que las células extraídas de portadores asintomáticos si fueron activadas adecuadamente.

Tabla. 08.- Prueba Tukey en tratamientos y concentraciones (0,05) del diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de orujos (vino) versus residuos del néctar de uva.

Error:	0,1752	gl:	12	
Producto	Medias	n	E.E.	
Orujos	0,89	9	0,14	A
Néctar	0,86	9	0,14	A
Error:	0,1752	gl:	12	
Concentración	Medias	n	E.E.	
(1 mg)	1,03	6	0,17	A
(3 mg)	0,91	6	0,17	A
(5 mg)	0,68	6	0,17	A

Elaborado por: Aguilar, C; Reyes, N, 2019

VI.- DISCUSION

En la investigación de **Muñoz, W; et al (2015)** se determinó el contenido de compuestos fenólicos en extractos obtenidos a partir de extracción sólido-líquido de pulpa liofilizada de champa (***Campomanesia Lineatifolia***), empleando como disolventes agua, etanol, mezcla de etanol y agua (7:3), a tres intervalos de temperatura (20,50,70°C). En nuestra investigación se utilizó agua destilada en tres temperaturas 80, 90 y 100°C respectivamente para la extracción de ácido gálico contenido en residuos de néctar de uva (cascaras y semillas) y vino.

La extracción que realizaron fue por medio del método sólido-líquido (lixiviación) a temperaturas de 20, 50 y 70 °C, empleando tres clases de disolventes agua destilada, mezcla etanol/agua (70:30) y mezcla etanol/agua (96:4), con un lapso de extracción de 4 h y una relación soluto: disolvente de 1:10. Para los ensayos se empleó etanol al 96%. En la investigación nuestra se procedió a realizar la extracción por medio acuoso empleando el agua durante una hora.

En lo que respecta a la eficiencia de las temperaturas, **Muñoz, W; et al; (2015)** manifiesta que la mayor cantidad extraída de compuestos fenólicos expresados en µg de ácido gálico/g fue a 70°C. El etanol fue el disolvente que presentó concentraciones más bajas en cuanto a compuestos fenólicos, seguido por el agua, el mejor disolvente que presentó mejores resultados obtenidos por la mezcla de etanol con agua (70:30) para la temperatura de extracción de 70°C ya mencionado antes, resultados que coinciden con nuestra investigación en donde la mayor extracción de ácido gálico en orujos del vino fue a 100°C, es decir, la mayor temperatura, sin embargo en el caso de residuos de néctar de uva fue a 80°C.

En cuanto a la temperatura que manifestó la menor extracción de ácido gálico de pulpa liofilizada de champa (*C lineatifolia*) fue a 20°C. En nuestra investigación, los resultados obtenidos manifestaron una mayor extracción de ácido gálico a la menor temperatura (80°C) en el caso del néctar, sin embargo como ya se mencionó a diferencia de los orujos dieron a la mayor temperatura (100°C) ; dichos resultados se atribuyen a que los compuestos fenólicos

presentes en el néctar de uva se hallan intactos, debido a que se encuentran en estado natural, caso diferente a los antioxidantes presentes en el orujo que manifiestan estado fermentado (**Muñoz, W; et al; 2015**).

En la investigación de **Thimothe, et. al, (2007)** midieron el efecto antibacteriano de *Staphylococcus Aureus* y resulto que todos los extractos fenólicos inhibieron notablemente las glucosiltransferasas B y C (70-85%) en concentraciones tan bajas de 62,5 µg / mL, donde la actividad biológica del orujo fermentado fue tan eficaz que los extractos de uva de fruta entera. En nuestra investigación una vez que se obtuvo la mayor concentración de ácido gálico, tanto en residuos del néctar (tratamiento A₁B₁) y orujos (tratamiento A₂B₃), se realizó lo propuesto en el segundo diseño experimental, en ambos tratamientos se midió la inhibición de *S aureus* en concentraciones mínimas de 5, 3 y 1 mg del compuesto extraído a las diferentes tres temperaturas, y dichos resultados manifestaron que no hubo diferencia significativa en ninguno de los dos casos en concentraciones de 5, 3 y 1 mg, sin embargo queda plasmado el poder inhibidor, debido a que la muestra blanco presento incontables células viables en la caja y 0 mm en halos de inhibición.

De igual manera en el trabajo de titulación de **Alarcón, J., (2018)** el efecto antimicrobiano in vitro del Extracto de *Vitis Vinífera* (Uva) sobre el *S mutans*, fue efectivo con una única concentración del 100% de extracto de *Vitis Vinífera* que presenta una leve acción inhibitoria sobre dicha bacteria al presentar un halo de inhibición de 4,35 mm; en nuestros resultados numéricamente el tratamiento C₁D₂ (concentración de 3mg) tiene mayor halo de inhibición con un diámetro de 1.10mm, que es el promedio de las diferencias de milímetros en los halos inhibidores esto en el caso de residuos de néctar de uva; en lo que respecta a los orujos del vino el mejor tratamiento inhibidor fue el C₂D₁ (concentración de 5mg) con un halo de 1.22mm.

Los resultados obtenidos con la concentración de compuesto fenólico expresado en ácido gálico, varían con la adicción de semillas como lo señala **Gutiérrez, (2017)**, lo cual aumenta la capacidad antioxidante de los vinos y del néctar de uva. Además, dentro de su investigación utilizo concentraciones de 10%,25%,

50% y encontró que no hay diferencias significativas por ensayo. Los resultados de nuestra investigación muestran que existe diferencia significativa entre tratamientos y no entre replicas lo que demuestra que fueron realizadas exitosamente las repeticiones.

VII.- CONCLUSIONES

- Hubo diferencias entre el contenido de compuestos fenólicos entre las muestras de orujos provenientes del vino y los residuos del néctar de uva, las cuales estuvieron en función a la temperatura de extracción, se demostró que a la temperatura mínima estudiada 80°C se obtuvo el mayor contenido de compuestos fenólicos para ambas muestras, mientras que a temperaturas de 90 y 100°C el contenido fenólico extraído fue igual para todos los casos, a excepción de las muestras de orujo que no cumplieron con el patrón mostrado y obtuvieron a 100 °C mayor contenido fenólicos.
- Existe actividad inhibitoria de los compuestos fenólicos en todas las muestras estudiadas, comparándose frente al blanco y al testigo, demostrándose que el ácido gálico comercial tiene gran capacidad de inhibición, mientras que las unidades experimentales mostraron un efecto inhibitorio de 10% en relación con el testigo.
- El efecto mínimo inhibitorio de las concentraciones estudiadas de compuestos fenólicos de residuos del néctar y orujos de vino se dio a 3 y 1 mm respectivamente, lo cual deja de manifiesto que los compuestos fenólicos extraídos de los residuos del néctar se encuentran intactos, mientras que en los orujos la mayor composición de antioxidantes queda en el vino, dejando a estos con contenido fenólicos, pero de menos actividad frente al *Staphylococcus áureos*.
- El aprovechamiento de los residuos generados en el área Alimenticia es una fuente de ingreso ya que se puede dar valor agregado a los mismos, además abriéndose campo en áreas de cosmética, farmacéutica, naturista; debido al contenido de compuestos fenólicos que se pueden encontrar en dichos residuos que pueden prevenir una enfermedad, transmisión de algún agente indeseable y nocivo (bacteria) que ingrese a nuestro metabolismo.

VIII.- RECOMENDACIONES

- Se recomienda aumentar el volumen de relación de extracción soluto/solvente para verificar si existe aumento de contenido fenólico, ya que en nuestra investigación utilizamos 100 ml de solvente por 10 gramos de semilla utilizada.
- Seguir investigando y evaluando el efecto de los compuestos fenólicos extraídos de frutas (arándanos, manzanas, otros) y hortalizas frente a otros patógenos de interés para la industria de alimentos, como el caso de *Helicobacter Pylori*
- Estudiar la actividad antioxidante, antitumoral, anticancerígena del ácido gálico para comparar dicha actividad con el efecto inhibitorio demostrado en la investigación.

IX.- BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, Y. (2016). Clasificación de grupos de Compuestos Fenólicos presentes en Frutas. Cultivos en Latinoamérica. Prensa. Santiago, Chile.
2. Alarcón, J. (2018). Efecto Antimicrobiano In Vitro del Extracto de Vitis Vinifera (uva) sobre Staphylococcus Mutans. Requisito para título de Odontólogo. Universidad Central del Ecuador. Quito. Ecuador.
3. Almudena, R; Briones, E; Luzardo, Y. (2016). Clasificación de compuestos fenólicos. Estaciona Verde. Vol. 5. Pág. 12
4. Alvarado, Y. (2015). Cultivos de uva para la Producción de Vino en el Ecuador. Generación de residuos agroindustriales con valor antioxidante. Universidad de las Américas. Ecuador.
5. Álvarez, MJ; Garma, P; Maldonado, Velásquez, M; Aguirre, F; Pantoja, F; Núñez, Y. (2018). Contenido de Polifenoles y actividad antioxidante de la Uva de Mar (Coccoloba Uvifera). Universidad Autónoma de Campeche. México.
6. Azua, L. (2006). Valor agregado a producción de cultivos de uva. La uva y su reutilización para generar empleo. Departamento de Investigación y .Desarrollo., Argentina.
7. Barberan, L (2016). Clasificación de Sustancias Bioactivas en el reino Vegetal. Ecología, Ecosistema y más. Pág. 25, Venezuela
8. Barcia, A (2011). Los polifenoles naturales alternativas para evitar uso de conservantes químicos. Polifenoles como conservantes. Bolivia, La Paz, vol. 5. Numero 2: pág. 34 -36.
9. Becket, U (2013). Sustancias Antioxidantes en cascaras de uva. Composición de polifenoles. Uruguay (Montevideo).

10. Campos, T (2002). Las uvas un fruto con ricas propiedades medicinales. Mi mundo Ecológico. Edición Norma, Guayaquil (Ecuador).
11. Castro, V (2014). Orujos del vino con efecto inhibidor sobre bacterias patógenas. Efecto de Compuestos Fenólicos en el vino, La Paz, Bolivia.
12. Colivet, J; Belloso, G; Hurtado, E. 2006. Comparación del efecto inhibidor de extractos de ají dulce (*capsicum chinense*) sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus sp.* Saber. Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente Venezuela. Vol. 18. Nº 2: 168-173 p. ISSN 1315-0162.
13. Contreras, H (2016). Ácido gálico con poder inhibidor. Compuesto Fenólico. Central Unión (Venezuela).
14. Coscarelli, T (2008). *Vitis Vinifera*. Propiedades de la planta *Vitis Vinifera*. p. 8987–9003.
15. Díaz, R. 2012. Efecto antibacteriano del ácido gálico y de la catequina sobre *helicobacter pylori* y *escherichia coli*. Grado de Ingeniero Agrónomo. Santiago de Chile. Universidad de Chile. 29 p.
16. EcoNoticias. 2015. Residuos de la elaboración del vino para desarrollar productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos, Econoticias.com. El periódico verde. 29/06/2015. <https://www.ecoticias.com/residuos-reciclaje/104842/Residuos-elaboracion-desarrollar-productos-alimenticios-cosmeticos-farmaceuticos>.
17. Euzeby (2015). Berry phenolics and their Antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. Vol. 49, 4076-4082.
18. Gálvez, J. (2013). El orujo de uva como fuente sostenible de Compuestos bioactivos: extracción, caracterización y aplicaciones biotecnológicas de fenólicos. p. 8987–9003.

19. García, E; Fernández, I; Fuentes, A. 2015. Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. Boletín ETSIAMN. Universitat Politècnica de València. Departamento de Tecnología de Alimentos. España. 6 – 9 p.
20. García, H. 2012. Activities of garlic oil, garlic powder, and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. Applied and Environmental Microbiology 66 (5): 2269-2273 pág.
21. Ghiselli, Y. 2011. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology 88: 308–316 pág.
22. Gómez, G. (2013). Grape seed phenolics: extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. Am. J. Enol. Vitic. Vol. 37, N° 1, 7-12.
23. Govea, M. 19 de Enero de 2017. Las asombrosas propiedades biológicas del ácido gálico. UNION. La Paz. Bolivia.
24. Gutiérrez, A. (2017). Determinación de la Capacidad Antioxidante de Vinos tintos. Efecto de la maceración con subproductos en la Industria Enológica. Universidad de Sevilla. España.
25. Helena, L. 2015. Los conservantes y sus efectos nocivos para la salud. Come bien. Publicado el 16 de febrero del 2015. Consultado el 15 de octubre del 2018. <https://comebien.co/los-conservantes-y-sus-efectos-nocivos-para-la-salud/>
26. Lazo de Jorgge, G; Soriano del Valle, G. 2016. Patrones de resistencia antimicrobiana de staphylococcus, aislados en perros Guayaquil, Ecuador 2015. Revista el misionero del Agro. V. 3 ed. 11. 52 p.

27. Loring, C. 2017. Conservantes Alimentarios. Todo lo que debes saber sobre los Conservantes Alimentarios. La Vanguardia. Portal de Nutrición. Barcelona. España.
28. LT10 (radio de la Universidad Nacional del Litoral). 2017. Buscan reutilizar desechos del vino para hacer antioxidantes. LT10. Santa. Fe Argentina. 25/07/2017. <http://www.lt10.com.ar/noticia/196092--buscan-reutilizar-desechos-del-vino-para-hacer-antioxidantes>.
29. Madigan, M. 2000. Biología de los microorganismos. Prentice hall. Madrid, España. 1064 p.
30. Méndez Pérez, C. 2018. Toxinas microbianas: aspectos generales y uso potencial como agentes antitumorales. Tesis de grado en biología. San Cristóbal de la Laguna. España. Facultad de ciencias Universidad de la Laguna. 09 p.
31. Mermel, R. 2011. Antimicrobial resistance in Staphylococcus. Infectious Diseases of North America. Vol.11. (4). Pag 813-841.
32. Monagas, U. (2005). Copia and Marina Heinonen. Berry phenolics and their Antioxidant activity. J. Agric. Food Chem. Vol. 49, 4076-4082.
33. Muñoz, W; Chávez, WR.; Pabón, R; Rendón, MR.; Rendón, MP.; Ojalvo, AM.; (2015). Extracción de Polifenoles. Extracción de compuestos fenólicos con actividad antioxidante a partir de Champa (*Campomanesia lineatifolia*). Revista CENIC (Ciencias Químicas). Ingenieros Químicos. La Habana (Cuba). P. 38 – 46.
34. Oszmianski, J.; Romeyer, F.; Sapis, J.; Macheix, J. 1986. Grape seed phenolics: extraction as affected by some conditions occurring during wine processing. Am. J. Enol. Vitic. Vol. 37, N° 1, 7-12.

35. Palacios, T. 2016. Compuestos Fenólicos. Propiedades en el mundo de los compuestos fenólicos. Renaciente. Caracas. Venezuela.
36. Paladino, S; Zuritz, C. 2011. Extracto de semillas de vid (*Vitis vinifera* L.) con actividad antioxidante: eficiencia de diferentes solventes en el proceso de extracción Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias ISSN: 0370-4661, vol. 43, núm. 1, 2011, 187-199 pp.
37. Piki, Mercedes. 2006. Los antimicrobianos naturales refuerzan la seguridad en los alimentos. Directo al paladar. Publicado el 28 de octubre del 2006. Consultado 30 de septiembre del 2018. <https://www.directoalpaladar.com/salud/los-antimicrobianos-naturales-refuerzan-la-seguridad-en-los-alimentos>.
38. Prieto, R; Mandel, D. 2012. Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. Clin. Microbiol. Rev. Vol.10. (4). Pag.781-791.
39. Quintana, L. 2013. Köhler's Medizinal-Pflanzen. Franz Eugen Köhler. Alemania. 22p.
40. Rivadeneira, S. 2014. Prevalencia de staphylococcus aureus resistente la meticilina, aislados en trabajadores de granjas porcinas de la provincia de pichincha. Tesis de médico Cirujano General. Quito. Ecuador. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. 3 – 4 p.
41. Rodríguez M., M. Alberto, M. Manca de Nadra. 2007. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. Food Control 18: 93-101
42. Rodríguez, F. 2011. Uso de Agentes Antimicrobianos naturales en la Conservación de Frutas y Hortalizas. Ingeniera Bioquímica en Alimentos.

- Instituto Tecnológico de Los Mochis. Mochicahui. Sinaloa. México. 153-154 p.
43. Rodríguez, J. 2003. Sabor y Seguridad en los Conservantes Naturales. [Documento en línea]. Disponible en: www.consumaseguridad.com. Consultado en: 22/10/2018.
44. Roldan, E. (22 de Marzo de 2017). www.institutodermocosmetica.com.
45. Romero, C (2008). Estado de madurez de la Uva. Concentración de compuestos fenólicos en variedad y estado de madurez de uva. Chile (Santiago).
46. Ruggueri, F. 2009. Utilización de las borras obtenidas del proceso de producción en vino de uva (*Vitis Vinífera*) para elaborar espesantes para repostería. Ingeniero en Alimentos. Santiago de Chile. Chile. Pontifica Universidad Catolica de Chile. 45 p.
47. Sánchez, U. 2014. Staphylococcus Aureus. Patogenia y Habitad de resistencia del Staphylococcus Aureus. Etiopatogenia Microbiologica. Seccion 2. 208.210 p.
48. Sabando, M (2013). Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other gram-negative bacteria. Applied and Environmental Microbiology 57 (12): 3613-3615.
49. Thimothe, J; Bonsi, I; Padilla, O; Koo, H. (2007) Caracterización química de la uva de vino tinto. (*Vitis vinifera* y *Vitis* híbridos interespecíficos) y orujo de extractos fenólicos y su actividad biológica contra *Streptococcus mutans*. Revista de Agricultura y Alimentación Química. p. 10200-10207.
50. Vattem, G. 2013. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. Process Biochemistry 40: 1583-1592 pág.

51. Venegas, G. (2012). Compuestos fenólicos en la fruta uva. Uva y sus agentes fenólicos. Estudios Enológicos, Uruguay.
52. Vicuña, J (2011). Compuestos fenólicos y su clasificación. Que son los Flavonoides. Ecuador (Quito).
53. Villegas, X. (2015). Concentración de compuestos fenólicos presentes en variedades de Vinos. Santiago de Chile. Chile. 103-105.

ANEXOS

<



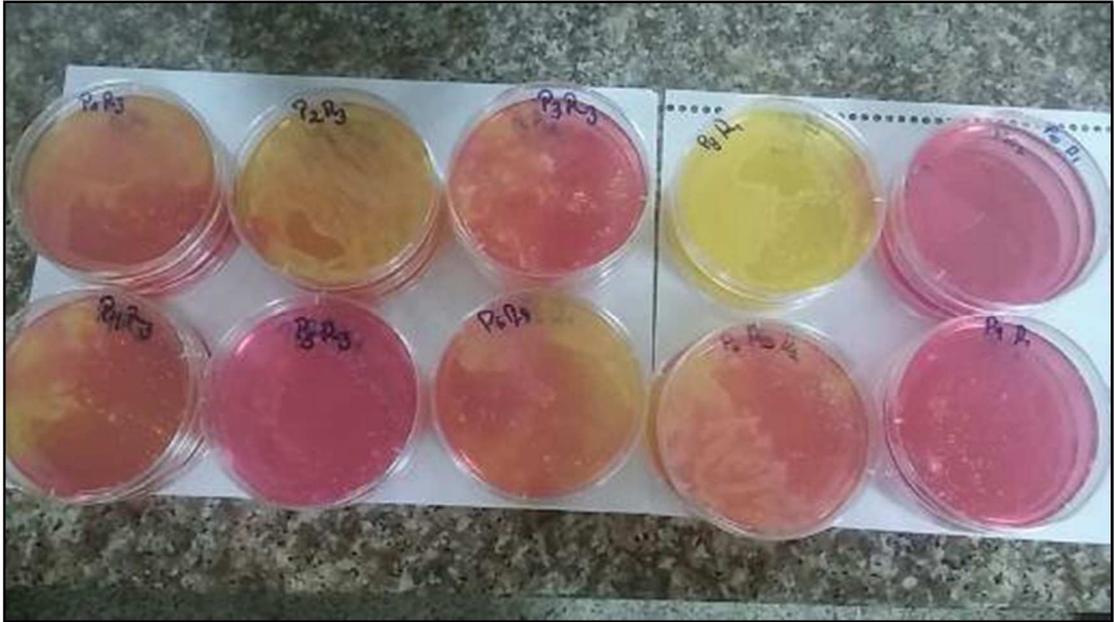
ANEXO. 1-2.- Preparación del medio de Cultivo



ANEXO. 3.- Muestras de raspados cutáneos de 10 individuos asintomáticos



ANEXO. 4-5-6.- Siembra de la Bacteria depositadas en el medio de Cultivo



ANEXO. 7.- Crecimiento de Gram Positivos (*Staphylococcus Aureus*) en el medio de cultivo



ANEXO. 8.- Presencia de Gram Positivos en forma de racimos agrupadas



ANEXO. 9-10.- Extracción del ácido gálico empleando agua como solvente



ANEXO. 11-12.- Método Folin Ciocalteu



ANEXO. 13-14-15.- Cuantificación de ácido Gálico mediante Espectrofotometría



ANEXO. 16.- Preparación del medio de Cultivo



ANEXO. 17.- Control de Temperatura sobre extracción ácido gálico



ANEXO. 18.- Actividad Inhibitoria de 5mg de Ácido Gálico del Néctar sobre el *Staphylococcus Aureus*



ANEXO. 19.- Actividad Inhibitoria de 1mg de Ácido Gálico del Vino sobre el *Staphylococcus*



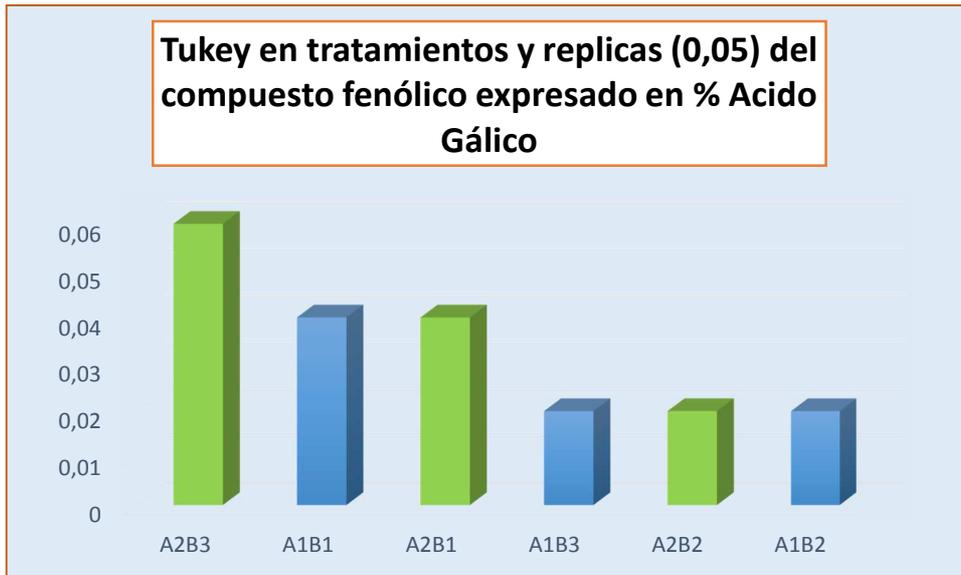
ANEXO. 20.- Actividad Inhibitoria de 3mg de Ácido Gálico del Néctar sobre el *Staphylococcus Aureus*



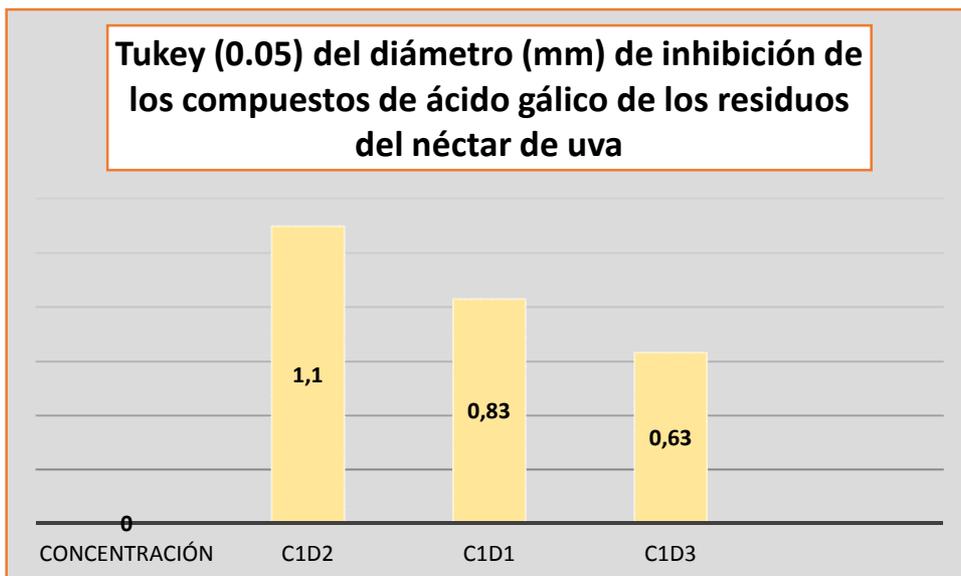
ANEXO. 21.- Actividad Inhibitoria de 3mg de Ácido Gálico del Vino sobre el *Staphylococcus Aureus*



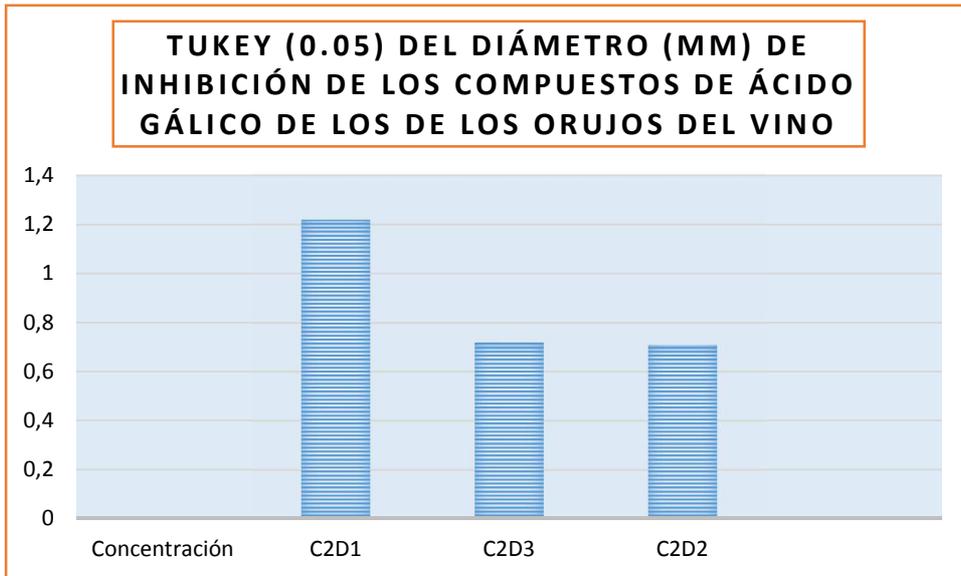
ANEXO. 22-23.- Presencia de *Staphylococcus Aureus* transcurridos 5 días de la Siembra



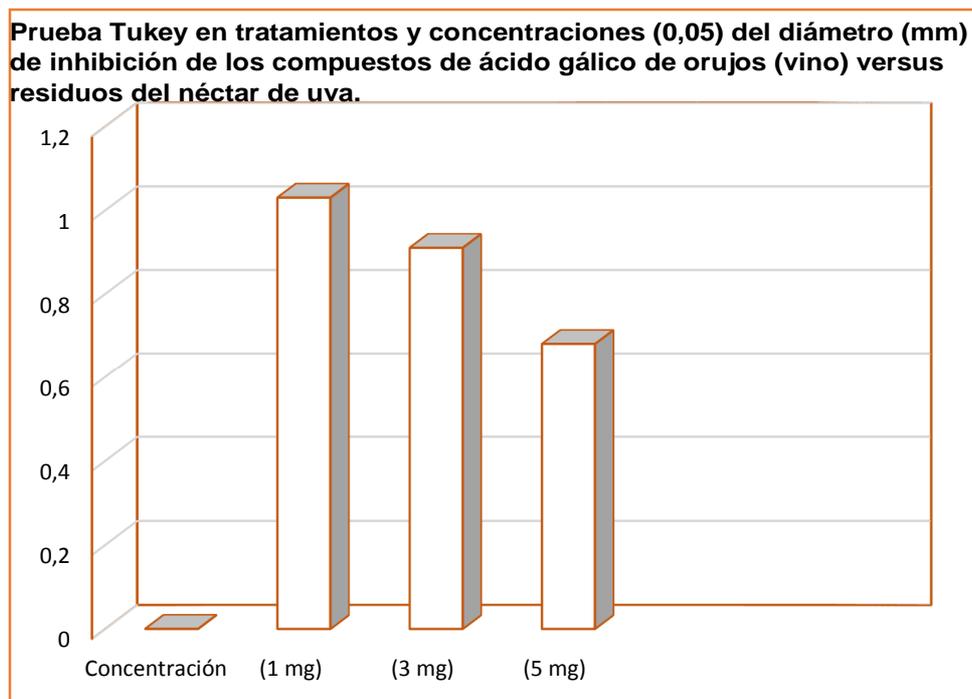
ANEXO. 24.- Prueba de Tukey en tratamientos y replicas (0,05) del compuesto fenólico expresado en % Acido Gálico



ANEXO. 25.- Prueba de Tukey (0.05) del diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de los residuos del néctar de uva



ANEXO. 26.- Prueba de Tukey (0.05) del diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de los orujos del vino



ANEXO. 27.- Prueba Tukey en tratamientos y concentraciones (0,05) de diámetro (mm) de inhibición de los compuestos de ácido gálico de orujos (vino) versus residuos del néctar de uva