

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL



“Antimicrobianos naturales de origen marino frente a *Helicobacter pylori*”

TRABAJO DE FIN DE GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

Alumna: Dña. Carla Palacios Gorba

Tutora: Dña. Maria Antonia Ferrús Pérez

Directora experimental: Dña. Maria Consuelo Pina Pérez

Curso Académico 2017/2018

VALENCIA, JUNIO DE 2018

TÍTULO: Antimicrobianos naturales de origen marino frente a *Helicobacter pylori*.

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria altamente prevalente en humanos (60-80 %), primera causa de inflamación crónica estomacal, asociada en los casos graves con cáncer gástrico, siendo la única bacteria carcinogénica reconocida hasta la fecha. El agua contaminada y diversos alimentos han sido relacionados con la supervivencia y diseminación de *H. pylori* en el ambiente y su transmisión al hombre a través de la cadena alimentaria.

La efectividad de la única terapia antibiótica de aplicación para erradicar la infección por este patógeno ha decaído drásticamente, debido a que cada vez se detectan más cepas resistentes. Ante la necesidad de buscar sustancias naturales antimicrobianas como alternativas efectivas, los compuestos de origen marino se presentan como un nicho sostenible de recursos con gran potencial nutricional y bioactivo.

Los compuestos de origen marino constituyen en nuestros días una fuente inagotable y sostenible de recursos con elevada aplicabilidad en la industria farmacéutica, alimentaria y estética. Las algas pardas del género *Phaeophyceae* son especialmente ricas en carbohidratos complejos de elevado potencial bioactivo. Entre ellos, el compuesto FUCOIDAN, polisacárido sulfatado de algas pardas, favorece el crecimiento de la microbiota intestinal beneficiosa; estimula el sistema inmune; inhibe la replicación viral; posee efecto antioxidante, anti-inflamatorio y anticancerígeno, siendo denominado el “*nutriente del futuro*”.

En el contexto expuesto, y como respuesta a la urgente necesidad de investigar sobre antimicrobianos alternativos a los antibióticos, altamente efectivos frente *Helicobacter pylori*, patógeno emergente de reconocida relevancia en salud pública, el objetivo principal del presente estudio es:

Evaluar el potencial antimicrobiano in vitro del compuesto FUCOIDAN obtenido de diversas especies de algas pertenecientes al género Phaeophyceae, algas pardas de elevada riqueza en dicho polisacárido bioactivo, frente a H. pylori.

Los resultados obtenidos del estudio evidencian la existencia de capacidad antimicrobiana del compuesto natural FUCOIDAN frente a *H. pylori* y sugieren que el uso de antimicrobianos naturales de origen marino podría complementar, o incluso ser una alternativa, al uso de antibióticos frente a *H. pylori*, especialmente cuando aparecen resistencias.

PALABRAS CLAVES: *Phaeophyceae*, antimicrobianos naturales, fucoidan, *Helicobacter pylori*, ecuación de Gompertz

ALUMNA: Dña. Carla Palacios Gorba

TUTORA: Prof. Dña. Maria Antonia Ferrús Pérez

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Dña. Maria Consuelo Pina Pérez

Valencia, junio de 2018

TITLE: Natural antimicrobials from marine origin against *Helicobacter pylori*.

ABSTRACT:

Helicobacter pylori is a highly prevalent bacteria in humans (60-80 %), first cause of chronic stomach inflammation associated with severe cases of gastric cancer, being the only carcinogenic bacterium recognized to date. Contaminated water and different foods, have been highlighted for their role in the survival and dissemination of *H. pylori* in the environment and its transmission to humans throughout the food chain.

The effectiveness of the unique antibiotic therapy of application to eradicate the infection by this pathogen has declined drastically, mainly due to the development of resistances. Due to the need of looking for natural antimicrobial substances, as an effective alternative, marine compounds are presented as a sustainable niche of resources with great nutritional and bioactive potential.

Marine origin compounds constitute in our days an inexhaustible and sustainable source of resources with a high applicability in the pharmacological, food and aesthetic industry. Brown algae from the *Phaeophyceae* genre are primarily rich in complex carbohydrates with high bioactive potential. Between them, the complex FUCOIDAN, sulphated polysaccharide of brown algae which encourages the growth of the beneficial intestinal microbiota; stimulates the immune system; inhibits the viral replication; has an antioxidant, anti-inflammatory and anti-cancer effects, being named as the "nutrient of the future".

In the exposed context, and as an answer to the urgent need to investigate about highly effective alternative antimicrobials to the antibiotics against *Helicobacter pylori*, an emergent pathogen recognised as relevant in public health, the main objective of this study is:

To evaluate the antimicrobial potential in vitro of the compound FUCOIDAN obtained from different algae species belonging to the Phaeophyceae genre, brown algae of high richness in this bioactive polysaccharide, against H. pylori.

The results obtained from this study show the existence of antimicrobial capacity of the natural compound FUCOIDAN against *H. pylori* and suggest that the use of natural antimicrobials of marine origin could be a complementary, or even alternative, therapy against *H. pylori*, especially when resistances are detected.

KEYWORDS: *Phaeophyceae*, natural antimicrobials, fucoidan, *Helicobacter pylori*, Gompertz equation

TÍTOL: Antimicrobians naturals d'origen marí front *Helicobacter pylori*.

RESUM:

Helicobacter pylori, és un bacteri altament prevalent en humans (60- 80 %), primera causa d'inflamació crònica estomacal, i en els casos greus càncer gàstric, sent l'únic bacteri carcinogen reconegut fins a l'actualitat. L'aigua contaminada, i diversos aliments, han sigut destacats pel seu paper en la supervivència i disseminació de *H. pylori* en l'ambient, i la seua transmissió a l'home a través de la cadena alimentària.

L'efectivitat de l'única teràpia antibiòtica d'aplicació per a eradicar la infecció per este patogen ha decaïgut dràsticament. Davant de la necessitat de buscar substàncies naturals antimicrobianes, com a alternatives efectives, els compostos d'origen marí es presenten com un nínxol sostenible de recursos amb gran potencial nutricional i bioactiu.

Els compostos d'origen marí constitueixen en els nostres dies una font inesgotable i sostenible de recursos amb elevada aplicabilitat en la indústria farmacèutica, alimentària i estètica. Les algues terroses del gènere *Phaeophyceae* són especialment riques en carbohidrats complexos d'elevat potencial bioactiu. Entre ells, el compost FUCOIDAN, polisacàrid sulfatat d'algues terroses, afavoreix el creixement de la microbiota intestinal beneficiosa; estimula el sistema immune; inhibeix la replicació viral; posseeix efecte antioxidant, antiinflamatori i anticancerigen, sent denominat el "nutrient del futur".

En el context exposat, i com a resposta a la urgent necessitat d'investigar sobre antimicrobians alternatius als antibiòtics, altament efectius front *Helicobacter pylori*, patogen emergent de reconeguda rellevància en salut pública, l'objectiu principal del present estudi és:

Avaluar el potencial antimicrobià in vitro del compost FUCOIDAN obtingut de diverses espècies d'algues pertanyents al gènere Phaeophyceae, algues terroses d'elevada riquesa en dit polisacàrid bioactiu, enfront de H. pylori.

Els resultats obtinguts de l'estudi evidencien l'existència d'una capacitat antimicrobiana front a *H. pylori* a causa del compost natural FUCOIDAN y suggerixen que l'ús d'antimicrobians naturals d'origen marí podria complementar, o inclús ser una alternativa, a l'ús d'antibiòtics enfront de *H. pylori*, especialment quan apareixen resistències.

PARAULES CLAU: *Phaeophyceae*, antimicrobians naturals, fucoidan, *Helicobacter pylori*, equació de Gompertz

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecerle a M^ª Antonia Ferrús y Ana González la oportunidad que me han otorgado al poder realizar el presente trabajo en el departamento de microbiología.

Por otra parte, en especial quiero agradecer a Maria Consuelo Pina, su inestimable ayuda en el laboratorio, asesorándome y guiándome durante el transcurso de este trabajo, por la confianza y el apoyo que ha depositado en mí desde el principio y por todo lo que con ella he aprendido.

Y a mis padres, por darme los mejores consejos, apoyarme en todas las decisiones, motivarme a seguir adelante y, sobre todo, gracias por creer en mí.

ÍNDICE DEL CONTENIDO:

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE <i>HELICOBACTER PYLORI</i>	1
1.1.1 Importancia en alimentos	2
1.1.2 Consecuencias para la salud	3
1.1.3 Terapia antibiótica	4
1.2 ANTIMICROBIANOS NATURALES	6
1.2.1 Antimicrobianos de origen marino	8
1.3 FUCOIDAN	10
1.3.1 Características estructurales	10
1.3.2 Capacidad antimicrobiana	11
2. OBJETIVOS	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1. <i>Helicobacter pylori</i> : Cepa de referencia.....	13
3.2. Método de turbidimetría - Curva de calibración	13
3.3. Preparación de matrices: Medio de referencia y suspensiones con FUCOIDAN	15
3.3.1. Ensayos de crecimiento en presencia de FUCOIDAN.....	15
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	18
4.1 Potencial antimicrobiano del compuesto FUCOIDAN procedente del alga <i>Macrocystis pyrifera</i> frente a <i>Helicobacter pylori</i>	18
4.2 Potencial antimicrobiano del compuesto FUCOIDAN procedente del alga <i>Undaria pinnatifida</i> frente a <i>Helicobacter pylori</i>	20
4.3 Potencial antimicrobiano del compuesto FUCOIDAN procedente del alga <i>Fucus vesiculosus</i> frente a <i>Helicobacter pylori</i>	22
4.4. Comparativa de la efectividad del FUCOIDAN en función del ORIGEN: especies <i>Macrocystis pyrifera</i> , <i>Undaria pinnatifida</i> y <i>Fucus vesiculosus</i>	24
4.5. Modelización matemática de los resultados de crecimiento obtenidos a 37 °C para <i>H. pylori</i> en MHB suplementado con FUCOIDAN.	26
5. CONCLUSIONES.....	28
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

ÍNDICE DE TABLAS:

INTRODUCCIÓN:

Tabla 1. Productos naturales y alimentos que presentan actividad anti-*H. pylori*. 7

Tabla 2. Características de las algas pardas *Macrocystis pyrifera*, *Undaria pinnatifida* y *Fucus vesiculosus*. 9

RESULTADOS Y DISCUSIONES:

Tabla 3. Comparativa del potencial antimicrobiana del compuesto FUCOIDAN procedente de diversas especies de algas *Phaeophyceae*, en función de la temperatura. 24

Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos en los estudios de crecimiento para *Helicobacter pylori* en Muller Hinton Broth (MHB) suplementado con FUCOIDAN a distintas concentraciones, procedente de diferentes especies de algas *Phaeophyceae*: *Macrocystis pyrifera*, *Undaria pinnatifida*, y *Fucus vesiculosus*. 27

ÍNDICE DE FIGURAS:

INTRODUCCIÓN:

- Figura 1.** Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori* con múltiples flagelos..... 1
- Figura 2.** Ciclo de replicación de *H. pylori* (sensibilidad antibiótica) y un estado no replicativo (insensibilidad antibiótica). Los ciclos ocurren según el pH del microentorno..... 5
- Figura 3.** Esquema de la OMS de los patógenos clasificados según su prioridad para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos 6
- Figura 4.** Algas marinas que crecen en la costa de California del Océano Pacífico. 8
- Figura 5.** Proceso de extracción del fucoidan procedente de algas pardas..... 10
- Figura 6.** Modelo medio de Pankter para la estructura del compuesto fucoidan..... 11

MATERIALES Y MÉTODOS:

- Figura 7.** Espectrofotómetro (Biomate 3, Thermo scientific) utilizado en los estudios de crecimiento realizados para *H. pylori* en el Departamento de Biotecnología, Cátedra de Microbiología de la Universidad Politécnica de Valencia. 13
- Figura 8.** Ejemplo de un resultado de crecimiento de *H. pylori* en siembra en placa de CBA+HB. 14
- Figura 9.** Cubeta en la cual se midieron todas las densidades ópticas a 600 nm. 14
- Figura 10.** Tubos conteniendo las distintas concentraciones bacterianas de las cuales se midió la densidad óptica a 600 nm. 15
- Figura 11.** Esquema preparación de matrices. 16

RESULTADOS Y DISCUSIONES:

- Figura 12.** Resultados obtenidos en los estudios de crecimiento para *Helicobacter pylori* en Muller Hinton Broth (MHB) suplementado con FUCOIDAN procedente del alga *Macrocystis pyrifera* a concentraciones en el intervalo 5-100 µg/mL, ver versus los resultados obtenidos en el sustrato control (MHB no suplementado). 19
- Figura 13.** Resultados obtenidos en los estudios de crecimiento para *Helicobacter pylori* en Muller Hinton Broth suplementado con FUCOIDAN procedente del alga *Undaria pinnatifida* a concentraciones en el intervalo 5-100 µg/mL, versus los resultados obtenidos en el sustrato control (MHB no suplementado). 21
- Figura 14.** Resultados obtenidos en los estudios de crecimiento para *Helicobacter pylori* en Muller Hinton Broth suplementado con FUCOIDAN procedente del alga *Fucus vesiculosus* a concentraciones en el intervalo 5-100 µg/mL, versus los resultados obtenidos en el sustrato control (MHB no suplementado). 23
- Figura 15.** Efectividad bactericida de las diferentes especies de alga en estudio dependiendo del tiempo de exposición: *Macrocystits pyrifera* (MBC = 100 µg/mL), *Undaria pinnatifida* (MBC = 25 µg/MI), *Fucus vesiculosus* (MBC = 25 µg/mL)..... 25

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE *HELICOBACTER PYLORI*

El género *Helicobacter* pertenece a la clase de las Epsilonbacteria, subdivisión Thiobacteria de la división Proteobacteria (Cavalier-Smith, 2002), y en la actualidad comprende 36 especies validadas: *H. pylori* (especie tipo), *H. mustelae*, *H. felis*, *H. fennelliae*, *H. cinaedi*, *H. nemestrinae*, *H. muridarum*, *H. acinonychis*, *H. canis*, *H. hepaticus*, *H. pametensis*, *H. pollurum*, *H. bilis*, *H. bizzozerinii*, *H. trogontum*, *H. cholecystus*, *H. rodentium*, *H. salomonis*, *H. canadensis*, *H. mesocricetorum*, *H. aurati*, *H. typhlonius*, *H. ganmani*, *H. cetorum*, *H. marmotae*, *H. anseris*, *H. brantae*, *H. cynogastricus*, *H. mastomirinus*, *H. equorum*, *H. baculiformis*, *H. suis*, *H. heilmannii*, *H. macacae*, *H. valdiviensis* y *H. himalayensis*. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature, <http://www.bacterio.net/helicobacter.html>).

Helicobacter pylori es una bacteria Gram negativa que coloniza la mucosa gástrica del estómago humano. Entre sus características morfológicas destacan su forma espiral con terminaciones redondeadas. Mide 2,5-4 μm de longitud y 0,5-1 μm de ancho y está dotada de 2-6 flagelos unipolares de 2,5 μm de longitud y 30 nm de grosor (Goodwin *et al.*, 1990). Son bacterias microaerófilas con metabolismo respiratorio que no metabolizan los carbohidratos. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37 °C, aunque también puede crecer en un rango de 35-39 °C (Mégraud, 1995).

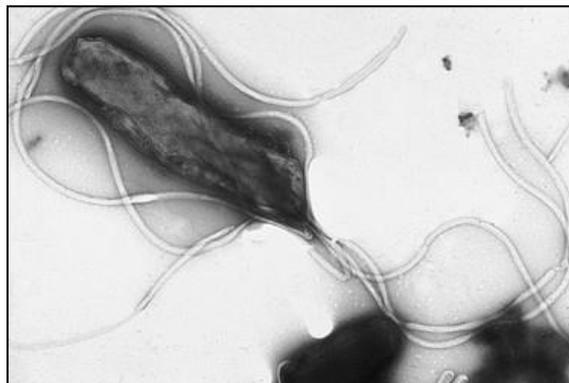


Figura 1. Micrografía electrónica de *Helicobacter pylori* con múltiples flagelos. (Fuente: Yutaka Tsutsumi, M.D. Professor Department of Pathology Fujita Health University School of Medicine.)

Las especies del género *Helicobacter* pueden ser subdivididas en dos grupos en función de su reservorio, el estómago o el intestino: las especies gástricas y las especies enteropáticas (no gástricas). Ambos grupos demuestran un alto nivel de especificidad en los órganos, así las especies gástricas son incapaces de colonizar el intestino y las especies no gástricas son incapaces de colonizar el estómago, aunque existen algunas especies, como *H. aurati*, *H. bilis* y *H. muridarum*, que pueden ser aisladas de ambos nichos (Kusters *et al.*, 2006).

Todas las especies gástricas de *Helicobacter* se han adaptado a las condiciones inhóspitas de la mucosa gástrica superficial. Esta capacidad de resistencia a las condiciones ácidas de la mucosa puede ser debida por un lado a que la ureasa (enzima presente en la bacteria e imprescindible en el proceso de colonización de la mucosa gástrica) hidroliza la urea produciendo amonio y

proporciona un medio alrededor de la bacteria casi neutro, lo que les permite la supervivencia evadiendo las propiedades bactericidas del ácido clorhídrico del estómago. Por otro lado, su motilidad, a causa de los flagelos, les permite realizar un movimiento rápido hacia el interior de la mucosa gástrica (Ansari & Yamaoaka, 2017). Ambas características, tanto la morfología espiral como la motilidad flagelar, le ayudan a penetrar en la capa de mucosa viscosa, donde las condiciones se aproximan más a un pH neutro, permitiendo de esta forma, su crecimiento en el estómago (Ansari & Yamaoaka, 2017).

La capacidad de colonizar y persistir en el estómago humano durante muchos años indica que esta bacteria está específicamente adaptada para ocupar sólo este nicho (Doig *et al.*, 1999).

H. pylori es una de las bacterias patógenas más importantes para el ser humano ya que es la causante de gastritis estomacal tipo B. La gastritis es probablemente la infección más común sufrida en la mayoría de los países de todo el mundo. Además, guarda una estrecha relación con el desarrollo de úlcera péptica y cáncer gástrico (Axon *et al.*, 2014).

1.1.1 Importancia en alimentos

Las rutas de transmisión del *H. pylori* no están totalmente establecidas. Considerando las diferentes evidencias epidemiológicas y microbiológicas, se han sugerido diversas vías, entre las que destacan el agua y los alimentos como posibles vectores (Palomino *et al.*, 2012).

Los alimentos cuyos factores intrínsecos son, actividad de agua superior a 0,97 y pH entre 4,9 y 6,0 pueden proporcionar condiciones óptimas para el desarrollo y supervivencia de *H. pylori*. A pesar de que es poco probable que la bacteria sobreviva en los alimentos de forma activa, puede sobrevivir, sin embargo, en forma viable no cultivable (VNC), es decir, permanecer en forma silente gracias al desarrollo de un estricto metabolismo endógeno, estado en el que no son capaces de crecer pero sí mantener actividad metabólica y en el que suelen adoptar forma cocoide. De esta manera, el microorganismo es capaz en cierto momento de retomar su plena capacidad metabólica, y recuperar potencial infectivo (Fernández-Delgado *et al.*, 2008). Un experimento que pone de manifiesto la supervivencia de este microorganismo en alimentos fue el que Karim & Maxwell (1989) llevaron a cabo. Inocularon artificialmente *H. pylori*, y lo cultivaron durante 8 días en muestras de leche almacenadas a temperatura ambiente y en refrigeración a 4°C. Los resultados que obtuvieron revelan que el microorganismo no se pudo multiplicar, pero logró sobrevivir disminuyendo su crecimiento en un ciclo log tras 4 días, a ambas temperaturas (Karim *et al.*, 1989).

Diversos estudios han profundizado sobre la presencia de *H. pylori* en diferentes alimentos. Por ejemplo, Fujimura *et al.* (2002) investigaron la presencia del microorganismo en leche de vaca mediante un método de cultivo y microscopía electrónica. Con los resultados que obtuvieron demostraron la presencia del gen *ureasa*, el cual es propio de *H. pylori*, en 13 de las 18 muestras de leche cruda, y en 11 de las 20 muestras de leche comercial pasteurizada analizadas (Fujimura *et al.*, 2002).

También se han realizado estudios sobre la presencia de *H. pylori* en moluscos, como el estudio de Fernández *et al.* (2007), que detectaron ADN del microorganismo en estudios en agua de mar, plancton y ostras en diferentes zonas de Venezuela. Los autores concluyeron que los moluscos podrían ser vehículos de transmisión, es decir, actuar como vectores de la infección por *H. pylori*, ya que este tipo de alimentos se suele ingerir crudo, en las zonas afectadas por la contaminación de esta bacteria (Fernández *et al.*, 2007). Estudios realizados por el grupo de investigación dirigido por la Prof. M. A. Ferrús, revelan igualmente la presencia de DNA de *H.*

pylori en aguas potables y aguas residuales en la región de la Comunidad Valenciana (Santiago *et al.* 2015).

Estudios realizados por Poms y Tatini (2001) evaluaron también la presencia y supervivencia de *H. pylori* en distintos alimentos semiprocesados y frescos, mantenidos a 4°C. En las muestras de leche pasteurizada y tofu la bacteria fue recuperada tras un periodo máximo de incubación de cinco días; en lechuga y pollo crudo el microorganismo sobrevivió durante dos días y solamente en yogurt no pudo ser recuperado. Por tanto, y como conclusión, se obtuvo que la bacteria *H. pylori* es capaz de sobrevivir en medios de elevada humedad, baja acidez y en condiciones de refrigeración. Esto supone un riesgo para la salud humana debido a su capacidad de transmisión a través de alimentos mínimamente procesados (Poms *et al.*, 2001).

1.1.2 Consecuencias para la salud

La infección por la bacteria *H. pylori* es la principal causa de cáncer gástrico además de ser la tercera causa de muerte por cáncer a nivel mundial (Venerito *et al.*, 2014).

La infección por *H. pylori* es la más prevalente del mundo ya que afecta aproximadamente al 50% de la población mundial. Esta bacteria se caracteriza por ser causante de varios tipos de patologías gástricas (Figueiredo *et al.*, 2002):

- Gastritis crónica
- Dispepsia funcional
- Úlcera péptica
- Úlcera de estómago
- Úlcera de duodeno
- Cáncer gástrico
- Cáncer de esófago
- Linfoma gástrico tipo MALT

Además, también se ha asociado a un aumento del riesgo de padecer numerosas patologías no digestivas (Cotticelli, *et al.*, 2006; Papagiannakis, 2013; Axon, 2014; Eusebi *et al.*, 2014; Dorer *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2014), tales como:

- Diabetes mellitus
- Enfermedad de Alzheimer
- Parkinson
- Adenoma y adenocarcinoma de colon
- Retinopatía serosa central idiopática
- Enfermedades autoinmunes:
 - Tiroiditis
 - Síndrome de Sjogren
 - Urticaria crónica

Los pacientes que padecen gastritis crónica tienen un mayor riesgo de desarrollar úlceras pépticas y carcinoma gástrico. Este riesgo es especialmente alto en individuos con gastritis atrófica multifocal crónica, un tipo de enfermedad autoinmune en la que los anticuerpos atacan el revestimiento de la mucosa del estómago, causando adelgazamiento y pérdida de muchas, o todas las células que producen los ácidos y enzimas.

Entre todas las enfermedades causadas por este patógeno, la mayor atención se presta al desarrollo del cáncer de estómago. Este tipo de patología ocupa el cuarto lugar en frecuencia

en el mundo y está directamente relacionada con el progreso de la acción maligna del microorganismo, junto con las predisposiciones genéticas.

Según Argent *et al.* (2004) la incidencia de cáncer gástrico está asociada indiscutiblemente con la infección por *H. pylori*, pero factores como la dieta y los polimorfismos genéticos del hospedador están directamente relacionados con el inicio de la patología y el grado de intensidad.

1.1.3 Terapia antibiótica

La primera terapia aplicada frente a este patógeno en 1988 comprendía el suministro de una combinación de bismuto junto con dos antibióticos. Ésta resultó tener diversos efectos secundarios, con un 55% de erradicación de la bacteria. Con el fin de simplificar, se introdujo la terapia dual en la cual se combina el omeprazol con claritromicina. Los resultados obtenidos no fueron los esperados ya que se obtenían porcentajes de erradicación por debajo del 70%. Los dos métodos anteriores han caído en desuso en Europa por su escasa eficacia contra *H. pylori* (Hernández, 2001).

En estudios realizados *in vitro*, la bacteria *H. pylori* es sensible a un elevado número de antibióticos, pero la mayoría pierden su actividad *in vivo* ya que el estómago tiene unas condiciones de pH muy restrictivas. Esta limitación hace necesaria la asociación de un inhibidor de la bomba de protones (PPI), como el omeprazol o lansoprazol, en la terapia. Los antibióticos más utilizados en la terapia contra la infección por *H. pylori* son (Gisbert *et al.*, 2005):

- Metronidazol
- Amoxicilina
- Tetraciclina
- Claritromicina

Y en menor medida:

- Quinolonas: Ciprofloxacina, Levofloxacina, Moxifloxacina
- Azitromicina
- Eritromicina
- Furazolidona
- Nitrofurantóina

Actualmente, el tratamiento de primera línea consiste en una terapia triple o una terapia cuádruple en caso de fallo de la primera. La terapia triple incluye un inhibidor de la bomba de protones (PPI) combinado con dos antibióticos, normalmente amoxicilina y claritromicina. La terapia cuádruple incluye, además de la triple medicación, sales de bismuto. La terapia secuencial es una terapia simple doble, que incluye una PPI más amoxicilina en los primeros 5 días de tratamiento, y a continuación una triple terapia con una PPI, claritromicina y tinidazol (dos veces diarias) durante los siguientes 5 días (Egan *et al.*, 2007).

La triple terapia tiene una eficacia del 75% pero tiene un elevado coste, y está asociada con la aparición de resistencia a los medicamentos, y numerosos efectos adversos, como alergias, mientras que la terapia secuencial tiene una eficacia del 90% e incluso mayor. Sin embargo, esta aproximación puede resultar equivocada ya que la bacteria puede oscilar entre un estado replicativo, en el que el microorganismo permanece susceptible al antibiótico, y un estado no replicativo, donde aparece fenotipo resistente y se convierte difícil de erradicar. Este cambio es

dependiente del pH del entorno: La bacteria entra en un estado no replicativo cuando el pH está en torno a 4,0-6,0 (Figura 2) (Egan *et al.*, 2007).

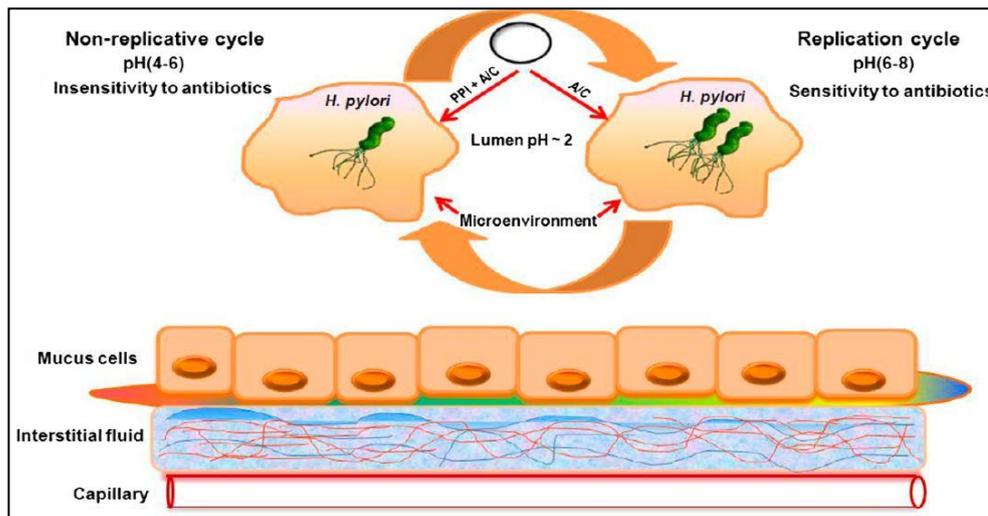


Figura 2. Ciclo de replicación de *H. pylori* (sensibilidad antibiótica) y un estado no replicativo (insensibilidad antibiótica). Los ciclos ocurren según el pH del microentorno. (Fuente: Egan *et al.*: Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2007, 12:31-37).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha publicado recientemente, (Ginebra, 27 de febrero del 2017) su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen por primera vez las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana, entre las que se encuentra en el segundo bloque, de prioridad elevada, la bacteria *Helicobacter pylori*. En la lista se pone de relieve especialmente la amenaza que suponen las bacterias Gram-negativas resistentes a múltiples antibióticos. Estas bacterias tienen la capacidad innata de desarrollar nuevas formas de resistir a los tratamientos, y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse fármaco-resistentes. Es por ello que existe la necesidad de encontrar productos naturales que tengan capacidad antimicrobiana en la terapia contra las infecciones causadas por estos microorganismos (OMS, 2017).

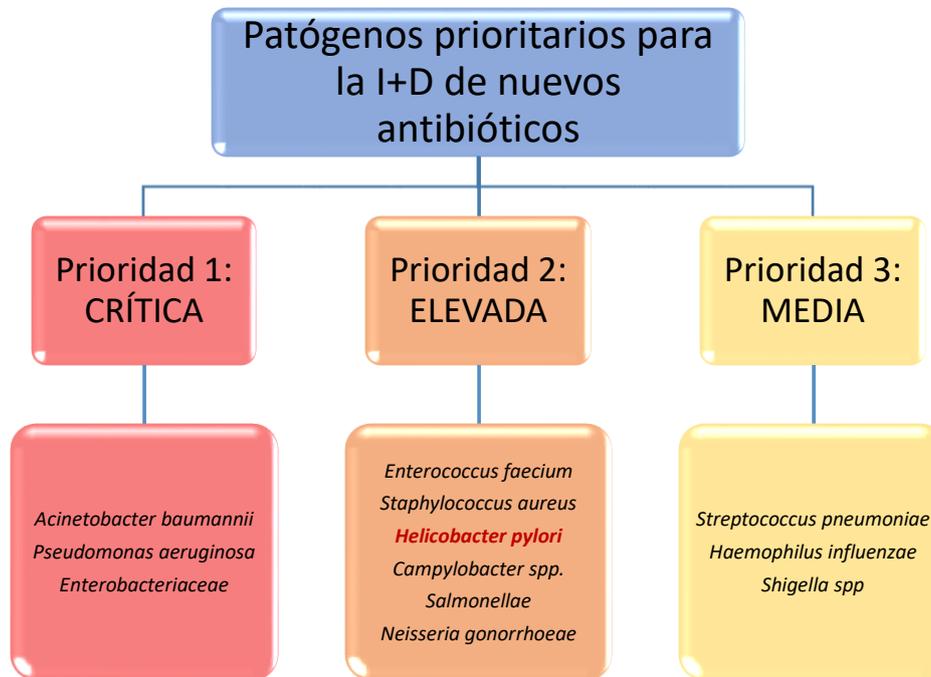


Figura 3. Esquema de la OMS de los patógenos clasificados según su prioridad para la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos. (Fuente: OMS, 2017)

1.2 ANTIMICROBIANOS NATURALES

La aparición de resistencias adquiridas a los antibióticos de uso habitual es una preocupación que se ha extendido a nivel mundial. Con la resistencia a los antibióticos alcanzando un punto de crisis en centros médicos y la creciente tasa de resistencia que afecta a las comunidades, existe una necesidad urgente de desarrollar las alternativas que, como agentes antimicrobianos, se proponen frente a los patógenos humanos. En este contexto, es extremadamente importante buscar nuevas fuentes terapéuticas con acción anti-*Helicobacter pylori* (Bonifácio *et al.*, 2014).

El uso de productos naturales en la terapia contra enfermedades causadas por microorganismos presenta ventajas sobre los fármacos derivados de fuentes sintéticas. Fundamentalmente, ventajas asociadas a los bajos efectos secundarios de compuestos naturales bioactivos cuando se compara su actividad toxicológica y farmacológica con los obtenidos de fuentes industriales. Por ello, áreas como la gastroenterología y la bacteriología vienen realizando desde hace algunos años una intensa labor de búsqueda e investigación sobre las actividades farmacológicas que tienen diversos productos naturales contra los agentes infecciosos (Bonifácio *et al.*, 2014).

Diversos productos naturales han demostrado actividad antimicrobiana contra *H. pylori* y durante siglos, una larga variedad de plantas y sustancias derivadas de recursos alternativos han sido utilizadas en el tratamiento de los trastornos gastrointestinales (Takeuchi *et al.*, 2014).

Tabla 1. Productos naturales y alimentos que presentan actividad anti-*H. pylori*.

Producto o alimento	Componente activo	Efecto antimicrobiano	Referencia
 Leche de bovino	Lactoferrina	Favorece efecto sinérgico - con los antibióticos en tratamiento de <i>H. pylori</i>	(Guttner <i>et al.</i> , 2003)
 Té verde	Compuestos de catequina	Inhibición de la actividad ureasa a través de la membrana celular disruptiva	(Di Mario <i>et al.</i> , 2006)
 Piel de manzana	Glicósidos de quercetina	Inhibición de la actividad ureasa	(Pastene <i>et al.</i> , 2009)
 Arándano	Compuestos de polifenoles	Inhibición de la adhesión de <i>H. pylori</i> a la mucosa gástrica	(Matsushima <i>et al.</i> , 2008)
 Ajo	Alicina, Componentes de dialilo-azufre	-	(O'Gara <i>et al.</i> , 2008)
 Aceites esenciales	Terpenos	-	(Ohno <i>et al.</i> , 2003)
 Jengibre	6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol, 6-shogaol, ácidos fenólicos	Bloqueo de la activación del receptor Toll-like 4 (TLR4)	(Nostro <i>et al.</i> , 2005)

El potencial antimicrobiano asociado a muchos de estos productos naturales está directamente relacionado con la presencia/riqueza de dichos productos en componentes bioactivos (compuestos polifenólicos, péptidos, polisacáridos, entre otros). Especial mención merecen los compuestos polisacáridos procedentes de fuentes vegetales (alginatos, laminarinas, Fucoïdanos sulfatados), por su demostrada capacidad antimicrobiana (Patel, 2012). Durante la última década se han descubierto numerosos polisacáridos bioactivos con propiedades funcionales interesantes procedentes de algas marinas (Figura 4) (Patel, 2012).



Figura 4. Algas marinas que crecen en la costa de California del Océano Pacífico. (Fuente: Patel, 2012).

1.2.1 Antimicrobianos de origen marino

El campo biomédico y alimentario está constantemente buscando nuevos biomateriales con propiedades innovadoras. Los polímeros naturales resultan prometedores en este sentido, tanto desde un punto de vista tecnológico, mejorando las propiedades sensoriales del producto final, como por la mejora del valor nutricional y funcional del producto acabado (alto contenido en fibra, efecto prebiótico, regulador del sistema inmunológico, entre otros).

Las macroalgas pardas del género *Phaeophyceae* son ricas en polisacáridos como los ácidos algínicos (alginato) o laminarinas (laminarans), pero también en fucanos sulfatados. Estos polisacáridos sulfatados únicamente se encuentran en especies de algas pertenecientes a este género (*Macrocystis pirifera*, *Undaria pinnatifida*, *Fucus vesiculosus*, *Nereocystis luetkeana*, *Fucus serratus*, *Durvillaea antártica*, *Nereocystis luetkeana*, *Fucus distichus*, *Egregia menziesii*, *Sargassum horneri*, *Durvillaea potatorum*...) y no poseen equivalencia en plantas terrestres; se asemejan sin embargo, en sus propiedades químicas y biológicas a los glicosaminoglicanos de mamíferos (Tiago *et al.*, 2012), y destacan en nuestros días como prometedores agentes terapéuticos.

Las características biológicas de los polisacáridos sulfatados provenientes de estas algas pardas reportadas hasta ahora son: antioxidantes, antitumorales, inmunomoduladoras, antiinflamatorias, anticoagulantes, antivirales, antiprotozoarias, antibacterianas y antilipémicas entre otras (Tiago *et al.*, 2012).

Entre las especies de algas pardas de mayor relevancia se encuentran tres de ellas sobre las que se centrará el presente estudio, pertenecientes a la orden de las Laminariales:

- *Macrocystis pirifera*
- *Undaria pinnatifida*
- *Fucus vesiculosus*

Tabla 2. Características de las algas pardas *Macrocystis pirifera*, *Undaria pinnatifida* y *Fucus vesiculosus*.

<i>Alga parda</i>	<i>Características estructurales</i>	<i>Características nutricionales</i>	<i>Características composicionales químicas</i>	<i>Referencia</i>
 <i>Macrocystis pirifera</i>	35 - 40 m de largo, diferenciadas en grampón, estípites y expansiones laminares	Rica en vitaminas A, B, C, y E; minerales entre ellos el yodo, sodio, hierro y azufre. Alto valor proteico. Contiene también ácido algémico, almidón, grasas, aceites, carbohidratos y fibra	Fucosa/galactosa (18/1), sulfato	(Black <i>et al.</i> , 1952)
 <i>Undaria pinnatifida</i>	La hoja es muy recortada, translúcida y flexible. Alcanza hasta 3 m de largo.	Alto contenido en calcio (13 veces más que la leche), fósforo, magnesio y hierro. También contiene vitaminas A, B1, B2, B12 y C.	Fucosa/galactosa (1/1.1), sulfato	(Lee <i>et al.</i> , 2004)
 <i>Fucus vesiculosus</i>	Recubierta de vesículas rellenas de aire	Rica en yodo, mucílagos solubles. Alto contenido en vitaminas (A, C, E, grupo B y ácido fólico) y oligoelementos (cobre, zinc, bromo, sílice, cromo y selenio)	Fucosa, sulfato	(Nishino <i>et al.</i> , 1994)

Todas las algas pardas presentan la especial característica de ser muy ricas en el polisacárido Fucoídano. El Fucoídano representa una familia de polisacáridos sulfatados (SP) solubles en agua, ricos en L-fucosa sulfatada, extraída de la matriz extracelular de estas algas (Li *et al.*, 2008). El

fucoïdan, el alfa-L-fucan sulfatado (término utilizado a menudo indistintamente con fucanos) ha demostrado un gran potencial bioactivo, destacando en la lucha contra el cáncer por sus destacados efectos en la apoptosis selectiva de células cancerígenas (Costa *et al.*, 2011).

1.3 FUCOIDAN

Fucoïdan se refiere a un tipo de polisacárido que contiene porcentajes sustanciales de grupos éster de L-fucosa y sulfato, derivados principalmente de algas pardas. El polisacárido fue nombrado como "fucoïdin" por el Profesor Kylin, en la Universidad Upsala de Suecia (1913) cuando fue aislado por primera vez de las algas pardas marinas. Ahora es nombrado como "fucoïdan" según las reglas de IUPAC, pero algunos también lo llaman fucan, fucosan o fucan sulfatado (Li *et al.*, 2008)

La extracción de fucoïdan a partir de algas pardas, como de otros polisacáridos sulfatados de las macroalgas, se realiza mediante el proceso de extracción acuosa en caliente, con precipitación con sales o disolventes orgánicos. El proceso se puede dividir en tres pasos: molienda de algas marinas, extracción/purificación (implica múltiples extracciones acuosas prolongadas y soluciones ácidas y puede incluir calcio para promover la precipitación de alginato y obtener fucoïdan) y secado/almacenamiento cuidadoso (Figura 5) (Tiago *et al.*, 2012).



Figura 5. Proceso de extracción del fucoïdan procedente de algas pardas (Fuente: Tiago *et al.*, 2012)

1.3.1 Características estructurales

Desde que Kylin aisló fucoïdan en 1913, se han investigado las estructuras del fucoïdan de diferentes algas pardas. El Fucoïdan de varias especies de algas marrones, como *Fucus vesiculosus*, tiene composiciones químicas simples, compuestas principalmente de fucosa y sulfato. Pero las composiciones de la mayoría de los fucoïdanes son complejas. Además de fucosa y sulfato, también contienen otros monosacáridos (manosa, galactosa, glucosa, xilosa, etc.) y ácidos urónicos, incluso grupos acetilo y proteínas. Además, las estructuras de fucoïdanes de diferentes algas pardas varían de una especie a otra (Li *et al.*, 2008).

La posición de los grupos sulfato juegan un papel importante en la actividad biológica de los polisacáridos sulfatados. Los métodos para determinar la posición de sulfato incluyen la espectroscopia infrarroja, la desulfatación, la estabilidad de ésteres de sulfato a álcali y el análisis de metilación (Li *et al.*, 2008).

En 1993, en los datos de metilación de GC/MS, Pankter y sus colaboradores revisaron este modelo estructural, sugiriendo que la región central del fucoïdan era principalmente un

polímero de fucosa unida a α - (1 \rightarrow 3) con grupos sulfato sustituidos en la posición C-4 en algunos de los residuos de fucosa (Figura 6). Anteriormente, Conchie y O'Neill encontraron que la unidad componente principal era 1,2- α -fucosa y la mayoría de los grupos sulfato se localizaban en la posición C-4 de las unidades de fucosa. La diferencia entre las dos observaciones se debe, en primer lugar, a una diferencia en el método de preparación: El fucoídano de Conchie fue extraído con agua caliente, en lugar de la extracción ácida utilizada por Pankter; y en segundo lugar, los métodos de metilación utilizados por cada uno diferían (Patankar *et al.*, 1993).

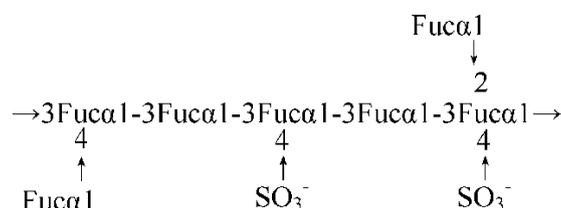


Figura 6. Modelo medio de Pankter para la estructura del compuesto fucoídano (Fuente: Li *et al.*, 2008).

1.3.2 Capacidad antimicrobiana

El compuesto fucoídano procedente de algas marinas ha sido objeto de muchos estudios científicos con el objetivo de evaluar sus posibles actividades biológicas, incluyendo antitumorales e inmunomoduladoras, antivirales, antitrombóticas y anticoagulantes, antiinflamatorias y antioxidantes, así como sus efectos contra diversas enfermedades renales, hepáticas y trastornos uropáticos (Patel *et al.*, 2012).

En el estudio realizado por Zhang *et al.* (2015) se analizaron los fucoídanos obtenidos de *Ascophyllum nodosum*, *Macrocystis pyrifera*, *Undaria pinnatifida* y *Fucus vesiculosus*, por su efecto sobre la apoptosis de neutrófilos humanos, la activación de NK en células de ratón, maduración de DCs de bazo, proliferación y activación de células T, y el efecto adyuvante *in vivo*. Los fucoídanos de *M. pyrifera* y *U. pinnatifida* retardaron fuertemente la apoptosis de neutrófilos humanos a baja concentración, mientras que los fucoídanos de *A. nodosum* y *F. vesiculosus* retrasaron la apoptosis de neutrófilos humanos a mayor concentración. Además, el fucoídano de *M. pyrifera* promovió la activación de las células NK y la actividad citotóxica contra las células YAC-1. Además, el compuesto fucoídano del alga *M. pyrifera* indujo la activación más fuerte de las DCs y células T de bazo y respuestas inmunes específicas de ovoalbúmina (OVA) en comparación con otros fucoídanos. Estos datos sugieren que el fucoídano de *M. pyrifera* puede ser potencialmente útil como agente terapéutico para enfermedades infecciosas, cáncer y un adyuvante eficaz para la vacuna (Zhang *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

En el contexto expuesto previamente, y como respuesta a la urgente necesidad de investigar sobre antimicrobianos naturales alternativos a los antibióticos, altamente efectivos frente a *Helicobacter pylori*, patógeno emergente de reconocida relevancia en salud pública, el **objetivo principal** del presente estudio es:

Evaluar el potencial antimicrobiano *in vitro* del compuesto FUCOIDAN obtenido de diversas especies de algas pertenecientes al género *Phaeophyceae*, algas pardas de elevada riqueza en dicho polisacárido bioactivo frente a *Helicobacter pylori*.

Como **objetivos específicos** del presente estudio se plantean los siguientes:

1. Evaluar el potencial antimicrobiano, bacteriostático y/o bactericida, del compuesto FUCOIDAN procedente de las especies *Fucus vesiculosus*, *Undaria pinnatifida* y *Macrocystis pyrifera* de algas pardas frente a *H. pylori*.
2. Determinar la influencia que los factores de exposición a FUCOIDAN, tiempo y temperatura, ejercen en el efecto antimicrobiano observado frente a *H. pylori*.
3. Obtener los parámetros cinéticos que describen el crecimiento del microorganismo bajo las condiciones de estudio.
4. Discutir la influencia que la estructura y origen del compuesto FUCOIDAN ejercen en la efectividad de este compuesto bioactivo frente a *H. pylori*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. *HELICOBACTER PYLORI*: CEPA DE REFERENCIA

La cepa *H. pylori* 11637 NCTC utilizada en el presente estudio fue proporcionada por la Colección de Cultivos Tipo de Reino Unido, y reconstituida de acuerdo a las indicaciones de la colección. A partir de dicha cepa se preparó un stock de crioviales congelados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, en concentración $1\pm 0.54\times 10^8$ CFU/mL – fase estacionaria.

3.2. MÉTODO DE TURBIDIMETRÍA - CURVA DE CALIBRACIÓN

La turbidimetría es un método establecido para estudiar el crecimiento bacteriano a través de mediciones de densidad óptica, lo cual hace posible el seguimiento del crecimiento de la población bacteriana en tiempo real (Dos Santos, 2007). Esta técnica se basa en el hecho de que las partículas pequeñas difractan la luz, dentro de ciertos límites, de manera proporcional a su concentración. Cuando un haz luminoso pasa a través de una suspensión bacteriana, la reducción en cantidad de luz transmitida a consecuencia de la difracción es pues una medida de masa bacteriana presente. Tales mediciones se realizan utilizando para ello un fotómetro o espectrofotómetro (ver figura 7), equipado con un prisma o una red de difracción que permite la iluminación de la muestra con luz de un margen estrecho y ajustable de longitudes de onda.



Figura 7. Espectrofotómetro (Biomate 3, Thermo scientific) utilizado en los estudios de crecimiento realizados para *H. pylori* en el Departamento de Biotecnología, Cátedra de Microbiología de la Universidad Politécnica de Valencia.

Para determinar el crecimiento bacteriano en función del aumento de la turbidez del medio es necesario realizar las correspondientes curvas de calibración que relacionen, para cada microorganismo y sustrato considerado, la equivalencia existente entre el valor de OD y el recuento bacteriano correspondiente, ajustando directamente los datos mediante una ecuación de regresión.

Para los estudios con *H. pylori* se construyeron inicialmente curvas de calibrado que relacionen $OD_{600\text{nm}}$ con recuento bacteriano (\log_{10} (UFC/mL)). Para ello, en primer lugar se tomaron alícuotas de crioviales mantenidos en stock, y se realizaron siembras directas en placas Agar Sangre Columbia (CBA) (Difco, Franklin Lakes, New Jersey, USA), suplementado al 10 % con sangre desfibrinada de caballo (HB) (Oxoid, UK) (CBA+HB), que se incubaron a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5-7 días),

en condiciones de microaerofilia (5% oxígeno, 10% dióxido de carbono, y 85 % nitrógeno) dispuestas en jarras de anaerobiosis (Campy Gas Pak system; Oxoid, Basingstoke, UK). Además, se tomaron alícuotas y se realizaron también diluciones seriadas en PBS filtrado (pore size, 0.2 µm; Sigma Aldrich sterile syringe filter) 1X (130 mmol/L sodium chloride, 10 mmol/L sodium phosphate, pH 7.2), procediendo también a la correspondiente siembra en placas de CBA+HB (D1, D2, D3, D4, D5). Dichas placas se mantuvieron en incubación 5-7 días en condiciones de microaerofilia a 37 °C (Figura 8). Tras la inspección visual de las placas a los 5 días, se realizaron los correspondientes recuentos bacterianos.



Figura 8. Ejemplo de un resultado de crecimiento de *H. pylori* en siembra en placa de CBA+HB.

Las placas correspondientes a recuentos bacterianos de entre $10^3 - 10^8$ UFC/mL se utilizaron para realizar la correspondiente curva de calibrado OD_{600nm} versus UFC/mL. Para ello se preparó el sustrato que será utilizado en el presente estudio como medio de referencia: Muller Hinton Broth (MHB) (Scharlab S.A., Barcelona, Spain) estéril (Bayona-Rojas., 2013; Douraghi *et al.*, 2010).

Las células de *H. pylori* se recogieron de las placas de CBA+HB y se introdujeron en viales conteniendo PBS 1X filtrado estéril, para proceder al lavado de las mismas (centrifugación 5000 rpm, 3 min). Una vez eliminado el sobrenadante, las células se re-suspendieron utilizando 1 mL de MHB estéril previamente preparado. Partiendo de las suspensiones celulares a las distintas concentraciones bacterianas, se realizaron inoculaciones de 1:10 en MHB. Con dicho conjunto de muestras se procedió a la realización de las mediciones espectrofotométricas por triplicado. Paralelamente, se realizaron siembras en placas CBA+HB para cada uno de los tubos conteniendo distintas concentraciones bacterianas. Con los resultados obtenidos se establecieron las correspondencias entre recuento en placa y medidas de OD a 600nm.

Curva de calibrado \log_{10} (UFC/mL) versus OD_{600nm} para *H. pylori* en MHB:

$$\log_{10}(UFC/mL) = 6,057 \times OD_{600nm} + 3,71$$

Ecuación 2

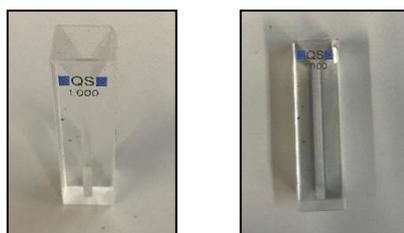


Figura 9. Cubeta en la cual se midieron todas las densidades ópticas a 600 nm.

3.3. PREPARACIÓN DE MATRICES: MEDIO DE REFERENCIA Y SUSPENSIONES CON FUCOIDAN

3.3.1. Ensayos de crecimiento en presencia de FUCOIDAN.

Las células de *H. pylori* mantenidas en stock fueron inoculadas (100 μ l) y crecidas en placas de CBA+HB (5 días, condiciones de microaerofilia). Las células crecidas fueron suspendidas en 500 μ l del medio que se utilizará como referencia en el presente estudio, MHB estéril. Se prepararon tubos (por triplicado) conteniendo 9900 μ l de MHB, sobre los que se adicionaron 100 μ l de la suspensión celular de *H. pylori*, ajustando el valor de $OD_{600nm} = 0.10 \pm 0.05$. Estos tubos se utilizaron como control, ya que permiten registrar el crecimiento de *H. pylori* en el medio NO SUPLEMENTADO CON FUCOIDAN, condiciones normales.

Paralelamente, se preparó una suspensión madre en MHB conteniendo FUCOIDAN en concentración 5000 μ g/mL, que fue dividida en alícuotas mantenidas en congelación a -20 °C. Partiendo de la solución madre se realizaron diluciones en MHB, y se prepararon tubos conteniendo 5, 10, 25, 50 y 100 μ g/mL de fucoidan (por triplicado para cada concentración) (Ver Figura 11). Dichos tubos fueron inoculados con las suspensiones bacterianas previamente preparadas, ajustando un valor final de $OD_{600nm} = 0.10 \pm 0.05$. Además de la suspensión control (no suplementada con fucoidan) se prepararon suspensiones blanco (no inoculadas), tanto para MHB como para MHB suplementado con las distintas concentraciones de fucoidan, que se utilizaron como “autozero” del equipo. Dichas suspensiones se mantuvieron almacenadas en las mismas condiciones que los tubos (37 °C y condiciones de microaerofilia) en jarras de anaerobiosis estériles, con el objetivo de determinar si la matriz sufre algún cambio que pudiera interferir en los resultados obtenidos mediante espectrofotometría (Ver Figura 11).

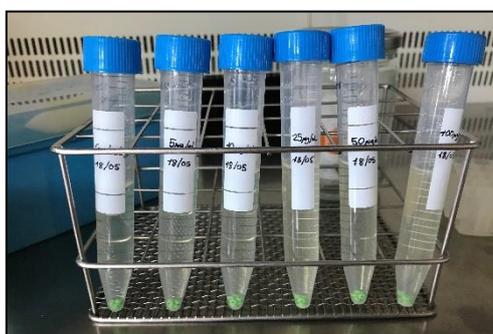
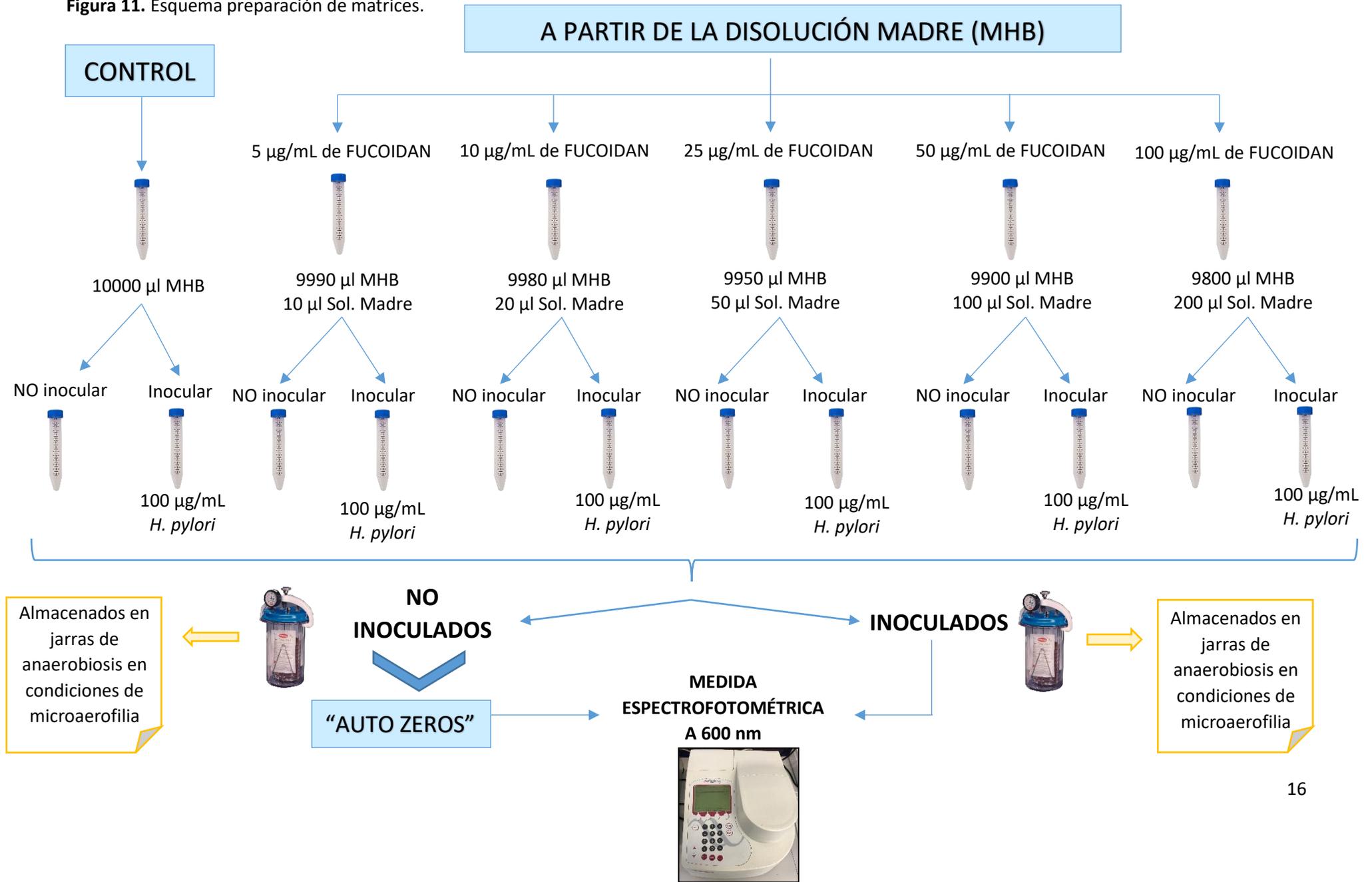


Figura 10. Tubos conteniendo las distintas concentraciones bacterianas de las cuales se midió la densidad óptica a 600 nm.

Figura 11. Esquema preparación de matrices.



MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DE LOS RESULTADOS

Los resultados cinéticos obtenidos en el crecimiento de *H. pylori* en presencia y ausencia de fucoïdan fueron ajustados a la ecuación modificada de Gompertz, cuya expresión matemática se detalla a continuación:

$$\text{Log}_{10}(N_t) = A + C e^{-e^{-Bx(t-M)}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde, N_t representa la carga final de microorganismos a tiempo t (CFU/mL); el parámetro A corresponde al \log_{10} del recuento inicial (\log_{10} (CFU/mL)); el parámetro C es la diferencia entre las asíntotas N_{\max} y N_0 (\log_{10} (CFU/MI)); B es la tasa de crecimiento relativo cuando $t = M$ (\log_{10} (CFU/mL)/h); y M es el parámetro que corresponde al tiempo requerido hasta alcanzar la máxima tasa de crecimiento (h).

Los parámetros A , B y C de la ecuación de Gompertz fueron utilizados para calcular los parámetros cinéticos tiempo de latencia (λ , h) y la tasa máxima de crecimiento específica (μ_{\max} , (\log_{10} (CFU/mL)/h)), de acuerdo con las siguientes ecuaciones (McMeekin *et al.*, 1993):

$$\lambda = M - \left(\frac{1}{B}\right) + \frac{\log_{10}(N_0) - A}{\mu_{\max}} \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\mu_{\max} = \frac{B \times C}{e} \quad \text{Ecuación 4}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE RESULTADOS

El análisis estadístico consistió en un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA) para detectar diferencias estadísticamente significativas (p -value ≤ 0.05) entre los resultados obtenidos en el crecimiento/inactivación de *H. pylori* en presencia del compuesto fucoïdan de las diferentes especies en estudio, dependiendo de las variables consideradas, concentración y temperatura de incubación. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

El efecto antimicrobiano del compuesto bioactivo FUCOIDAN se estudió *in vitro* frente a *Helicobacter pylori* utilizando un rango de concentraciones de entre 5-100 µg/mL. La exposición del microorganismo al compuesto FUCOIDAN se realizó mediante incubaciones a distintas temperaturas, 8 y 37 °C y tiempos de contacto de 0 a 10 días, estudiando además la influencia del origen del FUCOIDAN, procedente de diferentes especies de algas pardas: *Macrocystis pyrifera*, *Undaria pinnatifida* y *Fucus vesiculosus*, en su efectividad antimicrobiana frente a *H. pylori*.

La exposición de resultados se realiza para cada especie macroalgal en estudio, evaluando el efecto de las variables concentración de FUCOIDAN, temperatura de incubación, y tiempo de exposición, sobre la capacidad antimicrobiana del mismo, para finalmente establecer una comparación de la efectividad de este compuesto bioactivo en función de la especie de alga considerada.

4.1 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DEL COMPUESTO FUCOIDAN PROCEDENTE DEL ALGA MACROCYSTIS PYRIFERA FRENTE A HELICOBACTER PYLORI.

Los resultados obtenidos utilizando el compuesto FUCOIDAN obtenido del alga *Macrocystis pyrifera* revelan que, bajo condiciones de incubación óptimas para el microorganismo, todas las concentraciones de FUCOIDAN en estudio [5-100] µg/mL ejercen un efecto BACTERIOSTÁTICO sobre el crecimiento del microorganismo.

Como puede apreciarse gráficamente (Figura 12A), la adición de FUCOIDAN en concentraciones de [5-25] µg/mL prolonga la fase de latencia del microorganismo (λ , h) con respecto al control ($\lambda = 22$ h). Así, para 5 µg/mL la duración de la fase de latencia es de 48 h, siendo el valor de λ igual a 72 h para *H. pylori* en suspensiones conteniendo FUCOIDAN a razón de 10 y 25 µg/mL. Concentraciones de fucoïdan en el intervalo [50-100] µg/mL inhiben el crecimiento del microorganismo durante el periodo completo de estudio, permaneciendo la carga microbiana final de *H. pylori* en valores próximos a los inoculados inicialmente (≈ 4 ciclos \log_{10}). El compuesto FUCOIDAN de *Macrocystis pyrifera* resulta efectivo inhibiendo el crecimiento de *H. pylori* hasta en 2.70 ciclos \log_{10} en 5 días. Además, tras 7 días de incubación a temperatura óptima, para la concentración de 100 µg/mL no se consiguieron recuperar células viables cultivables (VC) de *H. pylori*, pudiendo ser esto debido bien a la entrada del microorganismo en forma cocoïde (estricto metabolismo endógeno), y por tanto no cultivables (VNC), o bien al efecto BACTERICIDA del compuesto.

A la temperatura de 8 °C, *Helicobacter pylori* no crece en medio de referencia MHB, permaneciendo sin embargo, en forma viable cultivable durante el periodo completo de incubación (10 días). Durante los 3 primeros días de incubación no existen diferencias significativas entre los niveles de *H. pylori* observados en MHB control, y el MHB suplementado con fucoïdan a las distintas concentraciones estudiadas. Sin embargo, tras 5 días de incubación a dicha temperatura, fue imposible recuperar células viables cultivables de *H. pylori* a partir de las suspensiones conteniendo fucoïdan. Con los datos de que disponemos, no podemos desvelar la influencia que la concentración de FUCOIDAN pueda tener sobre las células viables no cultivables (VNC) o muertas de *H. pylori*, ya que para todos los niveles de concentración

estudiados y tras 5 días de incubación, se observa la pérdida completa de viabilidad atribuida al efecto bactericida del FUCOIDAN y/o a la conversión de las formas helicoidales en cocoides. Sin embargo, el efecto bactericida y/o inhibitor del compuesto FUCOIDAN del alga *Macrocystis pyrifera* frente a *H. pylori* para una temperatura de incubación de 8 °C, depende significativamente (p -value ≤ 0.05) del tiempo de exposición.

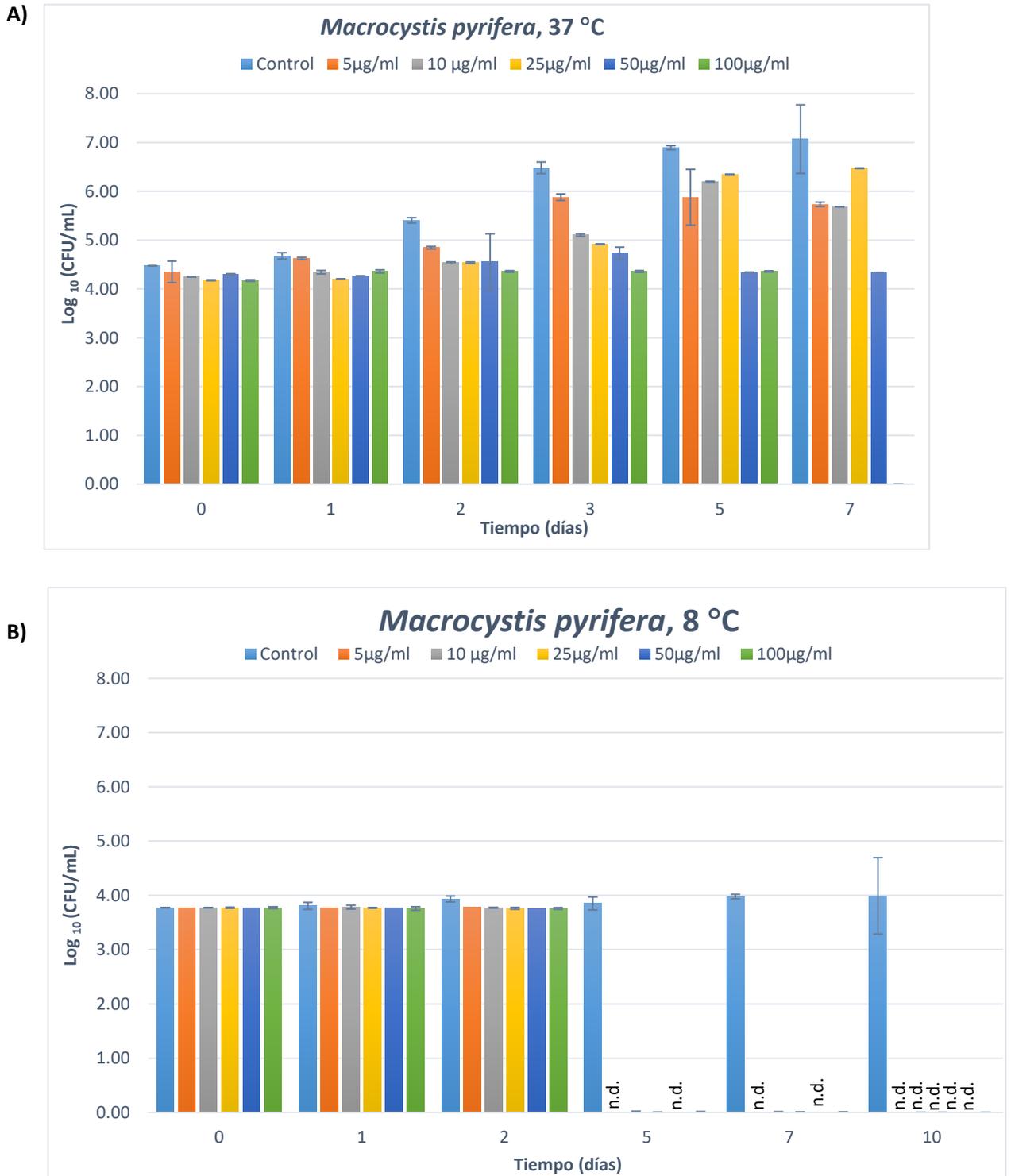


Figura 12. Resultados obtenidos en los estudios de crecimiento para *Helicobacter pylori* en Muller Hinton Broth (MHB) suplementado con FUCOIDAN procedente del alga *Macrocystis pyrifera* a concentraciones en el intervalo 5-100 µg/mL, ver versus los resultados obtenidos en el sustrato control (MHB no suplementado).

4.2 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DEL COMPUESTO FUCOIDAN PROCEDENTE DEL ALGA *UNDARIA PINNATIFIDA* FRENTE A *HELICOBACTER PYLORI*.

En la figura 13 se presentan los resultados relativos a los estudios de crecimiento para *H. pylori* en medio suplementado con fucoidan a distintas concentraciones [5-100] µg/mL, procedente del alga *Undaria pinnatifida*. En base a los resultados obtenidos, es posible concluir que el compuesto FUCOIDAN ejerce un marcado efecto BACTERICIDA frente al patógeno en estudio, para todas las concentraciones estudiadas. Tanto la variable “concentración de FUCOIDAN añadida al medio”, como la variable “tiempo de exposición”, afectan significativamente ($p\text{-value} \leq 0.05$) al efecto antimicrobiano ejercido por dicho compuesto bioactivo.

A la temperatura de 37 °C, a tiempos cortos de exposición (24 h), únicamente las concentraciones elevadas de fucoidan muestran efecto BACTERICIDA. Si bien tras 24 h de exposición al compuesto FUCOIDAN el efecto bactericida obtenido para las concentraciones de 50-100 µg/mL presenta una gran desviación, no resultando estadísticamente significativo, sí se trata de un efecto que marca tendencia. A medida que aumenta el tiempo de exposición a dicho compuesto en el medio se observa un marcado efecto bactericida, mayor a concentraciones más altas de fucoidan. Así, tras 48 h de exposición al compuesto fucoidan, las concentraciones de 25-50 µg/mL consiguen reducir la concentración de células VC de *H. pylori* en 2.30 ± 0.25 ciclos \log_{10} , no existiendo diferencias significativas entre el efecto observado a ambas concentraciones. Además, para este mismo periodo de incubación, la exposición a 100 µg/ml de fucoidan ejerce un efecto bactericida completo, permaneciendo el recuento de células VC por debajo del límite de detección (efecto bactericida equivalente a 4.10 ± 0.12 ciclos \log_{10}).

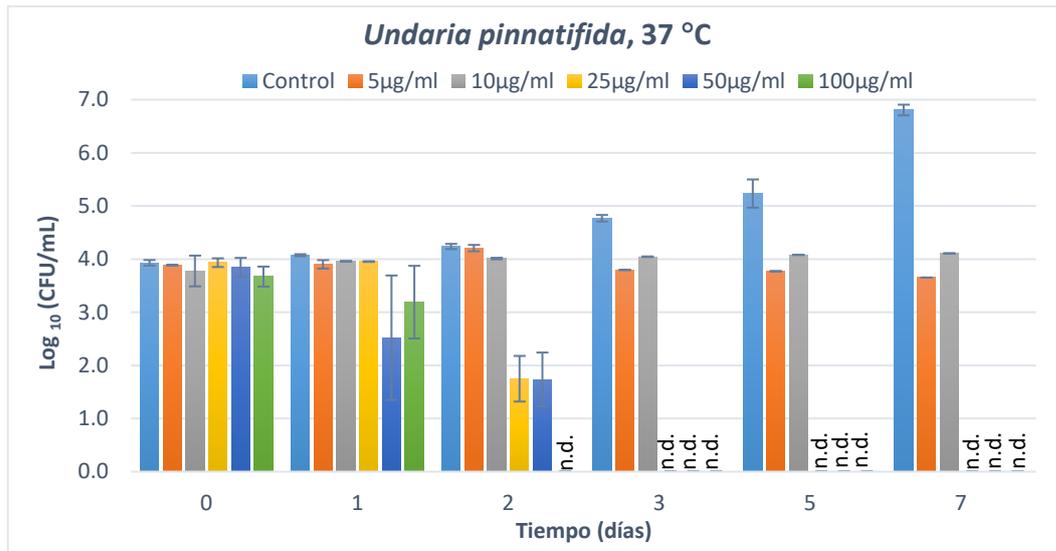
En las suspensiones conteniendo 5-10 µg/mL de fucoidan, los recuentos microbianos se mantienen en valores próximos a 4 ciclos \log_{10} durante el periodo completo de incubación (7 días), ejerciendo por tanto un marcado efecto bacteriostático en el crecimiento del patógeno, si lo comparamos con el crecimiento observado en el sustrato control (MHB no suplementado con fucoidan) (6.85 ± 0.24 ciclos \log_{10} , tras 7 días de incubación – 37 °C).

Para un tiempo de contacto de 3 días, las concentraciones de 25, 50 y 100 µg/ml reducen completamente la población de células VC de *H. pylori*, alcanzando reducciones de 4.85 ± 0.12 ciclos \log_{10} a 6.85 ± 0.24 ciclos \log_{10} con respecto al control, tras 7 días de incubación a 37 °C.

Como se ha comentado previamente, a la temperatura de 8 °C *H. pylori* no es capaz de crecer, sin embargo mantiene viabilidad en el sustrato control (MHB) durante el periodo completo de incubación (10 días). Sin embargo, a 8 °C, y tras 24 h de exposición a fucoidan destaca el efecto bactericida observado para 25 µg/mL, equivalente a 2.10 ± 0.10 ciclos \log_{10} . Para esta temperatura, tras 24 h de exposición a las concentraciones de 50 y 100 µg/mL, se alcanza una reducción completa en la concentración de células VC de *H. pylori*.

Tras 48 h de exposición a FUCOIDAN, los niveles de concentración final de *H. pylori* en el sustrato control y en el medio suplementado con 5 µg/mL FUCOIDAN no difieren significativamente. Sin embargo, concentraciones ≥ 10 µg/mL reducen por completo el número de células VC de *H. pylori* (valores de reducción próximos a 3.56 ± 0.64 ciclos \log_{10}).

A)



B)

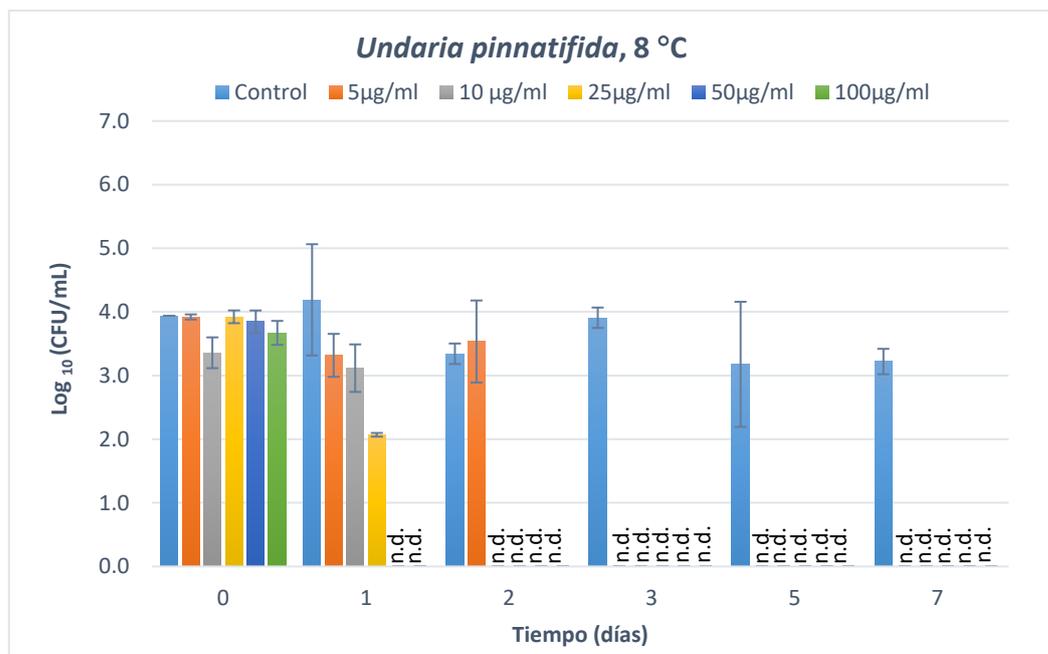


Figura 13. Resultados obtenidos en los estudios de crecimiento para *Helicobacter pylori* en Muller Hinton Broth suplementado con FUCOIDAN procedente del alga *Undaria pinnatifida* a concentraciones en el intervalo 5-100 µg/mL, versus los resultados obtenidos en el sustrato control (MHB no suplementado).

Para tiempos de exposición iguales o superiores a 3 días, todas las concentraciones de FUCOIDAN resultan BACTERICIDAS frente a *H. pylori*, no pudiendo determinar en qué medida una concentración resulta más efectiva que otra a medida que avanza el periodo de incubación.

Podemos concluir por tanto, que para el compuesto fucoidan procedente del alga *Undaria pinnatifida* se detecta tanto un efecto BACTERIOSTÁTICO (a 37 °C) como BACTERICIDA (a 37 y 8 °C) frente a *H. pylori*, siendo bacteriostático a las concentraciones de 5-10 µg/mL a 37 °C, y bactericida a las concentraciones [25-100] µg/mL a la misma temperatura. El efecto bactericida

del fucoidan se observa a la temperatura de 8 °C para todas las concentraciones en estudio [5-100] µg/mL (tiempo de exposición 3 días).

4.3 POTENCIAL ANTIMICROBIANO DEL COMPUESTO FUCOIDAN PROCEDENTE DEL ALGA *FUCUS VESICULOSUS* FRENTE A *HELICOBACTER PYLORI*.

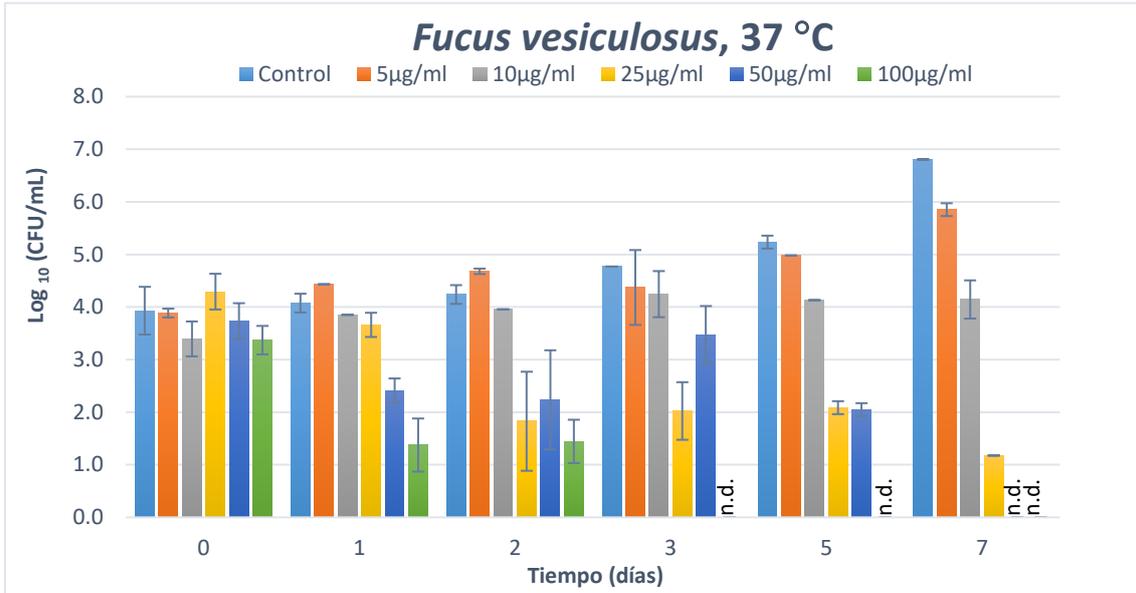
Se evaluó también el efecto antimicrobiano del compuesto FUCOIDAN procedente del alga *Fucus vesiculosus* frente a *H. pylori*. Los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento en MHB se presentan en la figura 14.

Como puede apreciarse, a la temperatura de 37 °C las concentraciones más bajas de fucoidan ([5-10] µg/mL) ejercen un marcado efecto BACTERIOSTÁTICO controlando el crecimiento de *H. pylori* durante el periodo completo de incubación (7 días). Dicho efecto bacteriostático es dependiente de la concentración, siendo inhibido el crecimiento de *H. pylori* en hasta 2.80 ± 0.07 ciclos \log_{10} en suspensiones conteniendo 10 µg/mL (7 días, 37 °C), alcanzando sólo 0.95 ciclos \log_{10} de inhibición para la concentración de 5 µg/mL (7 días, 37 °C).

A 37 °C, para concentraciones elevadas de fucoidan, 25, 50 y 100 µg/mL, el potencial antimicrobiano de este compuesto es BACTERICIDA. Tras 24 h de exposición a fucoidan, únicamente las concentraciones de 50-100 µg/ml presentan un marcado potencial BACTERICIDA frente a *H. pylori* equivalente a 1.60 ± 0.15 y 2.60 ± 0.24 ciclos \log_{10} , respectivamente. Tras 5 días de exposición a fucoidan las concentraciones de 25-50 µg/mL reducen en 2 ciclos \log_{10} el número de células VC de *H. pylori* – carga inicialmente inoculada. La concentración de 100 µg/mL resulta la más efectiva reduciendo por completo el número de células VC de *H. pylori* (3.55 ± 0.28 ciclos \log_{10}) en tan solo 3 días de contacto.

Los resultados obtenidos a 8 °C, para *H. pylori* en medio suplementado con fucoidan no han resultado consistentes para las concentraciones en el intervalo 5-10 µg/mL, ya que si bien parece que dicho compuesto resulta efectivo como BACTERICIDA a ambas concentraciones a partir de las 48 h de exposición, reduciendo hasta 2.10 ± 0.80 ciclos \log_{10} la carga microbiana inicialmente inoculada (condiciones 8 °C, 7 días de exposición a fucoidan), no ha sido posible determinar con precisión cuál de las dos concentraciones, o si las dos, resultan igualmente efectivas. A pesar de ello, es posible afirmar que tras 10 días de incubación, por exposición a fucoidan 5-10 µg/mL a 8 °C, se reduce completamente el número de células VC de *H. pylori* en MHB, alcanzando un efecto BACTERICIDA máximo de 3.71 ± 0.17 ciclos \log_{10} para ambas concentraciones.

A)



B)

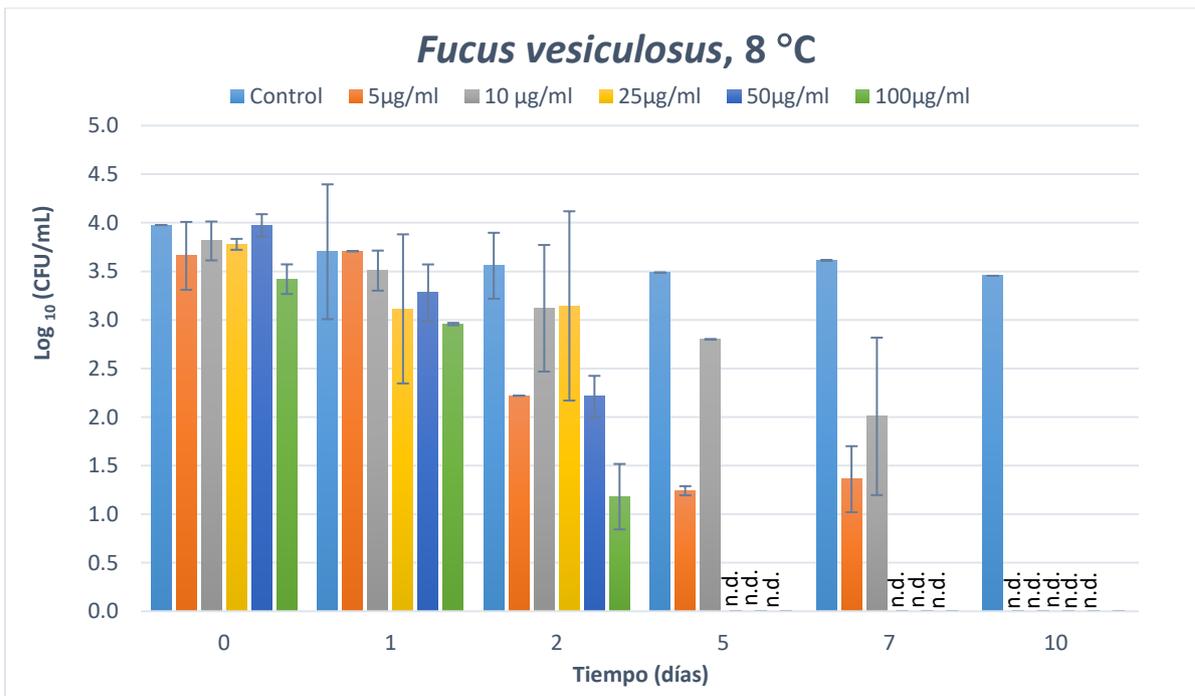


Figura 14. Resultados obtenidos en los estudios de crecimiento para *Helicobacter pylori* en Muller Hinton Broth suplementado con FUCOIDAN procedente del alga *Fucus vesiculosus* a concentraciones en el intervalo 5-100 µg/mL, versus los resultados obtenidos en el sustrato control (MHB no suplementado).

Concentraciones elevadas de FUCOIDAN en el rango 50-100 µg/mL, manifiestan efecto bactericida tras 48 h de exposición, equivalente a reducciones de 1.35 ciclos log y 2.20 ciclos log respectivamente, en los recuentos de células VC de *H. pylori*. Tras 5 días de incubación a 8 °C, en suspensiones conteniendo 25, 50 ó 100 µg/mL, el efecto bactericida observado es completo.

4.4. COMPARATIVA DE LA EFECTIVIDAD DEL FUCOIDAN EN FUNCIÓN DEL ORIGEN: ESPECIES *MACROCYSTIS PYRIFERA*, *UNDARIA PINNATIFIDA* Y *FUCUS VESICULOSUS*.

Obtenidos y discutidos los resultados correspondientes al efecto antimicrobiano del fucoidan procedente de cada una de las especies de algas en estudio, considerando tanto la concentración como el tiempo de exposición de las células de *H. pylori* a dicho compuesto, procedemos a evaluar de forma comparativa la efectividad de las distintas especies en función de su potencial BACTERIOSTÁTICO Y/O BACTERICIDA. Para ello, se ha elaborado la tabla 3, incluyendo los valores de concentración mínima inhibitoria (requerida para inhibir (≥ 0.5 ciclos \log_{10}) el crecimiento del patógeno con respecto al crecimiento observado en el sustrato control) y concentración mínima bactericida (requerida para reducir (≥ 0.5 ciclos \log_{10}) el número de células VC de *H. pylori* por debajo de los valores inicialmente inoculados).

Tabla 3. Comparativa del potencial antimicrobiana del compuesto FUCOIDAN procedente de diversas especies de algas *Phaeophyceae*, en función de la temperatura.

<i>Especie de alga género Phaeophyceae</i>	<i>Temperatura de estudio</i>	
<i>Macrocystis pyrifera</i>	37 °C	8 °C
MIC	50µg/mL	-
MBC	100 µg/mL	5µg/mL
<i>Undaria pinnatifida</i>	37 °C	8 °C
MIC	5µg/mL	-
MBC	25 µg/mL	5µg/mL
<i>Fucus vesiculosus</i>	37 °C	8 °C
MIC	5µg/mL	-
MBC	25µg/mL	5µg/mL

Como puede apreciarse en la tabla, la efectividad del FUCOIDAN es significativamente superior a la temperatura de 8 °C, mostrando el fucoidan procedente de todas las especies de alga estudiadas efecto bactericida frente a *H. pylori* para la concentración de 5µg/mL a esta temperatura. Este hecho es posiblemente debido a la combinación de factores de estrés o barreras al crecimiento que supone la utilización combinada de dos inhibidores, temperaturas próximas a refrigeración (bajo las cuales *H. pylori* es incapaz de crecer) y la adición del FUCOIDAN, compuesto bioactivo con elevada capacidad antioxidante. Este comportamiento es similar al observado con otros compuestos altamente efectivos frente a este patógeno, y que demostraron previamente potencial antimicrobiano, como por ejemplo los arándanos, los aceites esenciales, ó la piel de manzana, entre otros, debido a que poseen componentes activos (polifenoles, carotenoides) capaces de inhibir el crecimiento del patógeno (Pina-Pérez *et al.*, 2017).

Sin embargo, no sólo el valor de MIC y MBC, sino tanto el potencial bactericida expresado en ciclos \log_{10} de reducción por efecto de FUCOIDAN, como el tiempo de exposición requerido para alcanzar dicho efecto, son ambos factores determinantes en cuanto a discernir qué especie de alga es más efectiva frente a *H. pylori*.

En la figura 15 se presenta una comparativa de los niveles de reducción en células VC de *H. pylori* (\log_{10} (UFC/mL) alcanzados bajo el efecto de las distintas especies de alga, a las concentraciones

definidas como mínimas bactericidas (concentración requerida para reducir la población de células VC de *H. pylori* en al menos 0.5 ciclos \log_{10}).

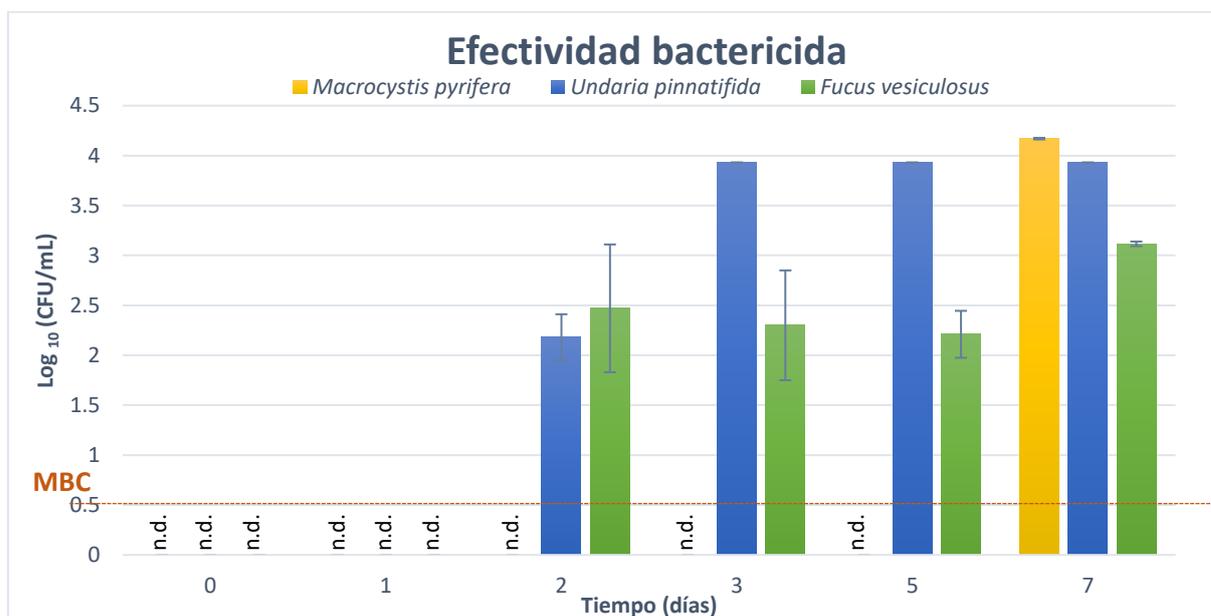


Figura 15. Efectividad bactericida de las diferentes especies de alga en estudio dependiendo del tiempo de exposición: *Macrocystis pyrifera* (MBC = 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *Undaria pinnatifida* (MBC = 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *Fucus vesiculosus* (MBC = 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

En función del valor obtenido para la MBC es posible afirmar que el compuesto FUCOIDAN procedente del alga *Macrocystis pyrifera* es de los tres estudiados el menos efectivo, siendo necesaria una concentración mínima de 100 mg/mL y un tiempo de contacto de 7 días, para obtener algún efecto bactericida sobre la población estudiada. De entre las especies *Undaria pinnatifida* y *Fucus vesiculosus*, si bien ambas presentan el mismo valor de MBC, idéntico tiempo de contacto, y valor de reducción (\log_{10} (CFU/mL)) en células VC de *H. pylori*, es el fucoidan procedente del alga *Undaria pinnatifida* la que para dicha concentración mínima bactericida (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), a medida que se incrementa el tiempo de exposición, incrementa efectividad, muy superior a la obtenida para el FUCOIDAN (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) procedente del alga *Fucus vesiculosus*, a iguales tiempos de exposición.

Tal efecto bactericida y bacterioestático del compuesto FUCOIDAN procedente del alga *Undaria pinnatifida* puede ser debido a que la concentración de éste en el alga sea la adecuada para producir tal efecto ya sea por los componentes monoméricos, el tamaño molecular, el sitio de sulfatación, el motivo estructural específico, el grado de determinación de la ramificación... (Patel, 2012)

Los compuestos responsables de dicha actividad antimicrobiana son los ácidos grasos, compuestos lipofílicos y fenólicos, lectina y los metabolitos secundarios como terpenos, alcaloides, polifenoles halogenados, isoprenoides y peróxidos de hidrogeno. Los compuestos fenólicos atacan las membranas de las paredes de los organismos patógenos, además inhiben sus funciones: transporte de electrones, captación de nutrientes, síntesis de ácidos nucleicos y proteínas y la actividad enzimática (Mohamed *et al.*, 2007).

4.5. MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DE LOS RESULTADOS DE CRECIMIENTO OBTENIDOS A 37 °C PARA *H. PYLORI* EN MHB SUPLEMENTADO CON FUCOIDAN.

Los resultados obtenidos previamente en lo referente al crecimiento de *H. pylori* a 37 °C, en MHB (control) y MHB+FUCOIDAN muestran el potencial bacteriostático de este compuesto bioactivo, reduciendo la velocidad de crecimiento del patógeno, en función de la concentración añadida al medio. Por ello, se considera relevante llevar a cabo un estudio cinético en profundidad, mediante la obtención de los parámetros que definen el crecimiento para células de *H. pylori* bajo las distintas condiciones estudiadas, con el objetivo de establecer una objetiva comparación entre dichos parámetros, y determinar de qué forma el efecto BACTERIOSTÁTICO de este compuesto es también dependiente de la especie de alga considerada.

Los resultados de crecimiento obtenidos se ajustaron al modelo primario de Gompertz, y los parámetros “duración de la fase de latencia (λ)”, en días, y “ratio máximo de crecimiento (μ_{\max})”, en \log_{10} (CFU/mL)/día fueron estimados. Los resultados obtenidos para los diferentes parámetros, así como la bondad de los ajustes (coeficiente R^2 -ajustado y Mean Absolute Error (MAE)) se presentan en la tabla 4.

Para la especie *Macrocystis pyrifera*, si bien entre 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ no existen diferencias significativas en los valores del parámetro λ , al incrementar la concentración, pasando a 25 mg/mL , el valor de este parámetro aumenta significativamente. De igual modo, para la especie *Fucus vesiculosus*, el valor de duración de la fase de latencia aumenta significativamente con el incremento de concentración de fucoidan añadida al medio, pasando de 6.56 días a 5 $\mu\text{g/mL}$ a 13.85 días para 10 $\mu\text{g/mL}$. Dicho incremento en la fase de latencia, a también acompañado de una reducción en el ratio máximo específico de crecimiento (μ_{\max}).

Bajo idénticas condiciones de cultivo, a la misma temperatura (37 °C) y con idéntica concentración de fucoidan añadida al medio (10 $\mu\text{g/mL}$), podemos concluir que el compuesto fucoidan procedente tanto del alga *Undaria pinnatifida* como de *Fucus vesiculosus*, presentan un mayor potencial BACTERIOSTÁTICO, que el fucoidan procedente del alga *Macrocystis pyrifera*, con valores más elevados para el parámetro λ , y valores más bajos para el parámetro μ_{\max} . Si comparamos el potencial bacteriostático de las dos especies más efectivas *Fucus vesiculosus* y *Undaria pinnatifida*, observamos que, si bien no existen diferencias significativas en los valores del parámetro λ entre ambas especies, sí es el valor de μ_{\max} significativamente más bajo para el compuesto FUCOIDAN procedente del alga *Undaria pinnatifida*. Si atendemos también a los valores de MIC, necesaria para impedir el crecimiento efectivo de *H. pylori* en el medio (ver tabla 4), observamos también como dicha concentración es igual a 5 $\mu\text{g/mL}$ para el FUCOIDAN del alga *Undaria pinnatifida*, y es igual a 10 $\mu\text{g/mL}$ para el mismo compuesto procedente del alga *Fucus vesiculosus*.

Se concluye por tanto, el mayor potencial bacteriostático del alga *Undaria pinnatifida* frente a *H. pylori* a la temperatura óptima de crecimiento de este patógeno.

Tabla 4. Parámetros cinéticos obtenidos en los estudios de crecimiento para *Helicobacter pylori* en Muller Hinton Broth suplementado con FUCOIDAN a distintas concentraciones, procedente de diferentes especies de algas *Phaeophyceae*: *Macrocystis pyrifera*, *Undaria pinnatifida*, y *Fucus vesiculosus*.

	Control MHB	MHB + 5 µg/mL			MHB + 10 µg/mL			MHB + 25 µg/mL		
		<i>Macrocystis pyrifera</i>	<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Fucus vesiculosus</i>	<i>Macrocystis pyrifera</i>	<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Fucus vesiculosus</i>	<i>Macrocystis pyrifera</i>	<i>Undaria pinnatifida</i>	<i>Fucus vesiculosus</i>
A	4.47±0.06	4.40±0.12	-	4.09±0.03	4.26±0.09	2.17±0.02	0.59±0.03	4.18±0.09	-	-
C	2.10±0.11	1.44±0.25	-	19.99±2.36	1.64±0.03	2.00±0.11	3.88±0.10	1.30±0.02	-	-
B	4.03±2.09	0.92±0.08	-	0.11±0.03	0.72±0.01	0.31±0.03	0.22±0.02	1.01±0.04	-	-
M	1.00±0.08	2.01±0.23	-	15.05±1.11	2.08±0.03	5.24±0.06	6.15±0.12	2.07±0.06	-	-
λ (días)	0.75±0.02 ^a	1.06±0.09 ^b	-	6.56±0.45 ^c	1.09±0.08 ^b	12.12±1.03 ^d	13.85±1.22 ^d	1.68±0.06 ^e	-	-
µ _{máx} (Log ₁₀ (CFU/mL))/días	3.11±0.23 ^a	0.48±0.02 ^b	-	0.82±0.16 ^c	0.43±0.06 ^b	0.22±0.02 ^e	0.32±0.04 ^f	0.48±0.05 ^b	-	-
R ² -ajustado	0.987	0.975	-	0.947	0.957	0.948	0.978	0.999	-	-
MAE	0.086	0.092	-	0.188	0.098	0.130	0.007	0.005	-	-

MAE: Mean Absolute Error.

^{a-f}: Diferencias significativas entre valores comprendidos en la misma fila

5. CONCLUSIONES

1. Los resultados de este estudio revelan la existencia de potencial antimicrobiano evidente del compuesto FUCOIDAN frente a *H. pylori*, para todas las especies de alga estudiadas.
2. Todos los factores considerados: concentración de fucoïdan, temperatura de incubación y tiempo de exposición, afectan significativamente el resultado bacteriostático y/o bactericida (niveles de crecimiento/viabilidad/muerte de *H. pylori*) detectado. La combinación de temperaturas de refrigeración junto con la adición de fucoïdan al medio resultó altamente efectiva en el control de este patógeno, siendo la MBC igual a 5 µg/mL, para todas las especies consideradas.
3. Se observa una marcada influencia del origen del FUCOIDAN (especie de la cual se extrae el compuesto) en el efecto observado: El fucoïdan procedente, tanto de *Macrocystis pirifera* como de *Undaria pinnatifida* y *Fucus vesiculosus*, muestra una efectividad tanto mayor cuanto mayor es el tiempo de exposición, y la concentración añadida al medio, reduciendo la viabilidad (efecto bactericida) y crecimiento del patógeno (efecto bacteriostático). El fucoïdan procedente del alga *Undaria pinnatifida* resulta el más efectivo frente a *H. pylori* con una MIC y MBC de 5 mg/mL y 25 mg/mL, respectivamente a 37 °C.
4. Los resultados obtenidos en el presente estudio abren nuevas vías de investigación en el campo del uso de antimicrobianos naturales de origen marino frente a *H. pylori* como posible alternativa futura al uso de antibióticos sintéticos, frente a los que este patógeno está generando resistencias.

5. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANSARI, S. and YAMAOKA, Y. (2017) Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. *Helicobacter.*, 22:e12386.
- ARGENT, R.H.; KIDD, M.; OWEN, R.J.; THOMAS, R.J.; LIMB; M.C. and ATHERTON, J.C. (2004). Determinants and consequences of different levels of cagA phosphorylation for clinical isolates of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterol.*, 127: 514–523.
- AXON, A. (2014). *Helicobacter pylori* and Public Health. *Helicobacter.*, 19 (S1): 68-73.
- BAYONA ROJAS, M. A. (2013). Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori*. *Rev Col Gastroenterol.*, 28: 94-99.
- BLACK, W.A.P.; DEWAR, E.T. and WOODWARD, F.N. (1952). Manufacture of algal chemicals. IV. -Laboratory-scale isolation of fucoxanthin from brown marine algae. *J Sci Food Agric.*, 3: 122–129.
- BONIFÁCIO VIDAL, B.; APARECIDO DOS SANTOS RAMOS, M.; BENTO DA SILVA, P. and MARIA BAUAB T. (2014). Antimicrobial activity of natural products against *Helicobacter pylori*: a review. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, 13: 54.
- CAVALIER-SMITH, T. (2002). The neomuran origin of archaeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 52: 7 – 76.
- COSTA, L.S.; TELLES, C.B.; OLIVEIRA, R.M.; NOBRE, L.T.; DANTAS-SANTOS, N.; CAMARA, R.B.; COSTA, M.S.; ALMEIDA-LIMA, J.; MELO-SILVEIRA, R.F.; ALBUQUERQUE, I.R.; LEITE, E.L. and ROCHA H.A. (2011). Heterofucan from *Sargassum filipendula* induces apoptosis in HeLa cells. *Mar Drugs.*, 9: 603–614.
- COTTICELLI, L.; BORRELLI, M.; D'ALESSIO, A.C.; MENZIONE, M.; VILLANI, A.; PICCOLO, G.; MONTELLA, F.; IOVENE, M.R.M. and ROMANO, M. (2006). Central serous chorioretinopathy and *Helicobacter pylori*. *Eur J Ophthalmol.*, 16 (2): 274-278.
- DI MARIO, F.; ARAGONA, G.; DAL BÓ, N.; CAVALLARO, L.; MARCON, V.; OLIVIERI, P.; BENEDETTI, E.; ORZÈS, N.; MARIN, R.; TAFNER, G.; CHILOVI, F.; DE BASTIANI, R.; FEDRIZZI, F.; FRANCESCHI, M.; SALVAT, M.H.; MONICA, F.; PIAZZI, L.; VALIANTE, F.; VECCHIATI, U.; CAVESTRO, G.M.; COMPARATO, G.; IORI, V.; MAINO, M.; LEANDRO, G.; PILOTTO, A.; RUGGE, M. and FRANZÈ A. (2006). Bovine lactoferrin for *Helicobacter pylori* eradication: an open, randomized, multicentre study. *Aliment Pharmacol Ther.*, 23: 1235-1240.
- DOIG, P.; DE JONGE, B.L.; ALM, R.A.; BROWN, E.D.; URIA-NICKELSEN, M.; NOONAN, B.; MILLS, S.D.; TUMMINO, P.; CARMEL, G.; GUILD, B.C.; MOIR, D.T.; VOVIS, G.F. and TRUST, T.J. (1999). *Helicobacter pylori* Physiology Predicted from Genomic Comparison of Two Strains. *Microbiol Mol Biol Rev.*, 63(3): 675-707.

- DOURAGHI, M.; KASHANI, S.; ZERAATI, H.; ESMAILI, M.; OGHALAIE, A. and MOHAMMA-DI, M. (2010). Comparative evaluation of three supplements for *Helicobacter pylori* growth in liquid culture. *Current Microbiol.*, 60(4): 254-262.
- DORER, M.S.; TALARICO, S. and SALAMA, N.R. (2009). *Helicobacter pylori's* unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog.*, 5(10): e1000544.
- DOS SANTOS, E.A.J. (2007). Estudio del comportamiento cinético de microorganismos de interés en seguridad alimentaria con modelos matemáticos. Tesis Doctoral en Ciencia de los Alimentos. Universitat Autònoma De Barcelona. 282 pp.
- EGAN, B.J.; KATICIC, M.; CONNOR, H.J.O. and MORAIN, C.A.O. (2007). Treatment of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.*, 12: 31–37.
- EUSEBI, L.H.; ZAGARI, R.M. and BAZZOLI, F. (2014). Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter.*, 19 (Sup 1): 1-5.
- FERNÁNDEZ, M.; CONTRERAS, M.; SUÁREZ, P.; GUENEAU, P. and GARCÍA-AMADO, M.A. (2007). Use of HP selective medium to detect *Helicobacter pylori* associated with other enteric bacteria in seawater and marine molluscs. *Lett Appl Microbiol.*, 45: 218-213.
- FERNÁNDEZ-DELGADO, M.; CONTRERAS, M.; GARCÍA-AMADO, M.A.; MICHELANGELI, F. y SUÁREZ, P. (2008). Evidencias de la transmisión acuática de *Helicobacter pylori*. *Interciencia.*, 33(6): 412-417.
- FIGUEIREDO, C.; MACHADO, J.C.; PHAROAH, P.; SERUCA, R.; SOUSA, S.; CARVALHO, R.; CAPELINHA, A.F.; QUINT, W.; CALDAS, C.; VAN DOORN, L.J.; CARNEIRO, F. and SOBRINHO-SIMÕES, M. (2002). *Helicobacter pylori* and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst.*, 94: 1680–1687.
- FUJIMURA, S.; KAWAMURA, T.; KATO, S.; TATENO, H. and WATANABE, A. (2002). Detection of *Helicobacter pylori* in cow's milk. *Lett Appl Microbiol.*, 35: 504–507.
- GISBERT, J.P. and PAJARES, J.M. (2005). *Helicobacter pylori* "rescue" therapy after failure of two eradication treatments. *Helicobacter.*, 10: 363-72.
- GOODWIN, C.S. and ARMSTRONG, J.A. (1990). Microbiological aspects of *Helicobacter pylori* (*Campylobacter pylori*). *Eur J Clin Microbiol.*, 9: 1-13.
- GUTTNER, Y.; WINDSOR, H.M.; VIJALA, C.H. and MARSHALL, B.J. (2003). Human recombinant lactoferrin is ineffective in the treatment of human *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.*, 17: 125-129
- HERNÁNDEZ, T.M. (2001). *Helicobacter pylori*. La bacteria que más afecta al ser humano. *Rev Cubana Aliment Nutr.*, 15(1): 42-54.
- KARIM, Q.N. and MAXWELL, R.H. (1989). Survival of *Campylobacter pylori* in artificially contaminated milk. *J Clin Pathol.*, 42(7): 778.

- KUSTERS, J.G.; ARNOUD, H. M.; VAN, V. and ERNST, J. K. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin Microbiol Rev.*, 19(3): 449–490.
- LEE, J.B.; HAYASHI, K.; HASHIMOTO, M.; NAKANO, T. and HAYASHI, T. (2004). Novel antiviral fucoidan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* (Mekabu). *Chem. Pharm. Bull.*, 52: 1091–1094.
- LI, B.; LU, F.; WEI, X. and ZHAO, R. (2008). Fucoidan: structure and bioactivity. *Molecules*, 13: 1671–1695.
- LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLARUTRE, Visto el 05-06-2018 <http://www.bacterio.net/helicobacter.html>
- MATSUSHIMA, M.; SUZUKI, T.; MASUI, A.; KASAI, K.; KOUCHI, T.; TAKAGI, A.; SHIRAI, T. and MINE, T. (2008). Growth inhibitory action of cranberry on *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol Hepatol.*, 23 Suppl 2: S175-S180.
- MCMEEKIN, T.A.; OLLEY, J. and ROSS, T. (1993) Predictive microbiology: Theory and application. Ed. Research studies press. Taunton. 340 pp.
- MÉGRAUD, F. (1995). Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Clin Gastroenterol.*, 9: 18- 507.
- MOHAMED, S.; HASHIM, S.N. and RAHMAN, H.A. (2012). Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. *Trends Food Sci Technol.*, 23(2): 83–96.
- NISHINO, T.; NISHIOKA, C. and URA, H. (1994). Isolation and partial characterization of a novel amino sugar-containing fucan sulfate from commercial *Fucus vesiculosus* fucoidan. *Carbohydr Res.*, 255: 213–224.
- NOSTRO, A.; CELLINI, L.; DI BARTOLOMEO, S.; DI CAMPLI, E.; GRANDE, R.; CANNATELLI M.A., MARZIO, L. and ALONZO, V. (2005). Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. *Phytother Res.*, 19: 198-202.
- O’GARA, E.A.; MASLIN, D.J.; NEVILL, A.M. and HILL, D.J. (2008). The effect of simulated gastric environments on the anti-*Helicobacter* activity of garlic oil. *J Appl Microbiol.*, 104: 1324-1331.
- OHNO, T.; KITA, M.; YAMAOKA, Y.; IMAMURA, S.; YAMAMOTO, T.; MITSUFUJI, S.; KODAMA, T.; KASHIMA, K. and IMANISHI, J. (2003). Antimicrobial activity of essential oils against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter.*, 8: 207-215.
- OMS. (2017). Visto el 05-06-2018. <http://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

- PALOMINO, C. and TOMÉ, E. (2012). *Helicobacter pylori*: Rol del agua y los alimentos en su transmisión. *An Venez Nutr.*, 25(2): 85 - 93.
- PAPAGIANNAKIS, P.; MICHALOPOULOS, C.; PAPALEXI, F.; DALAMPOURA, D. and DIAMANTIDIS, M.D. (2013). The role of *Helicobacter pylori* infection in haematological disorders. *Eur J Intern Med.*, 24 (8): 685-690.
- PASTENE, E.; SPEISKY, H.; TRONCOSO, M.; ALARCÓN, J. and FIGUEROA, G. (2009). In vitro inhibitory effect of apple peel extract on the growth of *Helicobacter pylori* and respiratory burst induced on human neutrophils. *J Agric Food Chem.*, 57: 7743-7749.
- PATANKAR, M.S.; OEHNINGER, S. and BARNETT, T. (1993). A revised structure for fucoidan may explain some of its biological activities. *J Biol Chem.*, 268: 21770–21776.
- PATEL, S. (2012). Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. *Biotech.*, 2: 171–185.
- PINA-PÉREZ, M.C.; RIVAS, A.; MARTÍNEZ, A. and RODRIGO, D. (2017). Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. *Food Chem.*, 235: 34-44.
- POMS, R.E. and TATINI, S.R. (2001). Survival of *Helicobacter pylori* in ready-to-eat foods at 4 °C. *Inter J Food Microbiol.*, 63: 281–286.
- SANTIAGO, P.; MORENO, Y. and FERRUS, M.A. (2015) Identification of Viable *Helicobacter pylori* in Drinking Water Supplies by Cultural and Molecular Techniques. *Helicobacter.*, 20: 252–259.
- TAKEUCHI, H.; TRANG, V.; MORIMOTO, N.; NISHIDA, Y.; MATSUMURA, Y. and SUGIURA, T. (v). (2014). Natural products and food components with anti- *Helicobacter pylori* activities. *World J. Gastroenterol.*, 20(27): 8971-8978.
- TIAGO, S.H.; ALVES, A.; POPA, E.G.; REYS L.L.; GOMES, M.E.; SOUSA, R.A.; SILVA, S.S.; MANO, J.F. and REIS RL. (2012) Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches. *Biomatter.*, 2(4): 278-289.
- VENERITO, M.; NARDONE, G.; SELGRAD, M.; ROKKAS, T. and MALFERTHEINER, P. (2014). Gastric cancer-epidemiologic and clinical aspects. *Helicobacter.*, 19(1): 32-37.
- WANG, F.; MENG, W.; WANG, B. and QIAO, L. (2014). *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation and gastric cancer. *Cancer Lett.*, 345 (2): 196-202.
- ZHANG, W.; ODA, T.; YU, Q. and JIN, J.O. (2015). Fucoidan from *Macrocystis pyrifera* has powerful immune-modulatory effects compared to three other fucoidans. *Mar Drugs.*, 13: 1084–1104.