



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



iata
Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos



INSTITUTO DE INGENIERÍA DE
ALIMENTOS PARA EL DESARROLLO

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA



EFECTO ANTIMICROBIANO DEL COMPUESTO BIOACTIVO FUCOIDAN FRENTE A Listeria monocytogenes

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN GESTIÓN DE
LA SEGURIDAD Y CALIDAD ALIMENTARIA

ALUMNA: Gabriela del Carmen Poveda Castillo

TUTOR ACADEMICO: Antonio Martínez

COTUTORA: Dolores Rodrigo

DIRECTORA EXPERIMENTAL: M^a Consuelo Pina Pérez

Curso Académico: 2016-2017

VALENCIA, JULIO 2017



EFECTO ANTIMICROBIANO DEL COMPUESTO BIOACTIVO FUCOIDAN FRENTE A *Listeria monocytogenes*

Gabriela del Carmen Poveda Castillo; M. Consuelo Pina Pérez¹; Antonio Martínez²; Dolores Rodrigo²

RESUMEN

El uso de antimicrobianos naturales procedentes de plantas, animales y microorganismos, ha sido propuesto como estrategia válida frente a algunos de los más relevantes patógenos de interés en alimentos. Ante la necesidad de realizar un uso eficiente y sostenible de los recursos, el uso de compuestos naturales procedentes de algas emerge actualmente como una valiosa alternativa para dar solución a los muchos problemas tecnológicos, de salud y alimentación a los que se enfrenta la sociedad creciente de nuestros días. Los resultados de este trabajo revelan el potencial bacteriostático y bactericida obtenido *in vitro* para el compuesto fucoidan del alga *Fucus vesiculosus* frente a *Listeria monocytogenes*. El potencial antimicrobiano de este compuesto resultó significativamente dependiente de la concentración [5-1000] µg/mL, de la temperatura [8-37] °C de incubación, y del tiempo de exposición [0-12] días. Los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC) para el fucoidan en medio de referencia (Müller-Hinton Broth) fueron de 5 y 100 µg/mL respectivamente, a 37 °C. A la temperatura de refrigeración, la MBC para este compuesto bioactivo en zumo de manzana fue de 1000 µg/mL.

RESUM

L'ús d'antimicrobians naturals procedents de plantes, animals i microorganismes ha estat proposat com una estratègia apropiada per fer front a molts dels microorganismes patògens de major rellevància en aliments. Amb la necessitat de fer un ús eficient y sostenible dels recursos, l'ús de compostos naturals procedents d'algues sorteix avui com una valuosa alternativa per donar solució a molts dels problemes tecnològics, de salut, i d'alimentació als que s'enfronta la població creixent dels nostres dies. Els resultats d'aquest treball revelen el potencial bacteriostàtic i bactericida obtingut *in vitro* per al compost fucoidan procedent del alga *Fucus vesiculosus* front *Listeria monocytogenes*. El potencial antimicrobià d'aquest compost va resultar significativament dependent tant de la concentració [5-1000] µg/mL, com de la temperatura [8-37] °C, i del temps d'exposició [0-12] dies. Els valors de Concentració Mínima Inhibitòria (MIC) i Concentració Mínima Bactericida (MBC) per al fucoidan en el medi de referència (Müller-Hinton Broth) foren

¹ Centro Avanzado de Microbiología de Alimentos (CAMA). Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022, Valencia.

² Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA). Carrer del Catedràtic Agustín Escardino Benlloch, 7, 46980 Paterna, València.



de 5 i 100 µg/mL, respectivament a 37 °C. A la temperatura de refrigeració la MBC per a aquest compost bioactiu en suc de poma va ser de 1000 µg/mL.

ABSTRACT

The use of natural antimicrobials derived from plants, animals and microorganisms, has been proposed as a valid strategy against the most relevant foodborne pathogens. Considering the need to carry out an efficient and a sustainable use of resources, the use of natural compounds from algae emerges as a valuable alternative to solve most of the technological, health, and alimentary problems that the growing population faces nowadays. The results in this research work reveal the bacteriostatic and bactericidal *in vitro* potential of fucoidan from the algae *Fucus vesiculosus* against *Listeria monocytogenes*. The antimicrobial potential of this compound was significantly dependent on the concentration [5-1000] µg/mL, the temperature [8-37] °C, and the exposure time [0-12] days. At 37 °C, in reference medium (Müller-Hinton Broth), the fucoidan Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values were 5 and 100 µg/mL respectively. At refrigeration temperature the MBC of this bioactive compound in apple juice was 1000 µg/mL.

PALABRAS CLAVE: Fucoidan, *Fucus vesiculosus*, *Phaeophyceae*, *Listeria monocytogenes*, zumo de manzana, antimicrobiano.

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, millones de personas enferman y muchas de ellas mueren al consumir alimentos contaminados con microorganismos patógenos causantes de enfermedades de transmisión alimentaria (Kim et al., 2017). Según recientes informes emitidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), anualmente se producen hasta 600 millones de casos de enfermedades de transmisión alimentaria y 420 mil muertes en todo el mundo (WHO, 2014; Dawoud et al., 2017).

El gran número de casos de enfermedades transmitidas por alimentos, particularmente aquellas causadas por bacterias, parásitos, y virus genera una gran preocupación en la comunidad científica, e industrial, a nivel internacional, impulsando la puesta en marcha de políticas e investigaciones innovadoras que sean capaces de prevenirlas y controlarlas.

Entre los microorganismos patógenos alimentarios de mayor interés en nuestros días destaca *Listeria monocytogenes*. Se trata de un patógeno responsable de crecientes problemas en las industrias alimentarias de todo el mundo (Liu et al., 2016) debido a sus particulares características: puede sobrevivir en un amplio rango de temperaturas (2 - 45 °C), pH (4.0 - 9.6), y alta salinidad (de hasta un 10%) (Gandhi y Chikindas, 2007; Smith et al., 2013; Colagiorgi et al., 2016). Además, este microorganismo es capaz de sobrevivir y proliferar bajo condiciones de refrigeración (2 - 4 °C), algo que junto a su capacidad de formar biofilms, representa el principal problema de control para la industria alimentaria (Abeyundara et al., 2017; FDA, 2012).

L. monocytogenes ha sido aislada fundamentalmente de alimentos frescos (vegetales, zanahorias, pepinos, calabaza, lechuga, y frutas), quesos blandos, productos lácteos, patés y salchichas, pescado ahumado, mariscos, ensaladas, productos "delicatessen", vegetales, zumos y de productos refrigerados listos para el consumo (ready-to-eat, RTE), es decir, productos que se consumen directamente sin cocinar (Buchanan et al., 2017; EFSA, 2015; FDA, 2012; Vázquez-Boland et al., 2001), o pasteurizados - refrigerados. Además, la prevalencia de este microorganismo en los productos RTE, se encuentra entre el 1% y el 13% (Jofré et al., 2016).

Las manifestaciones de la infección por *L. monocytogenes* dependen de varios factores, entre ellos, las características del huésped, la dosis ingerida y, la virulencia de la cepa considerada. En este sentido, *L. monocytogenes* puede causar dos tipos de enfermedades al ser humano. Una es la enfermedad gastrointestinal no invasiva, que en adultos saludables con sistemas inmunitarios intactos generalmente se resuelve sin consecuencias graves (FDA, 2012), puede no presentar síntomas o presentar síntomas leves, entre ellos, fiebre, dolores musculares, náuseas, vómitos y algunas veces diarrea, causando gastroenteritis febril aguda. En las poblaciones vulnerables, incluyendo, ancianos, niños, mujeres embarazadas, y adultos con sistemas inmunológicos debilitados como receptores de trasplantes, pacientes de cáncer y VIH (Colagiorgi et al., 2016; ECDC, 2016), se presenta la forma más severa de la enfermedad, la listeriosis invasiva. Esta manifestación de la

enfermedad ocurre como resultado del fracaso de la inmunidad mediada por células a nivel del hígado, lo que conduce a bacteriemia e invasión de otros órganos (Goulet et al., 2012). Las manifestaciones clínicas de la enfermedad invasiva con una elevada tasa de mortalidad son: septicemia, propagación de la infección al sistema nervioso causando meningitis, aborto involuntario, y muerte fetal (Silk et al., 2012; Jackson et al., 2010).

De acuerdo a los últimos datos publicados por el Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (ECDC), la listeriosis ha presentado una tasa de aumento constante en el periodo 2010-2015. En el 2015 se notificaron 2206 casos confirmados de esta infección, incluyendo 270 muertes con una tasa de 0,46 casos por 100 000 habitantes. Para este mismo año, la listeriosis resultó ser la infección por zoonosis con mayor tasa de hospitalización y mortalidad a nivel Europeo (EU), con un 97.4 % y 17,7 % respectivamente (ECDC, 2016). En Estados Unidos se reportan alrededor de 2500 casos de listeriosis por año, con una tasa de mortalidad entre el 20 % y 30 % (Zhu et al., 2017). Algunos de los más recientes casos de listeriosis grave se han dado en los últimos años, asociados al consumo de vegetales y frutas frescas o mínimamente procesadas: apio en Texas (2010), consumo de melón contaminado en Colorado (2011) y, recientemente, el brote asociado al consumo de manzanas de caramelo en California (2014) (Zhu et al., 2017).

La capacidad de este patógeno para formar biofilms en las pieles de frutas y vegetales (Abeyundara et al., 2017), generando de esta manera contaminación cruzada, o su capacidad de persistir en los zumos una vez macerada la fruta, incrementan el riesgo de que las células no inactivadas durante el proceso de pasteurización persistan durante el periodo de almacenamiento y/o comercialización en frío de este tipo de productos vegetales, saludables, y de gran atractivo para el consumidor.

En este contexto resulta especialmente importante la prevención y el control de *L. monocytogenes* en productos frescos y mínimamente procesados, comercializados en refrigeración, que todavía hoy representan un reto importante en seguridad alimentaria.

Antimicrobianos naturales

El uso de antimicrobianos es una práctica común en la industria alimentaria. Los antimicrobianos son compuestos químicos que están naturalmente presentes, o que son añadidos a los alimentos, envases de alimentos, superficies de contacto con alimentos o entornos de procesamiento de alimentos, para inhibir el crecimiento microbiano o eliminar completamente los microorganismos (AINIA, 2015). Este tipo de aditivo alimentario permite la conservación y prolongación de vida útil de los alimentos, mediante la inhibición o inactivación del crecimiento de microorganismos patógenos y alteradores (Davidson et al., 2015).

En este contexto, ante la necesidad de actuar de modo efectivo frente a la persistencia de los microorganismos patógenos en la industria alimentaria y combatir de modo eficiente la resistencia a los antibióticos que estos mismos patógenos están adquiriendo (Lungu et al., 2011), destaca la urgente necesidad de investigación de nuevos compuestos antimicrobianos que sean

realmente eficaces, de origen natural y cuya obtención y uso resulten sostenibles. Para estos nuevos compuestos antimicrobianos, se exige su carácter natural, que sustente el desarrollo y la formulación de productos frescos, mínimamente procesados, y libres de conservantes sintéticos (USDA-ERS, 2016) “*clean label*”, respondiendo a la demanda creciente del consumidor actual, bien informado y preocupado por su salud.

En este sentido, la comunidad científica internacional se centra desde hace años [2005-2016] en el estudio de compuesto bioactivos naturales que puedan prolongar la vida útil los alimentos perecederos, y garantizar su seguridad microbiológica, mejorando el valor nutricional y organoléptico del producto final.

Antimicrobianos de origen marino

Los antimicrobianos naturales han sido identificados y aislados de diversas fuentes que incluyen animales, plantas, hierbas, frutas, semillas, bacterias, hongos y organismos protistas (algas) (Gyawali y Ibrahim, 2014; Jaiswal y Jaiswal, 2014). Recientemente, los compuestos obtenidos a partir de algas han recibido una gran atención como origen de nuevas sustancias antimicrobianas, representando un nicho de investigación en nuestros días (Shannon y Abu-Ghannam, 2016; Pina-Pérez et al., 2017).

El potencial antimicrobiano de este tipo de compuestos bioactivos obtenidos a partir de las diferentes clases de algas *Phaeophyceae* (pardas), *Rhodophyceae* (rojas), *Chlorophyceae* (verdes), *Chrysophyceae* (doradas) y *Bacillariophyceae* (diatomeas) (figura 1) ha sido identificado por diversos grupos de investigadores, frente a bacterias patógenas (Gyawali y Ibrahim, 2014).

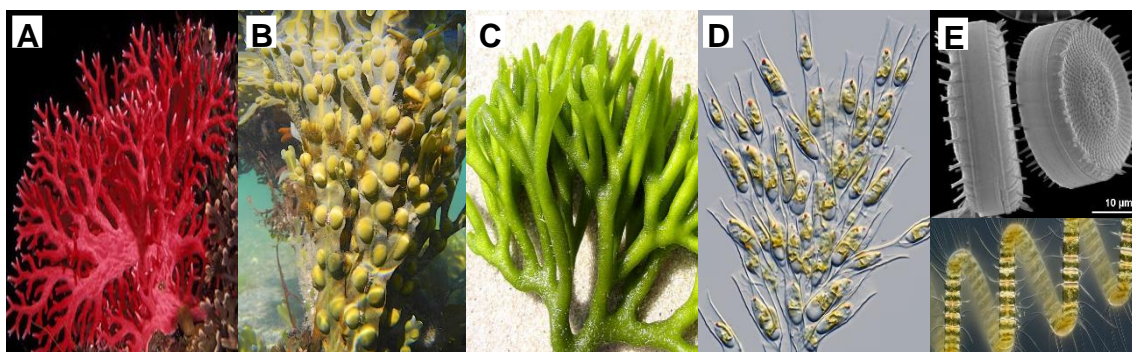


FIGURA 1. Ejemplos de diferentes clases de Algas. **A.** Rhodophyceae **B.** Phaeophyceae **C.** Chlorophyceae **D.** Chrysophyceae **E.** Bacillariophyceae

El efecto antimicrobiano de las algas ha sido atribuido a diferentes tipos de compuestos, entre ellos, polisacáridos, terpenos, ácidos orgánicos aromáticos, ácidos grasos poliinsaturados, proteínas y péptidos contenidos en los extractos algares (Qiao, 2010; Shannon y Abu-Ghannam, 2016). Estudios recientes llevados a cabo por Salem et al., (2011) demuestran la efectividad de diferentes extractos de algas pardas (*Cystoesira myrica*, *Cystoesira trinodis*, *Padina gymnospora*, *Sargassum dentifolium* y *Sargassum hystrix*);

rojas (*Actinotrichia fragilis*) y verdes (*Caulerpa racemosa* y *Codium fragile*) frente a un amplio rango de bacterias Gram positivas (*S. aureus* y *B. cereus*) y Gram negativas (*E. coli*, *E. feacalis*, *Salmonella sp.* y *P. aeruginosa*).

Polisacáridos extraídos de algas: fucoidan

Los polisacáridos son moléculas biológicas constituidas por polímeros de monosacáridos unidos mediante enlaces glucosídicos, cuya función principal es estructural y de reserva (Dumitriu, 2004). Diversos estudios postulan como mecanismo de acción antibacteriana de los polisacáridos obtenidos a partir de algas, la alteración de la pared celular y membrana citoplasmática bacteriana, ocasionada por la unión del polisacárido a receptores de glicoproteína en la superficie celular, hecho que desencadena la ruptura de la membrana y la fuga de material citoplasmático. Además, se han observado efectos antimicrobianos asociados a la ruptura del ADN bacteriano debido a la unión del mismo con el polisacárido algal (He et al., 2010; Shannon y Abu-Ghannam, 2016). Los polisacáridos obtenidos a partir de algas, especialmente los polisacáridos sulfatados como el fucano y la laminarina han sido utilizados con éxito en diversas aplicaciones farmacéuticas y dietéticas. Por ejemplo, en la administración de antibióticos orales para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Yu et al., 2015), así como también para evitar la adhesión de biofilms de *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica (Besednova et al., 2015).

Específicamente, las algas pardas del género *Phaeophyceae*, son muy ricas en polisacáridos, ácidos alginicos, laminarinas y fucanos sulfatados, principalmente, el fucoidan. Este último compuesto, el fucoidan, se encuentra en las paredes celulares de las algas pardas representando entre el 5% y el 40% del peso seco de este material vegetal (Silva et al., 2012). El compuesto fucoidan, es un tipo de carbohidrato sulfatado rico en fucosa y pequeñas proporciones de galactosa, manosa, xilosa, glucosa y ácidos urónicos (Pádua et al., 2015). Su estructura química es compleja (figura 2) y varía de acuerdo a la especie de alga marina de la que procede.

Numerosas publicaciones han demostrado las propiedades beneficiosas del fucoidan como anticoagulante, antitrombótico, antiviral, antitumoral, inmunomodulador, antioxidante y antiinflamatorio (Wang et al., 2010; De Jesus Raposo et al., 2015). Estas propiedades pueden variar, en mayor o menor intensidad en función del tamaño molecular, el grado de sulfatación, y de la geometría molecular del compuesto (Silva et al., 2012). Sin embargo, el potencial antimicrobiano del fucoidan, aunque prometedor, permanece hoy todavía escasamente estudiado frente a patógenos de origen alimentario. Marudhupandi y Thangappan (2013) evaluaron la capacidad antimicrobiana del fucoidan extraído de *Sargassum wightii* frente a dos patógenos Gram negativos de origen alimentario, *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae* obteniendo resultados efectivos, con valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) de 250 y 31.25 µg/mL, respectivamente.

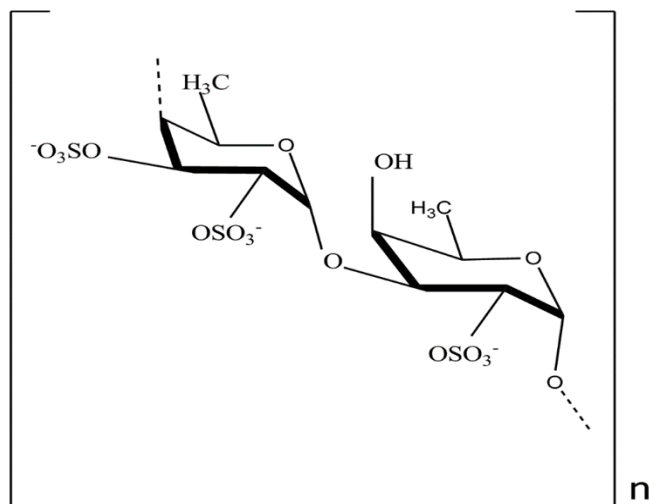


FIGURA 2. Estructura química del fucoidan
Fuente: Silva et al., 2012

Ahora bien, en lo que se refiere a la capacidad antimicrobiana del fucoidan frente a *L. monocytogenes*, aún no se ha reportado ningún tipo de resultado.

OBJETIVOS

El objetivo principal del presente estudio es determinar la capacidad antimicrobiana *in-vitro* del compuesto fucoidan del alga *Fucus vesiculosus* frente a *Listeria monocytogenes*. Para ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el comportamiento al crecimiento de *Listeria monocytogenes* en medio de referencia suplementado con fucoidan a distintas concentraciones, en el intervalo 5-1000 µg/mL, y bajo diferentes temperaturas de incubación, 8 y 37 °C.
- Determinar la influencia que las variables concentración, temperatura y tiempo de incubación ejercen en la capacidad antimicrobiana del compuesto fucoidan frente a *L. monocytogenes*.
- Validar los resultados obtenidos en medio de referencia utilizando un sustrato real, zumo de manzana pasteurizado y sometido a refrigeración, descrito como de riesgo por posible supervivencia de *L. monocytogenes*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismo

En el presente estudio se utilizó la cepa *Listeria monocytogenes* CECT 911 proporcionada por la colección Española de Cultivos Tipo (CECT). El cultivo liofilizado se re-vivió siguiendo para ello las instrucciones proporcionadas por

la CECT (figura 3). El contenido liofilizado de la cápsula fue disuelto en 0.2 mL de Caldo Triptona Soja (Tryptic Soy Broth, TSB) (SCharlab, Barcelona, Spain) y fue posteriormente transferido a 10 mL de TSB, e incubado en condiciones de agitación constante a 37 °C, durante 30 min. A continuación, el cultivo se dispuso en un matraz de 400 mL conteniendo TSB estéril, que fue incubado a 37 °C durante 16 h en agitación constante (200 rpm) hasta alcanzar fase estacionaria. Pasado este tiempo, el cultivo se repartió en tubos de centrifuga (250 mL) y se procedió a la centrifugación (4000 x g, 15 min, 4 °C) para separar el sobrenadante de la masa celular (precipitado). Se desechó el sobrenadante.

Las células recogidas por centrifugación fueron re-suspendidas en TSB estéril, garantizando así el lavado de las mismas (por duplicado). Tras la segunda centrifugación, las células fueron re-suspendidas en 20 mL de caldo TSB estéril y dispensadas en viales estériles de criocongelación de 2 mL, conteniendo TSB suplementado con glicerol al 20 %, en relación [1:1] (1 mL de suspensión celular; 1 mL (TSB+glicerol)). Los viales de 2 mL fueron inmediatamente congelados a -80 °C constituyendo así el stock de trabajo

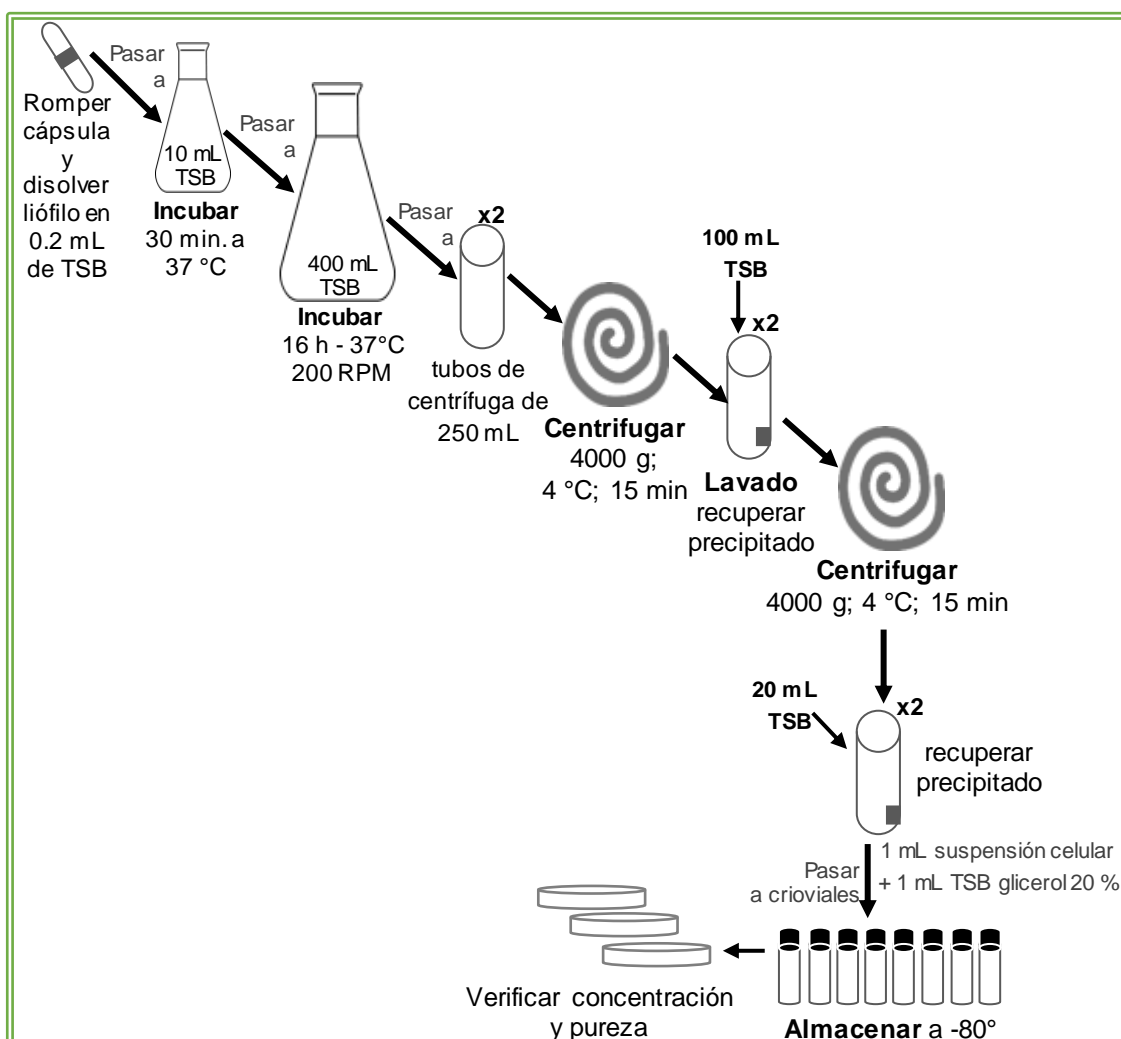


FIGURA 3. Esquema del proceso de constitución del stock de *L. monocytogenes* a partir del liofilo de la CECT.

cuya concentración y pureza fue determinada mediante recuento en placa utilizando Agar Tripton Soja (Tryptic Soy agar, TSA) (Scharlab S.A., Barcelona, SPAIN) y agar selectivo PALCAM (Scharlab, Barcelona, Spain). La concentración final del stock fue de $5 \pm 0.8 \times 10^9$ UFC/mL.

Preparación de las suspensiones conteniendo fucoidan

El compuesto fucoidan utilizado en el presente estudio procede del alga *Fucus vesiculosus*, especie perteneciente al género *Phaeophyceae* (algas pardas), suministrado en polvo (blanco; inodoro) por la empresa SigmaAldrich (Sigma-Aldrich, Inc, USA) (Referencia: F8190-500) con pureza $\geq 95\%$ (figura 4).



FIGURA 4. Fucoidan procedente del alga *Fucus vesiculosus* (Sigma-Aldrich Inc., USA)

Como sustrato de referencia se utilizó Caldo Müller Hinton (Müller Hinton Broth, MHB) (Scharlab, Barcelona, Spain), ampliamente elegido en los estudios de determinación de sensibilidad a antimicrobianos ya que garantiza una buena reproducibilidad en los resultados inter-laboratorios, destacada la sencillez en su composición, y el bajo contenido en compuestos que podrían antagonizar con la actividad de los compuestos antimicrobianos a evaluar (Iqbal et al., 2013)

Se preparó una suspensión madre de fucoidan a una concentración de 5000 $\mu\text{g/mL}$ en MHB, esterilizada mediante filtración utilizando filtros de 0.20 μm (Sigma-Aldrich, Inc, USA) (Minisart filters-Referencia 16534-K). Dicha suspensión madre fue dividida en alícuotas mantenidas en congelación a -20°C , y que fueron utilizadas en cada una de las sesiones de trabajo.

En cada sesión de trabajo, y partiendo de la solución madre, se prepararon suspensiones de fucoidan en MHB estéril, a las concentraciones 5, 10, 50, 100, 200, y 1000 $\mu\text{g/mL}$, en tubos estériles de 20 mL (por triplicado, tres tubos por concentración).

Inoculación e incubación de las suspensiones

Una vez preparadas las suspensiones conteniendo fucoidan, se procedió a inocular *L. monocytogenes* en las mismas, partiendo para ello de los viales de *L. monocytogenes* mantenidos en stock. La concentración media con la que se iniciaron los ensayos de capacidad antimicrobiana fue de 4.5×10^4 UFC/mL.

Como suspensión control se consideró aquella preparada en MHB, inoculada con *L. monocytogenes*, no suplementada con fucoidan, y que permite monitorizar el crecimiento de este patógeno en condiciones de referencia.

Se prepararon también soluciones blanco de MHB carentes de inóculo, tanto para el control como para las suspensiones conteniendo fucoidan a las distintas concentraciones.

Todas las suspensiones preparadas fueron mantenidas a 37 °C, temperatura óptima de crecimiento para *L. monocytogenes*, y a 8 °C, temperatura de ligero abuso en refrigeración a la que también puede crecer esta bacteria (Colagiorgi et al., 2016). El período completo de incubación fue de 7 días a 37 °C y de 12 días a 8 °C.

Cinéticas de crecimiento/inactivación en presencia de fucoidan

Para registrar el crecimiento bacteriano en el tiempo se realizaron mediciones espectrofotométricas (OD₅₅₀ nm) y recuentos bacterianos en placa (Qiao, 2010).

A intervalos regulares de tiempo (0, 1, 2, 3, 5, 7 días; 37 °C); (0, 1, 2, 3, 5, 7, 12 d; 8 °C) se extrajeron alícuotas y se procedió a la realización de las correspondientes mediciones espectrofotométricas (OD₅₅₀ nm). Las suspensiones “blanco” se utilizaron como autozero en el equipo. Dichas suspensiones “blanco” estériles, se monitorizaron al inicio de los ensayos (t= 0 h) y durante el periodo completo de incubación, para verificar la estabilidad de la matriz a lo largo del tiempo.

Paralelamente, se extrajeron alícuotas y se procedió a realizar diluciones seriadas en agua de peptona tamponada (Bufferend Peptone Water, BPW) (Scharlab, Barcelona, Spain) (1:1000 (p/v)) y siembra en placa de TSA por duplicado. Las placas se mantuvieron a 37 °C durante 48 h y se procedió posteriormente al recuento bacteriano (UFC/mL).

Todos los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, con tres repeticiones independientes y tres réplicas por repetición.

Los resultados de crecimiento/inhibición/muerte obtenidos para *L. monocytogenes* se representaron como el logaritmo decimal de las células viables ($\log_{10} (N_f/N_0)$); siendo N_f el número de UFC/mL a cada tiempo, y N_0 el número de UFC/mL a tiempo cero) frente al tiempo, determinando así el efecto bacteriostático y/o bactericida del compuesto fucoidan.

Validación en zumo de manzana

Con el objetivo de validar la efectividad del compuesto fucoidan *in vitro* en la formulación de un alimento real, se utilizó una matriz de composición sencilla, zumo de manzana (pH= 4.2) UHT (figura 5).

Atendiendo así, al riesgo asociado al consumo de zumos de frutas pasteurizados, y comercializados en refrigeración en lo que respecta a una posible contaminación y supervivencia de *L. monocytogenes* durante la vida útil del producto.



FIGURA 5. Zumo de manzana, utilizado como matriz alimentaria para determinar la capacidad antimicrobiana del compuesto fucoidan frente a *L. monocytogenes*.

Para verificar la efectividad del fucoidan en dicha matriz alimentaria, se prepararon suspensiones de zumo de manzana suplementado con fucoidan a las concentraciones de 25, 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (figura 6). La concentración inicial del *L. monocytogenes* añadida a la matriz fue de 5×10^4 UFC/mL. Como control se utilizó el zumo inoculado no suplementado con fucoidan. Como blanco se utilizó el zumo de manzana no suplementado con fucoidan, y no inoculado.

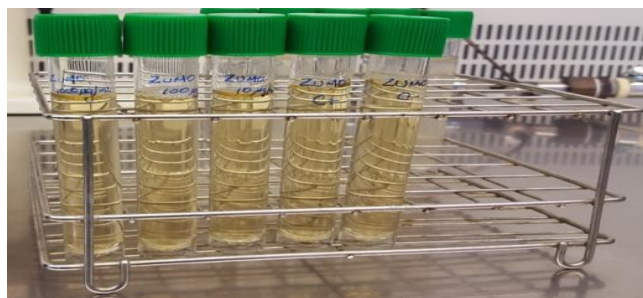


FIGURA 6. Cultivo de *L. monocytogenes* en zumo de manzana a diferentes concentraciones de fucoidan.

Conceptos de capacidad antimicrobiana. Potencial bacteriostático y bactericida

De acuerdo a los estudios previos realizados por (Choi et al., 2015) relativos a la evaluación de la capacidad antimicrobiana del compuesto fucoidan frente a otro patógeno alimentario Gram positivo, *Staphylococcus aureus*, se definen a continuación los conceptos Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y Concentración Mínima Bactericida (MBC), adaptados al presente estudio, en la determinación del potencial antimicrobiano del fucoidan frente a *Listeria monocytogenes*:

- Concentración Mínima Inhibitoria (MIC, $\mu\text{g}/\text{mL}$): aquella concentración mínima de fucoidan para la que se observa una inhibición del crecimiento (≥ 0.50 ciclos \log_{10}) del microorganismo *L. monocytogenes* con respecto al crecimiento observado en el sustrato control (no suplementado con fucoidan).

- Concentración Mínima Bactericida (MBC, $\mu\text{g/mL}$): aquella concentración mínima de fucoidan para la que se observa una reducción (≥ 0.50 ciclos \log_{10}) de la población de *L. monocytogenes* (\log_{10} (UFC/mL) inicialmente inoculada).

Análisis estadístico de los resultados

El análisis estadístico consistió en un análisis multifactorial de la varianza (ANOVA) para detectar diferencias estadísticamente significativas ($p\text{-value} \leq 0.05$) entre los resultados obtenidos en el crecimiento/inactivación de *L. monocytogenes* en presencia del compuesto fucoidan, dependiendo de las variables en estudio, concentración, temperatura y tiempo de incubación. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efectividad del fucoidan como compuesto antimicrobiano frente a *Listeria monocytogenes*.

El efecto antimicrobiano *in vitro* del compuesto fucoidan obtenido del alga *Fucus vesiculosus* se estudió a distintas concentraciones (5 - 1000 $\mu\text{g/mL}$) frente a *Listeria monocytogenes*. Los resultados obtenidos en los ensayos de incubación llevados a cabo a las temperaturas de 37 y 8 °C, en medio de referencia MHB se presentan en la figura 7.

Como puede apreciarse, a la temperatura de ligero abuso en refrigeración, el microorganismo *L. monocytogenes* es capaz de crecer un máximo de 1.06 ± 0.15 ciclos \log_{10} en el sustrato control, durante el período de 12 días de incubación. La adición de fucoidan en pequeñas concentraciones [5-25] $\mu\text{g/mL}$ no ejerce efecto bacteriostático y/o bactericida en el control de este patógeno. Sin embargo, al incrementar la concentración de fucoidan para concentraciones en el rango [50-1000] $\mu\text{g/mL}$, tras 7 días de incubación, se observa un efecto bacteriostático equivalente a 0.33 ± 0.02 ciclos \log_{10} para 50 $\mu\text{g/mL}$ y que alcanza el máximo de 0.75 ± 0.02 ciclos \log_{10} para [100-1000] $\mu\text{g/mL}$ tras 12 días de incubación a 8 °C. Incrementar la concentración de fucoidan por encima de 100 $\mu\text{g/mL}$, y hasta los 1000 $\mu\text{g/mL}$, no supone un aumento significativo en el potencial bacteriostático del compuesto.

A la temperatura de 37 °C, como puede apreciarse en la gráfica, el compuesto fucoidan revela potencial bacteriostático y bactericida frente a *L. monocytogenes*, dependiendo tanto de la concentración añadida al medio ($p\text{-value} \leq 0.05$), como del tiempo de exposición considerado ($p\text{-value} \leq 0.05$).

Tras 5 días de incubación, el compuesto fucoidan presenta efecto bacteriostático frente a *L. monocytogenes* a las concentraciones de 5, 25 y 50 $\mu\text{g/mL}$, inhibiendo el crecimiento del patógeno en un valor promedio de 1.62 ± 0.08 ciclos \log_{10} con respecto al control, y sin diferencias significativas en el potencial bacteriostático dependiente de la concentración. A medida que avanza el periodo de incubación, el efecto de la concentración de fucoidan se

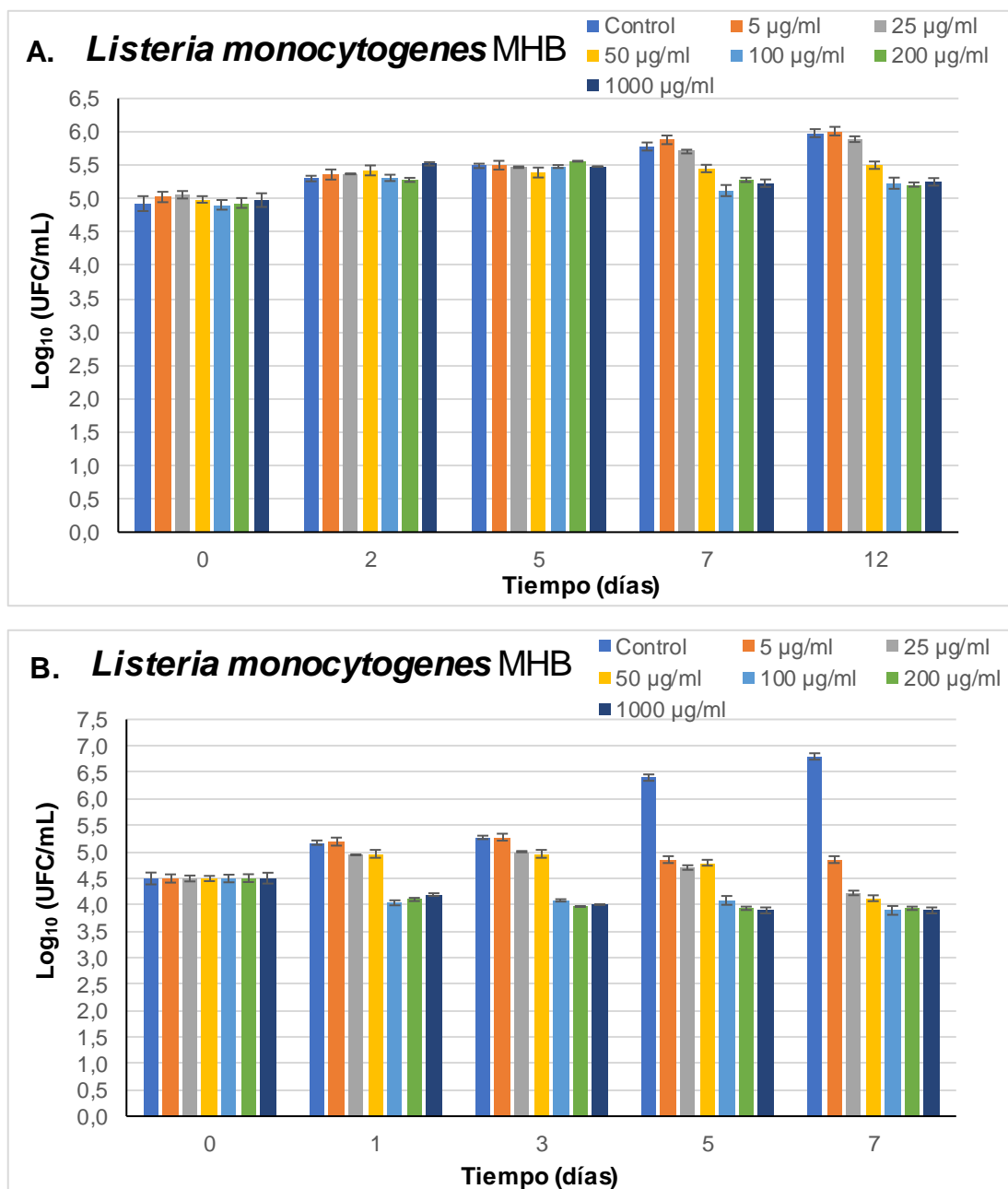


FIGURA 7. Resultados obtenidos en los ensayos de determinación de la capacidad antimicrobiana *in vitro* del compuesto fucoidan para *Listeria monocytogenes* en Müller Hinton Broth (MHB) a **A.** 8 °C (12 días), y a **B.** 37 °C (7 días).

torna evidente, siendo la concentración de 5 µg/mL efectiva inhibiendo el crecimiento del patógeno en hasta 1.95 ± 0.06 ciclos \log_{10} tras 7 días de contacto, mientras que para el mismo tiempo de incubación, las concentraciones de 25 y 50 µg/mL reducen la carga microbiana por debajo de los valores inicialmente inoculados, ejerciendo por tanto un efecto bactericida próximo a 0.40 ciclos \log_{10} .

Las concentraciones elevadas de fucoidan incluidas en el presente estudio 100, 200 y 1000 µg/mL ejercen un efecto bactericida sobre la población de *L. monocytogenes* inicialmente inoculada, incluso tras 24 h de incubación a 37 °C. Sin embargo, el efecto bactericida observado para el fucoidan añadido a

las concentraciones [100-1000] µg/mL no depende de la concentración añadida al medio, ni tampoco se incrementa de forma significativa con el tiempo de incubación (reducciones entre 0.51 (1 día incubación) a 0.62 ciclos \log_{10} (7 días incubación)).

Estudios previos llevados a cabo por Lee et al., (2013) atribuyen al fucoidan un potente efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas comúnmente presentes en la cavidad bucal (*Streptococcus mutans*, *Fusobacterium nucleatum*, y *Porphyromonas gingivalis*, entre otros), observándose capacidad bacteriostática a concentraciones de fucoidan en un intervalo de [150-500] µg/mL y bactericida a concentraciones en un intervalo de [250-1000] µg/mL. Resultados similares fueron reportados por Choi et al., (2015) quienes señalan una MIC a 128 µg/mL y una MBC entre [256-512] µg/mL frente a diferentes cepas de *S. aureus* (Gram +). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran una mayor efectividad del fucoidan frente a una bacteria Gram positiva, *L. monocytogenes*, con un valor de MIC a 37 °C de 5 µg/mL, y un valor de MBC de 100 µg/mL a la misma temperatura.

Los estudios publicados hasta la fecha confirman que la capacidad antimicrobiana del fucoidan depende tal como se ha señalado en este estudio, tanto de la concentración de fucoidan añadida al medio, del tiempo de exposición (Lee et al., 2013; Marudhupandi y Thangappan 2013; Choi et al., 2015) y de la temperatura de incubación. Así como también de la especie de alga a partir de la que es obtenido, y del grado de polimerización del compuesto (Liu et al., 2017).

Efectividad del compuesto fucoidan frente a *L. monocytogenes* utilizando un sustrato real: zumo de manzana

De acuerdo a los resultados obtenidos en apartados previos, y buscando la validación del potencial antimicrobiano del compuesto fucoidan frente a *L. monocytogenes* en un sustrato real sencillo, se ha trabajado en el presente estudio con zumo de manzana (pH= 4.2). La adición del compuesto fucoidan en dicho sustrato, puede representar no sólo un avance tecnológico por el potencial antimicrobiano asociado a dicho bioactivo, sino que también representa un incremento del valor nutricional del producto final, por su carácter prebiótico y antioxidante demostrado, y que podría dar lugar al desarrollo de bebidas funcionales, pasterizadas, y comercializadas en refrigeración. Los estudios se realizaron a las concentraciones de 25, 100 y 1000 µg/mL, manteniendo las suspensiones en condiciones de ligero abuso en refrigeración 8 °C, durante 12 días. Como puede apreciarse en la figura 8, el microorganismo no creció en el sustrato control durante el periodo de estudio, pero sí se mantuvo viable a la concentración inicialmente inoculada. La adición de fucoidan a la concentración de 25 µg/mL, no revela efecto bactericida alguno sobre la población de *L. monocytogenes* inicialmente inoculada. Sin embargo, para las concentraciones de 100 y 1000 µg/mL, se observa un efecto bactericida que progresa a medida que avanza el periodo de incubación (p-value ≤ 0.05). La concentración de 100 µg/mL actúa reduciendo en 0.40 ± 0.02 ciclos \log_{10} la carga microbiana inicial inoculada en el zumo tras 12 días de incubación, siendo la concentración de 1000 µg/mL

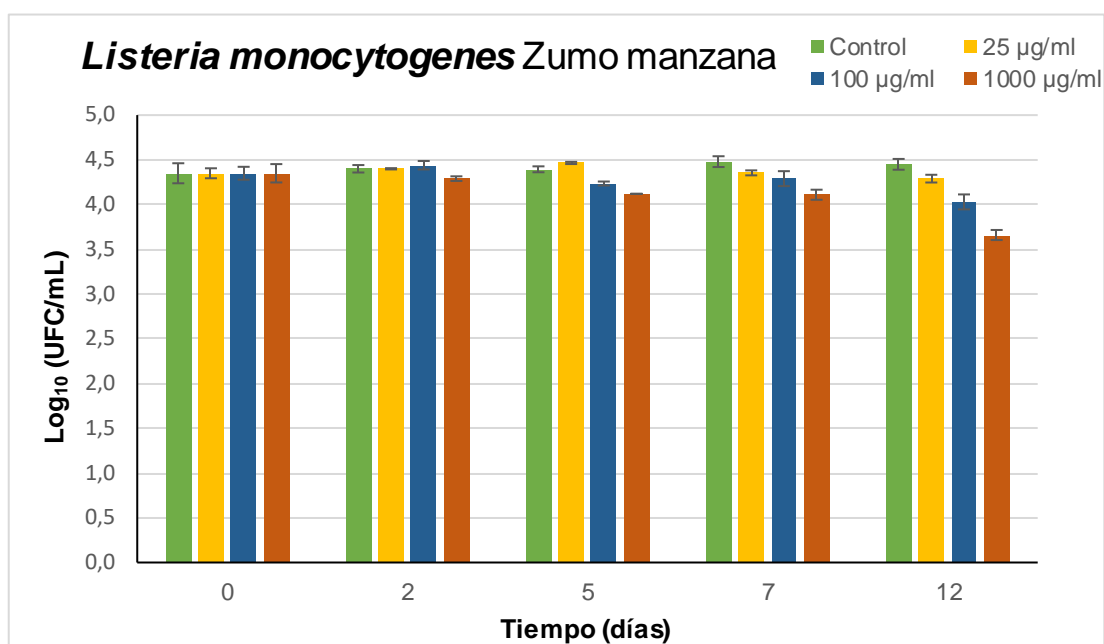


FIGURA 8. Resultados obtenidos en los ensayos de determinación de la capacidad antimicrobiana *in vitro* del compuesto fucoidan para *Listeria monocytogenes* en zumo de manzana a 8 °C (12 días).

altamente efectiva en dicha matriz alimentaria, alcanzando la reducción de la carga microbiana inicial en hasta 0.70 ± 0.01 ciclos \log_{10} , tras un tiempo de exposición de 12 días a 8 °C.

Con los resultados obtenidos se exponen en la tabla 1 los valores de los parámetros MIC y MBC, tanto en medio de referencia MHB como en sustrato real, zumo de manzana.

TABLA 1. Potencial bacteriostático y/o bactericida del compuesto fucoidan frente a *Listeria monocytogenes*, estimado en base a los valores de Concentración Mínima Inhibitoria (MIC), y Concentración Mínima Bactericida (MBC) obtenidos en los estudios cinéticos de crecimiento/inactivación, a 8 y 37 °C.

| Potencial antimicrobiano del fucoidan | | 37 °C | | | 8 °C | | | |
|---------------------------------------|-----------------|----------------------|---------|-----------------|--------------------|---------|-----------------|--------------------|
| | | Müeller Hinton Broth | (µg/mL) | Tiempo (días) | Ciclos \log_{10} | (µg/mL) | Tiempo (días) | Ciclos \log_{10} |
| MIC | | 5 | 5 | 1.55 ± 0.04 | 100 | 7 | 0.66 ± 0.02 | |
| MBC | | 100 | 1 | 0.51 ± 0.03 | - | - | - | |
| | | Müeller Hinton Broth | (µg/mL) | Tiempo (días) | Ciclos \log_{10} | (µg/mL) | Tiempo (días) | Ciclos \log_{10} |
| MIC | Zumo de manzana | - | - | - | - | - | - | |
| MBC | Zumo de manzana | - | - | - | 1000 | 12 | 0.70 ± 0.01 | |

Como puede apreciarse en la tabla, *L. monocytogenes* es más sensible al efecto del compuesto fucoidan cuando se incuba a su temperatura óptima de crecimiento, que cuando se incuba a temperatura de refrigeración. Este hecho es posiblemente debido a los mecanismos de respuesta que pone en funcionamiento esta bacteria frente a condiciones de estrés ambiental para protegerse de las mismas (pH ácido, baja temperatura y presencia de cloruro de sodio). Dichos mecanismos de protección frente al estrés ambiental incluyen la inducción de síntesis de proteínas y cambios de permeabilidad en la membrana plasmática (Gandhi y Chikindas, 2007). Tal como se ha descrito anteriormente, uno de los mecanismos de acción antimicrobiana de los polisacáridos obtenidos a partir de algas se produce a nivel de unión a receptores citoplasmáticos (He et al., 2010; Shannon y Abu-Ghannam, 2016). Ante la capacidad de *L. monocytogenes* de alterar la composición de su membrana plasmática para aumentar la tolerancia a temperaturas bajas, es posible que dichos cambios interfieran o impidan la actividad del fucoidan sobre la misma, a dichas temperaturas de refrigeración. Planteamientos similares han sido propuestos por Belda-Galbis et al., (2015) y Belda-Galbis et al., (2014) en estudios donde se comprueba la capacidad antimicrobiana del açai y carvacrol, otros compuestos de origen natural, frente a *Listeria innocua*, y en los que se observa la mayor efectividad de dichos compuestos bioactivos frente a *Listeria* spp. a la temperatura óptima de crecimiento de este microorganismo (37 °C).

Si bien *L. monocytogenes* es capaz de crecer hasta 1 ciclo log₁₀ en medio de referencia MHB a 8 °C, para idénticas condiciones de incubación, *L. monocytogenes* no es capaz de crecer en zumo de manzana, únicamente se mantiene viable. En el sustrato control, la adición de fucoidan en concentraciones ≥ 50 µg/mL a 8 °C actúa únicamente como factor de control del crecimiento. Si comparamos los resultados obtenidos en cuanto al potencial antimicrobiano del fucoidan en medio MHB (pH=6.8) y en zumo de manzana (pH=4.2), a la temperatura de refrigeración de 8 °C, el potencial antimicrobiano del fucoidan en la matriz alimentaria es superior al potencial antimicrobiano observado para este compuesto en medio de referencia. Este hecho es probablemente debido al efecto combinado del bajo valor de pH en zumo de manzana (acidez), y la adición de fucoidan, como barreras ambas al crecimiento de *L. monocytogenes*. Por tanto, la adición de 1000 µg/mL de fucoidan en la matriz alimentaria ácida resultaría una concentración efectiva en la reducción de la población bacteriana en estudio en valores próximos a 1 ciclo log₁₀, tras 12 días de contacto.

En este sentido, el fucoidan se presenta como una potente alternativa al uso de antimicrobianos sintéticos, siendo de origen natural, sostenible, inodoro, incoloro, y efectivo frente a bacterias Gram positivas, como estrategia de conservación complementaria al uso de otros tratamientos (previa pasterización, y comercialización refrigerada).

CONCLUSIÓN

El presente estudio demuestra la efectividad del compuesto fucoïdan del alga *Fucus vesiculosus* como antimicrobiano natural frente al patógeno de origen alimentario *Listeria monocytogenes*.

El compuesto fucoïdan es capaz de ejercer efecto bactericida o bacteriostático, en función de la concentración de fucoïdan utilizada, y del tiempo de exposición, frente a *L. monocytogenes*, a la temperatura óptima de crecimiento de este patógeno (37 °C). Sólo se observó efecto bacteriostático a temperaturas de ligero abuso en refrigeración (8 °C), para concentraciones iguales o superiores a 100 µg/mL, y dependiendo este efecto del tiempo de incubación (a partir de los 7 días).

El potencial bactericida del fucoïdan frente a *L. monocytogenes* fue validado en una matriz alimentaria, zumo de manzana, corroborando la influencia de las variables concentración de fucoïdan, y tiempo de exposición, en la efectividad de este compuesto.

Tal como se ha demostrado en el presente trabajo el compuesto fucoïdan es capaz de reducir la carga microbiana de *L. monocytogenes* en una matriz alimentaria, incluso considerando el peor escenario, rotura de la cadena de frío (8 °C). Los resultados incluidos en este estudio abren nuevas perspectivas en la utilización de este compuesto bioactivo sostenible, como antimicrobiano natural. Además, debido a las propiedades beneficiosas del fucoïdan resulta ideal para el incremento del carácter funcional de alimentos frescos, listos para consumo (RTE) o bebidas pasteurizadas.

AGRADECIMIENTOS

Cualquier cosa que diga o haga no será suficiente para expresar mi gratitud a todas las personas que me han apoyado en la realización de este Trabajo Fin de Master. Solo quiero dejar por escrito lo satisfecha que me siento por haber formado parte de un gran equipo de investigación, el equipo del Laboratorio 206 del IATA dirigido por Antonio Martínez y Loles Rodrigo. Muchas gracias Antonio y Loles por haberme abierto tan cordialmente las puertas del laboratorio. Sin duda mi tutora experimental, ha sido un gran apoyo. Muchas gracias Chelo por estar siempre pendiente, por incentivar me a tener las cosas a tiempo, gracias por ser tan atenta y amorosa, creo que eres una de las mejores científicas que he conocido y me siento feliz por haber trabajado a tu lado. Gracias a todos mis compañeros de experimentos Gema, Pilar, Temo, Erica, Camila, Pedro y Elena, sin vuestra ayuda no habría logrado terminar de contar placas, hacer siembra o salir de mis interminables dudas experimentales. Por último, gracias a mis amigas del piso que siempre me motivan animosamente para que no me rinda. Muchas gracias a todos.

REFERENCIAS

Abeyundara, P.; Dhowlaghar, N.; Nannapaneni, R.; Schilling, M.; Chang, S.; Mahmoud, B.; Sharma, C.; Ma, D. 2017. Growth and biofilm formation by *Listeria monocytogenes* in

- cantaloupe flesh and peel extracts on four food-contact surfaces at 22 °C and 10 °C. *Food Control*, **80**: 131–142.
- AINIA. ¿Cómo conseguir que tu material de envasado sea antimicrobiano?, [En línea]. España: 2015 Dirección URL: < <http://www.ainia.es/tecnoalimentalia/tecnologia/como-conseguir-que-tu-material-de-ensado-sea-antimicrobiano/> > [consulta: 8 Jun. 2017].
- Belda-Galbis, C. M.; Jiménez-Carretón, A.; Pina-Pérez, M. C.; Martínez, A.; Rodrigo, D. 2015. Antimicrobial activity of açai against *Listeria innocua*. *Food Control*, **53**, 212–216.
- Belda-Galbis, C. M.; Leufvén, A.; Martínez, A.; Rodrigo, D. 2014. Predictive microbiology quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. *Journal of Food Engineering*, **141**, 37–43.
- Besednova, N.; Zaporozhets, T.; Somova, L., Kuznetsova, T. 2015. Review: Prospects for the Use of Extracts and Polysaccharides from Marine Algae to Prevent and Treat the Diseases Caused by *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*, **20(2)**: 89–97.
- Buchanan, R.; Gorris, L.; Hayman, M.; Jackson, T.; Whiting, R. 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An Update on Outbreaks, Virulence, Dose-Response, Ecology, and Risk Assessments. *Food Control*, **75**: 1–13.
- Choi, S.; Jang, E.-J.; Cha, J.-D. 2015. Synergistic Effect between Fucoidan and Antibiotics Against Clinic Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, **6**: 275–285.
- Colagiorgi, A.; Di Ciccio, P.; Zanardi, E.; Ghidini, S.; Ianieri, A. 2016. A Look inside the *Listeria monocytogenes* Biofilms Extracellular Matrix. *Microorganisms*, **4**, 1–22.
- Davidson, P.; Cekmer, H.; Monu, E.; Techathuvanan, C. 2015. *The use of natural antimicrobials in food: an overview*. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Elsevier Ltd.
- Dawoud, T.; Shi, Z.; Kwon, Y.; Ricke, S. 2017. Overview of Salmonellosis and Food-borne Salmonella: Historical and Current Perspectives. In *Producing Safe Eggs*. Elsevier Inc., 113–138
- De Jesus Raposo, M.; De Morais, A.; De Morais, R. 2015. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. *Marine Drugs*, **13**, 2967–3028.
- Dumitriu, S. 2004. Polysaccharides. *Structural diversity and functional versatility*. (C. Press, Ed.) (Second). Quebec, Canada, 1-2.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2016. Annual epidemiological report, Salmonellosis. [en línea]. Dirección URL: <<http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/salmonellosis/Pages/surveillance-data-2016.aspx>>. [Consulta: 5 Jun. 2017]
- European Centre for Disease Prevention and Control. Listeriosis (ECDC). [en línea] 2016. Dirección URL: < <http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/listeriosis/Pages/index.aspx> > [consulta: 5 Jun. 2017]
- European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). (2015). *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013*. *EFSA Journal* (Vol. 13).
- Food and Drug Administration (FDA). 2012. "*Bad bug book: Handbook of Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins*", [en línea]. (Lampel, K. A.; Al-Khaldi, S.; Cahill, S. M. (eds.) (second). Dirección URL: [http://seafood.oregonstate.edu/pdf/Links/Bad Bug Book.pdf](http://seafood.oregonstate.edu/pdf/Links/Bad%20Bug%20Book.pdf). [consulta: 5 jun. 2017].
- Gandhi, M.; Chikindas, M. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, **113**, 1–15.
- Goulet, V.; Hebert, M.; Hedberg, C.; Laurent, E.; Vaillant, V.; De Valk, H.; Desenclos, J. C. 2012. Incidence of listeriosis and related mortality among groups at risk of acquiring listeriosis. *Clinical Infectious Diseases*, **54(1 March)**.
- Gyawali, R.; Ibrahim, S. A. 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, **46**, 412–429.
- He, F.; Yang, Y.; Yang, G.; Yu, L. 2010. Studies on antibacterial activity and antibacterial mechanism of a novel polysaccharide from *Streptomyces virginia* H03. *Food Control*, **21(2010)**, 1257–1262.
- Iqbal, J.; Siddiqui, R.; Kazmi, S. U.; Khan, N. A. 2013. A simple assay to screen antimicrobial compounds potentiating the activity of current antibiotics. *BioMed Research*

- International, **2013(2013)**, 1–4.
- Jackson, K. A.; Iwamoto, M.; Swerdlow, D. 2010. Pregnancy-associated listeriosis. *Epidemiology and Infection*, **138**, 1503–1509.
- Jaiswal, A. K.; Jaiswal, S. 2014. *Modelling the effects of natural antimicrobials as food preservatives*. (Woodhead Publishing Limited, Ed.), *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*. Cambridge, UK.: Elsevier.
- Jofré, A.; Garriga, M.; Aymerich, T.; Pérez-Rodríguez, F.; Valero, A.; Carrasco, E.; Bover-Cid, S. 2016. Closing gaps for performing a risk assessment on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat (RTE) foods: activity 1, an extensive literature search and study selection with data extraction on *L. monocytogenes* in a wide range of RTE food. *EFSA Supporting Publications*, **13(12)**: 184.
- Kim, S.; Choi, W.; Kang, D. H. 2017. Application of low frequency pulsed ohmic heating for inactivation of foodborne pathogens and MS-2 phage in buffered peptone water and tomato juice. *Food Microbiology*, **63**, 22–27.
- Lee, K. Y.; Jeong, M. R.; Choi, S. M.; Na, S. S.; Cha, J. 2013. Synergistic effect of fucoidan with antibiotics against oral pathogenic bacteria. *Archives of Oral Biology*, **58**, 482–492.
- Liu, G.; Ren, G.; Zhao, L.; Cheng, L.; Wang, C.; Sun, B. 2016. Antibacterial activity and mechanism of bifidocin A against *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, **73**, 854–861.
- Liu, M.; Liu, Y.; Cao, M.-J.; Liu, G.-M.; Chen, Q.; Sun, L.; Chen, H. 2017. Antibacterial activity and mechanisms of depolymerized fucoidans isolated from *Laminaria japonica*. *Carbohydrate Polymers*, **172**, 294–305.
- Lungu, B.; O'Bryan, C. A.; Muthaiyan, A.; Milillo, S. R.; Johnson, M.; Crandall, P. G.; Ricke, S. C. 2011. *Listeria monocytogenes*: Antibiotic resistance in food production. *Foodborne Pathogens and Disease*, **8(5)**, 569–578.
- Marudhupandi, T.; Thangappan, T. K. A. 2013. Antibacterial effect of fucoidan from *Sargassum wightii* against the chosen human bacterial pathogens. *International Current Pharmaceutical Journal*, **2(10)**, 156–158.
- Pádua, D.; Rocha, E.; Gargiulo, D.; Ramos, A. 2015. Bioactive compounds from brown seaweeds: Phloroglucinol, fucoxanthin and fucoidan as promising therapeutic agents against breast cancer. *Phytochemistry Letters*, **14**, 91–98.
- Pina-Pérez, M. C.; Rivas, A.; Martínez, A.; Rodrigo, D. 2017. Antimicrobial potential of macro and microalgae against pathogenic and spoilage microorganisms in food. *Food Chemistry*, **235**, 34–44.
- Qiao, J. "Antibacterial Effect of Extracts from Icelandic Algae (*Ascophyllum nodosum* and *Laminaria digitata*)", [en línea]. Iceland 2010. Dirección URL: <<http://www.unuftp.is/static/fellows/document/jin-proofread-caitlin-and-ski-mfd.pdf>>. Consulta [3 Jun. 2017].
- Salem, W.; Galal, H.; Nasr El-deen, F. 2011. Screening for antibacterial activities in some marine algae from the red sea (Hurghada, Egypt). *African Journal of Microbiology Research*, **5(15)**, 2160–2167.
- Shannon, E.; Abu-Ghannam, N. 2016. Antibacterial derivatives of marine algae: An overview of pharmacological mechanisms and applications. *Marine Drugs*, **14(4)**: 1-21.
- Silk, B. J.; Date, K. A.; Jackson, K.; Pouillot, R.; Holt, K.; Graves, L. M., ... Mahon, B. E. 2012. Invasive listeriosis in the foodborne diseases active surveillance network (FoodNet), 2004-2009: Further targeted prevention needed for higher-risk groups. *Clinical Infectious Diseases*, **54(SUPPL.5)**, S396-404.
- Silva, T. H.; Alves, A.; Popa, E. G.; Reys, L.; Gomes, M. E.; Sousa, R. A.; ... Reis, R. 2012. Marine algae sulfated polysaccharides for tissue engineering and drug delivery approaches. *Biomatter*, **2(4)**, 278–289.
- Smith, J. L.; Liu, Y.; Paoli, G. C. 2013. How does *Listeria monocytogenes* combat acid conditions? *Canadian Journal of Microbiology*, **59**, 141–52.
- USDA-ERC (United States Department of Agriculture-Economic Research Service). "Food Availability (Per Capita) Data System", [en línea]. 2016. Dirección URL: <https://www.ers.usda.gov/data-products/food-availability-per-capita-data-system/>> [consulta: 8 Jun. 2017]
- Vázquez-Boland, J. A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Domínguez-Bernal, G.; González-Zorn, B.; ... Kreft, J. 2001. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, **14(3)**, 584–640.

- Wang, J.; Zhang, Q.; Zhang, Z.; Song, H.; Li, P. 2010. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica*. *International Journal of Biological Macromolecules*, **46**, 6–12.
- World Health Organization (WHO). 2014. WHO estimates of the global burden of diseases. *WHO*, **46(3)**, 1–15.
- Yu, S. H.; Wu, S. J.; Wu, J. Y.; Wen, D. Y.; Mi, F. 2015. Preparation of fucoidan-shelled and genipin-crosslinked chitosan beads for antibacterial application. *Carbohydrate Polymers*, **126**, 97–107.
- Zhu, Q.; Gooneratne, R.; Hussain, M. A. 2017. *Listeria monocytogenes* in Fresh Produce: Outbreaks, Prevalence and Contamination Levels. *Foods*, **6(3)**, 21.