

Evaluación de las propiedades bioactivas frente a *Helicobacter pylori* de un extracto de *Achillea millefolium* L. y sus fracciones obtenidas por fraccionamiento supercrítico antisolvente (SAF)

Jose Manuel Silván^{1*}, Marisol Villalva¹, Teresa Alarcón-Cavero², Adolfo J. Martínez-Rodríguez¹

CIAL
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN
EN CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

¹ Grupo de Microbiología y Biotecnología (MICROBIO), Departamento de Biotecnología y Microbiología de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), CSIC-UAM. C/ Nicolás Cabrera 9, Campus de Cantoblanco, 28049, Madrid.

UAM
Universidad Autónoma
de Madrid

CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

² Hospital Universitario de la Princesa, Departamento de Microbiología. C/ Diego de León 62, 28006, Madrid.

Hospital Universitario
de La Princesa
SaludMadrid
Comunidad de Madrid

E-mail: jm.silvan@csic.es

INTRODUCCIÓN

Achillea millefolium L., conocida tradicionalmente como milenrama, es una planta de uso medicinal. Debido a los conocidos beneficios para la salud de esta planta, el estudio de su composición y de sus actividades biológicas ha despertado un creciente interés en las industrias farmacéutica y alimentaria. Entre sus principales efectos beneficiosos destacan sus propiedades anti-inflamatorias, antioxidantes, antibacterianas, antitumorales y antidiabéticas [1], siendo sus principales compuestos bioactivos los compuestos fenólicos y los terpenos [2]. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es uno de los principales patógenos humanos que se estima afecta al 50% de la población mundial [3]. La infección por *H. pylori* puede causar diversas enfermedades a nivel gástrico, que van desde la gastritis crónica, úlcera péptica, e incluso derivar en cáncer gástrico. Para su tratamiento se emplea una terapia combinada de al menos dos antibióticos. Sin embargo, en los últimos años ha aumentado la aparición de resistencias a los antibióticos empleados, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas para su tratamiento. El objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial efecto antibacteriano, anti-inflamatorio y antioxidante de un extracto de milenrama (YE) y de sus fracciones, insoluble (YPF) y soluble (YSF), obtenidas por SAF frente a tres cepas de *H. pylori* resistentes a antibióticos.

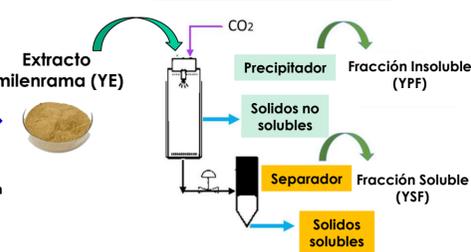
MATERIALES & MÉTODOS

Preparación extracto de milenrama

- Inflorescencias
- Hojas superiores secas



Fraccionamiento SAF



Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

- 3 cepas de *H. pylori* aisladas de biopsias gástricas (Hp48, Hp53 y Hp59).
- Medios selectivos de crecimiento: caldo de Brucella suplementado con 10% suero de caballo (BBH) y agar Mueller Hinton suplementado con 5% de sangre de carnero (MHB).
- Condiciones de crecimiento: reactivación de las cepas en MHB e incubación a 37°C durante 72 horas en atmósfera microaerófila (85% N₂, 10% CO₂, 5% O₂).

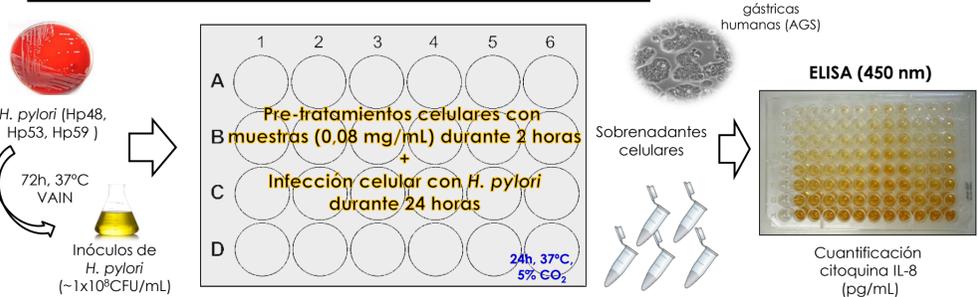


Actividad antibacteriana

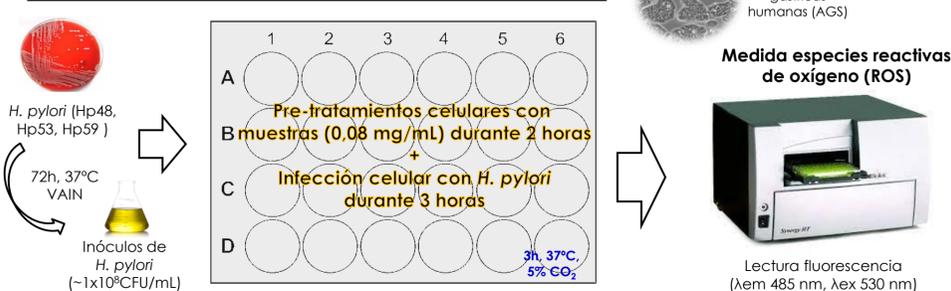
- Mezcla de reacción:
 - 4 mL medio BBH
 - 1 mL de las muestras (0,4 mg/mL) en BBH (o BBH para controles de crecimiento)
 - 100 µL de los inóculos bacterianos en fase estacionaria en BBH (~1x10⁸ CFU/mL)
- Incubación a 37°C durante 24 horas, agitación 150 rpm en atmósfera microaerófila
- Diluciones decimales y siembra en MHS
- Incubación a 37°C durante 72 horas en atmósfera microaerófila
- Recuento de UFC/mL



Actividad anti-inflamatoria utilizando un modelo celular



Actividad antioxidante utilizando un modelo celular



RESULTADOS

Actividad antibacteriana

Tabla 1. Actividad antibacteriana del extracto de milenrama (YE) y sus fracciones (YPF y YSF) (0,4 mg/mL) frente a las diferentes cepas de *H. pylori* tras 24 horas de tratamiento. Los resultados se expresan como log UFC/mL ± DS (n=3).

Cepas	Control	YE	YPF	YSF
Hp48	8,5 ± 0,3 ^c	<1,5 ^a	5,6 ± 0,7 ^b	<1,5 ^a
Hp53	8,4 ± 1,6 ^d	3,6 ± 0,5 ^b	6,3 ± 0,3 ^c	<1,5 ^a
Hp59	8,9 ± 0,9 ^d	2,1 ± 0,2 ^b	6,6 ± 0,6 ^c	<1,5 ^a

^{a,b,c,d} Valores de una misma fila marcados con diferentes letras indican diferencias significativas (ANOVA) ($p < 0,05$). *Limite de detección 1,5 log UFC/mL (Efecto bactericida)

Actividad anti-inflamatoria

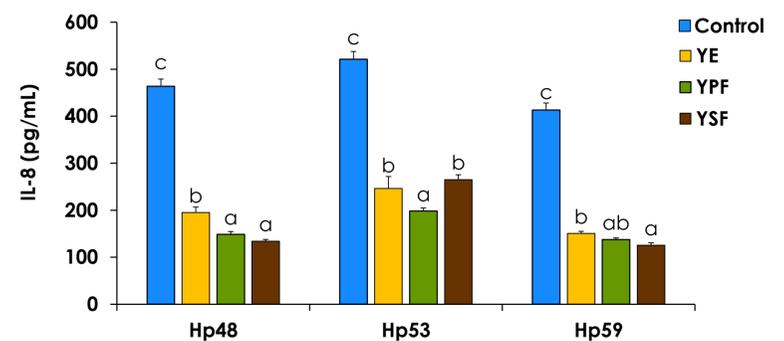


Figura 1. Efecto del extracto de milenrama (YE) y sus fracciones (YPF y YSF) (0,08 mg/mL) en la producción de IL-8 en células gástricas infectadas por diferentes cepas de *H. pylori*. Los resultados se expresan en pg/mL de IL-8 (media ± DS) (n=3). El control muestra la producción de IL-8 en células gástricas infectadas sin pre-tratamiento con los extractos. ^{a,b,c} Barras marcadas con diferentes letras indican diferencias significativas para una misma cepa (ANOVA) ($p < 0,05$).

Actividad antioxidante

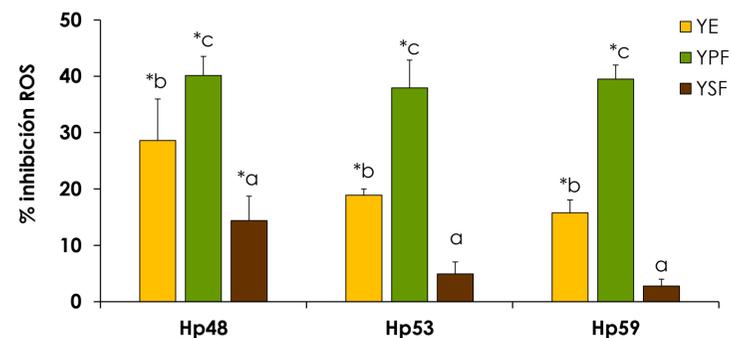


Figura 2. Efecto del extracto de milenrama (YE) y sus fracciones (YPF y YSF) (0,08 mg/mL) en la producción de ROS intracelular en células gástricas infectadas por *H. pylori*. Los resultados se expresan como % de inhibición en la producción de ROS (media ± DS) (n=3). *Barras marcadas con asterisco indican diferencias significativas en comparación con el control celular infectado (t-test) ($p < 0,05$). ^{a,b,c} Barras marcadas con diferentes letras indican diferencias significativas entre las muestras para una misma cepa (ANOVA) ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

- ❑ El extracto de milenrama (*Achillea millefolium*) evidenció una potente actividad antibacteriana frente a diferentes cepas de *H. pylori*.
- ❑ La milenrama podría ser potencialmente eficaz para combatir el estrés oxidativo y modular la respuesta inflamatoria asociada a la infección gástrica por *H. pylori*.
- ❑ Tanto los compuestos fenólicos como los aceites esenciales presentes en el extracto de milenrama parecen contribuir en sus propiedades bioactivas (antioxidante, antiinflamatoria y antibacteriana), aunque el grado de contribución varía en función de cada propiedad.
- ❑ Estos resultados demuestran la potencial eficacia del uso de extractos procedentes de milenrama frente a *H. pylori*, contribuyendo así al desarrollo y obtención de nuevas estrategias para el control de este patógeno humano.
- ❑ La técnica SAF permitió obtener fracciones enriquecidas en compuestos fenólicos o aceites esenciales, basándose en el concepto de extracción verde, pudiendo ser útil en el diseño de extractos bioactivos frente a *H. pylori* en los que se desee potenciar una bioactividad específica.
- ❑ Este enfoque es atractivo en términos de coste y puede ser especialmente útil en aquellos países en los que las instalaciones sanitarias y el acceso a determinadas sustancias farmacológicas no siempre son adecuados o están disponibles.

AGRADECIMIENTOS: Este trabajo fue realizado como parte del Proyecto HELIFOOD (AGL2017-89566-R). Financiado por MCIN/AEI /10.13039/501100011033/ y FEDER. "Una manera de hacer Europa".

REFERENCIAS: [1] Kusters, et al. (2006). *Clin. Microbiol. Rev.*, 19, 449-490. [2] Savoldi, et al. (2018). *Gastroenterology*, 155, 1372-1382. [3] Karkovic et al. (2019). *Molecules*, 24, 2001.