UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Efectos de la fenilcurcumina y sus derivados metálicos sobre *Helicobacter pylori*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

AIDE ROJAS MEDINA

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. IRMA ROMERO ALVAREZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2023

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Vocal: Dra. Josefina Herrera Santoyo

Tutora: Dra. Irma Romero Álvarez

1er. Suplente: M. en C. Genoveva Villalobos Contreras

2do. Suplente: M. en C. Gerardo Mata Torres Valle

LUGAR DONDE SE ELABORÓ EL PROYECTO:

Laboratorio 2, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Edificio D, Primer Piso. Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesora de tesis:

Dra. Irma Romero Álvarez

Sustentante:

Aide Rojas Medina

AGRADECIMIENTOS

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), DGAPA de la UNAM, IN207622.

Al proyecto CONACyT, FOINS-PRONACES-307152.

Agradezco mucho a la Dra. Erika Gómez Chang por su asistencia académica y técnica en la realización de los experimentos.

Al Dr. Raúl G. Enríquez Habib, al Dr. Yair Alvarez Ricardo, al Dr. William E. Meza Morales y al Dr. Marco Antonio Obregón Mendoza del Instituto de Química de la UNAM por la síntesis y donación de los compuestos curcuminoides utilizados en este trabajo.

A los integrantes del jurado: Dra. Irma Romero Álvarez, Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava, Dra. Josefina Herrera Santoyo, M. en C. Genoveva Villalobos Contreras y M. en C. Gerardo Mata Torres Valle por su disponibilidad, tiempo y observaciones dedicadas a este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Esther y Gustavo, por su apoyo incondicional. Me han guiado y aconsejado en cada etapa, me permitieron seguir mis sueños y sin ustedes nada de esto sería posible. Gracias por entenderme y motivarme cada que lo necesito. Ser su hija es la fortuna más grande que la vida me pudo haber dado, los quiero mucho.

A mi hermano Ricardo, porque me salvaste varias veces de ahogarme en estrés con tus videos graciosos y tu influencia para que practicara deportes. Además de ser la persona que siempre me alienta a superar mi pena o miedos a intentar cosas nuevas.

Quisiera agradecer a mis abuelitos Matilde, Pedro y Esther, cuyos buenos deseos y palabras de aliento siempre abundaron a lo largo de mi preparación académica. Gracias por apoyarme cada que podían, por preocuparse tanto por mí y por demostrarme su cariño.

A mi querida Lola, cuya existencia me trae calma cuando más lo necesito. Gracias por tranquilizarme en incontables ocasiones, por hacerme reír y en general por hacer mi vida más feliz sin siquiera intentarlo. También a Max, Frank, Bita y Helio que son mi rayito de luz en los días más oscuros.

Quiero agradecerles a mis más grandes amigos Marisol, Rodrigo, Dany y Sergio, por su lealtad y apoyo a través de los años, por ser mis confidentes y consejeros en todo momento. Guardo un lugar muy especial para ustedes en mi corazón, no los cambiaría por nada del mundo. Adicionalmente, gracias a mis amigas biólogas Caro y Mara por su amistad a lo largo de la carrera, sin ustedes la estadía en la facultad simplemente no hubiera sido lo mismo. Y por supuesto a mi amiga y compañera de laboratorio, Itzel. No sabes lo mucho que agradezco que esa clase nos haya juntado y que siguiéramos un camino similar. Gracias por los momentos, las pláticas y las risas.

Gracias a Román. Llegaste en la etapa más crítica de este proyecto y averiguaste una forma u otra para motivarme y apoyarme cuando más me hacía falta. Te agradezco mucho por todo tu cariño, por tu paciencia, por ayudarme a recuperar la confianza en mí misma y por recordarme quién quiero ser.

Mis más grandes agradecimientos a la Dra. Irma Romero Álvarez y a la Dra. Erika Gómez Chang. No sólo por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, sino también por todo su apoyo, sus consejos, su tiempo y su infinita paciencia. Realmente son personas increíbles en todo aspecto y les agradezco profundamente por todas sus enseñanzas.

Finalmente, gracias a todos mis profesores, a la Facultad de Ciencias y a la UNAM. Por las experiencias, el aprendizaje y las oportunidades, gracias por ayudarme a crear los recuerdos que atesoraré con mucho cariño sobre mi estadía en este lugar. Infinitas gracias por mi formación académica y personal.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS ..... **VII**
ÍNDICE DE TABLAS ..... **VIII**
LISTA DE ABREVIATURAS ..... **IX**
RESUMEN ..... **X**
ABSTRACT ..... **XI**
1. INTRODUCCIÓN **1**
2. ANTECEDENTES **2**
2.1. Helicobacter pylori 2
2.1.1. Clasificación y características generales 2
2.1.2. Factores de colonización 4
2.1.3. Factores involucrados en la inflamación y daño al tejido 5
2.1.4. Factores de supervivencia 6
2.2. Epidemiología 7
2.3. Patologías e impacto 8
2.4. Tratamientos 9
2.5. Plantas medicinales 12
2.5.1. Medicina tradicional 12
2.5.2. *Curcuma longa* 13
2.5.3. Propiedades biológicas de la curcumina 14
2.5.4. Propiedades anti-*Helicobacter pylori* y relacionadas 14
2.5.5. Caracterización química de la curcumina 16
3. OBJETIVOS **20**
3.1. Objetivo general 20
3.2. Objetivos particulares 20
4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO **21**
5. HIPÓTESIS **21**
6. ESTRATEGIA METODOLÓGICA **22**
6.1. Cepa, cultivo, identificación y conservación de *Helicobacter pylori* 22
6.2. Controles positivos 25
6.3. Compuestos experimentales 25
6.4. Determinación de la CMI 30

6.5. Análisis estadístico 31
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 33
7.1. Lote de *Helicobacter pylori* 33
7.2. Determinación de la CMI 36
7.2.1. Compuestos y diluciones 36
7.2.2. CMI de los antibióticos de referencia 37
7.2.3. CMI de los compuestos 39
8. CONCLUSIONES 54
9. PERSPECTIVAS 55
10. BIBLIOGRAFÍA 56
11. ANEXOS 66
11.1. Antecedentes complementarios 66
11.2. Análisis estadístico. Gráficos individuales y pruebas 68
11.2.1. Curcumina 68
11.2.2. Fenilcurcumina 69
11.2.3. $PhCur_2$-Mn 70
11.2.4. $PhCur_2$-Cu 71
11.2.5. $PhCur_2$-Zn 72
11.2.6. $PhCur_2$-Al 73
11.2.7. $PhCur_2$-Ga 74
11.2.8. $PhCur_3$-In 75
11.3. Cuentas viables 76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Helicobacter pylori*. 3
Figura 2. Curcumina: tautomerismo ceto-enol 17
Figura 3. Regiones importantes de la curcumina en relación a su funcionamiento 18
Figura 4. Esquema de la metodología general 22
Figura 5. Planeación de los experimentos 31
Figura 6. Tinción de Gram. 34
Figura 7. Pruebas de identificación de *Helicobacter pylori*. 35
Figura 8. Solución de $PhCur_2$-Al antes y después del proceso de sonicación 36
Figura 9. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con los controles positivos.... 38
Figura 10. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por el primer grupo de compuestos 39
Figura 11. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por el segundo grupo 43
Figura 12. Comparación de la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por controles positivos y por los compuestos derivados de la curcumina. 45
Figura 13. Distribución de datos de la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con curcumina. 68
Figura 14. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con curcumina. 68
Figura 15. Distribución de datos de la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con fenilcurcumina 69
Figura 16. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con fenilcurcumina 69
Figura 17. Distribución de los datos de la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con $PhCur_2$-Mn 70
Figura 18. Inhibición de *Helicobacter pylori* a diferentes concentraciones de $PhCur_2$-Mn. 70
Figura 19. Distribución de los datos en la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con $PhCur_2$-Cu 71
Figura 20. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con $PhCur_2$-Cu 71
Figura 21. Distribución de los datos de la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con $PhCur_2$-Zn 72
Figura 22. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con $PhCur_2$-Zn. 72

Figura 23. Distribución de los datos en la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con $PhCur_2$-Al 73
Figura 24. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con $PhCur_2$-Al..... 73
Figura 25. Distribución de los datos en la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con $PhCur_2$-Ga 74
Figura 26. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con $PhCur_2$-Ga. 74
Figura 27. Distribución de los datos en la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con $PhCur_3$-In..... 75
Figura 28. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con $PhCur_3$-In. 75
Figura 29. Sembrado de diluciones en la placa de agar Casman..... 77
Figura 30. Unidades formadoras de colonias encontradas por cada factor de dilución 77

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Regímenes de tratamientos para *Helicobacter* pylori 10
Tabla 2. Reportes de la actividad anti-*Helicobacter* pylori in vitro de la curcumina..... 15
Tabla 3. Propiedades de la curcumina relacionadas a la infección por *Helicobacter pylori* 16
Tabla 4. Toxicidad de la curcumina 16
Tabla 5. Complejos utilizados en este trabajo 26
Tabla 6. Conversión de la concentración en µg/mL a µM 37
Tabla 7. Resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos 38
Tabla 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por el primer grupo de compuestos 40
Tabla 9. Diferencia estadística entre los valores de inhibición de la curcumina con respecto a los valores de inhibición de los compuestos experimentales..... 41
Tabla 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por el primer grupo de compuestos 43
Tabla 11. CMI de antibióticos y diferentes compuestos activos de curcumina 46
Tabla 12. Degradación de curcuminoides dependiente de su estructura molecular..... 49
Tabla 13. Efecto antibacteriano de distintos complejos metálicos de curcumina reportados por otros autores 52

Tabla 14. Propiedades reportadas para diferentes complejos metálicos de la curcumina 66
Tabla 15. Factores de dilución 76

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES – Antiinflamatorios no esteroideos

ATCC – del inglés American Type Culture Collection (colección americana de cultivos tipo)

Cag-PAI – del inglés *cag* Pathogenicity Island (Isla de patogenicidad *cag)*

CMI – Concentración mínima inhibitoria

DMSO – Dimetilsulfóxido

IBP – Inhibidor de la bomba de protones

MALT – del inglés mucosa associated lymphoid tissue (tejido linfoide asociado a la mucosa)

MET – Microscopía electrónica de transmisión

MIC – del inglés Minimum inhibitory concentration

MT – Medicina tradicional

MTC – Medicina tradicional y complementaria

OMS – Organización Mundial de la Salud

PCR – del inglés polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PhCur – Fenilcurcumina

$PhCur_2$-Al – Complejo fenilcurcumina-Aluminio

$PhCur_2$-Cu – Complejo fenilcurcumina-Cobre

$PhCur_2$-Ga – Complejo fenilcurcumina-Galio

$PhCur_3$-In – Complejo fenilcurcumina-Indio

$PhCur_2$-Mn – Complejo fenilcurcumina-Manganeso

$PhCur_2$-Zn – Complejo fenilcurcumina-Zinc

ppm – Partes por millón

ROS – del inglés Reactive Oxygen Species (especies reactivas de oxígeno)

SOD – Superóxido Dismutasa

SST4 – Sistema de Secreción Tipo 4

UFC – Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Helicobacter pylori es una bacteria de gran relevancia en el sector salud debido a su capacidad de infectar la mucosa gástrica humana y generar una serie de patologías como la gastritis crónica, úlceras gástricas o duodenales, linfoma tipo MALT (tejido linfoide asociado a la mucosa) y cáncer gástrico. La infección por la bacteria es un evento que puede ser de carácter agudo o crónico y la severidad de la infección depende de factores del propio huésped, la bacteria y el ambiente. Recientemente se ha visto un incremento en la resistencia a antibióticos, como consecuencia, *H. pylori* es cada vez más difícil de erradicar y las terapias se vuelven más largas, costosas y con grandes porcentajes de fallo. Una solución a este problema es el uso de moléculas nuevas con potencial antibiótico. Dentro del campo de la medicina alternativa hay registros de plantas o extractos que son usados principalmente en las comunidades para el tratamiento de las enfermedades producidas por *H. pylori* y que recientemente han ganado importancia en el ámbito académico debido a que muestran tener potencial terapéutico.

Para el presente trabajo se evaluaron diferentes moléculas modificadas a partir de la curcumina, un compuesto que se extrae del rizoma de *Curcuma longa*, una planta de origen asiático que actualmente tiene una comercialización a nivel mundial y que ha mostrado actividad contra *H. pylori*. La finalidad fue probar el potencial anti-*H. pylori* de la curcumina, fenilcurcumina y 6 compuestos metálicos de la fenilcurcumina mediante la determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) sobre un cultivo líquido de la bacteria, usando como controles positivos dos antibióticos que se emplean regularmente en las terapias de erradicación: metronidazol y amoxicilina. Los resultados fueron positivos para la fenilcurcumina (PhCur), $PhCur_2$-Cu, $PhCur_2$-Mn y $PhCur_2$-Zn, cuyas CMIs fueron menores a la de la curcumina y mucho menores a la del metronidazol, además de que superaron el 100% de inhibición del crecimiento de las bacterias, dando un indicativo de su efecto bactericida. Por otro lado, $PhCur_2$-Al, $PhCur_2$-Ga y $PhCur_3$-In mostraron tener un efecto inhibitorio mucho menor y su CMI (100%) no se alcanzó dentro del rango de concentraciones probadas (menores a 3.9 µg/mL).

Con los datos obtenidos se puede concluir que el potencial para inhibir el crecimiento de *H. pylori* de la curcumina puede ser mejorado al realizar modificaciones sobre la molécula, además, en el caso de los complejos metálicos su potencial resultó ser dependiente del metal que contenga. Este es el primer reporte sobre la actividad *in vitro* anti-*H. pylori* de la fenilcurcumina y sus complejos metálicos. Queda para futuros estudios elucidar el mecanismo de acción de las moléculas y a qué nivel interactúan con la bacteria, especialmente para el caso de los compuestos más activos cuyo potencial para la terapia de erradicación contra la bacteria es prometedor.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a significant bacterium in the health sector because of its capacity to infect the human gastric mucosa, resulting in various pathologies such as chronic gastritis, gastric or duodenal ulcers, MALT-type lymphoma and gastric cancer. Bacterial colonization can be either acute or chronic, and the severity of the infection is influenced by host, bacterial and environmental factors. Due to the recent rise in bacterial resistance, the efficacy of *H. pylori* eradication treatments is decreasing, leading to longer durations, higher costs and increased rates of failure. To address this issue, researchers are seeking new antibiotic agents. Within the field of Alternative Medicine, there are documented instances of plants or extracts commonly used in communities for the treatment of *H. pylori* diseases. Recently, these remedies have become important in academic circles due to their demonstrated therapeutic potential.

In this study, we evaluated various chemically modified molecules from curcumin, a compound extracted from the rhizome of *Curcuma longa*, an Asian plant marketed worldwide, and that has demonstrated activity against *H. pylori*. The aim of this study was to investigate the anti-*H. pylori* activity of curcumin, phenylcurcumin and six phenylcurcumin-metal complexes by determining their Minimal Inhibitory Concentration (MIC) by the broth dilution method. Metronidazole and amoxicillin, two antibiotics commonly used in *H. pylori* eradication therapy, were included as positive controls. The tested compounds, including phenylcurcumin (PhCur), $PhCur_2$-Cu, $PhCur_2$-Mn and $PhCur_2$-Zn, demonstrate positive results with lower MICs than curcumin and significantly lower than metronidazole. In addition, these compounds exhibited a bactericidal effect by inhibiting bacterial growth by more than 100%. By contrast, $PhCur_2$-Al, $PhCur_2$-Ga and $PhCur_3$-In showed a much weaker inhibitory effect and their MIC 100% was not reached within the tested concentration range (lower than 3.9 µg/mL).

Based on the gathered data, it can be concluded that altering the curcumin molecule can enhance its potential to inhibit *H. pylori* growth and, in the case of metal complexes their ability varies depending on the specific metal they contain. This is the first report on the *in vitro* anti-*H. pylori* activity of phenylcurcumin and its metal complexes. It is necessary to elucidate the molecules' mechanism of action and their level of interaction with the bacteria, particularly the most active ones, whose potential for eradication therapy against the bacteria is promising.

1. INTRODUCCIÓN

Históricamente, el uso tradicional de la cúrcuma para tratar enfermedades data de miles de años, pero en los años 90s, a partir de la síntesis de la curcumina, su principio activo, comenzó a ganar popularidad dentro del campo médico. Como resultado, actualmente tenemos una enorme cantidad de estudios que han evaluado el potencial terapéutico de la molécula. Por otra parte, *Helicobacter pylori* es una bacteria muy importante por su capacidad de causar patologías gástricas severas y cáncer gástrico. A lo largo de los años, esta bacteria ha desarrollado una serie de mecanismos de resistencia antibiótica que van desde modificaciones genéticas y permeabilidad selectiva de su membrana, hasta cambios en la morfología de la bacteria. Consecuentemente, hay una búsqueda activa de moléculas novedosas que tengan la propiedad de detener el crecimiento de la bacteria o incluso promuevan su muerte celular.

La medicina tradicional funciona como fuente de compuestos con potencial terapéutico y está respaldada tanto por el conocimiento popular de los usuarios, su creciente demanda y la gran cantidad de estudios científicos que caracterizan las propiedades de los productos naturales, además de ser reconocida por la OMS. La curcumina entra en esta categoría de moléculas prometedoras, ya que, además de tener antecedentes de uso en la medicina medicinal asiática, se le han identificado propiedades biológicas, incluido su potencial antibacteriano contra *H. pylori*. Sin embargo, la molécula tiene muchos problemas derivados de su pobre solubilidad en medios acuosos y su rápida degradación.

Actualmente se pretende eliminar estos impedimentos con modificaciones químicas a su estructura o usando una vía de administración distinta. Recientemente, con base en la curcumina se sintetizó la fenilcurcumina, además de varios derivados metálicos, no obstante, su potencial antibiótico no ha sido evaluado. En el presente trabajo se empleó el método de dilución en caldo para determinar la actividad inhibitoria de estos curcuminoides sobre el crecimiento de *H. pylori* y comprobar si tienen un desempeño similar o incluso mejor al de la curcumina prístina.

2. ANTECEDENTES

2.1. Helicobacter pylori

2.1.1. *Clasificación y características generales*

Helicobacter pylori Goodwin 1989, es una bacteria Gram negativa que coloniza la mucosa gástrica humana. Mide 2-4 µm de largo por 0.5-1 µm de ancho, tiene de 4 a 8 flagelos unipolares y presenta varias formas dependiendo de las condiciones ambientales en las que crezca, la más característica es la espiralada (Figura 1). Es un organismo que crece en condiciones microaerofílicas: O_2 de 2 a 5% y CO_2 de 5 a 10%; además, necesita humedad alta y una temperatura entre 34-40 °C (Kusters *et al.*, 2006). Su taxonomía actual está descrita en el Manual de Bergey (Brenner *et al.*, 2005) como:

Dominio: Bacteria

Filo: Proteobacteria

Clase: Epsilonproteobacteria

Orden: Campylobacterales

Familia I: Helicobacteraceae

Género: *Helicobacter*

Especie: *Helicobacter pylori*

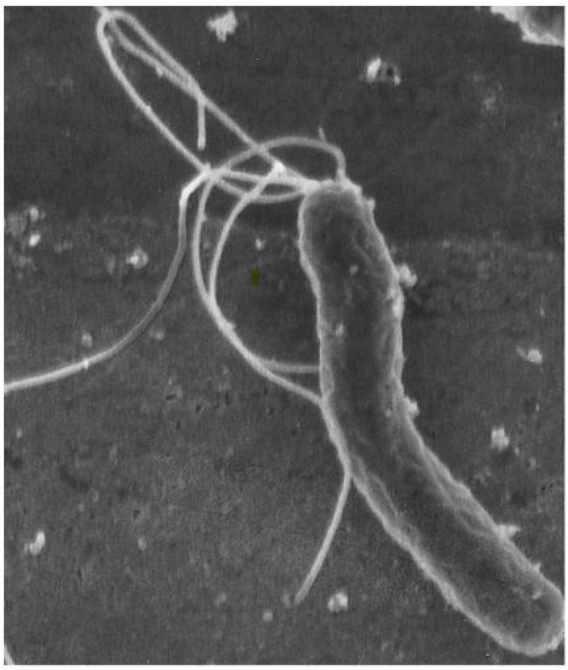


Figura 1. ***Helicobacter pylori***. Morfología de la bacteria observada por MET (× 21 000). Se aprecia la forma espiralada o en "S" y cinco flagelos. Tomado de Brenner *et al.* (2005).

Descubierta en 1982 por Marshall y Warren e inicialmente clasificada dentro del género *Campylobacter*, fue reclasificada siete años después cuando se propuso el género *Helicobacter* (Goodwin *et al.*, 1989). *Helicobacter pylori* es una bacteria que coloniza exclusivamente al ser humano, pero también ha sido encontrada en primates y puede inocularse en ratones, gerbos, gatos, perros y cerdos para experimentación (Brenner *et al.*, 2005). La infección por esta bacteria es, en la mayor parte de los casos, asintomática. Sin embargo, también se considera el principal agente etiológico de la gastritis crónica, de la úlcera péptica y es un factor de predisposición para el cáncer gástrico (Kusters *et al.*, 2006).

De las personas infectadas sólo algunas desarrollan patologías severas, por lo que la infección por *H. pylori* se considera una relación de carácter dual; actuando como un comensal (obtiene beneficios, pero no genera un impacto sobre el humano) o un agente patológico y la diferencia depende de factores ambientales, características y hábitos del hospedero y de la cepa que se encuentra colonizando (Blaser & Berg, 2001). El nivel de patogenicidad de una cepa depende de la vía evolutiva que tomó la bacteria en determinada zona geográfica; se estima su coevolución con el humano desde hace 58 000 años, trazándose su presencia, por

técnicas filogeográficas, por primera vez en África (Kim, 2016; Testerman & Morris, 2014). La susceptibilidad del hospedero a contraer cepas más o menos agresivas puede determinar la duración de la infección, es decir, que desarrolle un caso agudo o crónico (Brown, 2000).

Otros factores que pueden influir sobre la patogenicidad de *H. pylori* son las enfermedades crónicas (problemas cardiovasculares, diabetes, condiciones neurodegenerativas, etc.), los hábitos, la alimentación, la condición física, el nivel de estrés, el consumo de alcohol, entre otros. En el caso de la dieta, existe una asociación entre las enfermedades crónicas mencionadas y una alimentación a base de productos procesados (harinas, grasas, azúcares refinadas) con bajo consumo de plantas, este último punto es de suma importancia ya que, de forma natural, las plantas contienen fibras y agentes quimioprotectores que actúan como antioxidantes, antiinflamatorios y previenen la degeneración de los órganos (Bengmark *et al.*, 2009).

En la revisión de Zaidi *et al.* (2017) se reporta que los alimentos de la dieta diaria pueden funcionar como moduladores (positivos o negativos) del estado fisiológico del tracto digestivo e intestinal. De forma general, el cuerpo es beneficiado al consumir ciertas especias, plantas medicinales, productos fermentados que funcionan como probióticos, vegetales y frutas frescas, mientras que el consumo en exceso de sal, comidas ahumadas, alimentos de conserva y carnes procesadas se consideran dentro de dietas “hostiles” que pueden desencadenar inflamación e incluso carcinogénesis.

2.1.2. *Factores de colonización*

La infección por *H. pylori* es un evento de larga duración. La bacteria suele contraerse durante la niñez y es capaz de proliferar en la mucosa gástrica durante el resto de la vida humana a menos que el huésped se someta a un tratamiento de erradicación (Blaser & Berg, 2001). Una vez que la bacteria llega al estómago, se desplaza hacia la mucosa gástrica, predominantemente a la región del antro estomacal. La movilidad de la bacteria es proporcionada por sus flagelos que la ayudan a transportarse a través de soluciones viscosas como la capa de moco que recubre a las células del epitelio gástrico (IARC & WHO, 1994; Kusters *et al.*, 2006). La motilidad de la bacteria se regula por el reconocimiento de sustancias quimioatrayentes (urea, bicarbonato, arginina, histidina, zinc, níquel) o repelentes (pH ácido,

especies reactivas de oxígeno, bilis, cobre, moléculas quórum propias de *H. pylori*) (Johnson & Ottemann, 2018; Marcus & Scott, 2016).

A pesar de colonizar el estómago, *H. pylori* no es una bacteria acidófila sino neutrófila y crece óptimamente a un pH 7, por esta razón la bacteria se desplaza hacia la región de la mucosa gástrica donde el pH es neutro (Testerman & Morris, 2014). Para sobrevivir el recorrido a través del lumen gástrico (pH 3-4) la bacteria cuenta con un mecanismo de neutralización. La ureasa es una proteína de tipo intracelular que hidroliza la urea presente en el medio convirtiéndola en amoniaco (NH_3) y dióxido de carbono (CO_2), posteriormente, ambas moléculas sufren otros cambios que en conjunto mantienen un pH interno neutro y forman un microambiente también neutro, alrededor de la bacteria que le permite llegar y establecerse exitosamente en la mucosa gástrica (Sachs *et al.*, 2005).

Una vez situada en el epitelio gástrico, la bacteria usa proteínas de membrana externa denominadas adhesinas que, por reconocimiento de distintos peptidoglicanos y carbohidratos expresados en las células epiteliales, logra unirse a ellas. Este proceso es clave debido a las condiciones adversas dentro del estómago: el paso constante de fluidos y materia, los movimientos de peristalsis y el recambio constante de la capa de mucosa (Marcus & Scott, 2016). Cerca del 2% de las bacterias se encuentran adheridas al epitelio, el 30% está en un rango de 0-5 µm en el moco que recubre la superficie del epitelio y el resto está en un rango de 15-30 µm (Marcus & Scott, 2016).

2.1.3. *Factores involucrados en la inflamación y daño al tejido*

Helicobacter pylori hace uso de diferentes mecanismos de patogenicidad (Ogura *et al.*, 2000). Las adhesinas mencionadas previamente pueden inducir inflamación local en el epitelio gástrico de forma independiente o potenciando la actividad de otras proteínas dando como resultado una inflamación mayor (Alzahrani *et al.*, 2014).

Otro factor es la citotoxina vacuolizante (VacA), cuyo nombre hace referencia a su habilidad para producir abundantes vacuolas dentro de las células de la mucosa gástrica. Cuando las VacA son expulsadas por la bacteria, se adhieren a la membrana lipídica del epitelio creando un canal selectivo para aniones que es endocitado y da origen a la formación de vacuolas. Estas vacuolas se llenan de aniones cloruro (Cl^-) y bases débiles (NH_4^+), desencadenando una

reacción osmótica (se llena de agua) (Kim, 2016). Adicionalmente, la proteína puede unirse a la membrana mitocondrial para generar alteraciones que desencadenen una reacción apoptótica y suprime el mecanismo de barrera de las células epiteliales propiciando una pérdida de nutrientes esenciales (Testerman & Morris, 2014).

Algunas cepas pueden sintetizar la isla de patogenicidad Cag-PAI, involucrada en la inducción de la úlcera péptica y el cáncer gástrico. Es un conjunto de 31 genes que codifican un inyectisoma o sistema de secreción tipo 4 (SST4) y la citotoxina asociada al gen A (CagA). El inyectisoma es un conjunto de proteínas que forman una aguja capaz penetrar la membrana celular e inyectar a CagA (Alzahrani *et al.*, 2014). Los efectos de la citotoxina sobre el epitelio abarcan: promoción de la elongación celular (afecta su citoesqueleto), alteración de la motilidad y proliferación, generan inestabilidad cromosómica y también interactúa con proteínas que regulan los complejos de uniones estrechas entre células, como resultado final desencadenan una reacción apoptótica (Covacci *et al.*, 1998; Kim, 2016).

Finalmente, dentro de los factores de virulencia también participa la ureasa cuya función principal es generar CO_2 y NH_3. El amoniaco liberado puede inducir la producción de óxido nítrico (NO) por los macrófagos, que a su vez ejerce un efecto tóxico sobre las uniones intracelulares del epitelio gástrico (Wroblewski *et al.*, 2009).

2.1.4. *Factores de supervivencia*

Ciertas células del hospedero generan especies reactivas de oxígeno (ROS) como protección ante las infecciones, este evento se ve incrementado posterior a la colonización por *H. pylori*. Algunas ROS son el ácido hipocloroso (HOCl), el radical hidroxilo (HO·), el anión superóxido ($O_2\cdot^-$) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Las ROS dañan a las bacterias infligiendo alteraciones en su DNA, sus proteínas o su membrana lipídica, para neutralizar o evitar el daño, *H. pylori* tiene proteínas como la catalasa (KatA) enzima cuya función es convertir H_2O_2 en H_2O y O_2 (su abundancia representa el 4-5% de la expresión proteica total) y en la actualidad se hipotetiza que también inactiva al HOCl (Benoit & Maier, 2016). De forma similar, la enzima superóxido dismutasa (SOD), localizada en la superficie celular, confiere una mayor resistencia al estrés oxidativo provocado por H_2O_2 y $O_2\cdot^-$, además de interactuar con especies reactivas del nitrógeno como NO (precursor del peroxinitrito $ONOO^-$, muy reactivo) (Seyler *et al.*, 2001). Sumado a esto, existen otras peroxidasas cuyo

mecanismo todavía no ha sido elucidado completamente, pero que tienen gran impacto considerando que *H. pylori* sólo crece en condiciones microaerofílicas y es muy susceptible a la presencia del oxígeno, especialmente cuando se trata de sus especies reactivas.

Por otra parte, la ureasa también desarrolla un papel dentro de este apartado. Al mantener un pH regulado constantemente, esta proteína asegura que el potencial de membrana de la bacteria se mantenga estable, esto se debe a la doble acción que realiza la ureasa: el NH_3 es excretado al medio para formar su microambiente (adquiere un H^+, transformándose en su forma ionizada NH_4^+), mientras que el CO_2 se mantiene en el periplasma donde la anhidrasa carbónica lo convierte en HCO_3^-, un amortiguador muy fuerte a pH 7, la acción conjunta de ambas moléculas mantienen un pH neutro constante tanto en el exterior de la bacteria como a nivel de periplasma y citosol, esto impacta no sólo en las funciones básicas de la membrana, sino que también permite la correcta síntesis de proteínas (Marcus *et al.*, 2005; Sachs *et al.*, 2005).

2.2. Epidemiología

La distribución de *H. pylori* es de carácter global y aunque recientemente los reportes de prevalencia en países industrializados van en descenso, aún se encuentra presente en el 50% de la población mundial; la probabilidad de infección es dependiente de factores como la edad, país de residencia, etnicidad y principalmente factores socioeconómicos (Hunt *et al.*, 2011). Para el caso de México se reporta una prevalencia del 60-70%. Por estas razones es considerada como un problema de salud pública a nivel nacional y mundial (Hunt *et al.*, 2011; Kusters *et al.*, 2006).

Los mecanismos de transmisión de la bacteria aún no han sido claramente descritos y todavía existe mucha controversia dentro del tema. Aunque existen modelos de transmisión por consumo de agua contaminada, contacto con material quirúrgico incorrectamente esterilizado y zoonosis, no son apoyados del todo, pues las probabilidades de infección son muy bajas y no son comprobables (Brown, 2000). El modo de transmisión más aceptado es el de persona a persona; las dos rutas más estudiadas son la oral-oral, donde una persona es infectada por contacto con vómito, reflujo gástrico, placa dental o saliva (en menor medida) y la fecal-oral, ya que se ha podido cultivar a *H. pylori* a partir de muestras fecales (Brown, 2000; IARC & WHO, 1994). Aunado a esta teoría, las probabilidades de infección con la bacteria son

mayores durante la niñez y disminuyen conforme aumenta la edad, esto se debe a que durante las etapas tempranas puede ocurrir una transmisión intrafamiliar (Ding, 2020).

2.3. Patologías e impacto

Las enfermedades asociadas a la infección por *H. pylori* son consecuencia de una persistente inflamación de la mucosa gástrica (gastritis). Del total de personas infectadas se estima que alrededor del 80% permanecen asintomáticos, mientras que, del 10 al 20% desarrollan úlcera péptica, del 1 al 2% cáncer gástrico y menos del 1% linfoma tipo MALT (Kusters et al, 2006). Aunque en menor medida, también se han detectado otras enfermedades asociadas a la infección, como dispepsia funcional, adenocarcinoma colorrectal, ciertos tipos de linfomas no relacionados al estómago, cáncer de laringe/faringe y otras enfermedades exogástricas; esta correlación se induce a partir de la detección de *H. pylori* (a través de PCR, cultivos e histología) en pacientes y en diferentes órganos afectados que presentaron una mejora en su cuadro clínico tras tomar tratamientos para la erradicación de la bacteria (Testerman & Morris, 2014).

En 1994, la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer reconoció a *H. pylori* como un carcinógeno tipo I (IARC & WHO, 1994). El cáncer gástrico es el 5to más común y ocupa el 4to lugar como causa de muerte por cáncer, el 82% ocurren en regiones distales al cuerpo y el 90% de estos casos se atribuyen a *H. pylori*, tan solo para el año 2020 se estimó que a nivel mundial (estudio de 185 países) se presentaron 1.1 millones de casos nuevos de cáncer gástrico y 770 000 de muertes ocasionadas por el mismo y se estima que para 2040 esta cifra pueda incrementar hasta 1.8 millones de casos nuevos y 1.3 millones de muertes (Morgan *et al.*, 2022). De acuerdo con los datos de mortalidad de Globocan 2020, a nivel mundial ocurren más muertes por cáncer gástrico en hombres (65.4%) que en mujeres (34.6%) y se observa una tendencia mayor en países asiáticos, Sudamérica y en Europa central y del este.

2.4. Tratamientos

Aunque existen diferentes esquemas de tratamiento para la infección por *H. pylori*, los componentes pueden ser separados en tres categorías. 1) Antibióticos: existen varios tipos (β-lactámicos, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclinas, etc.), no es recomendado el uso de monoterapias (Tshibangu-Kabamba & Yamaoka, 2021). 2) Supresores del ácido estomacal: se trate de inhibidores de la bomba de protones (IBP) (omeprazol, lansoprasol, esomeprazol, rabeprasol), antagonistas de los receptores H2 de la histamina en las células parietales gástricas (cimetidina, ranitidina, etc.) o los nuevos y potentes inhibidores selectivos de la H^+, K^+-ATPasa gástrica (vonoprazan), los cuales disminuyen la secreción de ácido además de potenciar la actividad de algunos antibióticos (Scott *et al.*, 2016). 3) Citoprotectores de la mucosa gástrica: previenen lesiones agudas en la mucosa gástrica y aceleran su reparación (sales de bismuto, carbenoxolona, sucralfato) (Szabo, 2014). Algunos ejemplos de los esquemas de tratamiento se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Regímenes de tratamientos para *Helicobacter pylori*

Terapia	Duración	Tratamiento
		Primera línea
Terapia triple	7 – 14 días	Amoxicilina 1000 mg (2/día)
		Claritromicina o Metronidazol 500 mg (2/ día)
		IBP dosis estándar (2/día) o Esomeprazol 40 mg (1/día)
Terapia cuádruple	10 – 14 días	Metronidazol 250 mg (4/día)
		Tetraciclina 500 mg (4/día)
		IBP dosis alta (2/día) o Esomeprazol 40 mg (1/día)
		Bismuto 120 mg (4/día)
Secuencial	10 días	Amoxicilina 1000 mg (2/día) días 1 a 5
		Claritromicina 500 mg (2/día) días 6 a 10
		Metronidazol o Tinidazol 500 mg (3/día) días 6 a 10
		IBP dosis estándar (2/día) por los 10 días
Concomitante	14 días	Amoxicilina 1000 mg (2/día)
		Claritromicina 500 mg (2/día)
		Metronidazol o Tinidazol 500 mg (2 /día)
		IBP dosis estándar (2/día)
		Segunda línea o rescate
Terapia dual	14 días	Amoxicilina 500 mg (c/6 hrs)
		IBP dosis completa (c/6 hrs)
Triple de rescate	14 días	Amoxicilina 1000 mg (2/día) días 1 a 5
		Fluoroquinolona o Rifabutina
		IBP dosis estándar (2/día)
Cuádruple de rescate	14 días	Tetraciclina 500 mg (4/día)
		Furazolidona 100 mg (3/día)
		IBP dosis estándar (2/día)
		Bismuto o Subsalicilato (4/día)

IBP: Inhibidor de la bomba de protones. Modificado de Graham & Fischbach (2010); Testerman & Morris (2014).

En los últimos años la eficacia de las terapias ha disminuido debido a que la bacteria tiene una creciente resistencia a antibióticos, esto ocurre debido a diversas dificultades que impiden el apego del paciente al tratamiento como lo son experimentar efectos secundarios y adversos, la larga duración y gran complejidad de las terapias de erradicación y los costos elevados de los fármacos (Graham & Fischbach, 2010).

Actualmente, la terapia triple no se receta debido a su baja efectividad (<80%), por otra parte, la efectividad de las otras terapias es diferente para cada población dado que la bacteria presenta diferentes resistencias a antibióticos en todo el mundo. Para contrarrestarlo, se recomiendan tratamientos con dosis altas, duración prolongada (14 días) y empleando antibióticos que el paciente no haya usado previamente en otro tratamiento. En los tratamientos de segunda y tercera línea se recetan esquemas que consideran la resistencia local de la bacteria a diferentes antibióticos y la posible interacción de los fármacos con otros medicamentos que se encuentra consumiendo el paciente (Graham & Fischbach, 2010).

Helicobacter pylori tiene muchos mecanismos de protección contra los antibióticos que incluyen mutaciones en el DNA y RNA, mutaciones estructurales, regulación de expresión genética (mayor producción de ciertas proteínas), regulación del flujo de antibióticos por canales, formación de biofilm o un cambio a la morfología cocoide (Tshibangu-Kabamba & Yamaoka, 2021). La resistencia a los antibióticos en la población varía a través del tiempo y espacio, algunos ejemplos reportados son: 1) Claritromicina: Europa 7.7-15% (2012), Sudamérica 19.8-26.7% (2011), Asia 31-60% (2014) (Martínez *et al.*, 2014; Megraud *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019). 2)Tetraciclina: Sudamérica 0-26.8% (2010) y Europa 0.9% (2012) (Martínez *et al.*, 2014; Megraud *et al.*, 2013). 3) Levofloxacina: Europa 7.7-21.5% (2012), China 56% (2019), Sudamérica 23-37% (2011) (Martínez *et al.*, 2014; Megraud *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019). 4) Amoxicilina: Europa 0.7% (2012), Sudamérica 0-20.5% (2012) (Martínez *et al.*, 2014; Megraud *et al.*, 2013). 5) Metronidazol: Europa 30-43.8%, (2012), Asia 48.2-78% (2014), Sudamérica 38-81% (2010) (Martínez *et al.*, 2014; Megraud *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2019).

Para México el último reporte de resistencias a antibióticos por *H. pylori* fue realizado por Camorlinga-Ponce *et al.* (2021), donde se registran valores de 58.6%, 6.5%, 32.2% y 58.1% de resistencia para metronidazol, amoxicilina, claritromicina y levofloxacina respectivamente. Estos datos fueron obtenidos de muestras de bacterias provenientes de biopsias realizadas en la población mestiza en 2017, cabe mencionar que los porcentajes de resistencia para la población indígena son menores.

Además de las mono-resistencias, hay cepas que presentan resistencia a múltiples antibióticos (multirresistentes) o poseen heterorresistencia, es decir, que la persona infectada

tiene una población heterogénea de bacterias y que cada una de esas subpoblaciones tiene diferente susceptibilidad a los antibióticos, resultando en una erradicación parcial dependiendo de los antibióticos y las dosis usadas (Tshibangu-Kabamba & Yamaoka, 2021).

Considerando los problemas actuales de los tratamientos de erradicación de *H. pylori* y a la limitada gama de antibióticos a los que es susceptible la bacteria, es clara la necesidad de encontrar nuevos tratamientos y/o moléculas con diferentes mecanismos de acción, además de considerar las limitantes de las terapias de modo que exista un mejor apego del paciente a los tratamientos y se evite la generación de nuevas resistencias.

2.5. Plantas medicinales

2.5.1. *Medicina tradicional*

El uso de plantas y otros productos naturales para tratar enfermedades es una práctica muy extendida y antigua, a través del tiempo y en diferentes culturas se perfeccionaron los métodos o técnicas usadas para combatir enfermedades, dando origen a lo que conocemos como medicina tradicional (MT) (Yuan *et al.*, 2016). Mientras que en Occidente la MT se menosprecia debido a su falta de confiabilidad, en países asiáticos se ha logrado estandarizar y perfeccionar técnicas herbolarias al grado que ya forman parte de su sistema de salud, a nivel mundial son prácticas que prevalecen y mucha gente depende de ellas para el cuidado de su salud (Yuan *et al.*, 2016).

La OMS (2013) reconoce que hay una creciente demanda de la medicina tradicional y complementaria (MTC), por lo cual fijaron como objetivo incrementar su contribución a los sistemas de salud a través de su reglamentación e investigación a nivel mundial. Como ejemplo, en México se reporta un uso de esta medicina en el 20-39% de la población, que incluye tanto conocimiento tradicional regional como medicina tradicional china e india (Unani) (WHO, 2019). Las personas que acuden a estos tratamientos suelen pertenecer a grupos con bajo nivel socioeconómico, comunidades indígenas, adultos mayores de 60 años o que no cuentan con acceso a clínicas (van Gameren, 2010).

Aunque el uso de la MTC se vio reducida con el surgimiento de la medicina moderna y la obtención de fármacos modificados sintéticamente, ahora se sabe que estas tecnologías tienen límites, por lo que ha habido una creciente búsqueda de moléculas novedosas en los

productos naturales (Yuan *et al.*, 2016). En la actualidad el 50% de los fármacos de uso clínico provienen de productos naturales, siendo el 11% de origen vegetal. Las plantas sintetizan compuestos de protección ante distintas amenazas, los cuales son aprovechados en la medicina moderna, pero tienen un gran impacto en la herbolaria, que hasta hoy representa la principal fuente de salud para aproximadamente el 80% de la población mundial (Shakya, 2016). Debido a sus propiedades y a los valores nutricionales, estas plantas medicinales forman parte de la dieta diaria (especialmente especias) y se cree que su consumo periódico funciona como un mecanismo de prevención ante distintas enfermedades, entre ellas la infección de *H. pylori* o los daños causados por la misma (Zaidi *et al.*, 2017). En el laboratorio donde se desarrolló esta tesis, se han buscado alternativas para la erradicación y tratamiento de las enfermedades producidas por *H. pylori* en las plantas medicinales, las cuales han sido una fuente de compuestos o moléculas nuevas que pueden utilizarse como antibióticos.

2.5.2. *Curcuma longa*

Curcuma longa L., comúnmente conocida como cúrcuma, es una planta herbácea perene con rizomas oblongos de coloración amarillo-café que se cultiva en regiones tropicales y subtropicales (la especie silvestre es *Curcuma aromatica*). La India es el principal productor a nivel mundial, en dicho país es usada como especia, conservador y colorante alimenticio, en cosméticos y es parte de rituales o ceremonias religiosas (Priyadarsini, 2014). Además, es parte de la medicina tradicional en China y la India (Ayurveda) teniendo registros de su uso que datan desde hace 2500 años (Verma *et al.*, 2018). Actualmente, debido a sus variadas propiedades, su uso se ha extendido mundialmente.

De acuerdo a la base de datos de Trópicos, la especie se clasifica como:

Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Superorden: Lianae
Orden: Zingiberales
Familia: Zingiberaceae
Género: *Curcuma*
Especie: *Curcuma longa* L.

El rizoma de la especie puede contener del 2% al 9% de curcuminoides según las condiciones de crecimiento otorgadas, este grupo se compone de cuatro compuestos: curcumina, dimetoxicurcumina, bis-dimetoxicurcumina y curcumina cíclica, siendo la curcumina el de mayor proporción (60-70%), puede ser extraída y purificada por distintos métodos, así como también puede ser sintetizada (Priyadarsini, 2014). La curcumina fue descubierta en 1815, en 1913 se describió su estructura y se sintetizó, pero hasta 1995 empezó a tomar importancia en el campo médico como una molécula con potencial terapéutico (Sanphui & Bolla, 2018).

2.5.3. *Propiedades biológicas de la curcumina*

Entre las propiedades reportadas para la curcumina se encuentran la actividad antioxidante, antiinflamatoria, antibiótica, antimutágena y como anticancerígena. En la medicina moderna se emplea para tratar patologías o enfermedades como el Alzheimer, Parkinson, esclerosis múltiple, epilepsia, enfermedades cardiovasculares, artritis, cáncer, asma, síndromes metabólicos, diabetes, colitis, depresión, entre otras (Hewlings & Kalman, 2017). Su

2.5.4. *Propiedades anti-Helicobacter pylori y relacionadas*

El primer registro sobre la actividad anti-*H. pylori* de la curcumina lo realizaron Mahady *et al*. en 2002, reportando una buena actividad inhibitoria; evaluaron el potencial del compuesto y del extracto metanólico del rizoma de la cúrcuma sobre 14 aislados clínicos y 5 cepas $cagA^+$ incluyendo a la cepa de colección ATCC 43504. Para el caso del extracto metanólico se reportó una MIC_{50} de 50 µg/mL y de 12.5 µg/mL para las cepas $cagA^+$ y ATCC 43504, mientras que la curcumina tuvo una MIC (100%) de 6.25-12.5 µg/mL para los aislados clínicos, cepas $cagA^+$ y para la cepa ATCC 43504. Posteriormente, distintos autores realizaron más pruebas *in vitro* para comprobar el efecto de la curcumina y determinar su MIC (Tabla 2), así como pruebas específicas de daños a proteínas o su efecto inhibitorio en co-cultivos. En la mayoría de los casos se determinó el efecto inhibitorio usando el método de dilución en agar.

Tabla 2. Reportes de la actividad anti-*Helicobacter pylori in vitro* de la curcumina

Prueba	Efecto	Referencia
Prueba de susceptibilidad de 19 cepas de *H. pylori* (5 cepas *cagA*$^+$) mediante el método de dilución en agar (72 h)	MIC=6.25 µg/mL para la cepa ATCC 43504. Las otras cepas *cagA*$^+$ tuvieron una MIC en un rango de 6.25-12.5 µg/mL.	Mahady *et al.*, 2002
Evaluación de viabilidad celular por sus UFC (siembra en placa, incubadas durante 3 h)	Decremento en las UFC con 80 µM (~29.47 µg/mL) tras 1 h, sin efectos sobre la viabilidad celular	Foryst-Ludwig *et al.*, 2004
Susceptibilidad de *H. pylori* (ATCC 4354 y SS1) probada con el método de dilución en agar (72 h)	CMI=16 µg/mL para ambas cepas	Han *et al.*, 2006
Evaluación de UFC en cultivos incubados por 5 h	Se inhibió el crecimiento y viabilidad de las UFC a una concentración de ≥20 µM (~7.36 µg/mL)	Zaidi *et al.*, 2009
65 cepas (aislados clínicos y ATCC 43504) de *H. pylori* se cultivaron con curcumina (dilución en agar) (120 h)	CMI en un rango de 5-50 µg/mL, siendo 10 o 15 µg/mL la CMI para la mayoría de las cepas	De *et al.*, 2009
Co-cultivo de células AGS y *H. pylori* (cepas SS1 y AM1) pretratada con curcumina (24 h)	Efecto bactericida al 100% para ambas cepas a la concentración de 60 µM (22.1 µg/mL)	Kundu *et al.*, 2011

UFC: Unidades formadoras de colonias, CMI: Concentración mínima inhibitoria

Adicionalmente, se han reportado actividades de la curcumina sobre las complicaciones asociadas a la infección por *H. pylori*. Zaidi *et al.* (2017) comprobó el potencial de la curcumina de reducir lesiones y la inflamación en el tejido gástrico y en la revisión de Chattopadhyay *et al.* (2004) se reportan otros beneficios asociados al estómago (Tabla 3). Finalmente, también se han realizado pruebas en distintos modelos que prueban que la curcumina no tiene efectos tóxicos incluso a concentraciones altas (Tabla 4).

Tabla 3. Propiedades de la curcumina relacionadas a la infección por *Helicobacter pylori*

Efecto	Referencia
Inhibición de la inflamación a través de diferentes mecanismos (óxido nítrico, interferones, factores de necrosis tumoral e interleucinas)	Chainani-Wu, 2003
Protección contra ciertos tipos de inducción de úlceras en cuyos (dosis de 20-50 mg/kg)	Dasgupta *et al.*, 1969
Incrementa producción de mucina y protección contra irritantes en conejos	Lee *et al.*, 2003
Efecto contra las úlceras por eliminación de ROS	Chattopadhyay *et al.*, 2004

Tabla 4. Toxicidad de la curcumina

Efecto	Referencia
En poblaciones asiáticas se usa en la medicina tradicional en dosis de 0.2-0.5 g/kg y el consumo diario de cúrcuma alcanza dosis de 0.5-1.5 g/kg sin que se presenten efectos adversos	Eigner & Scholz, 1999
No presenta toxicidad ni efectos adversos en humanos a dosis altas (hasta 8000 mg/kg al día)	Chainani-Wu, 2003
No causa alteraciones en la producción y desarrollo de eritrocitos, leucocitos, hemoglobina, suero proteico ni fosfatasas	Chattopadhyay *et al.*, 2004
La cúrcuma (5 g/kg al día) no muestra efectos adversos en componentes de la sangre como el suero proteico, la albúmina, globulina, ni a nivel hepático (enzimas) en pollos	Attia *et al.*, 2017

Estos estudios sientan una base para explorar el potencial aprovechamiento de la curcumina como una molécula de acción ante la gastritis, especialmente cuando es causada por *H. pylori*, ya sea por su efecto antibiótico o por los beneficios que le aporta al hospedero.

2.5.5. *Caracterización química de la curcumina*

La curcumina (diferuloimetano), clasificada por la IUPAC como (1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadiano-3,5-diona, está constituida por tres partes: dos anillos aromáticos con grupos fenólicos unidos por una cadena insaturada de carbono (Figura 2).

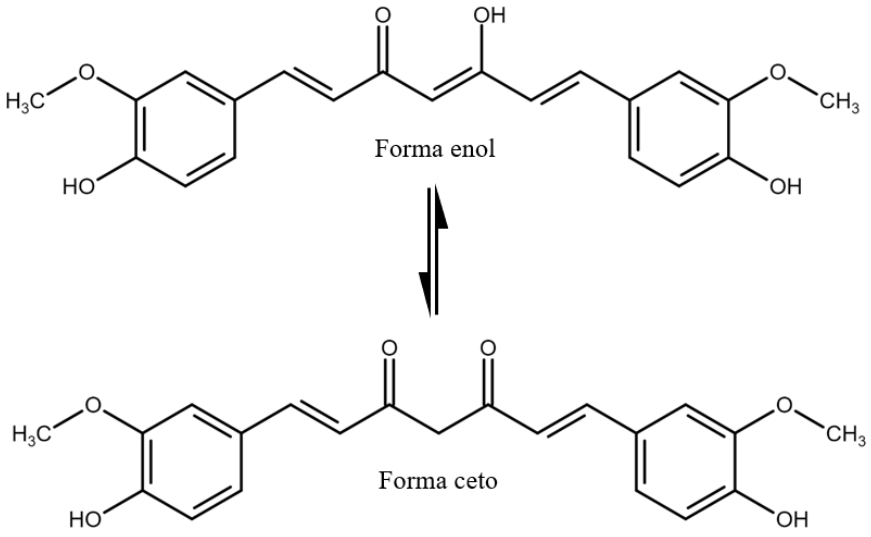


Figura 2. Curcumina: tautomerismo ceto-enol. Propiedad de la molécula de curcumina para tener un grupo funcional ceto- o enol-. Cuando actúa como ligando para metales se adopta la forma β-dicetona. Modificado de Priyadarsini (2014).

Tiene un peso molecular de 368.38 uma y su fórmula química es $C_{21}H_{20}O_6$ (Priyadarsini, 2014). Su punto de fusión es a los 176-177 °C (estable a temperaturas altas incluso cuando ha sido disuelta), es un ácido débil (donador de protones H^+, pKa=7.7-8.5), de carácter hidrofóbico (logP de ~3.0) cuyos solventes óptimos son DMSO, metanol, etanol, ácido acético, cloroformo, etc. Dependiendo de la proporción de sus conformaciones y el pH del ambiente, puede cambiar su nivel de solubilidad, así como la coloración amarilla-roja que presenta (Chattopadhyay *et al.*, 2004; Priyadarsini, 2014).

En la parte de la cadena de carbonos tiene un tautómero (Figura 2) que puede existir en forma ceto- en pH neutro o ácido, o enol- cuando se trata de un pH alcalino o es disuelta en aceites; a esta porción se le conoce como 1,3-ceto-enol o diceto (β-dicetona) y tiene la propiedad de crear puentes de hidrógeno, actuando como un quelante natural (Al-Noor *et al.*, 2022).

Su uso en el ámbito farmacéutico está limitado por su pobre solubilidad en agua. No puede usarse en soluciones acuosas y, a nivel sistémico, la molécula es difícilmente absorbida por el epitelio intestinal. Por otra parte, es susceptible a su metabolización una vez que entra en la cavidad oral; se reducen sus enlaces dobles o se conjuga con otras moléculas (ácido

glucónico o sulfato) y en cultivos *in vitro* se degrada por dos vías; ruptura de la cadena que resulta en la obtención de vainillina y ácido ferúlico (baja proporción) o su autooxidación por contacto con O_2 a bi-ciclopentadiona (mayor proporción) (Schneider *et al.*, 2015). En conjunto, la curcumina es inestable, pobremente absorbida (la proporción que llega a la sangre es muy baja), rápidamente metabolizada y eliminada del organismo (Hewlings & Kalman, 2017; Kharat *et al.*, 2017).

Para contrarrestar la situación se ha hecho uso de distintas metodologías. En primer lugar, se propone administrar la molécula previamente embebida en micelas, liposomas, hidrogeles, emulsiones, suspensiones o en conjugados, como es el caso de la piperina que incrementa su biodisponibilidad (Kharat *et al.*, 2017). La segunda opción es modificar los grupos químicos de su estructura para incrementar el tiempo de su degradación. Y la tercera opción es aprovechar la propiedad de la curcumina como un quelante natural añadiendo metales a la molécula. En un ambiente acuoso la curcumina se ve degradada hasta en un 90% transcurridos 30 min (reacción acelerada en pH básicos, concentraciones bajas y con exposición solar), esto se debe a la alta reactividad de la porción insaturada de la cadena de carbonos. La síntesis de complejos metálicos en proporciones 1:1, 2:1 y 3:1 (ligando-metal) a través de enlaces coordinados con la parte dicetona de la molécula, usando metales de transición, de no-transición y óxidos de metal es capaz de contrarrestar la reactividad de la molécula (Priyadarsini, 2014).

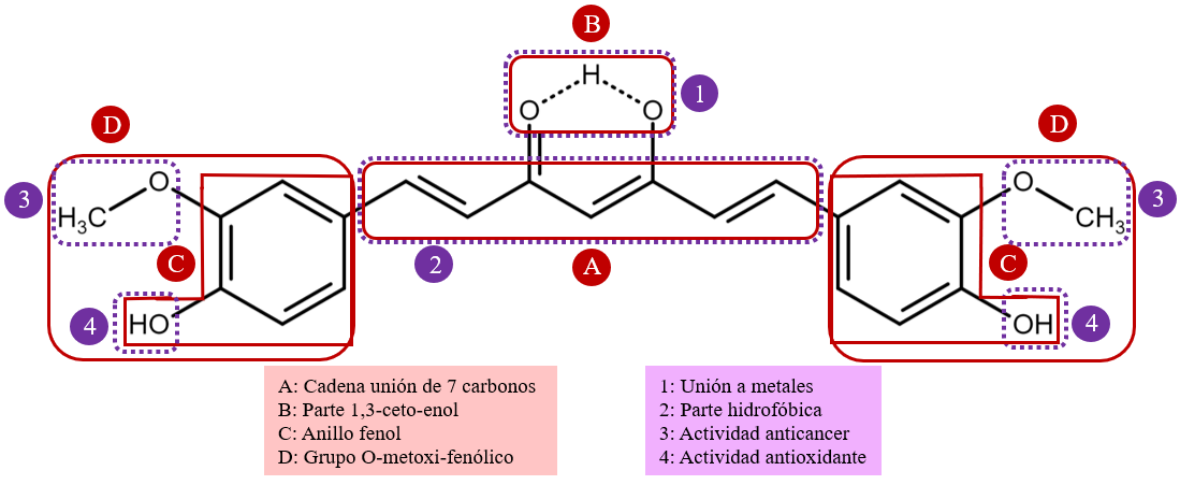


Figura 3. Regiones importantes de la curcumina en relación a su funcionamiento. Una molécula de curcumina tiene efectos terapéuticos relacionados a su estructura y los grupos funcionales dentro de la misma. Modificado de Al-Noor *et al.* (2022) y Prasad *et al.* (2021).

Al integrar metales a la estructura de las curcuminas se producen cambios a nivel físico y se afectan las propiedades terapéuticas de la molécula: la toxicidad intrínseca de algunos de los metales se reduce y presentan un mejor efecto farmacológico los complejos metálicos en comparación de la curcumina prístina (Prasad *et al.*, 2021). El alcance terapéutico de los complejos depende del metal presente, los potenciales se pueden agrupar en antiviral, antibiótico, antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno, gastroprotector y neuroprotector (Ver anexo 11.1. Tabla 14) (Shakeri *et al.*, 2019)

Considerando que los artículos reportan un mejor efecto antibacteriano de los complejos metálicos en comparación de la curcumina sola, la modificación es de gran interés para la búsqueda de moléculas nuevas con posible potencial de inhibición contra *H. pylori*. En el laboratorio del Dr. Raúl Enríquez Habib del Instituto de Química de la UNAM se han sintetizado recientemente varios derivados de la curcumina como la diacetilcurcumina y la fenilcurcumina (Alvarez-Ricardo *et al.*, 2020; Meza-Morales *et al.*, 2019) y a partir de ellos, complejos metálicos. Estos compuestos deben ser puestos a prueba para determinar su interacción con *H. pylori* y, en caso de que presenten actividad antibiótica, ver si tienen potencial para la erradicación de la bacteria.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la fenilcurcumina y de sus complejos metálicos fenilcurcumina-Mn, fenilcurcumina-Zn, fenilcurcumina-Cu, fenilcurcumina-Al, fenilcurcumina-Ga y fenilcurcumina-In sobre el crecimiento de *H. pylori*, en función de conocer si pueden ser utilizados como terapias para el tratamiento de la infección por la bacteria.

3.2. Objetivos particulares

- Obtener un lote activo y homogéneo de la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* a partir de la reserva del laboratorio, mediante su cultivo, identificación y criopreservación, para posteriormente realizar las pruebas de inhibición de su crecimiento.

- Determinar el efecto de los controles positivos: amoxicilina, metronidazol y curcumina sobre el crecimiento de *H. pylori* mediante la obtención de su concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en medio líquido para validar la metodología utilizada en los compuestos experimentales.

- Determinar el efecto sobre el crecimiento de *H. pylori* de la fenilcurcumina y sus seis derivados metálicos mediante la obtención de la CMI de cada compuesto por el método de dilución en medio líquido.

4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

La investigación sobre la actividad antibiótica, particularmente anti-*H. pylori*, de la fenilcurcumina y sus derivados metálicos puede ayudar a elucidar el valor farmacéutico y/o terapéutico de las moléculas de curcumina modificadas. Considerando que son moléculas recientemente sintetizadas (la bacteria no ha sido expuesta a ellas), se ha cubierto el tautomerismo ceto-enol (el sitio más reactivo de la molécula) y que se han eliminado los grupos funcionales de los anillos aromáticos, la interacción de las moléculas con la bacteria y el medio será diferentes al de la curcumina prístina, e incluso se puede argumentar un mejor desempeño de sus propiedades biológicas de acuerdo al historial de modificaciones y su relación con la estabilidad de la molécula.

De forma complementaria, la presente investigación puede esclarecer el impacto de los metales sobre la actividad anti-*H. pylori* de la molécula. Considerando los reportes previos sobre la actividad antibiótica de otros complejos metálicos, es probable que dichos complejos posean una mayor actividad sobre la bacteria en comparación de la curcumina sola. Sin embargo, no puede haber una comparación cercana porque se trata del primer trabajo que evalúa el potencial terapéutico de estas moléculas recién sintetizadas.

Finalmente, cabe mencionar que es necesario corroborar el valor de CMI de la curcumina para el método de dilución en medio líquido, ya que todos los registros que se tienen para *H. pylori* son para el método de dilución en placa. La importancia radica en la interacción de la molécula con el medio líquido, porque ha mostrado problemas de solubilidad en medios acuosos y esta condición podría alterar los resultados.

5. HIPÓTESIS

Considerando la actividad anti-*H. pylori* reportada para la curcumina, se espera que los derivados sintéticos a partir de ella, como la fenilcurcumina y sus complejos metálicos, tengan un efecto inhibitorio sobre la bacteria.

6. ESTRATEGIA METODOLÓGICA

La estrategia metodológica se separa en dos apartados (Figura 4) que comprenden a) el manejo de la bacteria: sus diferentes métodos de cultivo e identificación y b) las pruebas de inhibición realizadas, que comprende la preparación de los compuestos curcuminoides usados y sus diluciones, la preparación de los antibióticos, los ensayos *per se* y los análisis estadísticos.

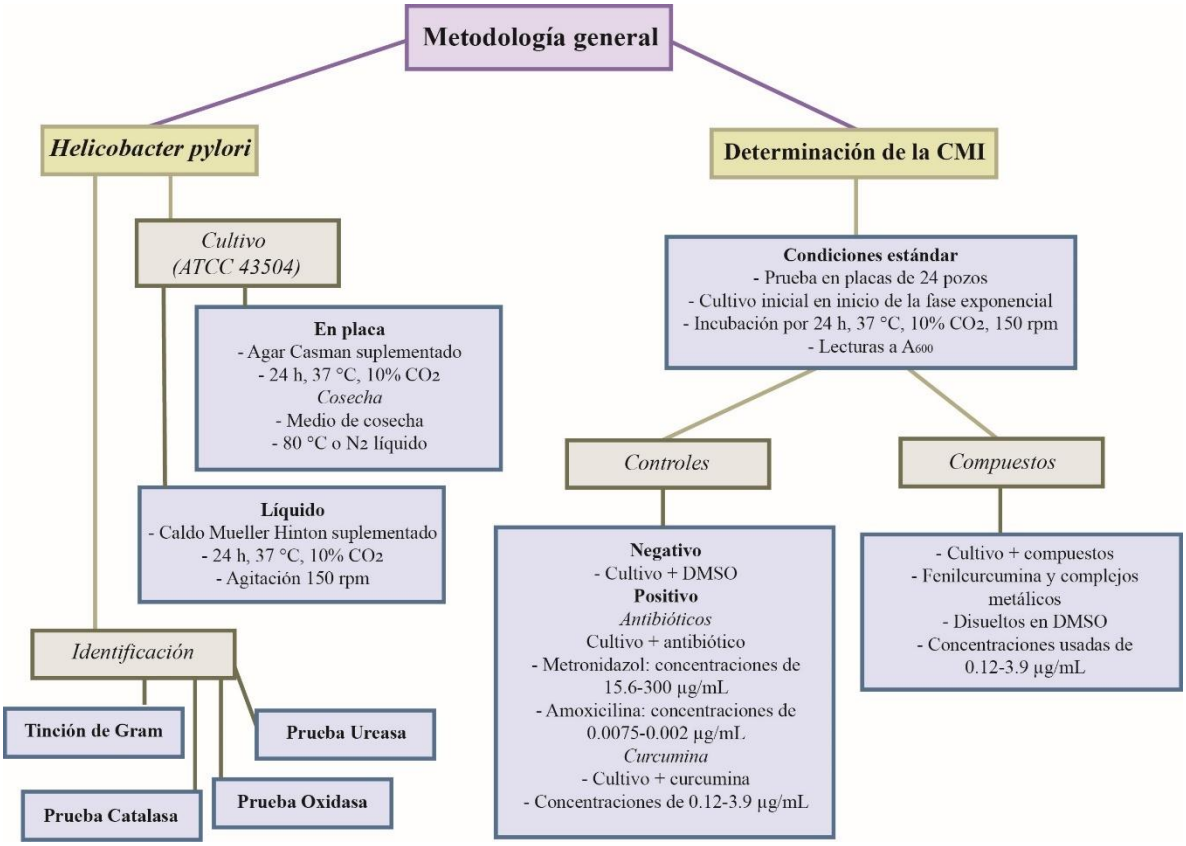


Figura 4. Esquema de la metodología general. Resumen de las actividades que se realizaron para obtener los resultados de la presente tesis.

6.1. Cepa, cultivo, identificación y conservación de *Helicobacter pylori*

Se empleó la cepa de *Helicobacter pylori* procedente de la "American Type Culture Collection" (colección americana de cultivos tipo) (ATCC) 43504. Para el lote se usó la reserva del laboratorio que se encontraba almacenada a -80 °C, los viales se descongelaron, se homogeneizó su contenido y las bacterias se reactivaron creciéndolas en cajas Petri de Agar-Sangre: Agar Casman suplementadas con 5% de sangre desfibrinada de carnero, 2 mg/L anfotericina, 2.5 mg/L polimixina, 5 mg/L trimetoprima y 10 mg/L vancomicina. Estas

cajas se dejaron envejecer durante una semana para mejorar el rendimiento de las bacterias, este tratamiento se sigue de acuerdo a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio) (CLSI, 2015).

Esta reactivación o presiembra se incubó por 24 h a 37 °C ± 2 °C en condiciones microaerofílicas (10% CO_2, 5% O_2, 85% N_2), procurando una alta humedad del ambiente. Trascurrido este plazo las cajas fueron cosechadas en tubos eppendorf de 1 ml que contiene 0.5 ml de Medio de Cosecha (28 g/L de medio de Brucella suplementado con 10% de glicerol, 10% suero fetal bovino y vancomicina 10 mg/L). El peso de los viales se registra para conocer la cantidad de bacterias cosechadas y determinar el rendimiento de los cultivos (Gomez-Chang *et al.*, 2018).

Para obtener el lote final, se sembraron las bacterias reactivadas en placas de Agar-Sangre para obtener un cultivo más abundante y se incubaron por 24 h en las condiciones establecidas. Al día siguiente se cosecharon los viales para preservación en tubos eppendorf con 0.5 ml de medio de Cosecha y los viales destinados a experimentación en 0.25 ml de medio de Cosecha. Todos los viales fueron etiquetados, pesados y debidamente registrados. Esta reserva de bacterias se almacenó de dos formas mediante su criogenización; la mayor parte se mantuvo a -80 °C en un ultracongelador (REVCO), mientras que una parte menor se almacenó dentro de un tanque de nitrógeno líquido (punto de fusión del nitrógeno: -210 °C).

Para identificar a la bacteria, determinar su pureza y rendimiento, se realizaron 4 pruebas de forma aleatoria en los cultivos: 1) Tinción de Gram. A partir de un cultivo se tomó una asada de bacterias que se extendió en un portaobjetos con agua destilada y se dejó al aire para su secado. Se realizó la técnica estándar de tinción de Gram con cristal violeta (1 min más enjuague), lugol (1 min más enjuague), decolorante de alcohol acetona (1:1, sólo escurrimiento y enjuague) y safranina (1 min más enjuague) (Coico, 2005). La preparación se observó en el microscopio a distintos aumentos incluyendo el objetivo 100x con inmersión en aceite y se tomaron fotos de los campos para describir las morfologías observadas y su proporción. Debido a la estructura de su pared celular, los organismos Gram positivos retienen el colorante cristal violeta incluso después del proceso de decoloración, mientras que los Gram negativos no, presentando una coloración roja.

2) Prueba de la ureasa. En un portaobjetos se pone una asada de bacterias y una gota de solución de urea 6 M, pH 7.0 con 0.05% rojo fenol. Esta reacción prueba la alcalinización del medio: cuando la proteína entra en contacto con la solución de urea se produce NH_3 + CO_2, que incrementan el pH del medio y se da un cambio en el color del indicador de pH rojo de fenol (naranja – pH ácido, rojizo – pH básico), indicando la presencia y funcionalidad de la enzima (Sachs *et al.*, 2005).

3) Prueba de la catalasa. En un portaobjetos se colocó una gota de H_2O_2 al 3.5%, al cual se añadió una asada de bacterias. Como ya se habló antes, la catalasa es capaz de romper ROS, en este caso interactúa con el peróxido formando burbujas (O_2 liberado), con lo cual se puede confirmar la presencia y el correcto funcionamiento de la proteína.

4) Prueba de la oxidasa. Utilizando una placa en seco de oxidasa (Dry Slide Oxidase, DIFCO) se pone una asada de bacterias. Es una reacción basada en la capacidad del colorante (*N, N, N', N'*-tetrametil-*p*-fenilenediamino dihidrocloruro) de actuar como un donador de electrones: en estado reducido el compuesto es incoloro pero si la coloración se torna azul-morado está en estado oxidado y es un indicativo de que el organismo probado tiene al complejo de la citocromo oxidasa, el cual actúa como un transportador de electrones en la respiración aeróbica y está presente en organismos aeróbicos y anaeróbicos facultativos (Jurtshuk & Mcquitty, 1976; Steel, 1961). En el caso de *H. pylori* la citocromo c oxidasa está presente (Brenner *et al.*, 2005) produciendo la coloración azul intenso sobre la placa.

Para evaluar el efecto de los compuestos de prueba sobre el crecimiento *H. pylori*, se optó por un medio líquido para la prueba de dilución en caldo. El medio que se utilizó es Caldo Mueller-Hinton suplementado con 0.2% de β-ciclodextrina, 2 mg/L anfotericina, 2.5 mg/L polimixina, 5 mg/L trimetoprima y 10 mg/L de vancomicina. Los detalles del crecimiento de la bacteria se especificarán en el apartado de la prueba.

Todos los medios ocupados para los cultivos (tanto sólidos como líquidos) se almacenaron en condiciones de refrigeración (~4 °C) y antes de ser usados se atemperaron en una incubadora (~37 °C) para evitar que la bacteria tenga un choque térmico y su rendimiento se vea afectado. Dado que *H. pylori* es un patógeno humano y está considerado como un microorganismo de Nivel de riesgo 2 de acuerdo al "Biosafety in microbiological and biomedical laboratories" (Bioseguridad en laboratorios microbiológicos y biomédicos) de la

CDC/NIH-USA (Centers for Disease Control and Prevention / National Institutes of Health) (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades / Institutos Nacionales de Salud), se siguieron las prácticas de bioseguridad correspondientes (CDCP & NIH, 2020): entrenamiento previo a manejar los patógenos con supervisión de un profesional, el acceso al área de trabajo está restringido mientras se está trabajando con el organismo, se debe tener especial cuidado por la contaminación a través de aerosoles o gotas, además se debe seguir las prácticas microbiológicas estándar como la esterilización del material, equipo adecuado con campanas de flujo laminar tipo II (filtro HEPA con flujo de aire laminar vertical), protecciones, limpieza, entre otros.

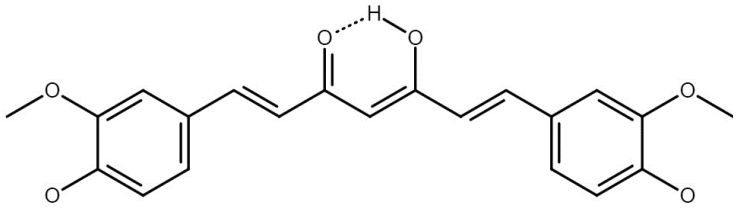
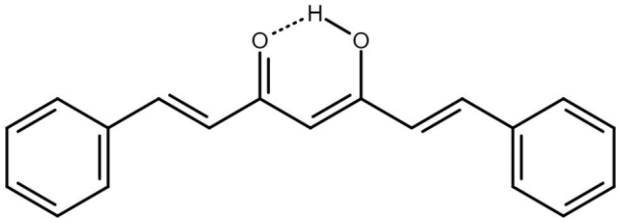
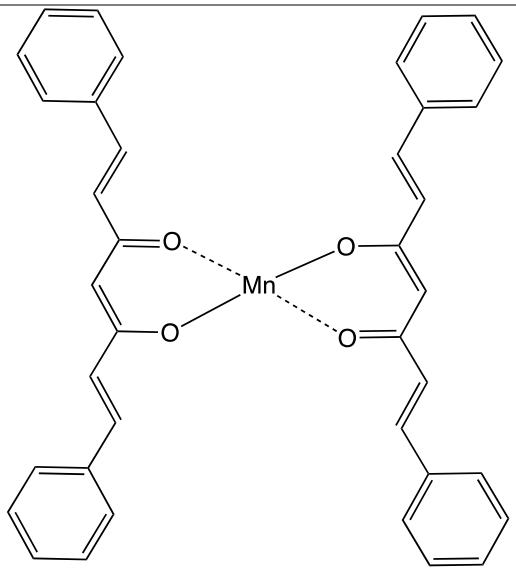
6.2. Controles positivos

Para este proyecto se utilizaron como controles positivos dos antibióticos: metronidazol (Sigma-Aldrich) y amoxicilina (Sigma-Aldrich). Se hizo una solución madre o stock de metronidazol disuelta en DMSO a una concentración de 45 mg/mL para que al añadir 10 µL de esta solución a la reacción de 1.5 mL la concentración final máxima del reactivo fuera de 300 µg/mL. A partir de esta solución stock, se hicieron 5 diluciones para que las concentraciones finales del ensayo fueran 15.6, 31.25. 62.5, 125, 250 y 300 µg/mL, cada concentración fue disuelta usando un agitador tipo vórtex. Para el caso de la amoxicilina se usó como disolvente agua estéril, también se hizo una equivalencia para que las concentraciones finales de las pruebas fueran de 0.002, 0.003, 0.004, 0.0045, 0.005 y 0.0075 µg/mL. Todo se realizó en condiciones de esterilidad previo a la realización de los experimentos.

6.3. Compuestos experimentales

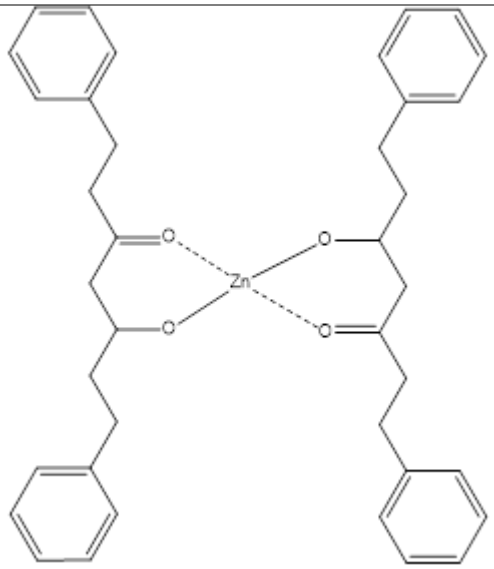
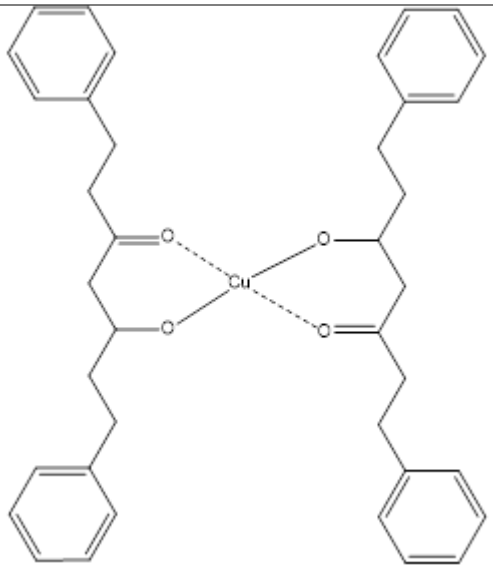
La curcumina y los derivados utilizados fueron sintetizados por el grupo del Dr. Raúl Enríquez Habib del Instituto de Química, UNAM. Los compuestos empleados se muestran en la Tabla 7 que registra su fórmula, estructura y peso molecular.

Tabla 5. Complejos utilizados en este trabajo

Molécula*	Nombre/fórmula/ Abreviatura usada	Peso molecular (g/mol)
	Curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$)	368.37
	Fenilcurcumina ($C_{19}H_{16}O_2$) PhCur	277.46
	Fenilcurcumina-Manganeso ($C_{38}H_{30}O_4Mn$) PhCur$_2$-Mn	607.61

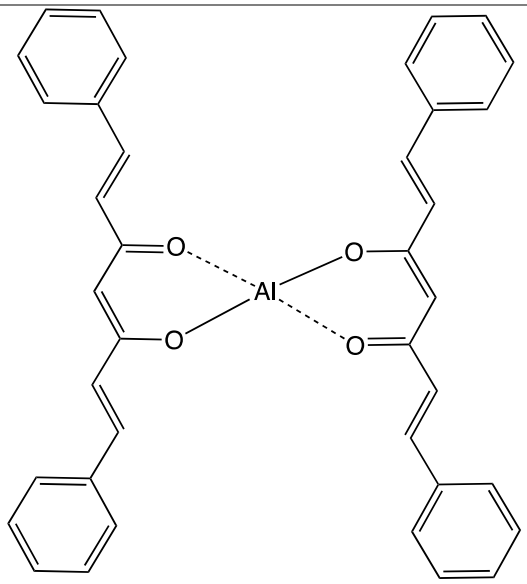
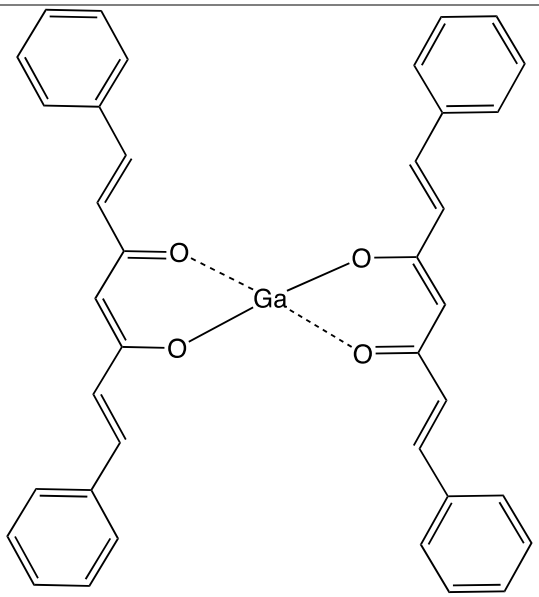
*Estructuras proporcionadas por el Dr. Yahir Alvarez Ricardo

Tabla 7. Complejos utilizados en este trabajo (continuación)

Molécula*	Nombre/fórmula/ Abreviatura usada	Peso molecular (g/mol)
	Fenilcurcumina-Zinc ($C_{38}H_{30}O_4Zn$) $PhCur_2$-Zn	628.12
	Fenilcurcumina-Cobre ($C_{38}H_{30}O_4Cu$) $PhCur_2$-Cu	626.28

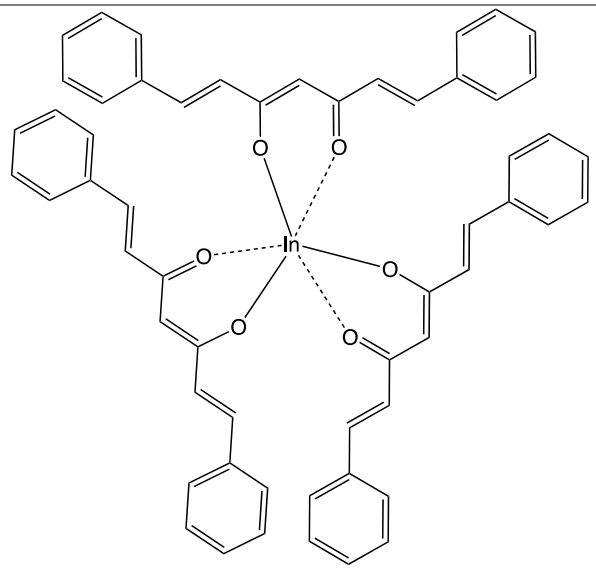
*Estructuras proporcionadas por el Dr. Yahir Alvarez Ricardo

Tabla 7. Complejos utilizados en este trabajo (continuación)

Molécula*	Nombre/fórmula/ Abreviatura usada	Peso molecular (g/mol)
	Fenilcurcumina-Aluminio ($C_{38}H_{30}O_4Al$) $PhCur_2$-Al	577.64
	Fenilcurcumina-Galio ($C_{38}H_{30}O_4Ga$) $PhCur_2$-Ga	622.39

*Estructuras proporcionadas por el Dr. Yahir Alvarez Ricardo

Tabla 7. Complejos utilizados en este trabajo (continuación)

Molécula*	Nombre/fórmula/ Abreviatura usada	Peso molecular (g/mol)
	Fenilcurcumina-Indio ($C_{57}H_{45}O_6In$) PhCur$_2$-In	940.80

*Estructuras proporcionadas por el Dr. Yahir Álvarez Ricardo

Debido al antecedente de la inestabilidad de la curcumina a la luz, los compuestos fueron almacenados en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente y las diluciones se utilizaron frescas (se prepararon momentos antes a su utilización). El disolvente elegido fue dimetilsulfóxido (DMSO), que no tiene efecto inhibidor sobre el crecimiento de la bacteria a la concentración final a la que queda (0.66%) (Gomez-Chang *et al.*, 2018). Como característica adicional el DMSO no fue esterilizado para evitar su hidratación durante el proceso, ya que podría intervenir con la solubilidad de los curcuminoides.

Se prepararon soluciones madre o stock de cada compuesto a una concentración de 0.585 mg/mL, de manera que al agregar 10 µl de la solución a la reacción de 1.5 mL, queda una concentración final de 3.9 µg/mL. Esta concentración máxima se eligió con base en los valores de CMI reportados para la curcumina y también porque se realizó un experimento preliminar para encontrar el rango de concentraciones a utilizar en la prueba de inhibición del crecimiento. En este experimento encontramos que un intervalo de 0.12 a 3.9 µg/mL cubre las concentraciones necesarias para determinar la CMI de los compuestos, esperando

que la fenilcurcumina y los derivados metálicos muestren un potencial inhibitorio similar al de la curcumina.

Para garantizar la homogeneidad de las soluciones, cada solución madre fue sometida a uno o dos procesos de sonicación a 40 KHz, a 40 °C durante 10 min y a partir de este stock se realizaron las diluciones seriadas (1:1) necesarias para cada experimento (ya no fue necesaria la sonicación para las diluciones). Exceptuando el proceso de sonicación, todo se realizó en condiciones de esterilidad.

6.4. Determinación de la CMI

La actividad antibacteriana de cada uno de los compuestos se determinó mediante la obtención de su Concentración mínima inhibitoria (CMI), es decir, la concentración mínima a la cual se inhibe el 100% del crecimiento de la bacteria. Se preparó un cultivo líquido de *H. pylori*, a partir de los viales criogenizados, que creció en agitación constante (150 rpm) a 37 °C (10% CO_2), en un matraz que permita su buena aireación, hasta que alcanzó una lectura inicial de A_{600}=0.3 (equivalente a ~$1x10^8$), es decir, el inicio de la fase exponencial de crecimiento de la bacteria (crecimiento que se alcanza tras ~5h si la lectura inicial es de A_{600}=~0.23). En todo momento se evita una exposición prolongada al frío, oxígeno y a condiciones anormales para la bacteria, porque puede impactar el rendimiento del cultivo.

Se colocaron 1.5 mL de este cultivo líquido en cada pozo de una placa de 24 pozos. Adicionalmente, se añadieron 0.01 mL de cada control o compuestos a ensayar, la distribución de las concentraciones puede verse en la Figura 5. Una vez incorporado todo, se tomó una lectura inicial (Ai) en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm (A_{600}) de cada uno de los pozos y las placas permanecieron en las condiciones de incubación previamente establecidas por 24 h. Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia final (Af) de cada pozo de la placa y el porcentaje de inhibición se calculó tomando como referencia los controles negativos, ya que representaban el 100% de crecimiento posible.

$$\%\ crecimiento = \frac{(Af - Ai\ prueba)100}{Af - Ai\ control\ negativo}$$

$$\%\ inhibición = 100 - \%\ crecimiento$$

	1	2	3	4	5	6	
A							DMSO (control)
B	3.9 µg/mL	1.95 µg/mL	0.97 µg/mL	0.48 µg/mL	0.24 µg/mL	0.12 µg/mL	Compuesto (experimental)
C	3.9 µg/mL	1.95 µg/mL	0.97 µg/mL	0.48 µg/mL	0.24 µg/mL	0.12 µg/mL	
D	3.9 µg/mL	1.95 µg/mL	0.97 µg/mL	0.48 µg/mL	0.24 µg/mL	0.12 µg/mL	

Figura 5. Planeación de los experimentos. La primera hilera (A) corresponde a los controles negativos (6). Los compuestos experimentales, ya sea curcuminoides o antibióticos, se distribuyen para evaluar por triplicado seis concentraciones diferentes

Todos estos procedimientos se realizan en condiciones de esterilidad para evitar que alguna contaminación pueda sesgar los resultados finales. Los datos de la absorbancia inicial y final de los pozos se vaciaron a tablas en Excel para realizar los cálculos pertinentes.

NOTA: Para corroborar que al momento de agregar los compuestos el cultivo de bacterias este al inicio de la fase exponencial de su crecimiento (~$1x10^8$ UFC/mL), se realizó el conteo de colonias de bacterias en por el método de plaqueo (cuenta viable). Los detalles del procedimiento se explican en el Anexo. 11.3. Además de exhibir el estado del cultivo inicial, este método también nos indica la viabilidad y pureza del cultivo.

6.5. Análisis estadístico

Por cada compuesto se realizaron al menos tres experimentos con cultivos de fechas diferentes y en todos ellos cada concentración se hizo por triplicado, los controles negativos de cada experimento fueron hechos por sextuplicado. A partir de los resultados se obtuvieron los promedios y la desviación estándar de la media para cada concentración usando el programa Excel. Para determinar si existen diferencias significativas de inhibición entre los controles y los compuestos probados se aplicaron pruebas de heterocedasticidad (Bartlett) y

normalidad (Shapiro-Wilk). Con estos resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA de una vía) o una prueba de Kruskal-Wallis ambos con un nivel de confianza del 95%. Dado el caso de que existiera una diferencia significativa preliminar se realizó una comparación por grupos usando la prueba de Bonferroni con un nivel de confianza del 95% para determinar las diferencias significativas por grupo y también entre las concentraciones. Los análisis estadísticos, así como las gráficas finales fueron realizadas en el programa GraphPrism.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Lote de *Helicobacter pylori*

La obtención de un lote de *H. pylori* fue el primer objetivo particular de esta tesis. Esto no es una actividad trivial debido a que la bacteria suele ser descrita como un organismo "fastidioso": requiere de condiciones y cuidados muy específicos para su crecimiento que sólo alguien experimentado puede lograrlo.

Se generó un lote homogéneo y correctamente identificado de la cepa ATCC 43504 de *H. pylori*. Esta cepa se caracteriza por ser resistente al metronidazol y tener las secuencias que codifican para la isla de patogenicidad Cag-PAI, CagA, VacA, BabA y SabA. Al ser una cepa altamente estandarizada, es la recomendada para investigación y como control de calidad por la ATCC (Kinoshita-Daitoku *et al.*, 2020). Para cubrir las necesidades del laboratorio, la presiembra fue de 4 cajas de agar con ~12 mg de bacteria/caja, esta cantidad es necesaria porque se trata de bacterias que han estado en congelación a -80 °C por varios meses, una cantidad menor retrasaría considerablemente el tiempo de crecimiento. Las presiembra se incubó por 24 h, transcurrido el tiempo se observaron tapetes característicos de *H. pylori* (traslúcidos ligeramente blancos) que indican un buen rendimiento. A partir del stock generado con esta presiembra, se hizo la siembra final (70 cajas en total) que contenían ~10 mg de bacterias/caja y fueron incubadas por 24 h, como se trata de bacterias reactivadas, esta cantidad es suficiente para un buen rendimiento. Como resultado final se generaron 4 viales para preservación en el laboratorio (pesos húmedos de 60 a 80 mg de bacterias por vial) y 130 viales (pesos húmedos de 20-40 mg de bacterias por vial) para experimentación que se almacenaron mediante su criogenización.

Cuando se genera un lote siguiendo la metodología descrita y cuidando los tiempos de manejo para impedir que la bacteria se exponga durante un tiempo prolongado ante factores adversos como el frío y el oxígeno es posible tener resultados homogéneos. Esta propiedad es vital para la reproducibilidad de los resultados y por lo tanto para el desarrollo de todos los experimentos del proyecto en cuestión.

Las pruebas de identificación estandarizadas para *H. pylori* y confirmar que los cultivos no tuvieran contaminaciones, se llevaron a cabo en 5 cajas Petri elegidas al azar del lote cosechado.

En tinción diferencial de Gram se observó la coloración rojiza característica de las bacterias Gram negativas como lo es *H. pylori* (Figura 6). Como puede observarse, la morfología predominante de los cultivos son bacilos curvos y rectos sin la presencia de cocos, esto es un buen indicativo del estado metabólico de la bacteria y el lote en general. Cuando los cultivos tienen formas espirales, bacilares o filamentosas se trata de organismos cultivables que son capaces de colonizar el estómago y adherirse a la mucosa, mientras que cuando se encuentran en forma cocoide son bacterias que, a pesar de ser metabólicamente activas, no son cultivables. Algunas de las causas por las que este cambio ocurre es la deprivación nutricional, cambio de pH, temperatura o condiciones no microaerofílicas, presencia de compuestos antibióticos y crecimiento *in vitro* muy prolongado (Krzyzek & Gościniak, 2018).

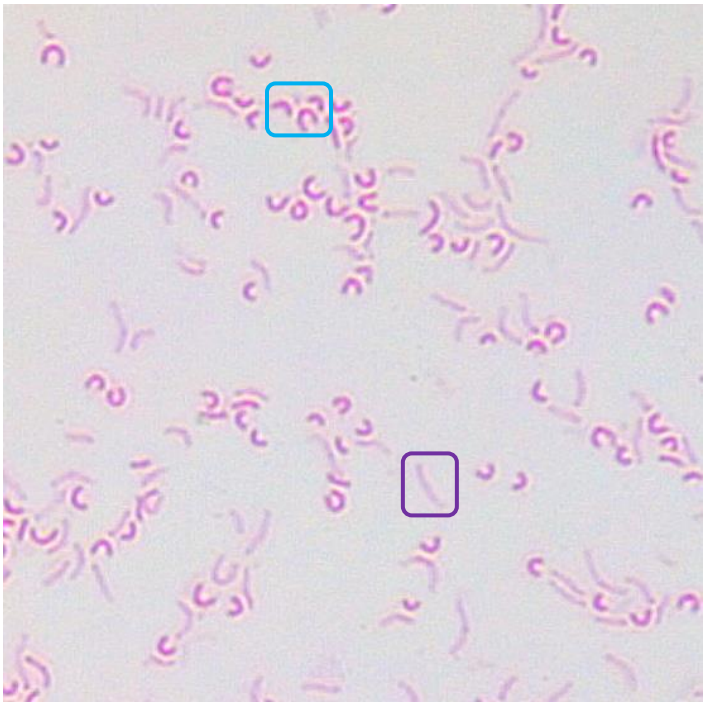


Figura 6. Tinción de Gram. Microscopía de campo claro (100x). *H. pylori* tiene distintas morfologías, en el recuadro morado se indica una forma bacilar filamentosa, dependiendo de su posición puede describirse como espiralada. El recuadro azul identifica los bacilos curvados, pueden tener formas similares a las letras “u” o “v”.

Las pruebas bioquímicas también arrojaron resultados positivos. Con la prueba de ureasa (proteína que alcanza el 10% de la producción proteica total de *H. pylori*) pueden observarse distintas coloraciones que van del naranja al rojo (Figura 7a), la intensidad de la reacción se debe a la cantidad de muestra de las placas que se agregó a la solución. Las tonalidades rojas indican el funcionamiento de la proteína que rompe la urea y alcaliniza el medio, alterando la coloración naranja de la solución base (rojo fenol).

La catalasa representa el 4-5% de la producción proteica total de *H. pylori*, a partir de su función protectora ante el H_2O_2 (producido por otras células o intrínsecamente para producir daño oxidativo, en agua y O_2), la función de la proteína es fácilmente identificable por la producción de burbujas de O_2 en la prueba (Harris *et al.*, 2002). En la figura 7b se aprecia la presencia de burbujas en todas las pruebas, nuevamente, la cantidad de las burbujas presentes es equivalente a la cantidad de la muestra utilizada en la prueba.

Finalmente, en la placa Dryslide se puede observar la prueba positiva para la proteína oxidasa por el viraje a un color azul intenso (Figura 7c). Aunque sólo se muestra una aplicación, la prueba se repitió para las 5 cajas, todas ellas mostraron un resultado positivo.

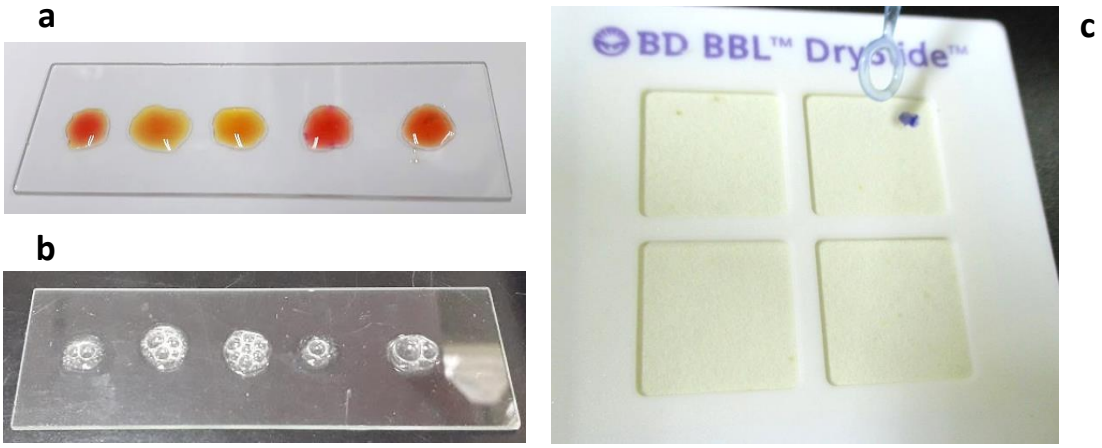


Figura 7. Pruebas de identificación de *Helicobacter pylori*. (a) Prueba de ureasa. Se presentan pruebas con cantidades variables de *H. pylori* para denotar el viraje a rosa del rojo fenol al ser alcalinizado. (b) Prueba de catalasa. El tiempo de reacción es muy corto por lo que no se puede observar la diferencia entre las muestras (c) Prueba de oxidasa: coloración en la esquina superior derecha del segundo cuadrante.

Gracias al resultado final de estas pruebas y a las observaciones pertinentes tanto de la morfología de la bacteria como de los tapetes de crecimiento, es posible decir que se cultivó exitosamente un lote de *H. pylori* de acuerdo a los estándares determinados por la CLSI, obteniendo un cultivo metabólicamente activo, correctamente identificado y que no muestra contaminaciones.

7.2. Determinación de la CMI

7.2.1. *Compuestos y diluciones*

Los compuestos y sus diluciones se prepararon 30 min antes de las pruebas de inhibición. Durante la preparación de las soluciones madre se observó una diferencia en la solubilidad de algunos los curcuminoides. Mientras que la curcumina y la fenilcurcumina no presentaron problemas, la mayoría de las soluciones de los complejos metálicos no eran homogéneas (similares a una suspensión). El proceso de sonicación contrarrestó este problema, sin embargo, fue necesario realizar por segunda vez el proceso para los complejos de $PhCur_2$-Al, $PhCur_2$-Ga y $PhCur_3$-In para obtener el aspecto traslúcido deseado (Figura 8). Cabe mencionar que para estos compuestos también se realizaron stocks de mayor concentración, pero presentaron problemas de solubilidad que no podían ser solucionados con sonicación, por lo que no se emplearon dichas concentraciones.

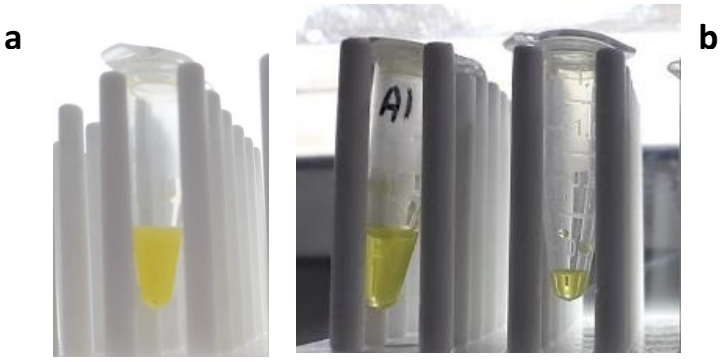


Figura 8. Solución de $PhCur_2$-Al antes y después del proceso de sonicación. (a) Solución stock [585 µg/mL] inmediatamente después de haber sido solubilizada. Se puede observar una clara turbidez. b) Solución stock posterior a ser sonicada y una dilución. Da la impresión de ser una solución homogénea por la transparencia que presenta.

Considerando que la mayoría de reportes de CMI de la curcumina están en µg/mL (ppm) y que esta es la unidad usada generalmente para las pruebas de susceptibilidad de compuestos o extractos crudos, será la unidad que se utilice para la presente tesis. No obstante, dado que se trata de compuestos puros y para fines de comparación se hizo la conversión a concentración en µM (µmol/L), tal y como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Conversión de la concentración en µg/mL a µM

Compuesto	Concentración en µg/mL					
	0.121	**0.243**	**0.487**	**0.975**	**1.95**	**3.9**
	Concentración µM					
Curcumina	0.32	0.65	1.32	2.64	5.29	10.58
PhCur	0.43	0.87	1.75	3.51	7.02	14.05
$PhCur_2$-Mn	0.19	0.39	0.801	1.6	3.20	6.41
$PhCur_2$-Cu	0.19	0.38	0.777	1.55	3.11	6.22
$PhCur_2$-Zn	0.19	0.38	0.775	1.55	3.10	6.20
$PhCur_2$-Al	0.20	0.42	0.843	1.68	3.37	6.75
$PhCur_2$-Ga	0.19	0.39	0.782	1.56	3.13	6.26
$PhCur_3$-In	0.12	0.25	0.517	1.03	2.07	4.14

7.2.2. *CMI de los antibióticos de referencia*

En primer lugar, se llevó a cabo el ensayo para la determinación de la Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los controles positivos: metronidazol y amoxicilina. Estos dos antibióticos son comúnmente utilizados en la terapia de erradicación de la bacteria, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 9. La cepa empleada (ATCC 43504) es resistente al metronidazol, esto significa que la concentración a la cual el antibiótico inhibe el crecimiento de la bacteria es superior a su rango de sensibilidad usual. La CMI obtenida correspondiente al metronidazol es de 125 µg/mL, valor que se encuentra dentro de los límites estandarizados para esta cepa (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007) (ver Tabla 7). Por otra parte, esta cepa tiene sensibilidad normal a la amoxicilina, los resultados arrojaron una CMI de 0.004 µg/mL, valor ligeramente por debajo de lo establecido por la CLSI, pero que entra en la categoría de sensibilidad de acuerdo a EUCAST (2023) (Tabla 7).

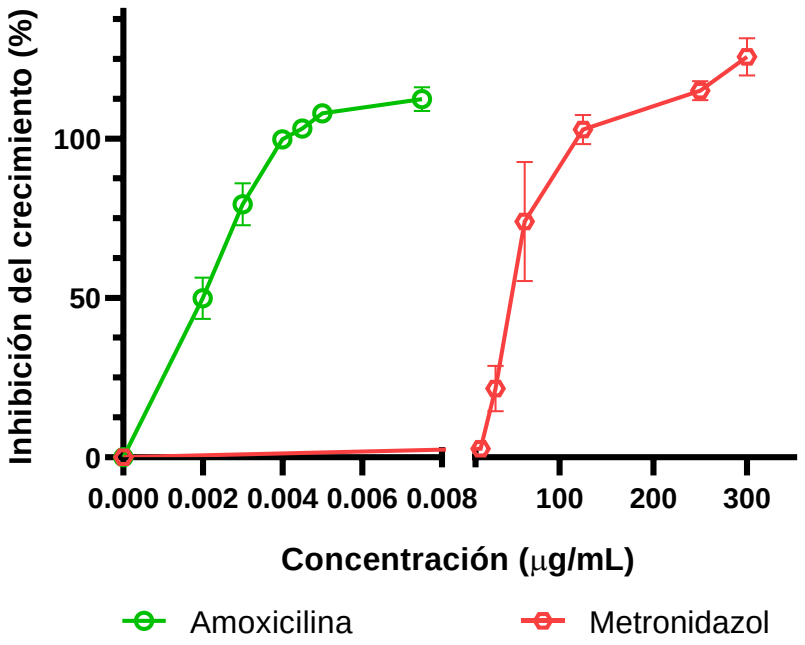


Figura 9. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con los controles positivos. El eje x tiene un corte en su continuidad para poder representar ambos controles positivos en la misma gráfica y que no existan afectaciones por sus respectivos órdenes de magnitud.

Tabla 7. Resistencia de *Helicobacter pylori* a los antibióticos

Antibiótico	CMI (mg/L)		
	EUCAST		CLSI
	Sensible ≤	Resistente >	*Límites estándar
Metronidazol	8	8	64-256
Amoxicilina	0.125	0.125	0.015-0.12
Claritromicina	0.25	0.25	0.015-0.12
Levofloxacina	1	1	Nr
Tetraciclina	1	1	0.12-1

Nr: No registrado. *Límites de sensibilidad usados como control de calidad para determinar la CMI en la cepa ATCC 43504 según lo establecido por el CLSI (CLSI, 2007).

Considerando que las CMI de ambos antibióticos se encuentran dentro de los valores registrados en la literatura, es posible concluir que el método utilizado (dilución en medio

líquido) es válido para continuar con los ensayos de inhibición del crecimiento y determinar la CMI de los compuestos experimentales. Para efectos de comparación y como no se trata de un antibiótico estandarizado, los resultados de la inhibición de *H. pylori* con curcumina se toman como control o punto de referencia para el resto de los curcuminoides en el siguiente apartado.

7.2.3. *CMI de los compuestos*

Respecto a los resultados obtenidos con los compuestos ensayados, se dividieron en dos grupos, el primer grupo (Figura 10 y Tabla 8) incluye a los compuestos que inhibieron al 100% el crecimiento de *H. pylori* y corresponden a la curcumina, fenilcurcumina, $PhCur_2$-Mn, $PhCur_2$-Cu y $PhCur_2$-Zn.

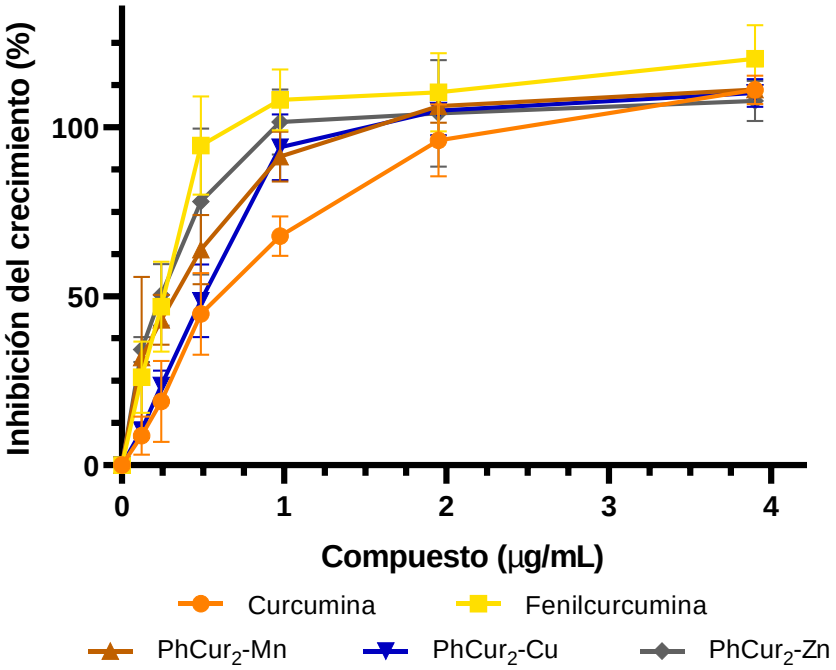


Figura 10. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por el primer grupo de compuestos. Cada punto representa el promedio de al menos 3 experimentos por triplicado cada uno de ellos con sus desviaciones estándar correspondientes.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por el primer grupo de compuestos

(µg/mL)	Porcentaje de inhibición				
	Curcumina	**PhCur**	**PhCur$_2$-Mn**	**PhCur$_2$-Cu**	**PhCur$_2$-Zn**
3.9	110.98±4.2	120.17±9.9	111.07±1.9	110.10±4.1	107.75±5.9
1.95	96.13±10	110.29±11	106.19±4.9	104.83±7.2	104.05±15
0.975	67.78±5.8	108.05±9	91.32±7.4	94.04±9.7	101.54±9.6
0.487	44.74±12	94.55±14	63.80±10	48.62±10	77.96±21
0.243	18.84±11	46.93±13	43.05±7.4	23.53±4.4	50.36±9.1
0.121	8.75±5.6	26.02±10	31.84±23	10.41±1.7	34.20±3.7

Todos los compuestos de este grupo inhibieron completamente el crecimiento de la bacteria de forma dependiente de la concentración (a mayor concentración, mayor poder de inhibición), cabe resaltar que tanto la fenilcurcumina como los complejos metálicos tuvieron resultados mejores al de la curcumina, mostrando el 100% de inhibición del crecimiento a concentraciones menores.

La curcumina fue tomada como punto de comparación para el resto de los curcuminoides experimentales ya que se trata de un compuesto previamente evaluado. Se obtuvo una inhibición de 96.13±10% a la concentración de 1.95 µg/mL. Debido a su desviación estándar, esta fue la concentración que se registrará como su CMI. Siguiendo el mismo proceso, los resultados y sus respectivas desviaciones estándar del primer grupo de compuestos señalan a la fenilcurcumina como la molécula que tuvo mejor potencial inhibitorio a una menor concentración, con una CMI de 0.48 µg/mL. Por otra parte, la PhCur$_2$-Zn, PhCur$_2$-Mn y PhCur$_2$-Cu tuvieron una CMI de 0.97 µg/mL. El ajuste de la CMI por su desviación estándar fue corroborado con un análisis estadístico (ver anexo 11.2.2-5): indica que, en un mismo compuesto, las concentraciones más altas no tienen diferencias significativas entre sí. Este análisis aplica para la fenilcurcumina (0.48-1.95 µg/mL), PhCur$_2$-Mn (0.97-3.9 µg/mL), PhCur$_2$-Cu (0.97-3.9 µg/mL) y PhCur$_2$-Zn (0.97-3.9 µg/mL). En cuestión numérica, la CMI de los compuestos resulta ser menor a la que se observa en la gráfica de la Figura 9 (siguiendo la tendencia de la curva).

Para comprobar la interpretación de que la fenilcurcumina y sus derivados metálicos tienen un efecto mejor al del control (curcumina), se hizo un análisis estadístico que comparó los compuestos experimentales contra la curcumina en cada concentración probada (Tabla 9).

Tabla 9. Diferencia estadística entre los valores de inhibición de la curcumina con respecto a los valores de inhibición de los compuestos experimentales

Compuesto	**Concentración (µg/mL)**					
	0.121	0.24	0.48	0.97	1.95	3.9
PhCur	ns	*	*	****	ns	ns
$PhCur_2$-Mn	ns	ns	ns	**	ns	ns
$PhCur_2$-Cu	ns	ns	ns	**	ns	ns
$PhCur_2$-Zn	*	*	ns	***	ns	ns

Con respecto a la curcumina (a las concentraciones indicadas) los valores de significancia son: (*) p=0.037, (**) p=0.0091, (***) p=0.0006 y (***) p<0.0001. ns: no significativo.

De acuerdo a este análisis, todos los compuestos experimentales son estadísticamente mejores que la curcumina a la concentración de 0.97 µg/mL: mientras la curcumina tiene una inhibición del 67.7%, los demás compuestos se encuentran por encima del 90%. Particularmente, PhCur y $PhCur_2$-Zn tuvieron inhibiciones estadísticamente mejores que la curcumina a concentraciones menores: 0.121 µg/mL (Cur 8.7%, $PhCur_2$-Zn 34.2%), 0.24 µg/mL (Cur 18.8%, PhCur 46.9%, $PhCur_2$-Zn 50.3) y 0.48 µg/mL (Cur 44.7%, PhCur 94.5%). Y, como ya se mencionó, la diferencia deja de ser significativa para las concentraciones altas.

En resumen, el análisis estadístico y la tendencia de las curvas comprueban que los compuestos tienen mejor actividad anti-*H. pylori* que la curcumina. Y los valores de CMI, en µg/mL, indican que PhCur es 4 veces más potente que la curcumina y $PhCur_2$-Mn, $PhCur_2$-Cu y $PhCur_2$-Zn son 2 veces más potentes.

En las concentraciones más altas de todos los experimentos se registró una absorbancia final menor a la absorbancia inicial, esto ocurre cuando la cantidad de bacterias final es menor a la muestra inicial (reflejado en las curvas que superan el 100% de inhibición). La razón por la cual se empleó espectrofotometría para monitorear el crecimiento celular es porque, en

suspensiones celulares sin tinción e independientemente de la composición del medio, la absorbancia registrada es directamente proporcional a la densidad celular (Mohler *et al.*, 1996). Tomando esto como base, todos los compuestos de este grupo, incluida la curcumina, son compuestos con actividad bactericida porque no sólo tienen la capacidad de inhibir la proliferación de las bacterias, sino que también provocan activamente la muerte celular y esta actividad se ve reflejada en la disminución celular del medio.

Cabe mencionar que los curcuminoides, dependiendo de su concentración, aportan coloración al medio, sin embargo, esto no genera interferencia en la medición de las muestras. Por una parte, la longitud de onda usada fue de 600 nm (evalúa básicamente la densidad celular) y la región del espectro a la cual la curcumina presenta su pico máximo de absorción se encuentra en un rango de 410 a 430 nm (Priyadarsini, 2014). Por otro lado, al sacar la diferencia de absorbancia de las muestras (Af - Ai) en los cálculos para determinar el porcentaje de inhibición (ver Sección 6.4), se descarta la posible absorción que pudiera aportar el color de los curcuminoides.

El segundo grupo de compuestos corresponde a los complejos metálicos restantes $PhCur_2$-Al, $PhCur_2$-Ga y $PhCur_3$-In. Este grupo también presentó inhibición sobre el crecimiento de *H. pylori* (Figura 11 y Tabla 10), pero no se tiene CMI para ninguno de los compuestos porque no lograron el 100% de inhibición a las concentraciones ensayadas.

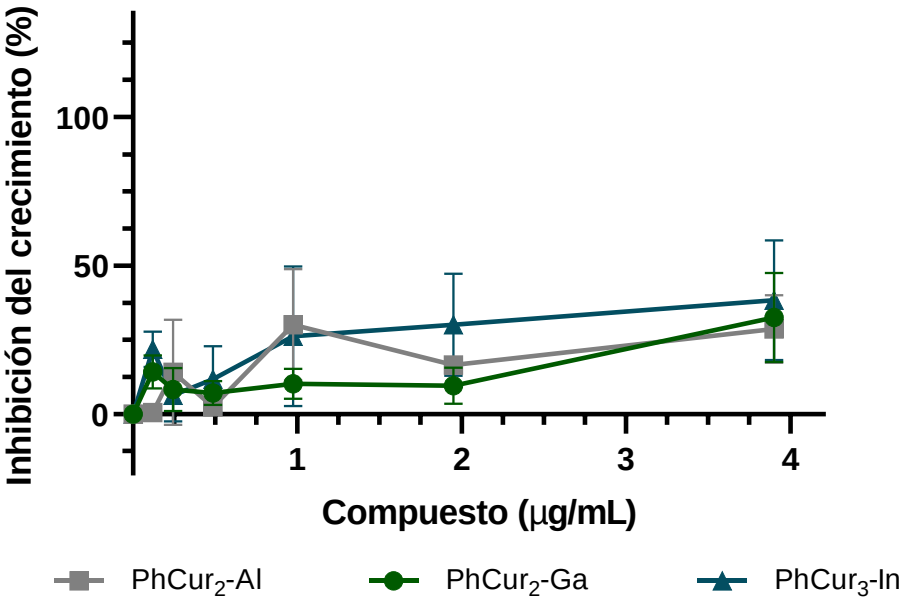


Figura 11. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por el segundo grupo. Los porcentajes de inhibición presentados son la media de 3 experimentos por triplicado con sus desviaciones estándar. Los resultados se presentan utilizando la misma escala que para el primer grupo para fines de comparación.

Tabla 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por el segundo grupo de compuestos

(µg/mL)	Porcentaje de inhibición		
	$PhCur_2$-Al	**$PhCur_2$-Ga**	**$PhCur_3$-In**
3.9	28.65±11	32.53±14	38.37±20
1.95	16.50±2.6	9.53±6.1	30.04±17
0.975	29.99±18	10.20±5.1	26.23±23
0.487	2.34±2	7.03±3.9	11.77±11
0.243	14.09±17	8.26±7.2	6.23±8.8
0.121	0.48±2	5.57±5.5	21.75±5.9

No está claro si las curvas de inhibición son dependientes de la concentración debido a la dispersión de los puntos, especialmente en las concentraciones más bajas. Existe la posibilidad de que esta dispersión y las desviaciones estándar grandes puedan estar relacionadas con los problemas de solubilidad que se experimentaron con estos compuestos.

Particularmente, la $PhCur_3$-In es un complejo formado con 3 moléculas de fenilcurcumina (a diferencia de los demás) y fue uno de los que presentó más problemas de solubilidad. Aunque la coloración por los curcuminoides se elimina al contemplarlos en la muestra inicial, la presencia de otras partículas suspendidas que no sean células puede alterar el resultado. Esto se debe a que la medición en el espectro se ve afectada en soluciones heterogéneas con múltiples componentes que varían en forma, tamaño o composición, porque el efecto de la dispersión de la luz será diferente para cada componente (Jin *et al.*, 2012).

Retomando el potencial inhibitorio de estos compuestos, el análisis estadístico corroboró que no hay diferencias significativas con respecto al control negativo. Existen algunas excepciones como es el caso de $PhCur_2$-Al a 0.97 µg/mL (29.9%) y 3.9 µg/mL (28.6%), $PhCur_2$-Ga a 3.9 µg/mL (32.5%) y $PhCur_3$-In a 1.95 µg/mL (30%) y 3.9 µg/mL (38.3%) (ver anexo 11.2.6-8). Suponiendo que las curvas de inhibición respeten una tendencia asintótica, teóricamente se requeriría una concentración muy alta de los compuestos para lograr el 100% de inhibición de la bacteria. Aunque el nivel de erradicación para este grupo de compuestos no es completamente nulo, su potencial para una terapia de erradicación contra *H. pylori* no tiene fines prácticos. También se debe considerar que los metales en este grupo de compuestos no son metales esenciales para el cuerpo humano (Na, Mg, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Co, Mn y Mo), por lo que las concentraciones usadas deben ser más controladas; un exceso de metales, incluso aquellos que desempeñan un rol en los sistemas biológicos, pueden inducir cierto grado de toxicidad en el cuerpo (Jomova *et al.*, 2022).

En conjunto, probar la actividad de estos compuestos a concentraciones superiores representa un desafío, tanto por sus características físico-químicas (solubilidad pobre en DMSO no solucionada con sonicación), como biológicas (metales no esenciales en sistemas biológicos).

Para analizar el potencial anti-*H. pylori* de los compuestos que resultaron activos y que se pudo obtener sus respectivas CMIs, primer grupo, se hizo una comparación con los controles positivos: amoxicilina y metronidazol (Figura 12).

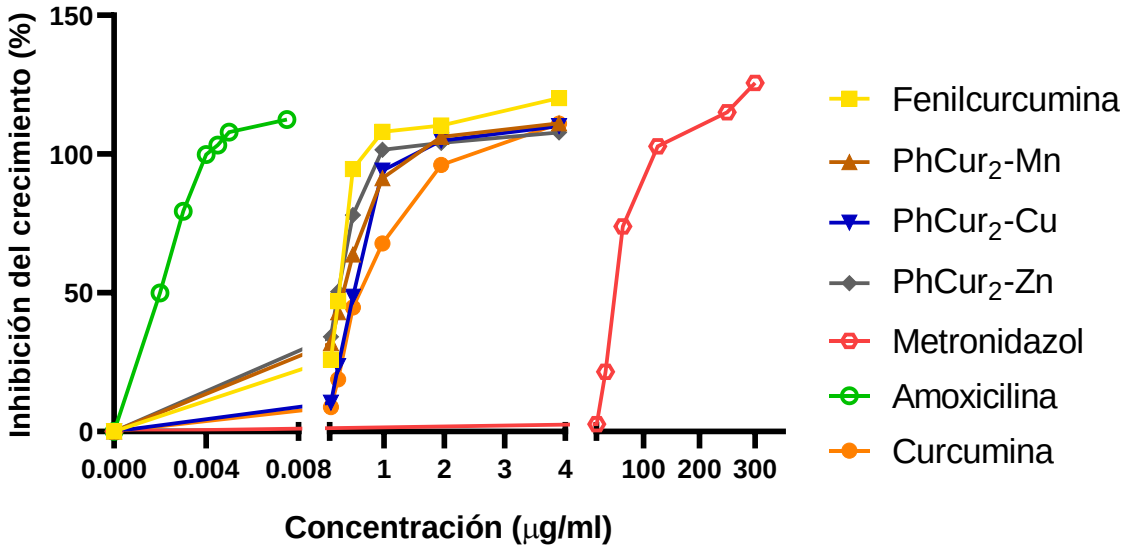


Figura 12. Comparación de la inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* por controles positivos y por los compuestos derivados de la curcumina.

La cepa ATCC 43504 es resistente al metronidazol y sensible a la amoxicilina, al tomar los valores de sus CMIs se establece un rango de concentraciones (0.004-125 µg/mL) donde se pueden encontrar compuestos con buen potencial antibiótico contra *H. pylori*. Dentro de este intervalo encontramos a la curcumina, fenilcurcumina y sus derivados metálicos $PhCur_2$-Mn, $PhCur_2$-Cu y $PhCur_2$-Zn, cuyas CMIs están en un rango más próximo al de la amoxicilina que al del metronidazol. Esto los convierte en posibles candidatos para la terapia de erradicación de la bacteria, ya que no se requiere una cantidad abundante de los compuestos para observar su potencial inhibitorio y bactericida. Aunado a ello, se trata de moléculas novedosas a las que *H. pylori* no ha sido expuesta, por lo cual no hay forma de que la bacteria haya desarrollado mecanismos de resistencia.

Finalmente, los resultados se presentaron en un sistema unitario de µg/mL para facilitar la comparación con los artículos que también prueban la capacidad de inhibición de la curcumina o sus complejos metálicos y que en su mayoría usan este sistema. Sin embargo, también se analizó usando como medida de concentración µM para evaluar la potencia de la molécula (Tabla 11)

Tabla 11. CMI de antibióticos y diferentes compuestos activos de curcumina

Compuesto	CMI	
	µg/mL*	**µM**
Metronidazol	125	730.31
Amoxicilina	0.004	0.109
Curcumina	1.95	5.29
Fenilcurcumina	0.48	1.75
$PhCur_2$-Mn	0.975	1.60
$PhCur_2$-Cu	0.975	1.55
$PhCur_2$-Zn	0.975	1.55

(*****) Valor de CMI tomado según la desviación estándar y su significancia.

De acuerdo a estos resultados, la CMI en µM es prácticamente igual para todos los compuestos del primer grupo. Bajo este esquema también cambia la perspectiva de la fenilcurcumina con respecto a los complejos metálicos, porque se ve una mejor actividad inhibitoria con $PhCur_2$-Cu y $PhCur_2$-Zn (1.55 µM) que con PhCur (1.75 µM), sin embargo, no es una gran diferencia. Por otra parte, esta escala también permite hacer una mejor comparación con los antibióticos, principalmente con el metronidazol, cuyo valor de CMI se encuentra muy alejado de la fenilcurcumina y sus derivados metálicos.

Los antecedentes reportan que los experimentos *in vitro* para probar la capacidad anti-*H. pylori* de la curcumina tienen resultados positivos (Tabla 2), con la excepción de los valores nulos de inhibición descritos por Foryst-Ludwig *et al.* (2004). Usando la cepa de referencia ATCC 43504, en el presente trabajo se obtuvo la CMI de la curcumina a una concentración de 1.95 µg/mL, valor inferior al rango establecido por el resto de los autores (Tabla 2) (6.25-16 µg/mL). Esta disminución en la concentración probablemente se debe a la metodología empleada. Aunque el uso del método de dilución en agar o dilución en medio líquido para probar compuestos en *H. pylori* es indistinto porque ambos están bien estandarizados y los resultados son extrapolables (Piccolomini *et al.*, 1997), se trata del primer registro de la CMI de la curcumina obtenido con el método de dilución en medio líquido. De forma general es difícil de probar compuestos poco polares en medios con una base acuosa (sólidos o líquidos) por su tendencia hidrofóbica. Sin embargo, la metodología empleada incluye el uso de β-

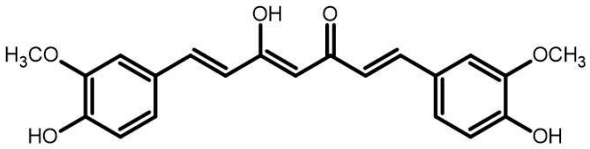
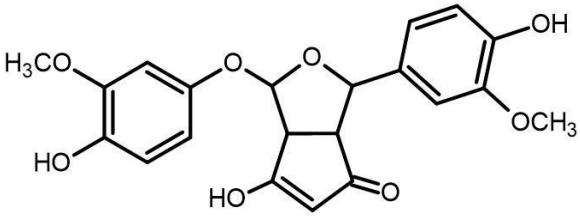
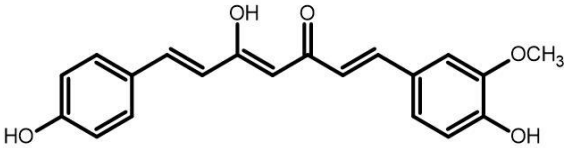
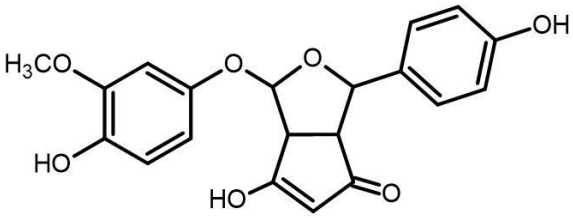
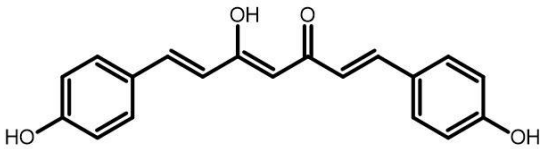
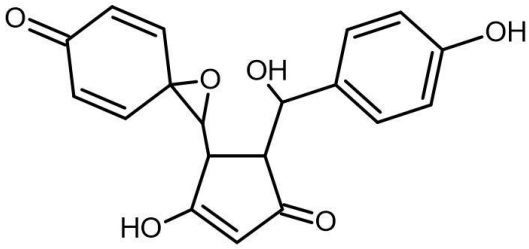
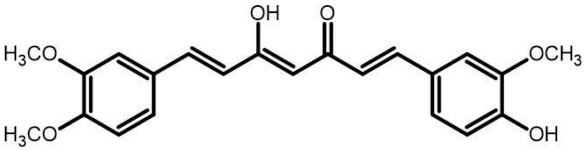
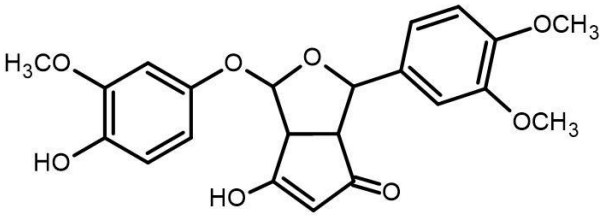
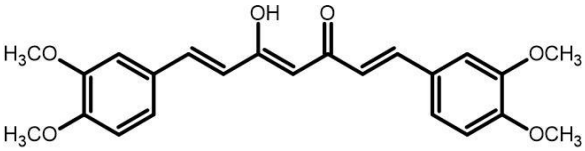
ciclodextrina en el medio de cultivo líquido, la cual es capaz de mejorar la solubilidad de algunos compuestos en medios acuosos, mejorar la permeabilidad de fármacos a través de la membrana y mejorar la biodisponibilidad de los compuestos, estas propiedades parecen incrementarse cuando se prueban sobre cultivos de bacterias Gram negativas (Paczkowska *et al.*, 2019).

Por otro lado, aunque no se puede determinar el mecanismo de acción de los compuestos ensayados en el presente trabajo con la metodología usada, sí nos da cierto panorama sobre el papel de la estructura molecular en el potencial inhibitorio, porque cada derivado de la curcumina tuvo un desempeño diferente por "pequeña" que fuera su modificación estructural. Los curcuminoides son parte de los fenoles, grupo químico caracterizado por sus abundantes actividades biológicas, entre ellas la antibiótica. Uno de los principales mecanismos de acción descrito para su actividad antibiótica es la interacción de los anillos fenólicos con la membrana celular de los organismos; dependiendo de su estructura molecular, el nivel de hidrofobicidad de un fenol cambia, haciéndolo más o menos reactivo con esta porción de la célula (Miklasińska-Majdanik *et al.*, 2018). Adicionalmente, cuando las moléculas tienen grupos hidroxilo, muestran afinidad hacia ciertas proteínas y se ha visto que esta propiedad es importante para el potencial antibacteriano de los fenoles porque generan inhibición de enzimas y toxinas, impide la formación de biofilm y actúan de forma sinérgica con algunos antibióticos (Miklasińska-Majdanik *et al.*, 2018).

Con respecto a la curcumina, se han propuesto diferentes mecanismos antibacterianos basados en diferentes investigaciones. A nivel de membrana citoplasmática incrementa su permeabilidad y degradación por producción de ROS (en terapias fotodinámicas) o por infiltración debido a las características anfipáticas y lipofílicas de la molécula. Además, la región ceto-enol de la curcumina es capaz de generar un déficit intracelular de NADPH lo que conduce a la muerte celular. Otros blancos de acción son el DNA, las proteínas, la pared celular y los sistemas de quorum-sensing (Ecevit *et al.*, 2022). Estos mecanismos de acción, que no han sido evaluados específicamente para *H. pylori*, dan un acercamiento hacia el posible mecanismo de acción de las moléculas y el por qué tienen diferentes potenciales según las modificaciones estructurales de la molécula.

Por otra parte, la fenilcurcumina genera interés al ser el compuesto con mejor potencial inhibitorio de todos los curcuminoides evaluados (usando unidades en µg/mL). Este compuesto no tiene los grupos metoxilo, ni hidroxilo en sus anillos aromáticos. Con base en nuestros resultados, parece que la ausencia de estos grupos mejora la actividad inhibidora del crecimiento de *H. pylori*. Otro acercamiento para explicar por qué este compuesto y sus complejos metálicos demostraron mejor potencial inhibitorio con respecto a la curcumina es su tiempo de interacción con el medio previo a la degradación de la molécula. En la revisión de Schneider *et al.* (2015) discuten sobre las diferencias en el tiempo de degradación en análogos de la curcumina según su estructura molecular (Tabla 12) cuando sufren autooxidación, proceso de degradación presente en estudios *in vitro*.

Tabla 12. **Degradación de curcuminoides dependiente de su estructura molecular**

Compuesto/estructura	Autooxidación (~$t_{1/2}$)	Producto
 Curcumina	Rápida (minutos)	 Bi-ciclopentadiona
 Dimetoxicurcumina (DMC)	Lenta (horas-días)	 Dimetoxibiciclopentadiona
 Bis-dimetoxicurcumina (BDMC)	Estable: requiere oxidación enzimática o química	 Bisdimetoxispiroepoxido
 4’-*O*-metilcurcumina	Lenta (horas-días)	 Metilbiciclopentadiona
 4’,4’’-*O*-dimetilcurcumina	Estable	Nr

Nr: No registrado. Tomado y modificado de Schneider *et al.* (2015).

El proceso de autooxidación depende principalmente de la presencia del grupo metoxi, por lo que su presencia aumenta la rapidez con que se degrada la molécula. Se ha comprobado que, en los extractos de cúrcuma, los análogos curcuminoides DMC y BDMC (carentes del

grupo metoxi) son los responsables de disminuir la susceptibilidad de la curcumina a la autooxidación (Schneider *et al.*, 2015). En soluciones acuosas, la estabilidad que aportan estos análogos es independiente de la acidez o alcalinidad del medio, e incluso se mantiene a pH fisiológico (donde se observa una degradación más rápida de la curcumina), sólo se ve ligeramente más afectada hacia pH alcalinos (Kharat *et al.*, 2017).

Dados las condiciones de las pruebas de inhibición: medio acuoso (cultivo líquido) con pH ligeramente alcalino (pH de 7.4 para Mueller-Hinton), la estabilidad de las moléculas y el tiempo de interacción con la bacteria es muy importante. Los productos de degradación de la curcumina son muchos y se han reportado actividades terapéuticas para cada uno de ellos (Schneider *et al.*, 2015), sin embargo, interpretando los datos obtenidos, puede que dichos productos no tengan tanto impacto sobre el crecimiento de la bacteria como la molécula completa. La fenilcurcumina y sus derivados metálicos carecen de los grupos metoxi, si siguen el comportamiento de los análogos DMC y BDMC, su estabilidad en el medio es más estable que la curcumina. Teóricamente, se extiende su tiempo de interacción con la bacteria y como consecuencia estaríamos observando la actividad de la molécula "entera" sobre el crecimiento de la bacteria y no de sus productos de degradación.

A pesar de que los complejos metálicos se formaron a partir de moléculas de fenilcurcumina, su proceso de degradación podría ser diferente debido a la presencia del metal. Los metales se enlazaron aprovechando la propiedad quelante del tautomerismo ceto-enol, impidiendo la posible interacción de esta región con otros componentes del medio. Dependiendo de las condiciones preexistentes, esta región de la molécula es sensible al medio por tres mecanismos: 1) reacciona con ROS, 2) sufre degradación química y metabolización y 3) presenta adición nucleofílica (Priyadarsini, 2014). Al bloquear esta región en la fenilcurcumina se estaría disminuyendo su interacción con otras moléculas no relacionadas al potencial antibiótico, a la vez que aminora su susceptibilidad a la degradación.

Aunque todavía se desconoce si los derivados de la fenilcurcumina liberan sus metales durante la interacción con *H. pylori*, no se debe ignorar que el potencial inhibitorio fue característico para cada complejo, indicando una posible actividad dependiente del metal contenido en las moléculas. Los metales tienen propiedades dependientes de su estado de oxidación, algunos tienen relevancia biológica para *H. pylori* porque forman parte de la

estructura de algunas proteínas de supervivencia; como el zinc (en la anhidrasa carbónica y en proteínas maduradoras de la ureasa), cobre o manganeso (participa en rutas metabólicas y biosíntesis de fosfolípidos), pero también pueden tener efectos adversos al grado de ser usados como potenciadores de las terapias de erradicación (aluminio) (Donma *et al.*, 2006; Haley & Gaddy, 2015). Este es un tema que todavía tiene muchas preguntas sin responder, especialmente cuando se trata del papel que tienen de los metales en condiciones *in vivo*. Por ejemplo, el cobre tiene una acción dual, en la bacteria funciona como cofactor en el proceso de respiración, pero su presencia en el lumen estomacal interviene negativamente con la movilidad y quimiotaxis de *H. pylori*, la afectación es tan grave al grado de clasificarse como un citotóxico (Haley & Gaddy, 2015).

Comparado a la curcumina, los complejos metálicos suelen demostrar mejor potencial inhibitorio. Esta tendencia puede observarse en diversas investigaciones que evaluaron el efecto de distintos complejos curcuminoides sobre el crecimiento de otras bacterias (Tabla 13).

Tabla 13. Efecto antibacteriano de distintos complejos metálicos de curcumina reportados por otros autores

Organismo	Concentración – Inhibición		Tiempo de ensayo	Referencias
	Curcumina	Complejo metálico		
E. coli (Gram -)	25 µM – 19.5% HCur	25 µM – 99.7% Mn^{II} $(Cur)_2(HCur)$	60 min	Das *et al.*, 2020
	SA	93.8 µg/mL – CMI $In(Cur)_3$	24 h	Tajbakhsh *et al.*, 2008
S. aureus (Gram +)	50 µM – 85% HCur	50 µM – 99.6% Mn^{II} $(Cur)_2(HCur)$	120 min	Das *et al.*, 2020
	187.5 µg/mL – CMI	93.8 µg/mL – CMI $In(Cur)_3$	24 h	Tajbakhsh *et al.*, 2008
P. aeruginosa (Gram -)	125 µg/mL – CMI	75.3 µg/mL – CMI $ZnI_2(Cur)_2$	20 h	Papadimitriou *et al.*, 2018
	SA	23.4 µg/mL – CMI $In(Cur)_3$ 23.4 µg/mL – CMI $In(DAC)_3$	24 h	Tajbakhsh *et al.*, 2008
	125 µg/mL – 86.5%	62.5 µg/mL – 98.5% Cu-CUR 62.5 µg/mL – 96.8% Zn-CUR	16 h	Gholami *et al.*, 2020
S. epidermis (Gram +)	46.9 µg/mL – CMI	23.4 µg/mL – CMI $In(Cur)_3$ 46.9 µg/mL – CMI $In(DAC)_3$	24 h	Tajbakhsh *et al.*, 2008

SA: Sin actividad. Cur: Curcumina. CUR: Complejo curcuminoide. CMI: 100% de inhibición del crecimiento. DAC: Diacetilcurcumina. HCur: Dicetocurcumina.

Aunque estos ensayos no fueron realizados con *H. pylori*, podríamos establecer cierta correlación, especialmente con las bacterias Gram negativas (*E. coli* y *S. epidermis*). En todos los casos la inhibición causada por los complejos metálicos es igual o superior a la de la curcumina y este patrón se repite en el presente estudio para la mitad de los complejos metálicos ensayados ($PhCur_2$-Mn, $PhCur_2$-Cu y $PhCur_2$-Zn). Estos resultados indican que, en cierta medida, los metales presentes en los complejos curcuminoides tienen influencia sobre el potencial antibacteriano de los compuestos, ya sea mejorando o disminuyéndolo.

Al tratarse de moléculas novedosas es necesario evaluar su toxicidad en distintos modelos, especialmente considerando que los resultados de su actividad anti-*H. pylori* son prometedores. Actualmente se están realizando estas pruebas en el Instituto de Química de la UNAM por el equipo del Dr. Raúl Enríquez Habib, quien amablemente nos proporcionó los compuestos. Este equipo ya ha caracterizado otros derivados curcuminoides, incluida su toxicidad aguda, como es el caso de la diacetilcurcumina (DAC) y sus complejos metálicos $(DAC)_2Zn$, $(DAC)_2Cu$, $(DAC)_2Mg$ y $(DAC)_2Mn$. Utilizando un modelo murino, comprobaron que ninguno de estos compuestos puede inducir toxicidad aguda en concentraciones de hasta 3g/kg (vía oral) (Meza-Morales *et al.*, 2019). De forma análoga, la toxicidad de la curcumina y la cúrcuma (incluye DMC, BDMC y otros análogos) es prácticamente nula (hasta 8 g/kg al día) (Tabla 4), siendo indicativos de que los compuestos ensayados también pueden presentar una baja toxicidad.

8. CONCLUSIONES

Se obtuvo de forma exitosa un lote activo y homogéneo de la cepa ATCC 43504 de *H. pylori* siguiendo la metodología estandarizada para su reactivación, cultivo y preservación. La identificación de la bacteria se confirmó por sus características morfológicas y morfología celular y las pruebas bioquímicas que identifican algunas proteínas características de *H. pylori:* ureasa, oxidasa y catalasa.

Utilizar esta cepa resulta ser una buena estrategia porque, además de ser la cepa de referencia recomendada por la CLSI, su resistencia al metronidazol y sensibilidad a otros antibióticos permiten validar la metodología usada. Cuando la CMI de los antibióticos de referencia se encuentra dentro de los rangos establecidos por la CLSI o la EUCAST, podemos concluir que los resultados son válidos y que la metodología empleada, en este caso la de dilución en medio líquido es una práctica viable y confiable para determinar la susceptibilidad de la bacteria a los compuestos experimentales.

Es la primera vez que se evalúa el potencial anti-*H. pylori* de la curcumina utilizando el método de dilución en cultivo líquido y probando tiempos de interacción más largos; su CMI obtenida resultó ser mucho menor a las concentraciones registradas en la literatura. Los compuestos experimentales presentaron grandes diferencias con respecto a su potencial inhibitorio: la fenilcurcumina, $PhCur_2$-Mn, $PhCur_2$-Cu y $PhCur_2$-Zn (grupo 1) demostraron tener una fuerte actividad antibacteriana, además de tener valores de CMIs menores a la curcumina, también exhiben potencial bactericida a concentraciones altas. Por otra parte, $PhCur_2$-Al, $PhCur_2$-Ga y $PhCur_3$-In (grupo 2) fueron los compuestos con menor potencial terapéutico para las concentraciones ensayadas: sumado a que su inhibición no superó el 40%, también presentaron problemas de solubilidad.

Este proyecto representa la primera evaluación del efecto de la fenilcurcumina y sus derivados metálicos sobre el crecimiento de *H. pylori*. Al tratarse de moléculas con pequeñas diferencias estructurales entre sí, pero cuyo potencial antibiótico es muy diferente, podemos concluir que los cambios en la estructura de la molécula y la presencia de metales tiene un gran impacto en su actividad anti-*H. pylori*. De acuerdo al contenido de grupos funcionales (metoxi y OH) o la integración ciertos metales (grupo 1 *vs* grupo 2) el potencial anti-*H. pylori* se verá impactado de forma positiva o negativa. Sin embargo, no se conocen muchos detalles

de estas interacciones, ni mucho menos sus procesos de degradación o toxicidad, por lo que representan una buena y amplia oportunidad de investigación.

9. PERSPECTIVAS

Este proyecto queda abierto a muchos caminos, uno de ellos es la estabilidad de las moléculas probadas: es necesario realizar pruebas que aclaren la diferencia entre la reactividad que tiene la curcumina y sus derivados (fenilcurcumina y sus complejos metálicos) con el medio, para ver si es posible mejorar su farmacodinamia. Una forma de lograrlo es realizando experimentos que evalúen el estado de la molécula a distintos tiempos, para ver si puede haber cierto grado de degradación y de ser posible si existe un tiempo óptimo de su actividad.

Otro punto importante a investigar con detalle es su toxicidad, ya que para implementarse en alguna terapia no deben de causar daño al paciente en las dosis que se van a emplear.

También es necesario estudiar el mecanismo a través del cual los compuestos inhiben el crecimiento de la bacteria, asimismo, determinar su concentración mínima bactericida. Por otra parte, sería necesario evaluar su efecto sobre los procesos de colonización de la bacteria (la adherencia de la bacteria, la ureasa y su capacidad de desplazarse). Adicional a las pruebas anteriores, se puede probar el efecto de los compuestos directamente sobre el estómago para determinar si tiene alguna actividad gastroprotectora o anti-úlceras. Finalmente, si las pruebas arrojan resultados positivos, se puede apuntar hacia modelos *in vivo* que nos puedan acercar más hacia el posible uso de la curcumina, fenilcurcumina y sus derivados metálicos en el tratamiento de la infección por *H. pylori*.

10. BIBLIOGRAFÍA

Al-Noor, T. H., Ali, A. M., Al-Sarray, A. J. A., Al-Obaidi, O. H., Obeidat, A. I. M., & Habash, R. R. (2022). A Short Review: Chemistry of Curcumin and Its Metal Complex Derivatives. Journal of University of Anbar for Pure Science, 16(1), 20–26. https://doi.org/10.37652/juaps.2022.174832

Alvarez-Ricardo, Y. F., Sánchez-López, D. M., Meza-Morales, W. E., Obregón-Mendoza, M. A., Arias-Olguín, I. I., Nieto-Camacho, A., Toscano, R. A., & Enríquez, R. G. (2020). Stereochemistry and Antioxidant Activity of 1,3-Diol Derivatives of Diacetylcurcumin-4H: A Joint NMR, X-Ray, and Biological Approach. Chemistry Select, 5(5), 1616–1622. https://doi.org/10.1002/slct.201903089

Alzahrani, S., Lina, T. T., Gonzalez, J., Pinchuk, I. V., Beswick, E. J., & Reyes, V. E. (2014). Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. World Journal of Gastroenterology, 20(36), 12767–12780. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12767

Asti, M., Ferrari, E., Croci, S., Atti, G., Rubagotti, S., Iori, M., Capponi, P. C., Zerbini, A., Saladini, M., & Versari, A. (2014). Synthesis and characterization of 68Ga-labeled curcumin and curcuminoid complexes as potential radiotracers for imaging of cancer and Alzheimer's disease. Inorganic Chemistry, 53(10), 4922–4933. https://doi.org/10.1021/ic403113z

Attia, Y. A., Al-Harthi, M. A., & Hassan, S. S. (2017). Turmeric (*Curcuma longa* Linn.) as a phytogenic growth promoter alternative for antibiotic and comparable to mannan oligosaccharides for broiler chicks. Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias, 8(1), 11–21. https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4309

Barik, A., Mishra, B., Kunwar, A., Kadam, R. M., Shen, L., Dutta, S., Padhye, S., Satpati, A. K., Zhang, H. Y., & Indira Priyadarsini, K. (2007). Comparative study of copper(II)-curcumin complexes as superoxide dismutase mimics and free radical scavengers. European Journal of Medicinal Chemistry, 42(4), 431–439. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.11.012

Bengmark, S., Mesa, D., & Gil, A. (2009). Plant-derived health-the effects of turmeric and curcuminoids. Nutrición hospitalaria, 24(3), 273–281.

Benoit, S. L., & Maier, R. J. (2016). *Helicobacter* catalase devoid of catalytic activity protects the Bacterium against oxidative stress. Journal of Biological Chemistry, 291(45), 23366–23373. https://doi.org/10.1074/jbc.M116.747881

Blaser, M. J., & Berg, D. E. (2001). *Helicobacter pylori* genetic diversity and risk of human disease. Journal of Clinical Investigation, 107(7), 767–773. https://doi.org/10.1172/JCI12672

Brenner, D. J., Krieg, N. R., & Staley, J. T. (2005). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 2). Springer.

Brown, L. M. (2000). *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. Epidemiologic Reviews, 22(2), 283–297. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.epirev.a018040

Camorlinga-Ponce, M., Gómez-Delgado, A., Aguilar-Zamora, E., Torres, R. C., Giono-Cerezo, S., Escobar-Ogaz, A., & Torres, J. (2021). Phenotypic and Genotypic Antibiotic Resistance Patterns in *Helicobacter pylori* Strains From Ethnically Diverse Population in México. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 10. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.539115

CDCP, & NIH. (2020). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (6a ed.). Public Health Service.

Chainani-Wu, N. (2003). Safety and Anti-Inflammatory Activity of Curcumin: A Component of Tumeric (*Curcuma longa*). The Journal of Alternative and Complementary Medicine, 9(1), 161–168. https://doi.org/10.1089/107555303321223035

Chattopadhyay, I., Biswas, K., Bandyopadhyay, U., & Banerjee, R. K. (2004). Turmeric and curcumin: Biological actions and medicinal applications. Current Science, 87(1), 44–53. https://www.jstor.org/stable/24107978

Chauhan, G., Rath, G., & Goyal, A. K. (2013). In-vitro anti-viral screening and cytotoxicity evaluation of copper-curcumin complex. Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology, 41, 276–281. https://doi.org/10.3109/21691401.2012.742096

CLSI. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement (Vol. 27). Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI. (2015). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria (3a ed., Vol. 35). Clinical and Laboratory Standards Institute. www.clsi.org.

Coico. (2005). Gram Staining. En Current Protocols in Microbiology: Vol. Appendix 3C. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9780471729259.mca03cs00

Covacci, A., Telford, J. L., Del Giudice, G., Parsonnet, J., & Rappuoli, R. (1999). *Helicobacter pylori* Virulence and Genetic Geography. Science, 62(11), 1328–1333. https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1328

Das, S., Mukhopadhyay, K., Saha, T., Kumar, P., Sepay, N., Ganguly, D., & Tiwari, K. (2020). Multitargeting antibacterial activity of a synthesized Mn^{2+} complex of curcumin on gram-positive and gram-negative bacterial strains. ACS Omega, 5(27), 16342–16357. https://doi.org/10.1021/acsomega.9b04079

De, R., Kundu, P., Swarnakar, S., Ramamurthy, T., Chowdhury, A., Nair, G. B., & Mukhopadhyay, A. K. (2009). Antimicrobial activity of curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during infections in mice. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(4), 1592–1597. https://doi.org/10.1128/AAC.01242-08

Ding, S. Z. (2020). Global whole family based-*Helicobacter pylori* eradication strategy to prevent its related diseases and gastric cancer. World Journal of Gastroenterology, 26(10), 995–1004. https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i10.995

Donma, O., Donma, M. M., & Sonmez, S. (2006). Metal speciation, phytochemicals and *Helicobacter pylori* infection. Medical Hypotheses, 67(3), 545–549. https://doi.org/10.1016/j.mehy.2006.02.045

Ecevit, K., Barros, A. A., Silva, J. M., & Reis, R. L. (2022). Preventing Microbial Infections with Natural Phenolic Compounds. Future Pharmacology, 2(4), 460–498. https://doi.org/10.3390/futurepharmacol2040030

Eigner, D., & Scholz, D. (1999). Ferula asa-foetida and *Curcuma longa* in traditional medical treatment and diet in Nepal. Journal of Ethnopharmacology, 67, 1–6. https://doi.org/10.1016/s0378-8741(98)00234-7

EUCAST. (2023). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0. http://www.eucast.org.

Foryst-Ludwig, A., Neumann, M., Schneider-Brachert, W., & Naumann, M. (2004). Curcumin blocks NF-κB and the motogenic response in *Helicobacter pylori*-infected epithelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 316(4), 1065–1072. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.158

Garufi, A., Trisciuoglio, D., Porru, M., Leonetti, C., Stoppacciaro, A., D'Orazi, V., Avantaggiati, M. L., Crispini, A., Pucci, D., & D'Orazi, G. (2013). A fluorescent curcumin-based Zn(II)-complex reactivates mutant (R175H and R273H) p53 in cancer cells. Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 32(1), 72. https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-72

Gholami, M., Zeighami, H., Bikas, R., Heidari, A., Rafiee, F., & Haghi, F. (2020). Inhibitory activity of metal-curcumin complexes on quorum sensing related virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. AMB Express, 10(111). https://doi.org/10.1186/s13568-020-01045-z

Globocan. (2020). Stomach. International Agency for Research on Cancer. https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/7-Stomach-fact-sheet.pdf

Gomez-Chang, E., Uribe-Estanislao, G. V., Martinez-Martinez, M., Gálvez-Mariscal, A., & Romero, I. (2018). Anti-*Helicobacter pylori* potential of three edible plants known as quelites in Mexico. Journal of Medicinal Food, 21(11), 1150–1157. https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0137

Goodwin, S. C., Armstrong, J. A., Chilvers, T., Peters, M., Collins, D., Sly, L., McConnell, W., & Harper, W. E. S. (1989). Transfer of *Campylobacter pylori* and *Campylobacter mustelae* to *Helicobacter* gen. nov. as *Helicobacter pylori* comb. nov. and *Helicobacter mustelae* comb. nov. Respectively. International Journal of Systematic Bacteriology, 39(4), 397–405.

Gorgannezhad, L., Dehghan, G., Ebrahimipour, S. Y., Naseri, A., & Nazhad Dolatabadi, J. E. (2016). Complex of manganese (II) with curcumin: Spectroscopic characterization, DFT study, model-based analysis and antiradical activity. Journal of Molecular Structure, 1109, 139–145. https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2015.12.051

Graham, D. Y., & Fischbach, L. (2010). *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. Gut, 59(8), 1143–1153. https://doi.org/10.1136/gut.2009.192757

Haley, K. P., & Gaddy, J. A. (2015). Metalloregulation of *Helicobacter pylori* physiology and pathogenesis. Frontiers in Microbiology, 6(911). https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00911

Han, C., Wang, L., Yu, K., Chen, L., Hu, L., Chen, K., Jiang, H., & Shen, X. (2006). Biochemical characterization and inhibitor discovery of shikimate dehydrogenase from *Helicobacter pylori*. FEBS Journal, 273(20), 4682–4692. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05469.x

Harris, A. G., Hinds, F. E., Beckhouse, A. G., Kolesnikow, T., & Hazell, S. L. (2002). Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: role of catalase (KatA) and Fur, and functional analysis of a novel gene product designated ' KatA-associated protein ', KapA (HP0874). Microbiology, 148(1), 3813–3825. https://doi.org/10.1099/00221287-148-12-3813

Hewlings, S. J., & Kalman, D. S. (2017). Curcumin: A review of its effects on human health. Foods, 6(10), 92. https://doi.org/10.3390/foods6100092

Hunt, R. H., Xiao, S. D., Megraud, F., Leon-Barua, R., Bazzoli, F., van der Merwe, S., Vaz Coelho, L. G., Fock, M., Fedail, S., Cohen, H., Malfertheiner, P., Vakil, N., Hamid, S., Goh, K. L., Wong, B. C. Y., Krabshuis, J., & Le Mair, A. (2011). *Helicobacter pylori* in developing countries. World Gastroenterology Organization Global Guidelines. Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases, 20(3), 299–304.

IARC, & WHO. (1994). Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori* (Vol. 61). IARC.

Jahangoshaei, P., Hassani, L., Mohammadi, F., Hamidi, A., & Mohammadi, K. (2015). Investigating the effect of gallium curcumin and gallium diacetylcurcumin complexes on the structure, function and oxidative stability of the peroxidase enzyme and their anticancer and antibacterial activities. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 20(7), 1135–1146. https://doi.org/10.1007/s00775-015-1295-x

Jin, J. W., Chen, Z. P., Li, L. M., Steponavicius, R., Thennadil, S. N., Yang, J., & Yu, R. Q. (2012). Quantitative spectroscopic analysis of heterogeneous mixtures: The correction of multiplicative effects caused by variations in physical properties of samples. Analytical Chemistry, 84(1), 320–326. https://doi.org/10.1021/ac202598f

Johnson, K. S., & Ottemann, K. M. (2018). Colonization, localization, and inflammation: the roles of H. *pylori* chemotaxis *in vivo*. Current Opinion in Microbiology, 41, 51–57. https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.019

Jomova, K., Makova, M., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., Rhodes, C. J., & Valko, M. (2022). Essential metals in health and disease. Chemico-Biological Interactions, 367, 110173. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.110173

Jurtshuk, P., & Mcquitty, D. N. (1976). Use of a Quantitative Oxidase Test for Characterizing Oxidative Metabolism in Bacteria. Applied and environmental microbiology, 31(5), 668–679. https://journals.asm.org/journal/aem

Kharat, M., Du, Z., Zhang, G., & McClements, D. J. (2017). Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 65(8), 1525–1532. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b04815

Kim, J. M. (2016). H. *pylori* Virulence Factors: Toxins (CagA, VacA, DupA, OipA, IceA). En *Helicobacter pylori* (pp. 77–88). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-287-706-2_5

Kinoshita-Daitoku, R., Ogura, Y., Kiga, K., Maruyama, F., Kondo, T., Nakagawa, I., Hayashi, T., & Mimuro, H. (2020). Complete Genome Sequence of *Helicobacter pylori* Strain ATCC 43504, a Type Strain That Can Infect Gerbils. Microbiology Resource Announcements, 9(18), e00105. https://doi.org/10.1128/mra.00105-20

Krishnankutty, K., & John, V. D. (2003). Synthesis, characterization, and antitumour studies of metal chelates of some synthetic curcuminoids. Synthesis and Reactivity in Inorganic and Metal-Organic Chemistry, 33(2), 343–358. https://doi.org/10.1081/SIM-120017791

Krzyzek, P., & Gościniak, G. (2018). Morphology of *Helicobacter pylori* as a result of peptidoglycan and cytoskeleton rearrangements. Przeglad Gastroenterologiczny, 13(3), 182–195. https://doi.org/10.5114/pg.2018.78284

Kundu, P., De, R., Pal, I., Mukhopadhyay, A. K., Saha, D. R., & Swarnakar, S. (2011). Curcumin alleviates matrix metalloproteinase-3 and -9 activities during eradication of *Helicobacter pylori* infection in cultured cells and mice. PLoS ONE, 6(1). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016306

Kunwar, A., Narang, H., Indira Priyadarsini, K., Krishna, M., Pandey, R., & Sainis, K. B. (2007). Delayed activation of PKCδ and NFκB and higher radioprotection in splenic lymphocytes by copper (II)-curcumin (1:1) Complex as compared to curcumin. Journal of Cellular Biochemistry, 102(5), 1214–1224. https://doi.org/10.1002/jcb.21348

Kusters, J. G., Van Vliet, A. H. M., & Kuipers, E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clinical Microbiology Reviews, 19(3), 449–490. https://doi.org/10.1128/CMR.00054-05

Mahady, G. B., Pendland, S. L., Yun, G., & Lu, Z. Z. (2002). Turmeric (*Curcuma longa*) and curcumin inhibit the growth of *Helicobacter pylori*, a group 1 carcinogen. Anticancer research, 22(1), 4179–4182.

Marcus, E. A., Moshfegh, A. P., Sachs, G., & Scott, D. R. (2005). The periplasmic α-carbonic anhydrase activity of *Helicobacter pylori* is essential for acid acclimation. Journal of Bacteriology, 187(2), 729–738. https://doi.org/10.1128/JB.187.2.729-738.2005

Marcus, E. A., & Scott, D. R. (2016). Gastric colonization by *H. pylori*. En *Helicobacter pylori* (pp. 23–34). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-287-706-2_2

Martínez, J. D., Henao, S. C., & Lizarazo, J. I. (2014). Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en América Latina y el Caribe. Revista Colombiana de Gastroenterología, 29(3), 218–227. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572014000300003&lng=en&tlng=es.

Megraud, F., Coenen, S., Versporten, A., Kist, M., Lopez-Brea, M., Hirschl, A. M., Andersen, L. P., Goossens, H., Glupczynski, Y., Alarcon, T., Albrecht, P., Barna, Z., Burucoa, C., Calvet, X., Cambau, E., Cellini, L., Conroy, M. C., Deforges, L., Dzierzanowska-Fangrat, K., Zanetti, M. (2013). *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption. Gut, 62(1), 34–42. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302254

Mei, X., Xu, D., Xu, S., Zheng, Y., & Xu, S. (2011). Gastroprotective and antidepressant effects of a new zinc (II)-curcumin complex in rodent models of gastric ulcer and depression induced by stresses. Pharmacology Biochemistry and Behavior, 99(1), 66–74. https://doi.org/10.1016/j.pbb.2011.04.002

Mei, X., Xu, D., Xu, S., Zheng, Y., & Xu, S. (2012). Novel role of Zn(II)-curcumin in enhancing cell proliferation and adjusting proinflammatory cytokine-mediated oxidative damage of ethanol-induced acute gastric ulcers. Chemico-Biological Interactions, 197(1), 31–39. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.03.006

Meza-Morales, W., Mirian Estévez-Carmona, M., Alvarez-Ricardo, Y., Obregón-Mendoza, M. A., Cassani, J., Ramírez-Apan, M. T., Escobedo-Martínez, C., Soriano-García, M., Reynolds, W. F., & Enríquez, R. G. (2019). Full structural characterization of homoleptic complexes of diacetylcurcumin with Mg, Zn, Cu, and Mn: Cisplatin-level Cytotoxicity *in vitro* with Minimal Acute Toxicity *in vivo*. Molecules, 24(8), 1598. https://doi.org/10.3390/molecules24081598

Miklasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., & Wąsik, T. J. (2018). Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of Staphylococcus aureus clinical strains. International Journal of Environmental Research and Public Health, 15(10), 2321. https://doi.org/10.3390/ijerph15102321

Mohammadi, K., Thompson, K. H., Patrick, B. O., Storr, T., Martins, C., Polishchuk, E., Yuen, V. G., McNeill, J. H., & Orvig, C. (2005). Synthesis and characterization of dual function

vanadyl, gallium and indium curcumin complexes for medicinal applications. Journal of Inorganic Biochemistry, 99(11), 2217–2225. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2005.08.001

Mohler, W., Charlton, C. A., & Blau, H. M. (1996). Spectrophotometric Quantitation of Tissue Culture Cell Number in Any Medium. Short Technical Reports, 21(2), 260–266. https://doi.org/10.2144/96212st03

Morgan, E., Arnold, M., Constanza Camargo, M., Gini, A., Kunzmann, A. T., Matsuda, T., Meheus, F., Verhoeven, R. H. A., Er^ Ome Vignat, J., Laversanne, M., Ferlay, J., & Soerjomataram, I. (2022). The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020−40: A population-based modelling study. eClinicalMedicine, 47(1), 1–10. https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101404

Ogura, K., Maeda, S., Nakao, M., Watanabe, T., Tada, M., Kyutoku, T., Yoshida, H., Shiratori, Y., & Omata, M. (2000). Virulence Factors of *Helicobacter pylori* Responsible for Gastric Diseases in Mongolian Gerbil. Journal of Experimental Medicine, 192(11), 1601–1609. https://doi.org/https://doi.org/10.1084/jem.192.11.1601

OMS. (2013). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Organización Mundial de la Salud.

Paczkowska, M., Szymanowska-Powałowska, D., Mizera, M., Siąkowska, D., Błaszczak, W., Piotrowska-Kempisty, H., & Cielecka-Piontek, J. (2019). Cyclodextrins as multifunctional excipients: Influence of inclusion into β-cyclodextrin on physicochemical and biological properties of tebipenem pivoxil. PLoS ONE, 14(1), e0210694. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210694

Papadimitriou, A., Ketikidis, I., Stathopoulou, M.-E. K., Banti, C. N., Papachristodoulou, C., Zoumpoulakis, L., Agathopoulos, S., Vagenas, G. V., & Hadjikakou, S. K. (2018). Innovative material containing the natural product curcumin, with enhanced antimicrobial properties for active packaging. Materials Science and Engineering: C, 84, 118–122. https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.11.041

Piccolomini, R., Di Bonaventura, G., Catamo, G., Carbone, F., & Neri, M. (1997). Comparative Evaluation of the E Test, Agar Dilution, and Broth Microdilution for Testing Susceptibilities of *Helicobacter pylori* Strains to 20 Antimicrobial Agents. Journal of Clinical Microbiology, 35(7), 1842–1846. https://doi.org/https://doi.org/10.1128/jcm.35.7.1842-1846.1997

Prasad, S., Dubourdieu, D., Srivastava, A., Kumar, P., & Lall, R. (2021). Metal–curcumin complexes in therapeutics: An approach to enhance pharmacological effects of curcumin. International Journal of Molecular Sciences, 22(13), 1–24. https://doi.org/10.3390/ijms22137094

Priyadarsini, K. I. (2014). The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. Molecules, 19(12), 20091–20112. https://doi.org/10.3390/molecules191220091

Pucci, D., Crispini, A., Mendiguchía, B. S., Pirillo, S., Ghedini, M., Morelli, S., & De Bartolo, L. (2013). Improving the bioactivity of Zn(ii)-curcumin based complexes. Dalton Transactions, 42(26), 9679–9687. https://doi.org/10.1039/c3dt50513h

Rubagotti, S., Croci, S., Ferrari, E., Orteca, G., Iori, M., Capponi, P. C., Versari, A., & Asti, M. (2017). Uptake of Ga-curcumin derivatives in different cancer cell lines: Toward the development of new potential 68Ga-labelled curcuminoids-based radiotracers for tumour imaging. Journal of Inorganic Biochemistry, 173, 113–119. https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.05.002

Sachs, G., Weeks, D. L., Wen, Y., Marcus, E. A., & Scott, D. R. (2005). Acid Acclimation by *Helicobacter pylori*. Phisiology, 20(1), 429–438. https://doi.org/10.1152/physiol.00032.2005

Sanphui, P., & Bolla, G. (2018). Curcumin, a Biological Wonder Molecule: A Crystal Engineering Point of review. Crystal Growth and Design, 18(9), 5690–5711. https://doi.org/10.1021/acs.cgd.8b00646

Schneider, C., Gordon, O. N., Edwards, R. L., & Luis, P. B. (2015). Degradation of Curcumin: From Mechanism to Biological Implications. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(35), 7606–7614. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b00244

Scott, D. R., Sachs, G., & Marcus, E. A. (2016). The role of acid inhibition in *Helicobacter pylori* eradication. F1000Research, 5(1747), 1–7. https://doi.org/10.12688/F1000RESEARCH.8598.1

Seyler, J., Olson, J. W., & Maier, R. J. (2001). Superoxide dismutase-deficient mutants of *Helicobacter pylori* are hypersensitive to oxidative stress and defective in host colonization. Infection and Immunity, 69(6), 4034–4040. https://doi.org/10.1128/IAI.69.6.4034-4040.2001

Shakeri, A., Panahi, Y., Johnston, T. P., & Sahebkar, A. (2019). Biological properties of metal complexes of curcumin. BioFactors, 45(3), 304–317. https://doi.org/10.1002/biof.1504

Shakya, A. K. (2016). Medicinal plants: Future source of new drugs. International Journal of Herbal Medicine, 4(4), 59–64. https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1395.6085

Singh, A., & Dutta, P. K. (2020). Green synthesis, characterization and biological evaluation of chitin glucan-based zinc oxide nanoparticles and its curcumin conjugation. International Journal of Biological Macromolecules, 156, 514–521. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.081

Steel, K. J. (1961). The Oxidase Reaction as a Taxonomic Tool. Journal of General Microbiology, 25, 297–306. https://doi.org/10.1099/00221287-25-2-297

Szabo, S. (2014). “Gastric cytoprotection” is still relevant. Journal of Gastroenterology and Hepatology, 29(4), 124–132. https://doi.org/10.1111/jgh.12735

Tajbakhsh, S., Mohammadi, K., Deilami, I., Zandi, K., Fouladvand, M., Ramedani, E., & Asayesh, G. (2008). Antibacterial activity of indium curcumin and indium diacetylcurcumin. African Journal of Biotechnology, 7(21), 3832–3835. http://www.academicjournals.org/AJB

Testerman, T. L., & Morris, J. (2014). Beyond the stomach: An updated view of *Helicobacter pylori* pathogenesis, diagnosis, and treatment. World Journal of Gastroenterology, 20(36), 12781–12808. https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i36.12781

Tshibangu-Kabamba, E., & Yamaoka, Y. (2021). *Helicobacter pylori* infection and antibiotic resistance: from biology to clinical implications. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology, 18(9), 613–629. https://doi.org/10.1038/s41575-021-00449-x

van Gameren, E. (2010). Health insurance and use of alternative medicine in Mexico. Health Policy, 98(1), 50–57. https://doi.org/10.1016/j.healthpol.2010.04.006

Verma, R. K., Kumari, P., Maurya, R. K., Kumar, V., Verma, R. B., & Singh, R. K. (2018). Medicinal properties of turmeric (*Curcuma longa* L.): A review. International Journal of Chemical Studies, 6(4), 1354–1357.

Wang, D., Guo, Q., Yuan, Y., & Gong, Y. (2019). The antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* to five antibiotics and influencing factors in an area of China with a high risk of gastric cancer. BMC Microbiology, 19(152). https://doi.org/10.1186/s12866-019-1517-4

Wang, J., Wei, D., Jiang, B., Liu, T., Ni, J., & Zhou, S. (2014). Two copper(II) complexes of curcumin derivatives: Synthesis, crystal structure and *in vitro* antitumor activity. Transition Metal Chemistry, 39(5), 553–558. https://doi.org/10.1007/s11243-014-9831-z

WHO. (2019). WHO Global Report on Traditional and Complementary Medicine 2019.

Wroblewski, L. E., Shen, L., Ogden, S., Romero-Gallo, J., Lapierre, L. A., Israel, D. A., Turner, J. R., & Peek, R. M. (2009). *Helicobacter pylori* Dysregulation of Gastric Epithelial Tight Junctions by Urease-Mediated Myosin II Activation. Gastroenterology, 136(1), 236–246. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.011

Yan, F. S., Sun, J. L., Xie, W. H., Shen, L., & Ji, H. F. (2018). Neuroprotective effects and mechanisms of curcumin–Cu (II) and –Zn (II) complexes systems and their pharmacological implications. Nutrients, 10(1). https://doi.org/10.3390/nu10010028

Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. Molecules, 21(559), 1–18. https://doi.org/10.3390/molecules21050559

Zaidi, S. F., Ahmed, K., Saeed, S. A., Khan, U., & Sugiyama, T. (2017). Can Diet Modulate *Helicobacter pylori*-associated Gastric Pathogenesis? An Evidence-Based Analysis. Nutrition and Cancer, 69(7), 979–989. https://doi.org/10.1080/01635581.2017.1359310

Zaidi, S. F. H., Yamamoto, T., Refaat, A., Ahmed, K., Sakurai, H., Saiki, I., Kondo, T., Usmanghani, K., Kadowaki, M., & Sugiyama, T. (2009). Modulation of Activation-Induced Cytidine Deaminase by Curcumin in *Helicobacter pylori*-Infected Gastric Epithelial Cells. *Helicobacter*, 14(1), 588–595. https://doi.org/10.1111/j.1523-5378.2009.00724.x

Zandi, K., Ramedani, E., Mohammadi, K., Tajbakhsh, S., Deilami, I., Rastian, Z., Fouladvand, M., Yousefi, F., & Farshadpour, F. (2010). Evaluation of Antiviral Activities of Curcumin Derivatives against HSV-1 in Vero Cell Line. Natural Product Communications, 5(12), 1935–1938. http://www.inutritionals.com/store/index.php?1=product-detail&p=138.

11. ANEXOS

11.1. Antecedentes complementarios

Tabla 14. Propiedades reportadas para diferentes complejos metálicos de la curcumina

Metal	Potencial	Complejo	Efecto	Referencia
Manganeso	*Antioxidante*	Cur-Mn(II)	Mejor efecto antioxidante que la molécula simple de curcumina, elimina radicales libres	Gorgannezhad *et al.*, 2016
		DAC_2-Mn(II)	Inhibe la peroxidación lipídica en un modelo murino	Meza-Morales *et al.*, 2019
Zinc	*Antioxidante*	Cur-Zn(II)	Incrementa enzimas antioxidantes y disminuye el nivel de MDA generado estrés además de prevenir la ulceración por radicales libres en ratones	Mei *et al.*, 2011
		Cur-Zn(II) y Cur_2-Zn(II)	Potencia la acción de la SOD, catalasa y glutatión peroxidasa y atenúa los niveles de MDA en células PC12	Yan *et al.*, 2018
		Cur-ChGC@Zn(II)ONP	Elimina radicales libres (ABTS+ y DPPH)	Singh & Dutta, 2020
		DAC_2-Mn(II)	Previene la peroxidación lipídica y potencia su actividad antioxidante	Meza-Morales *et al.*, 2019
	Antiinflamatorio	Cur-Zn(II)	Suprime NF-κB, TGF-β1, IL-8, TNF-α en un modelo murino	Mei *et al.*, 2012
		Cur-Zn(II) y Cur_2-Zn(II)	Inhibe el NF-κB inducido por H_2O_2 en células PC12	Yan *et al.*, 2018
	Anticancerígeno	(bpy-9)Zn-Curc, Cl	En ciertas líneas cancerígenas genera daño en DNA induce apoptosis y en modelos *in vivo* ubica y llega a tumores	Garufi *et al.*, 2013
		(bpy-9)Zn-CurcBF_4 y L_2 Zn-Curc	Inducen apoptosis o necrosis sobre la línea celular de neuroblastomas SH-SY5Y	Pucci *et al.*, 2013
Indio	*Antioxidante*	Cur_3-In y InL_3	Su capacidad antioxidante es 3 veces mayor al de la curcumina	Mohammadi *et al.*, 2005
	Anticancerígeno	Cur_3-In y DAC_3-In	Tiene citotoxicidad hacia células cancerígenas (linfomas) en ratones	Mohammadi *et al.*, 2005

Cur: curcumina, DAC: diacetilcurcumina, L: ligando, ChGC@ZnONP: nanopartículas (@) de zinc en un complejo quitina-glucano, bpy: bipiridina**,** MDA: malondialdehído, NF-κB: factor nuclear kappaB, IL: interleucina, TGF-β1: factor de crecimiento tumoral beta1, PKCδ: Proteína cinasa C delta, SOD: Superóxido dismutasa.

Tabla 14. Propiedades reportadas para diferentes complejos metálicos de la curcumina (continuación)

Metal	Potencial	Complejo	Efecto	Referencia
Cobre	*Antioxidante*	Cur-Cu(II) y Cur_2-Cu(II)	Potencia la acción de la SOD, catalasa y glutatión peroxidasa y atenúa los niveles de MDA en células PC12	Yan *et al.*, 2018
		Cur-Cu(II)	Elimina radicales libres simulando la actividad de la SOD y disminuye la peroxidación lipídica	Barik *et al.*, 2007
		DAC_2-Cu(II)	Inhibe la peroxidación lipídica en un modelo murino	Meza-Morales *et al.*, 2019
	Antiinflamatorio	Cur-Cu(II)	Elimina PKCδ y NF-κB, es buen inhibidor de ROS en un modelo *in vivo*	Kunwar *et al.*, 2007
		Cur-Cu(II) y Cur_2-Cu(II)	Inhibe el NF-κB inducido por H_2O_2 en células PC12	Yan *et al.*, 2018
	Anticancerígeno	$Cu(L^{1-4})_2$	Produce muerte celular para células tumorales de Ehrlich en un modelo murino	Krishnankutty & John, 2003
		CuL_2	Citotoxicidad selectiva hacia ciertas líneas celulares cancerígenas (ASPC-1, MCF-7 Y HeLa)	Wang *et al.*, 2014
	Antiviral	Cur-Cu(II)	Inhibe la multiplicación de múltiples tipos de virus, incluyendo HSV-1, virus vesiculares y respiratorios sin mostrar toxicidad	Chauhan *et al.*, 2013
Galio	*Antioxidante*	Cur_3-Ga y DAC_3- Ga	Incremento en estabilidad oxidativa de algunas proteínas y mejora su actividad antioxidante	Jahangoshaei *et al.*, 2015
		Cur_3-Ga y GaL_3	Comparado a la curcumina, tiene actividad antioxidante tres veces mayor	Mohammadi *et al.*, 2005
	Anticancerígeno	Cur_2-Ga y DAC_2-Ga	Muestra citotoxicidad en líneas cancerígenas de colon (HT29) y linfomas (K562)	Rubagotti *et al.*, 2017
		Cur_3-In y DAC_3-In	Tiene citotoxicidad hacia células cancerígenas (linfomas) en ratones	Mohammadi *et al.*, 2005
		Cur_2-Ga, DAC_2-Ga y $bDHC_2$-Ga	Capacidad para internalizarse en células cancerígenas de pulmón	Asti *et al.*, 2014
	Antiviral	Curc-Cu Curc-Ga	Efecto antiviral contra HSV-1. Mejor efecto citotóxico que la curcumina	Zandi *et al.*, 2010

Cur: curcumina, DAC: diacetilcurcumina, L: ligando, $(Phen)CuLCl_2$: complejo de curcumina con fenaltrolina, ligando, cloro y cobre, MDA: malondialdehído, ROS: especies reactivas de oxígeno, NF-κB: factor nuclear kappaB, PKCδ: Proteína cinasa C delta. SOD: Superóxido dismutasa, bDHC: bis-dehidroxicurcumina.

11.2. Análisis estadístico. Gráficos individuales y pruebas

11.2.1. *Curcumina*

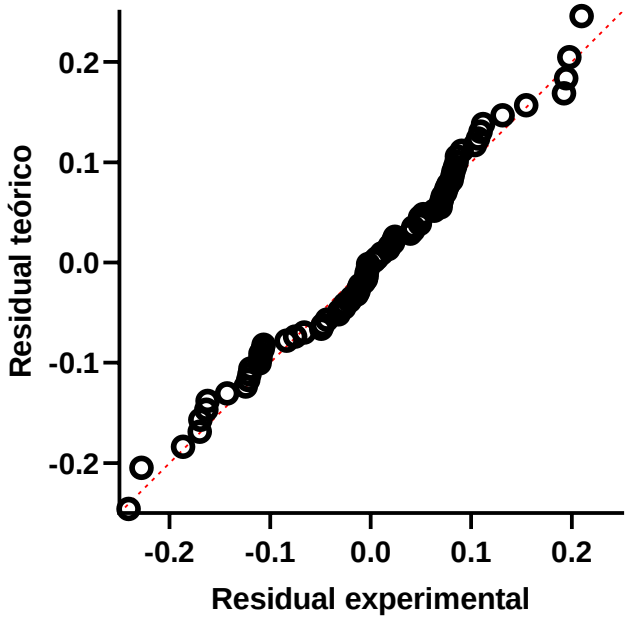


Figura 13. Distribución de datos de la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con curcumina. Gráfico de cuantiles para determinar la distribución de los datos. De acuerdo a la prueba de Bartlett pasa el supuesto de heterocedasticidad y con la de Shapiro-Wilk se confirmó que los datos se distribuyen de forma normal.

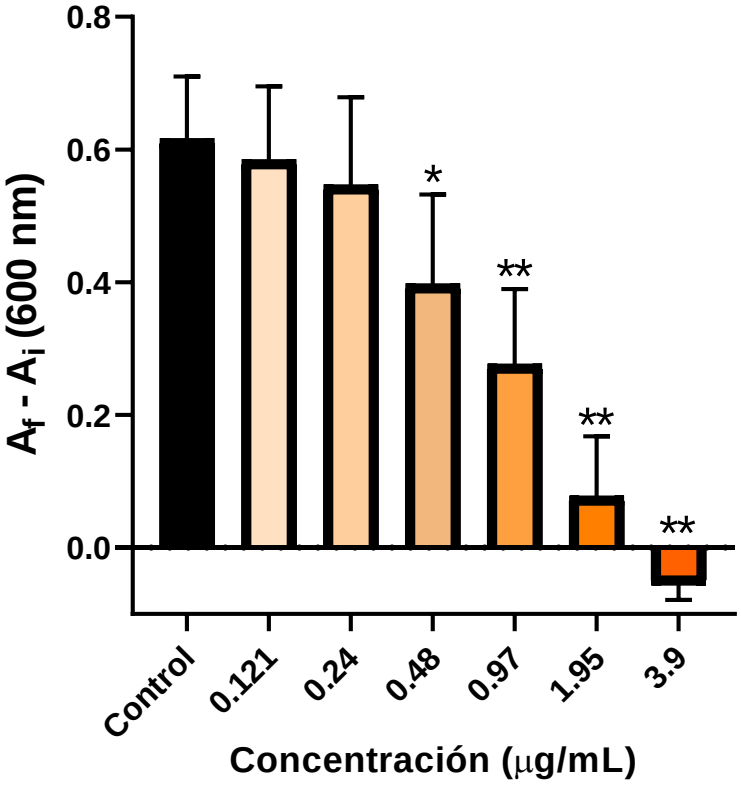


Figura 14. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con curcumina. De acuerdo al análisis de varianzas y a la prueba de Bonferroni se confirma que se inhibió significativamente el crecimiento de la bacteria, las mediciones se determinaron según la diferencia entre la absorbancia inicial y final de los experimentos. Con respecto al Control, los valores de significancia son: (*) $p=0.002$, (**) $p<0.0001$.

11.2.2. *Fenilcurcumina*

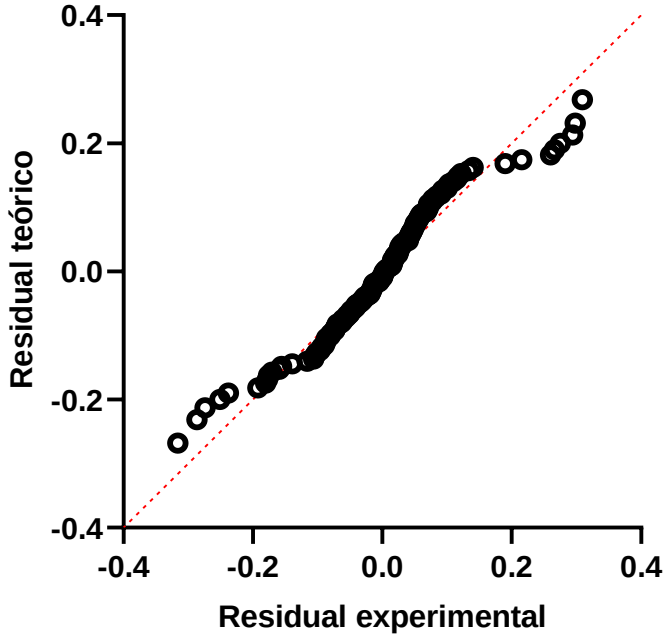


Figura 15. Distribución de datos de la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con fenilcurcumina. Los datos obtenidos en este experimento pasaron la prueba de Bartlett, sin embargo, no muestran una distribución normal de acuerdo a la prueba de Shapiro-Wilk, por lo tanto, se aplicó una prueba no paramétrica (Kruskal-Wallis).

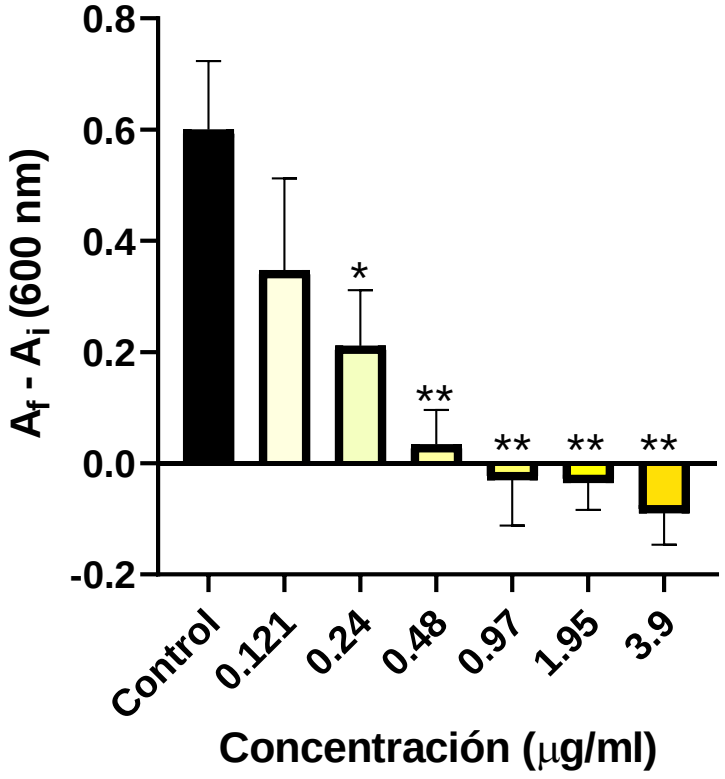


Figura 16. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con fenilcurcumina. La prueba de Kruskal-Wallis y el análisis por grupos de la prueba de Bonferroni confirman que existe una inhibición significativa. Valores de significancia con respecto al control: (*) $p=0.0227$, (**) $p<0.0001$.

Adicionalmente se hizo un análisis estadístico para las concentraciones de 0.48 a 1.95 µg/mL, las cuales no resultaron ser estadísticamente diferentes entre sí.

11.2.3. *PhCur$_2$-Mn*

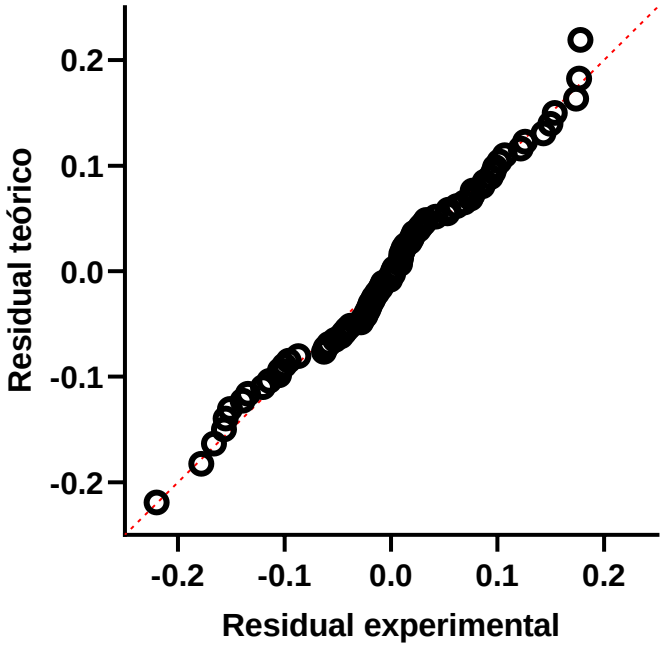


Figura 17. Distribución de los datos de la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con PhCur$_2$-Mn. En la gráfica de cuantiles se observan los datos cuya heterocedasticidad y normalidad fue confirmada posteriormente con la prueba de Bartlett y la prueba de Shapiro-Wilk.

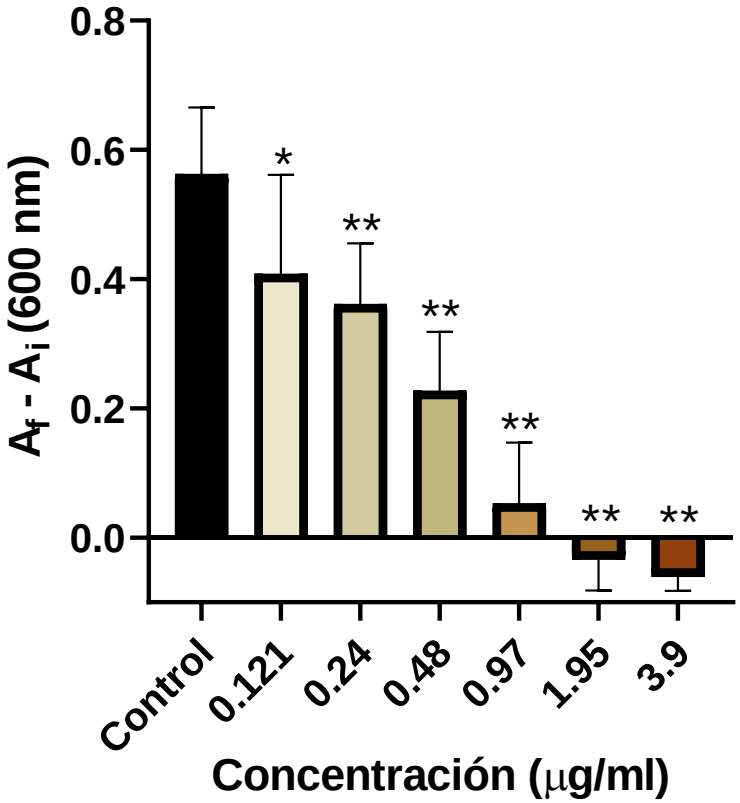


Figura 18. Inhibición de *Helicobacter pylori* a diferentes concentraciones de PhCur$_2$-Mn. De acuerdo a la prueba de análisis de varianza y a la prueba por grupos de Bonferroni se confirma la inhibición significativa del crecimiento de la bacteria en todas las concentraciones probadas. Valores de significancia con respecto al control: (*) $p<0.0013$, (**) $p<0.0001$.

Adicionalmente se hizo un análisis estadístico para las concentraciones de 0.97 a 3.9 µg/mL, las cuales no resultaron ser estadísticamente diferentes entre sí.

11.2.4. *PhCur$_2$-Cu*

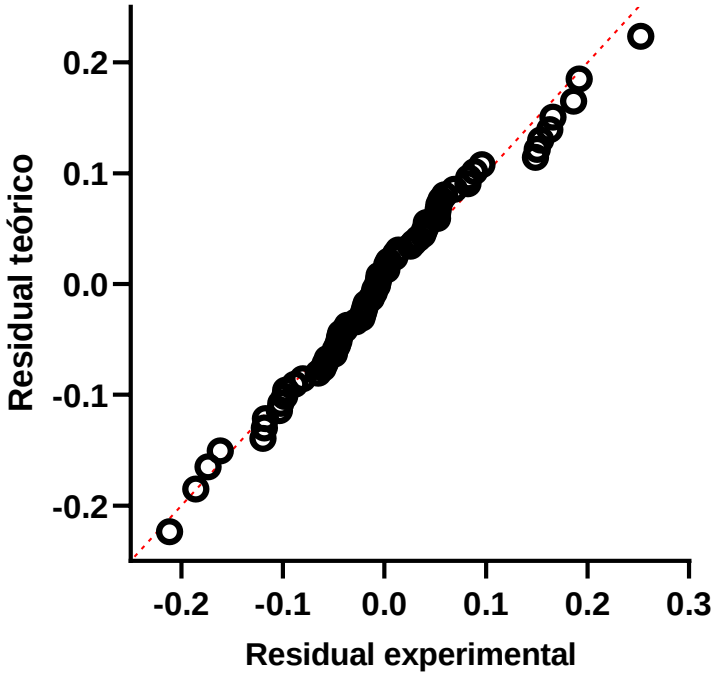


Figura 19. Distribución de los datos en la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con PhCur$_2$-Cu. Los datos de este experimento pasaron la prueba de heterocedasticidad y normalidad de Bartlett y Shapiro-Wilk respectivamente.

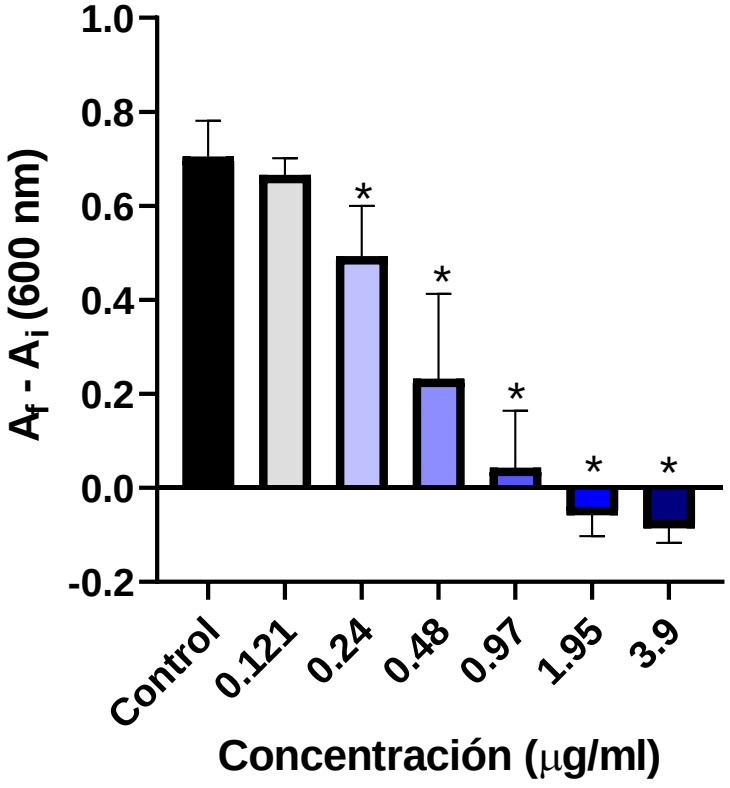


Figura 20. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con PhCur$_2$-Cu. Los resultados del experimento muestran inhibiciones significativas para todas sus concentraciones a excepción de la más baja. Valores de significancia con respecto al control: (*) $p<0.0001$.

Adicionalmente se hizo un análisis estadístico para las concentraciones de 0.97 a 3.9 µg/mL, las cuales no resultaron ser estadísticamente diferentes entre sí.

11.2.5. *PhCur$_2$-Zn*

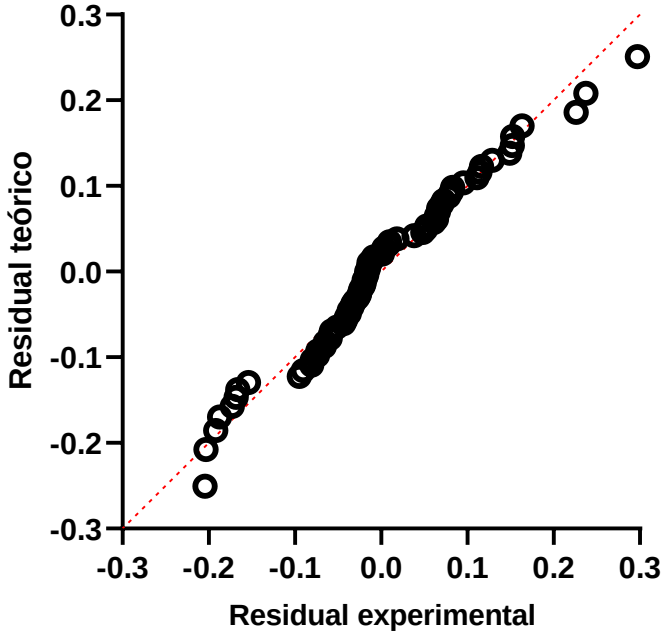


Figura 21. Distribución de los datos de la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con PhCur$_2$-Zn. En la gráfica de cuantiles se observan los datos cuya heterocedasticidad y normalidad fue confirmada posteriormente con la prueba de Bartlett y la prueba de Shapiro-Wilk.

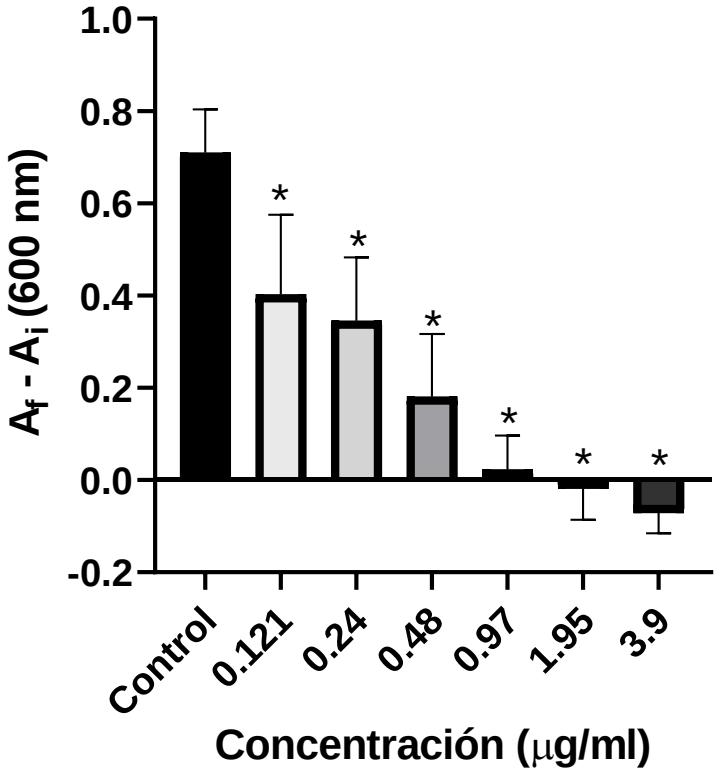


Figura 22. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con PhCur$_2$-Zn. Los resultados del experimento muestran inhibiciones significativas para todas sus concentraciones. Valores de significancia con respecto al control: (*) $p<0.0001$.

Adicionalmente se hizo un análisis estadístico para las concentraciones de 0.97 a 3.9 µg/mL, las cuales no resultaron ser estadísticamente diferentes entre sí.

11.2.6. *PhCur$_2$-Al*

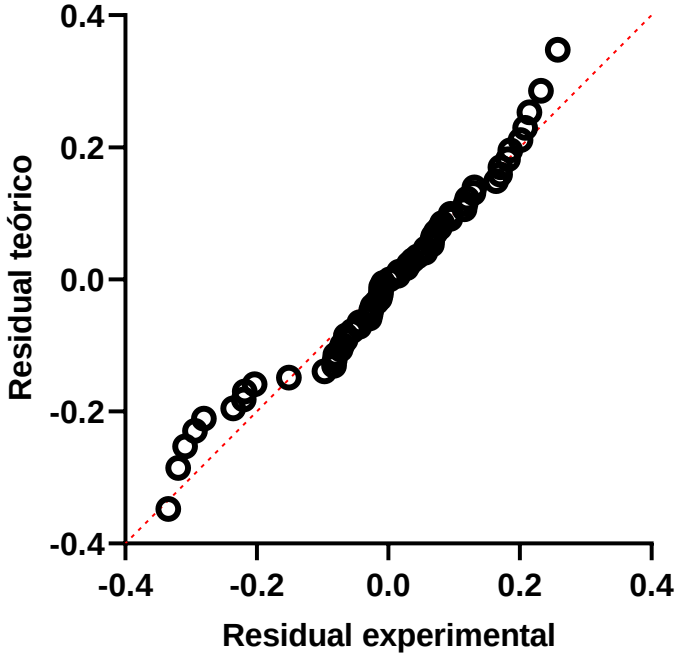


Figura 23. Distribución de los datos en la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con PhCur$_2$-Al. Los resultados para los datos de esta prueba fueron estadísticamente significativos para la prueba de Bartlett, pero no pasaron la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, por lo que se optó por un análisis no paramétrico.

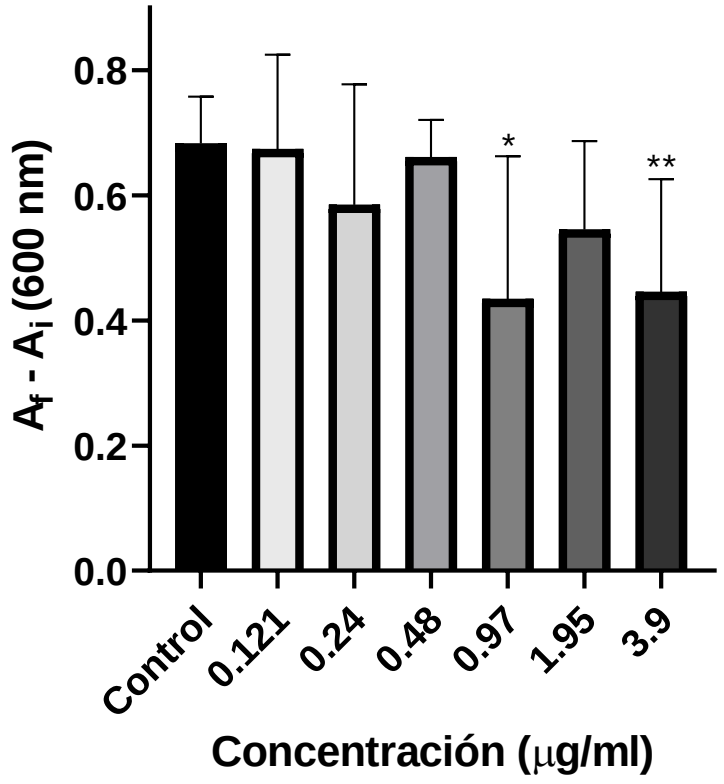


Figura 24. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con PhCur$_2$-Al. El análisis estadístico para este grupo mostró inhibición significativa para dos concentraciones. Valores de significancia con respecto al control: (*) p=0.0152, (**) p=0.0032.

11.2.7. *PhCur$_2$-Ga*

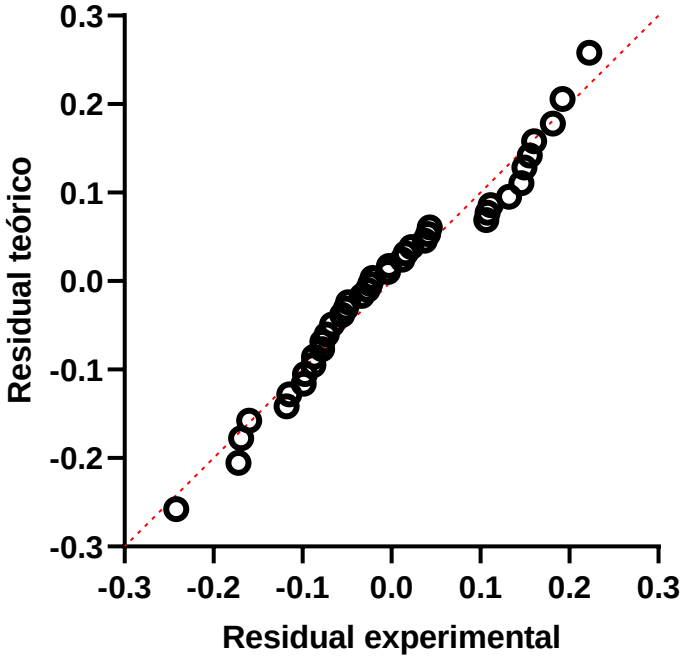


Figura 25. Distribución de los datos en la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con PhCur$_2$-Ga. Se obtuvieron resultados no significativos para las pruebas de heterocedasticidad y normalidad, por lo que se concluye que los datos deben ser evaluados con una prueba no paramétrica.

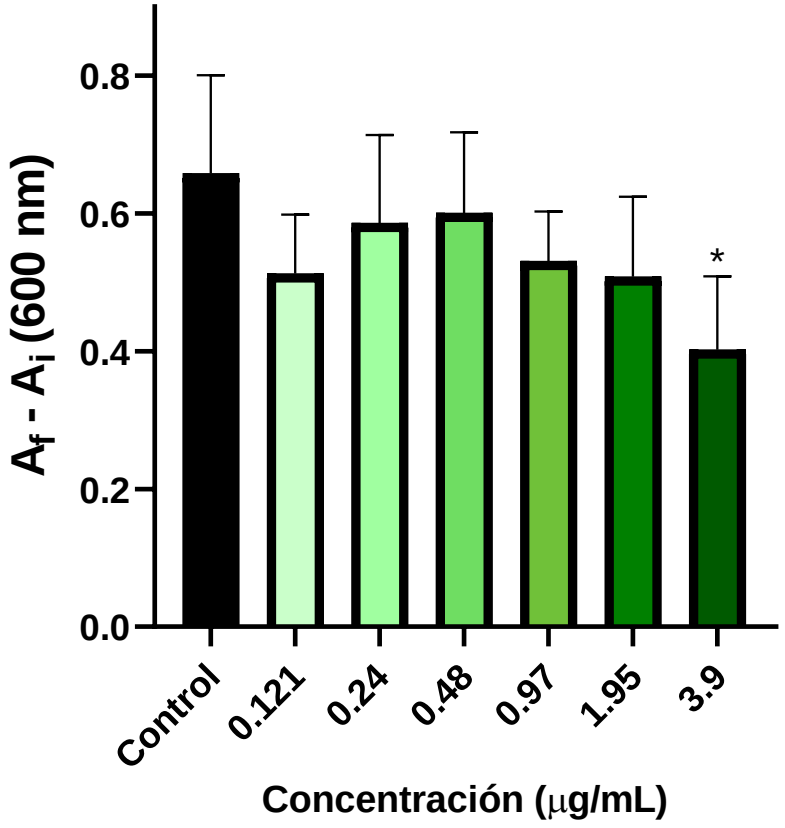


Figura 26. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con PhCur$_2$-Ga. De todas las concentraciones probadas, únicamente la concentración más alta logró tener una inhibición significativa. Valores de significancia con respecto al control: (*) p=0.0059.

11.2.8. *PhCur$_3$-In*

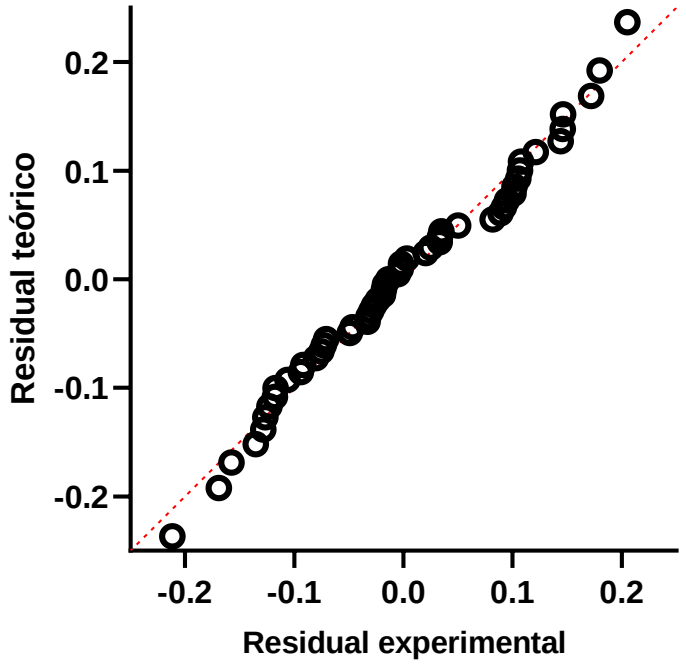


Figura 27. Distribución de los datos en la prueba de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con PhCur$_3$-In. Los datos de la presente prueba pasaron la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, sin embargo, no presentaron significancia para pasar la prueba de heterocedasticidad de Bartlett, por lo que se evaluaron con una prueba no paramétrica.

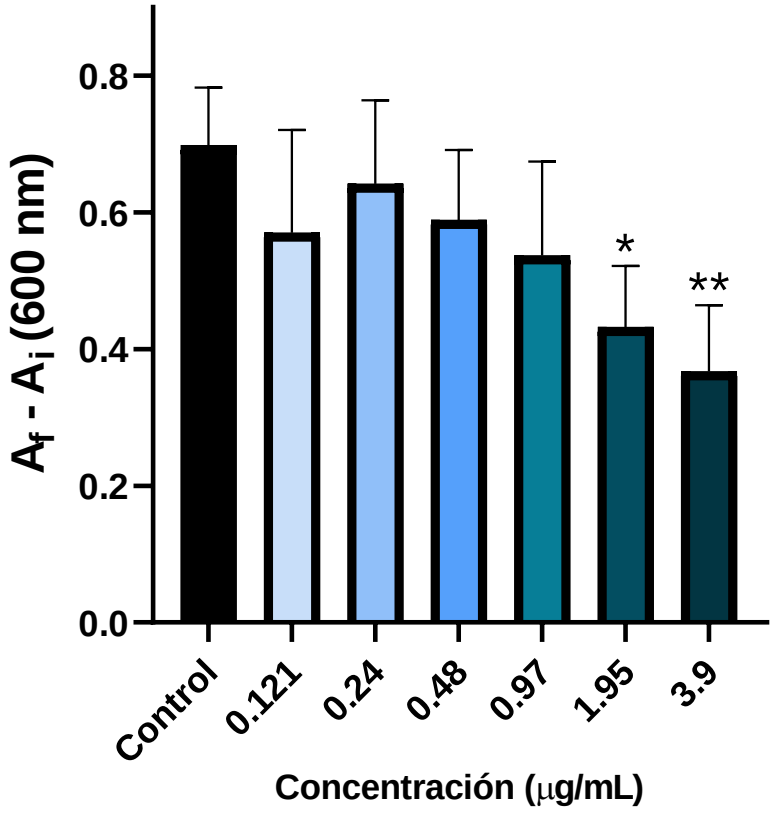


Figura 28. Inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori* con PhCur$_3$-In. Únicamente las dos concentraciones más altas de este complejo metálico presentaron inhibición significativa. Valores de significancia con respecto al control: (*) $p=0.0013$, (**) $p<0.0001$.

11.3. Cuentas viables

Para determinar las Unidades formadoras de colonias (UFC) de los cultivos en el momento en el que se agregaron los compuestos a ensayar (el cual se encontraba en el inicio de su fase de crecimiento exponencial (A_{600}=~0.3)) se hicieron diluciones seriadas en condiciones de esterilidad hasta alcanzar los factores de dilución deseados ($1x10^{-5}$, $1x10^{-6}$, $1x10^{-7}$), tal como se indica en la Tabla 11. Se utilizó medio Mueller-Hinton para diluir.

Tabla 15. Factores de dilución

Tubo	Factor de dilución	Contenido
HP	-	200 µl medio de cultivo
1	$1x10^{-1}$	225 µL MH + 25 µl medio tubo HP
2	$1x10^{-2}$	225 µL MH + 25 µl medio tubo 1
3	$1x10^{-3}$	225 µL MH + 25 µl medio tubo 2
4	$1x10^{-4}$	225 µL MH + 25 µl medio tubo 3
5	$1x10^{-5}$	225 µL MH + 25 µl medio tubo 4
6	$1x10^{-6}$	225 µL MH + 25 µl medio tubo 5
6	$1x10^{-6}$	225 µL MH + 25 µl medio tubo 5
7	$1x10^{-7}$	225 µL MH + 25 µl medio tubo 6

En una placa de agar Casman suplementado (β-ciclodextrina 2 g/L y vancomicina 10 mg/L), se hicieron las divisiones para hacer el sembrado de la dilución correspondiente (Figura 28). En cada cuadrante fueron sembrados 25 µL del tubo en cuestión y se dejaron en la incubadora (10% CO_2, 5% O_2, a 37 °C) durante 7 días, transcurrido el tiempo las placas se retiraron y se hizo el conteo de las colonias observadas para cada sección. Finalmente, todos los resultados se vaciaron a una tabla en Excel para obtener la cantidad de UFC por mL siguiendo la ecuación:

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{(total\ colonias) \times (factor\ de\ dilución)}{muestra\ sembrada\ (mL)}$$

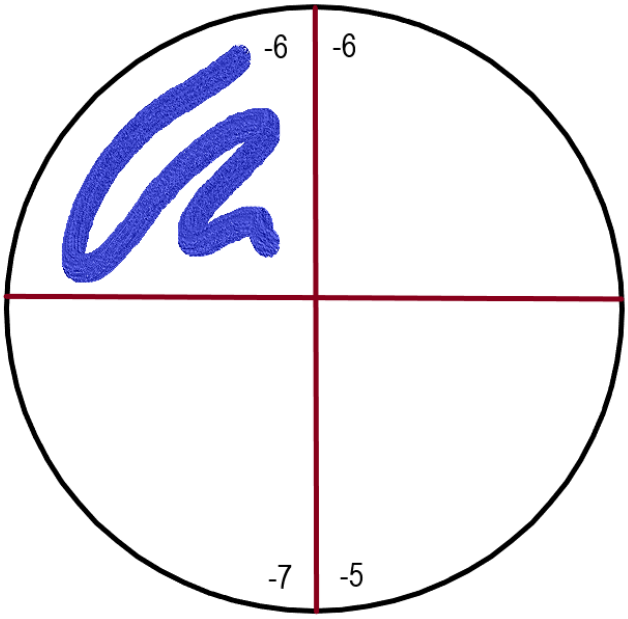


Figura 29. Sembrado de diluciones en la placa de agar Casman. Los números -5, -6 y -7 corresponden a las diluciones $1x10^{-5}$, $1x10^{-6}$ y $1x10^{-7}$ respectivamente.

De todos los experimentos realizados se sacó el promedio para cada dilución, los cuales están representados en la Figura 29, la media de las 3 diluciones dio un valor de promedio final de $5.5x10^{8}$.

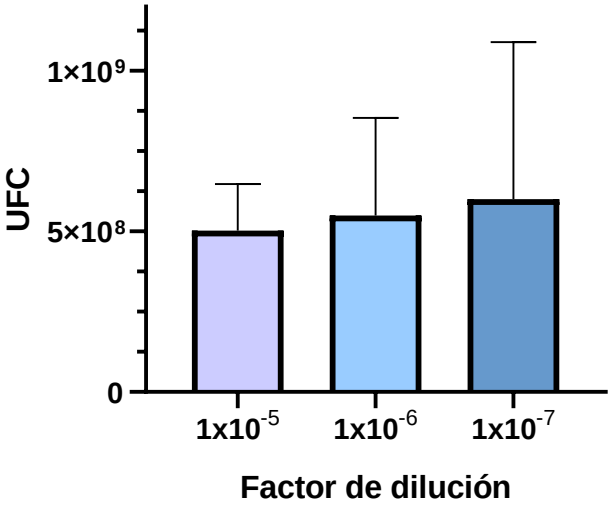


Figura 30. Unidades formadoras de colonias encontradas por cada factor de dilución.