

EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA Y ANTIFÚNGICA *IN VIVO* DE BIOCOMPOSITOS DE QUITOSANO-ÁCIDO PIRROL-2-CARBOXÍLICO EN DIFERENTES MODELOS DE ESTUDIO

Gálvez-Irqui, A. C., García-Romo J. S., Luque-Alcaraz, A. G., Burboa-Zazueta, M.G., Cortez-Rocha, M.O., Burgos-Hernández, A., Calderón-Santoyo, M., Plascencia-Jatomea, M., Universidad de Sonora, Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos, Hermosillo 83000, almac.galvezir@gmail.com.

Palabras clave: Toxicidad, Bionanomateriales de quitosano, Células eucariotas y procariontas.

Introducción. El quitosano es un biopolímero policatiónico capaz de retardar o inhibir el desarrollo bacteriano y fúngico al interactuar con componentes celulares presentes en la membrana y pared celular. Se caracteriza por ser biodegradable, biocompatible y presentar baja o nula toxicidad, características que han promovido su uso en el desarrollo de diferentes biomateriales para contrarrestar el crecimiento microbiano en áreas de importancia socioeconómica. Investigaciones recientes sobre nano- y micromateriales de base biológica elaborados con quitosano han demostrado que estos exhiben un incremento en su actividad antifúngica con respecto a otros materiales, tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo*; sin embargo, a la fecha son pocos los reportes sobre los riesgos toxicológicos asociados, lo que puede limitar su aplicación en el área agrícola e industria de alimentos. El objetivo de este trabajo fue sintetizar biocompositos de quitosano-ácido pirrol-2-carboxílico (CS-PCA) y evaluar la toxicidad y actividad antifúngica *in vivo*.

Metodología. Los biocompositos de CS-PCA se sintetizaron por la técnica de nanoprecipitación y su caracterización incluyó tamaño hidrodinámico, potencial Z e índice de polidispersión por la técnica de dispersión dinámica de la luz (DDL) (1). El análisis toxicológico se realizó mediante el ensayo de mutagenicidad de Ames utilizando *Salmonella typhimurium* TA100 y TA98 (2). El efecto en la viabilidad celular se determinó por el ensayo de MTT basado en la reducción de las sales de MTT a formazán por enzimas mitocondriales, utilizando células de tejido epitelial de retina humana ARPE-19 (3). El daño estructural en las células ARPE-19 se determinó por microscopía de fluorescencia empleando fluorocromos faloidina y DAPI (1). El efecto fitotóxico se realizó siguiendo el protocolo para compuestos puros o mezclas complejas, por monitoreo de la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) (4). El efecto antifúngico se evaluó mediante la reducción de la severidad de infección (%) del crecimiento *in vivo* de *Aspergillus niger* en frutos de tomate saladette almacenado durante 14 d a humedad relativa y temperatura controladas, utilizando el doble y el triple de la CI_{50} (380 $\mu\text{g/mL}$) reportada previamente para el crecimiento *in vitro* del hongo (5).

Resultados. Las partículas del biocomposito de CS-PCA presentaron un tamaño y un potencial Z de 502 ± 72 nm y $+54.7 \pm 15.0$ mV, respectivamente, con un índice de polidispersión de 0.571 ± 0.00 . El ensayo de mutagenicidad indicó que el material no induce mutaciones en las cepas de *S. typhimurium* TA-100 y TA98 con respecto al control (+) de aflatoxina B₁ ($P \leq 0.05$). Además, tanto el biocomposito como las partículas de quitosano no duplicaron el número de revertantes espontáneas para cada cepa. Se encontró una reducción ($P \leq 0.05$) del 25% en la viabilidad de las células ARPE-19 expuestas al biocomposito de CS-PCA (750 $\mu\text{g/mL}$), con respecto al control sin tratamiento. Sin embargo, en el tratamiento con las partículas de sólo quitosano

se encontraron porcentajes de viabilidad $> 95\%$ a todas las concentraciones evaluadas, mientras que en el tratamiento con antifúngico comercial (flutriafol) se inhibió la viabilidad en un 80% a 750 $\mu\text{g/mL}$. Las células ARPE-19 expuestas al material de CS-PCA no evidenciaron afectaciones estructurales en la integridad de los núcleos y filamentos de actina. En el ensayo de fitotoxicidad se observó que los biocompositos de CS-PCA afectaron ($P \leq 0.05$) la germinación y la elongación de la raíz y tallo de semillas de lechuga a concentraciones > 400 $\mu\text{g/mL}$; los resultados normalizados de los porcentajes de inhibición de la elongación de la raíz (REI) y de la germinación de las semillas (IGN) indicaron que el material es altamente tóxico para la semilla de lechuga. Con respecto a la actividad contra *A. niger*, los biocompositos de CS-PCA (a concentraciones de 760 y 1140 $\mu\text{g/mL}$) retardaron ($P \leq 0.05$) el desarrollo del hongo en los frutos infectados hasta el tercer día de almacenamiento, alcanzando una reducción de 53 y 50% al cuarto día con respecto al control.

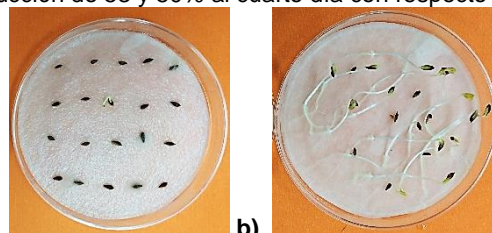


Fig. 1 Semillas de lechuga expuestas a 800 $\mu\text{g/mL}$ (a) y control H₂O (b) durante 120 h de germinación en condiciones de humedad y temperatura controladas.

Conclusiones. Bajo las condiciones de análisis utilizadas, el biocomposito de CS-PCA sintetizado no evidencia un perfil de agente mutagénico y muestra una alta biocompatibilidad con células ARPE-19. Asimismo, el material es capaz de retrasar la invasión fúngica por poco tiempo cuando se aplica por aspersión directamente en el fruto de tomate. Sin embargo, la evaluación fitotóxica indicó que este material es altamente dañino para el desarrollo de las semillas de lechuga. Los resultados sugieren que el material no es apto como pretratamiento antifúngico de las semillas previo a su cultivo.

Agradecimientos. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto No. 219786 y la beca de posgrado a Alma Carolina Gálvez-Irqui.

Bibliografía.

- Gálvez-Irqui, A. C., et al. (2019). *Appl Microbiol Biotechnol.* 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09670-w>
- Maron D M., & Ames N B. (1993). *Mutat Res.* 113:173-215.
- Hernández-Téllez, C. N., et al. (2018). *Rev Mex Ing Quim.* 17(3), 897-912.
- Sobrero, M. C., & Ronco, A. (2004). Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). En: *Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC/IMTA. Canadá, Capítulo, 4*, 71-79.
- Bautista-Rosales, P. U., et al. (2014). *Crop Prot.* 65, 194-201.

