



Jesteśmy częścią sieci
European University of
Post-Industrial Cities (UNIC)



Seguridad citológica y actividad microbiológica de las formulaciones de ácido fúlvico (terra+ alkaline y terra+ minerals) – informe de estudios preliminares

Realizado en el marco del proyecto Science Hub por el Dr. Marcin Włodarczyk, La Mtra. Jolanta Kalinowska y bajo la dirección de la Dra. Karolina Rudnicka (Cátedra de Inmunología y Biología de las Infecciones, Facultad de Biología y Protección del Medio Ambiente, Universidad de Łódź, Polonia)

Periodo de ejecución: mayo–agosto de 2023

I. EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE LOS ÁCIDOS FÚLVICOS

Objetivo: Evaluar la citocompatibilidad de los productos que contienen formulaciones de ácido fúlvico (**terra+ alkaline y terra+ minerals**), así como excluir las concentraciones que afectan la viabilidad celular en cultivos *in vitro*. La citotoxicidad potencial puede influir en los resultados de otras pruebas biológicas *in vitro* y limitar posibles aplicaciones biomédicas.

Materiales y métodos: Los estudios de citotoxicidad se realizaron utilizando fibroblastos murinos (L929, ATTC, Rockville, MD, EE. UU.), recomendados por la Organización Internacional de Normalización (ISO-10993-5-2009) para la evaluación de compuestos con potencial aplicación biomédica. Este es un modelo estándar utilizado en estudios de biocompatibilidad *in vitro* debido a su estabilidad, tiempo óptimo de división y crecimiento adherente.

Los fibroblastos murinos se cultivaron en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich), suplementado con suero bovino inactivado (Cytogen, Polonia) y antibióticos: penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml), en condiciones estándar de incubación para cultivo celular (37°C, 5% CO₂, >90% de humedad). La suspensión celular se sembró en placas de cultivo celular de 96 pozos y se incubó durante la noche (5% CO₂, 37°C, >90% de humedad) para permitir la adhesión de las células a la superficie del recipiente y la formación de monocapas celulares.

Después de la incubación en la placa de 96 pozos, los cultivos celulares se observaron con microscopio invertido para confirmar que formaban monocapas compactas y homogéneas. El medio se reemplazó por 100 µl de medio fresco. Posteriormente, se añadieron a los pozos seleccionados diluciones seriadas de los ácidos fúlvicos evaluados (tres repeticiones por cada dilución) en medio RPMI-1640, dentro de un rango de dilución de 1:2 a 1:4096.

Se incluyeron los siguientes controles: control de viabilidad (células en medio de cultivo sin el compuesto evaluado) y control de citotoxicidad (K-), es decir, células tratadas con una solución de saponina al 2%, sustancia con fuertes propiedades citotóxicas. Los cultivos preparados de este modo se incubaron durante 24 horas (5% CO₂, 37°C, >90% de humedad). Después de la incubación, el estado de las células se observó bajo microscopio óptico y se registró cualquier cambio en su morfología.

El procedimiento del ensayo MTT fue el siguiente: después de la incubación nocturna de las células con los ácidos fúlvicos evaluados, se añadieron 20 µl del reactivo MTT (Sigma Aldrich) a una concentración de 5 mg/ml en cada pozo, seguido de una incubación de 4 horas (5% CO₂, 37°C, >90% de humedad). En el siguiente paso, las placas se centrifugaron (1400 rpm, 10 min), se retiraron los sobrenadantes y se reemplazaron con 150 µl de DMSO y 25 µl de tampón glicina en cada pozo. Después de un minuto de incubación a temperatura ambiente y agitación

en vortex, se midió la absorbancia a 570 nm utilizando un lector Multiskan EX (Thermo Scientific).

Resultados e interpretación: De acuerdo con las normas ISO, un compuesto que no induce una citotoxicidad superior al 30% de células muertas debe considerarse no citotóxico. Con base en este criterio, si la viabilidad celular después de 24 horas de exposición a **terra+ alkaline** y **terra+ minerals** se mantiene por encima del 70%, deben considerarse citocompatibles (Fig. 1).

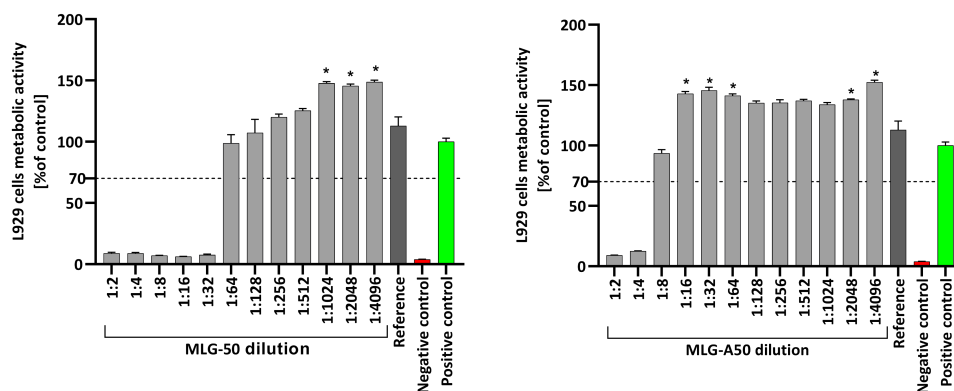
Todas las formulaciones mostraron seguridad citológica por encima de la dilución 1:32. **terra+ alkaline** presentó la mayor citocompatibilidad, ya que solo las diluciones 1:2–1:4 de **terra+ alkaline** afectaron significativamente la viabilidad celular. **terra+ minerals** mantuvo citocompatibilidad por encima de 1:16 y 1:32, respectivamente.

Es interesante destacar que **terra+ minerals**, en bajas concentraciones (dilución 1:1024–1:4096), estimuló la proliferación celular o aumentó la actividad celular. Un efecto similar también se observó para **terra+ alkaline** en concentraciones altas (1:16–1:64) y bajas de **terra+ minerals** (1:1024–1:4096).

Tomando en cuenta la dilución final de los productos **terra+ alkaline** y **terra+ minerals** listos para su uso, todas las formulaciones evaluadas deben considerarse citocompatibles.

Otros autores demostraron que el ácido fúlvico, en un rango de concentraciones de 0.001–10 µg/ml, no afectó la viabilidad de una línea celular basofílica (<http://dx.doi.org/10.1271/bbb.60702>), y que a una concentración de 100 µg/ml solo redujo la viabilidad en un 10%. También se ha demostrado, en modelos murinos y de rata dentro de estudios toxicológicos complejos, que la suplementación con FA a una dosis de 5000 mg/kg de peso corporal/día fue considerada segura y no se observó ningún nivel de efecto adverso observable (NOAEL) (<https://doi.org/10.1155/2020/8899244>).

No existen datos sobre el efecto del FA en la proliferación o actividad metabólica de células animales o humanas. Sin embargo, se ha demostrado que los ácidos fúlvicos aumentan la tasa de proliferación en plantas (*Abies cephalonica*), especialmente en los primeros días de muestreo.



Ryc. 1. Actividad proliferativa/metabólica de los fibroblastos L929 sometidos a la acción de **terra+ alkaline** y **terra+ minerals**, en comparación con cultivos celulares control. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba U de Mann-Whitney en el software STATSOFT ($p < 0,05$ con respecto al control positivo).

I. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE TERRA+ ALKALINE Y TERRA+ MINERALS



Objetivo. Determinar si **terra+ alkaline** y **terra+ minerals** presentan actividad antimicrobiana frente a los agentes infecciosos más comunes que causan infecciones en humanos, mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (CFU) y la evaluación de la actividad microbiológica (reducción de resazurina).

Materiales y métodos. En la prueba se utilizaron cuatro cepas bacterianas aisladas de la glándula mamaria bovina: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus agalactiae*. La suspensión bacteriana, con una densidad aproximada de $\sim 1 \times 10^8$ CFU/ml, se diluyó 100 veces en caldo Mueller Hinton. El inóculo bacteriano inicial se sembró posteriormente en pozos de placas de cultivo de 96 pozos que contenían **terra+ alkaline** y **terra+ minerals** en una cantidad de 100 μ l/pozo (volumen final: 200 μ l) y se incubó a 37°C, en condiciones aeróbicas, durante 20 ± 2 horas.

Para determinar el número de unidades formadoras de colonias (CFU/ml) tras la incubación con **terra+ alkaline** y **terra+ minerals** (a diferentes diluciones), se sembraron 100 μ l de cada pozo en placas de agar sólido, se incubaron durante la noche y luego se contaron las CFU, comparándolas con el cultivo control sin **terra+ alkaline** ni **terra+ minerals**.

Paralelamente, el efecto sobre la actividad/viabilidad microbiana se evaluó mediante el ensayo de reducción de resazurina. La prueba de resazurina (ensayo Alamar Blue) es una medición simple, rápida y sensible, por ejemplo, para bacterias. Las células vivas son metabólicamente activas y pueden reducir el colorante no fluorescente resazurina a resorufina, un colorante altamente fluorescente, mediante reductasa mitocondrial. La intensidad de la fluorescencia es proporcional al número de células bacterianas vivas.

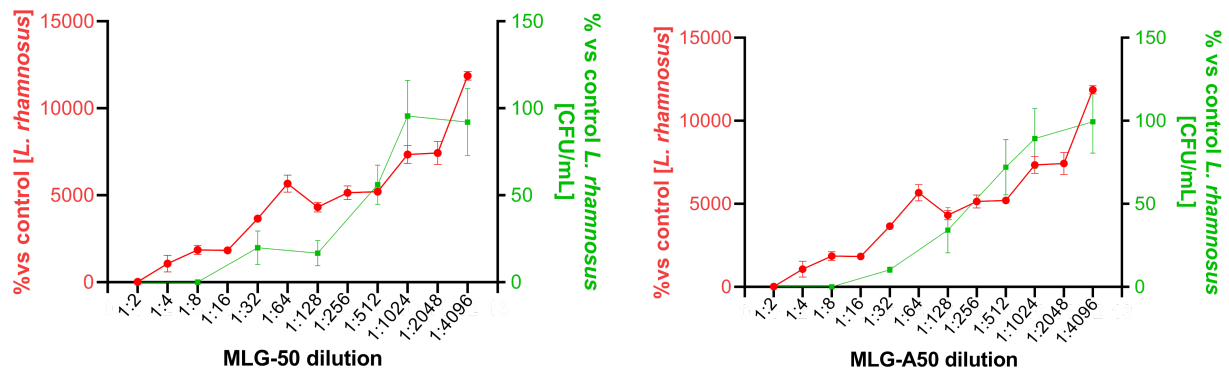
El ensayo se configuró exactamente igual que la prueba CFU; sin embargo, en lugar de sembrar los líquidos en placas de agar, se añadieron 20 μ l de resazurina por pozo a los cultivos incubados con **terra+ alkaline** y **terra+ minerals**. Después, se incubó a 37°C y 5% CO₂ durante 30 minutos, y se midió la fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 550 nm y de emisión de 590 nm mediante un lector multimodal de placas.

Resultados. Se demostró que ninguna de las formulaciones **terra+ alkaline** y **terra+ minerals** inhibe la actividad de los microorganismos (datos no mostrados). Tanto en el método CFU como en los resultados basados en Alamar Blue, se observó el mismo número y actividad bacteriana en el entorno de **terra+ alkaline** y **terra+ minerals** que en el control (sin **terra+ alkaline** ni **terra+ minerals**).

No existen datos disponibles sobre el efecto antimicrobiano del FA puro, no aislado. Sin embargo, se ha demostrado que el FA derivado de carbohidratos (CHD-FA) presenta una fuerte actividad frente a diversos patógenos bacterianos y fúngicos, con una concentración mínima inhibitoria igual o inferior al 0,5%. Además de la actividad antimicrobiana, se observó una mejor cicatrización de heridas tras el tratamiento con CHD-FA, lo cual se demostró mediante la medición del área de la herida, el examen histopatológico y el perfil de expresión génica relacionado con la cicatrización, así como por las citocinas liberadas (DOI: [10.1097/TA.0000000000000737](https://doi.org/10.1097/TA.0000000000000737)).

Demostramos que **terra+ alkaline** y **terra+ minerals** (1:32–1:128) intensifican el crecimiento de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* en comparación con el control. Uno de los estudios realizados en peces cobítidos en acuarios experimentales se centró exclusivamente en el efecto de la suplementación dietética con ácido fúlvico sobre la actividad digestiva intestinal (análisis enzimático), la actividad antioxidante, la actividad de enzimas inmunológicas y la

composición de la microflora durante un ensayo de alimentación de 60 días. Se demostró que la necesidad óptima de ácido fúlvico en la dieta para un crecimiento máximo fue de 16,4 g por kg de alimento. La suplementación con ácido fúlvico produjo un aumento en la abundancia de secuencias de Firmicutes y Actinobacteria, junto con una disminución en Proteobacteria. Los resultados sugieren que la suplementación con ácido fúlvico redujo la abundancia relativa de *Serratia*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* y *Edwardsiella*, y aumentó de forma relativa la cantidad de *Lactobacillus* en el intestino (DOI: [10.1016/j.fsi.2017.01.008](https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.01.008)).



Ryc. 2. Efecto del ácido fúlvico **terra+ alkaline** y **terra+ minerals** sobre la actividad metabólica (línea roja) y el recuento de UFC/CFU (línea verde) de *L. rhamnosus*. Comparación entre el ensayo de resazurina y el análisis de UFC/CFU.

Resumen. La suplementación con ácidos fúlvicos influye positivamente en el funcionamiento del sistema inmunológico al estimular los monocitos —células del sistema inmune— y, con ello, reducir los procesos inflamatorios en el organismo (Chien et al., 2015).

Otros autores también demostraron que el FA posee propiedades antioxidantes, lo que sugiere que este compuesto puede ser un excelente candidato como fuente natural de antioxidantes, de utilidad tanto para la industria farmacéutica como para la alimentaria (Cardenas et al., 2011).

El ácido fúlvico también protege frente a los efectos desfavorables de metales pesados presentes en el entorno, por ejemplo en el agua, reduciendo su absorción, como se mostró en el caso del cadmio en un modelo animal (Kumar, Sekar, 2018).

También se han observado diferencias en el grado de absorción de sustancias esenciales para el organismo, como vitaminas y minerales, así como de medicamentos. Se observó que, en presencia de FA, aumentó la absorción de minerales, lo que puede deberse a su unión con el ácido fúlvico mediante quelación, en lugar de la formación de complejos, lo que probablemente influye en su solubilidad.

En cuanto a vitaminas y medicamentos, vale la pena señalar que la presencia de ácido fúlvico redujo su absorción (Willis, 2015).

Además de lo mencionado anteriormente, el FA aporta numerosos beneficios para la salud, y su consumo a través de la dieta, por ejemplo en forma de suplementación, puede influir favorablemente en el funcionamiento de todo el organismo.

Bibliografía



Jesteśmy częścią sieci
European University of
Post-Industrial Cities (UNIC)



1. Chien SJ, Chen TC, Kuo HC, Chen CN, Chang SF. 2015. Fulvic acid attenuates homocysteine-induced cyclooxygenase-2 expression in human monocytes. *BMC Complement Altern Med.* 13;15:61. doi: 10.1186/s12906-015-0583-x. PMID: 25888188; PMCID: PMC4369892.
2. Cardenas, Noemi & Coballase-Urrutia, Elvia & Gertrudis, Bernardino & Chaverri, Jose & Barragan, Gerardo. 2011. Antioxidant activity of fulvic acid: A living matter-derived bioactive compound. *Journal of Food, Agriculture and Environment.* 9:123-127.
3. Kumar, Deeptha & Sekar, Sasikala. 2018. Titrimetric estimation of fulvic acid substances in Oriens Shilajit as a part of herbal nutraceutical standardization. 198-199.
4. Kirsten Willis. 2015. An investigation of the effects of fulvic and humic acids on the absorption of selected drugs, vitamins and minerals using the everted mouse gut model.

-----**FIN DEL INFORME**-----

dr Karolina Rudnicka

En nombre del equipo Science Hub (Dr. Marcin Włodarczyk y Mtra. Jolanta Kalinowska)