

BOL. CENTRO INVEST. BIOL. 33(1): 1 – 13

GRADO DE SENSIBILIDAD DE ORGANISMOS PATÓGENOS A LA CUPROCLOROFILA

TERESITA DE J. ROMERO LÓPEZ ¹ Y
MIRIAM PÉREZ HERNÁNDEZ ²

¹ Centro de Investigaciones Pesqueras,
5^{ta} Avenida, Santa Fe, Playa, Ciudad Habana, Cuba

² Empresa de Productos Biológicos Carlos J. Finlay,
Calle Infanta, Esq. Manglar, Plaza, Ciudad Habana, Cuba

RESUMEN.- La cuproclorofila, extraída de *Chlorella* sp. cultivada en los efluentes orgánicos de las instalaciones procesadoras de mariscos y pescados de Cuba, se aplicó seca y húmeda (de 5 y 60 días de almacenamiento), y en concentraciones de 3, 5, 20 y 50 % sobre 22 organismos patógenos, con el fin de probar su acción bactericida. La cuproclorofila seca no dio resultados satisfactorios; en cambio, los patógenos tratados con cuproclorofila húmeda de 5 días fueron más sensibles, a medida que se incrementó la concentración. Ocho patógenos resultaron resistentes al producto. *Recibido:* 22 Junio 1998, *aceptado:* 19 Febrero 1999.

Palabras claves: Cuproclorofila, *Chlorella* sp., clorofila, patógenos, bactericida, sensibilidad, medicamento, Cuba.

DEGREE OF SENSITIVITY OF PATHOGENIC ORGANISMS TO CUPROCHLOROPHYLL

ABSTRACT.- We determined the bactericidal efficiency of cuprochlorophyll (extracted from *Chlorella* sp. cultivated

in organic effluent from the fish-processing industry in Cuba) on 22 pathogenic organisms. The product was applied dry, as a liquid (stored 5 to 60 days), and in different concentrations (3, 5, 20, and 50 %). Dry cuprochlorophyll gave no satisfactory results. Liquid cuprochlorophyll was more efficient at 5 days, and as concentrations increased. Eight pathogens were resistant to the product. *Received:* 22 June 1998, *accepted:* 19 February 1999.

Key words: Cuprochlorophyll, *Chlorella* sp., chlorophyll, pathogens, bactericide, sensitivity, medicine, Cuba.

INTRODUCCIÓN

Son muchas las enfermedades producidas por organismos patógenos así como los tratamientos que se aplican para su eliminación parcial o total.

Entre los productos aplicados con relativa eficacia para tratar una amplia gama de afecciones de origen animal y humana se encuentra la clorofila (de Armas *et al.* 1988). Actualmente, la cuproclorofila es un ingrediente muy cotizado en la industria del cosmético y médico-farmacéutica. Se obtiene como producto de la sustitución en la molécula de clorofila del Magnesio por el Cobre, a través de la acción previa del ácido clorhídrico sobre la molécula de clorofila. El Hidrógeno ocupa el sitio del Magnesio hasta formarse un nuevo pigmento, la feofitina de color pardo (MES 1979).

Tanto el uso de la clorofila como de la cuproclorofila está muy generalizado en varios países y en el liderazgo se encuentra Japón, con una gama de combinaciones donde está presente el pigmento de referencia, integrando un surtido amplio de cremas, champúes, desodorantes, pastas dentales, licores para la salud, etc.

Entre las enfermedades que han sido tratadas con alguna dosis del producto se citan el tratamiento y prevención de colitis ulcerativas y úlceras digestivas (Oketani y Rai 1993, Takemi *et al.*

1980), gastritis (Iwai *et al.* 1990), fotohipersensitividad (Kimura 1980), sarros dentales (Futami *et al.* 1986), tumores (Yuchi *et al.* 1985) y anemia (Horiuchi y Fujikawa 1987).

En el trabajo de Inoue y Nishimura (1990) se hace referencia a la acción bactericida de la clorofila, estudio que sirvió de base a los especialistas del Centro de Investigaciones Pesqueras (CIP) y de la Empresa de Productos Biológicos (EPB) Carlos J. Finlay para verificar la acción de la cuproclorofila seca y húmeda y con concentraciones diferentes sobre 22 organismos patógenos. El pigmento fue extraído de la microalga *Chlorella* sp. que se desarrolla en lagunas de cultivo al aire libre en una empresa de productos pesqueros del país (Romero y Echeverría 1998).

MATERIALES Y MÉTODOS

El pigmento cuproclorofila se extrajo según el método descrito por la UNESCO (1966). La concentración resultante en el extracto alcohólico fue del 3 %. La pasta de microalga utilizada para estos fines contenía aproximadamente un 70 % de humedad. Su extracción y conservación se realizó como señalan los trabajos de Romero (1998) y Romero y Echeverría (1998).

Los organismos patógenos de ensayo se presentan a continuación: 1) *Escherichia coli*, 2) *Salmonella paratyphi*, 3) *Salmonella typhimurium*, 4) *Shigella dysenteriae*, 5) *Citrobacter* 33, 6) *Staphylococcus aureus*, 7) *Streptomyces albus*, 8) *Pseudomona aeruginosa*, 9) *Sarcina luteas*, 10) *Klebsiella pneumoniae*, 11) *Alcaligenes faecalis*, 12) *Providencia* N 1608 – 50, 13) *Proteus vulgaris*, 14) *Enterobacter aerogenes*, 15) *Pneumococcus pneumoniae*, 16) *Micrococcus luteus*, 17) *Streptococcus* A, 18) *Corynebacterium diphtheriae*, 19) *Bordetella pertussis*, 20) *Candida albicans*, 21) *Candida utilis*, y 22) *Neisseria meningitidis* a.

Los géneros del 1 al 14 fueron sembrados en placas con medio Agar de Triptona-Soja; del 15 al 19 en Agar-Sangre; la *Candida* en extracto de malta y la *Neisseria* en Agar-Chocolate, todos ellos según

lo indica el manual de la OXOID (1981 y 1993) y el manual de Microbiología Médica (Jawetz *et al.* 1984).

Previo a los ensayos *in vitro*, se realizó el chequeo rutinario de esterilidad a la cuproclorofila. Ésta debía mantener las condiciones óptimas requeridas para su posterior análisis como agente antiséptico sobre los microorganismos patógenos.

La respuesta a la acción del pigmento sobre los organismos patógenos inoculados en las placas de Petry se valoró de la siguiente forma:

1) Cargando con cuproclorofila discos de papel absorbente, circulares de 6 mm de diámetro, comúnmente usados en los antibiogramas y previamente secados a una temperatura de 27 - 28 °C, por un período de 2 horas.

2) Cargando los discos con cuproclorofila, al 3 % de concentración y almacenada por un período de tiempo de 5 y 60 días.

3) Cargando los discos de papel con cuproclorofila a concentraciones de 3, 5, 20 y 50 %.

Para todos los casos expuestos, la carga de los discos fue a razón de 3.7 µg, y todas las muestras fueron incubadas por 24 horas a 37 °C.

Para facilitar la interpretación de los resultados, se estableció que al producirse un halo de inhibición menor o igual a 3 mm de radio a partir del centro del disco, correspondería a los organismos ligeramente sensibles al producto (S); entre 4 y 8 mm, a los sensibles (S⁺) y mayor o igual a 9 mm a los organismos muy sensibles (S⁺⁺).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba de esterilidad del licor de cuproclorofila resultó negativa. Ésto comprobó la posibilidad de la validez de este

producto como agente capaz de eliminar, o al menos, actuar en mayor o menor grado sobre los organismos patógenos de prueba.

La Tabla 1 señala el comportamiento de *E. coli*, *S. paratyphi*, *S. typhimurium*, *S. dysenteriae* y *Citrobacter* 33. Estos organismos fueron tomados al azar, pero no respondieron a la acción de la cuproclorofila al 3 % de concentración, tratada previamente con calor. En el transcurso de 24 h, los discos expuestos en las placas no mostraron ningún halo de inhibición que demostrara la eficacia del producto en esas condiciones, concluyéndose que la cuproclorofila seca no posee validez alguna como aditivo clínico.

TABLA 1. Acción de la cuproclorofila seca a 27 °C sobre diferentes bacterias patógenas tomadas al azar.

BACTERIA	CUPROCLOROFILA AL 3 % DE CONC. (MUESTRA SECA A 27 °C)
<i>Escherichia coli</i>	Resistente
<i>Salmonella paratyphi</i>	Resistente
<i>Salmonella typhimurium</i>	Resistente
<i>Shigella dysenteriae</i>	Resistente
<i>Citrobacter</i> 33	Resistente

La cuproclorofila va disminuyendo su eficacia a través del tiempo. Ésto se demostró al hacer actuar sobre diferentes organismos patógenos por un período de 24 horas, discos cargados con el producto al 3 % de concentración, procedente de muestras almacenadas por 5 y 60 días.

En la Tabla 2 se presenta el resultado de 13 de las bacterias estudiadas y a excepción de *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *P. vulgaris* que se mantuvieron resistentes a la acción de la cuproclorofila al 3 % de concentración, en los demás casos, el licor almacenado por 5 días fue más efectivo que el almacenado por 60 días.

En *E. coli*, *S. dysenteriae*, *S. luteas*, *A. faecalis* y *E. aerogenes*, hubo cierta tendencia a formar halo con la cuproclorofila más envejecida, aunque siempre existieron bacterias que no fueron afectadas por la acción del producto. La Tabla 2 describe el porcentaje de eficiencia con el que fueron destruidas estas bacterias alrededor del disco.

TABLA 2. Acción de la cuproclorofila con 5 y 60 días de almacenamiento sobre diferentes bacterias patógenas tomadas al azar.

BACTERIA	CUPROCLOROFILA DE DIFERENTES EDADES AL 3 % DE CONC.	
	60 Días	5 Días
<i>Escherichia coli</i>	S (50 %)	S ⁺
<i>Salmonella paratyphi</i>	R	S ⁺⁺
<i>Salmonella typhimurium</i>	R	S ⁺
<i>Shigella dysenteriae</i>	S ⁺ (50 %)	S ⁺⁺
<i>Citrobacter 33</i>	R	S ⁺
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R
<i>Sarcina luteas</i>	S (70 %)	S ⁺
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S ⁺⁺
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R
<i>Providencia</i> N 1608-50	S ⁺	S ⁺⁺
<i>Proteus vulgaris</i>	R	R
<i>Alcaligenes faecalis</i>	S ⁺ (90 %)	S ⁺⁺
<i>Enterobacter aerogenes</i>	S (10 %)	S ⁺

Con los resultados de esta investigación no es posible dar un veredicto fehaciente del tiempo de vida útil de la cuproclorofila ni de la eficacia con que pueda incidir sobre los patógenos a través del tiempo, porque para ello se requiere realizar un estudio de estabilidad del producto, tomando como referencia cepas que resultaron ser las

más sensibles en todos los tratamientos expuestos en esta investigación.

Según se muestra en la Tabla 3, muchos patógenos se mantuvieron resistentes a niveles bajos de concentración (3 y 5 %) en el transcurso de 24 horas de incubación. Tal es el caso de *C. albicans*, *S. aureus* y *Streptococcus A*, que presentaron buena

TABLA 3. Acción de la cuproclorofila a diferentes concentraciones sobre un número de bacterias patógenas tomadas al azar.

BACTERIA	CUPROCLOROFILA A DIFERENTES CONCENTRACIONES (%)			
	3	5	20	50
<i>Escherichia coli</i>	S ⁺	S ⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺
<i>Shigella dysenteriae</i>	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺
<i>Citrobacter 33</i>	S ⁺	S ⁺	S ⁺	S ⁺⁺
<i>Sarsina luteas</i>	S ⁺	S ⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺
<i>Alcaligenes faecalis</i>	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺
<i>Enterobacter aerogenes</i>	S ⁺	S ⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺	S ⁺⁺
<i>Candida utilis</i>	S	S	S ⁺	S ⁺⁺
<i>Candida albicans</i>	R	R	S	S ⁺
<i>Staphylococcus aureus</i>	R	R	S	S ⁺⁺
<i>Streptococcus A</i>	R	R	S	S ⁺
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	R	R	R	R
<i>Bordetella pertussis</i>	R	R	R	R
<i>Pneumococcus pneumoniae</i>	R	R	R	R
<i>Micrococcus luteus</i>	R	R	R	R
<i>Proteus vulgaris</i>	R	R	R	R
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	R	R	R	R
<i>Streptomyces albus</i>	R	R	R	R

R = Resistente, S= ligeramente sensible, S⁺ = Sensible, S⁺⁺ = Muy sensible.

sensibilidad al producto al 20 y 50 % de concentración. Se observó que *S. dysenteriae*, *A. faecalis* y *K. pneumoniae* son muy sensibles a la cuproclorofila y por el contrario, *C. diphtheriae*, *B. pertussis*, *P. pneumoniae*, *M. luteus*, *P. vulgaris*, *P. aeruginosa* y *S. albus*, resultaron completamente resistentes.

La Tabla 3 muestra además que los restantes organismos también presentaron una marcada tendencia a aumentar el halo de inhibición a medida que la concentración del pigmento se hacía mayor, de lo que se infiere que la concentración de este producto juega un papel muy importante para la destrucción de determinados organismos patógenos.

CONCLUSIONES

La cuproclorofila seca al 3 % de concentración no presenta validez para el tratamiento de enfermedades ocasionadas por los organismos patógenos de prueba.

La cuproclorofila al 3 % de concentración disminuye su eficacia en el tratamiento de organismos patógenos, según se hace mayor el tiempo de almacenaje del producto.

Los patógenos estudiados presentaron diferentes grados de sensibilidad a la cuproclorofila con 3, 5, 20 y 50 % de concentración.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece la colaboración de Gerardo Suárez en la realización de este trabajo, a los técnicos del laboratorio de microalgas de la Empresa INDAL, a todos sus trabajadores y muy especialmente a los de la Empresa de Productos Biológicos Carlos J. Finlay, quienes aportaron las cepas patógenas, sus conocimientos y ayuda desinteresada.

LITERATURA CITADA

- DE ARMAS, U. R., D. E. ORTEGA Y G. R. RODES. 1988. Fisiología vegetal. Ed. Pueblo y Educación, C. Habana, Cuba, 325 pp.
- EWING, W. J. 1973. Identification of Enterobacteriaceae by biochemical reactions. HEW Publication, Minnesota, 258 pp.
- FUTAMI, T., S. TSUJITA Y I. EGUCHI. 1986. Agent for dyeing sordes on tooth. Patente No. JP.61291516-19861222, Japón.
- GUERRA, M. C. 1994. Enfermedad y daños a la salud. Pp. 188-196, *en* Las condiciones de la salud en las Américas. OPS. 1.
- HORIUCHI, T. Y A. FUJIKAWA. 1987. Health food for effective to anemia. Patente No. JP. 62019527-19870128, Japón.
- INOUE, C. Y Y. NISHIMURA. 1990. Production of chlorophyll preparation. Patente No. JP.02083329-19900323, Japón.
- IWAI, M., I. KODA, O. INOUE, Y. NARITA Y. K. YOKOYAMA. 1990. Remedy for gastritis. Patente No. JP.02149522-19900608, Japón.
- JAWETZ, E., J. L. MELNICK Y E. A. ADELBURG. 1984. Manual de microbiología médica. Ed. Revolucionaria (9 ed.), C. Habana, Cuba, 595 pp.
- JOKLIK, W. K., H. P. WILLETT Y D. B. AMOS. 1983. Zinsser microbiología. Ed. Revolucionaria (17 ed.), C. Habana, Cuba, 1413 pp.
- KIMURA, S. 1980. Preventive and remedy for photohypersensitivity. Patente No. JP.55100317-19800731, Japón.
- MACHADO, R. H. 1996. Enfermedades de transmisión sexual en la adolescencia. Pp. 46-60, *en* Obstetricia y ginecología infanto juvenil. SOCUDEP, C. Habana, Cuba.

- MES (MINISTERIO DE EDUCACIÓN SUPERIOR). 1979. Prácticas de fisiología vegetal. Ed. Pueblo y Educación, C. Habana, 130 pp.
- MIMS, A. C., H. J. PLAYFAIR, M. I. ROITT, D. WAKELIN Y R. WILLIAMS. 1995. Microbiología médica. Mosby/Doyma Libros, Londres.
- OKETANI, K. Y H. RAI. 1993. Agent for treatment and ulcerative colitis. Patente No. JP.05246847-19930924, Japón.
- OXOID. 1981. Manual OXOID (4 ed.). Ed. OXOID, Limited, Wade Road, Basingstoke, Inglaterra, 360 pp.
- OXOID. 1993. Manual OXOID (3 ed.). Ed. OXOID Limited, Wade Road, Basingstoke, Inglaterra, 222 pp.
- PELÁEZ, M. J. 1996. Enfermedades de transmisión sexual. Causas, transmisión, riesgos y prevención. Pp. 35-45, en Obstetricia y ginecología infanto juvenil. SOCUDEF, C. de la Habana, Cuba.
- ROMERO L., T. 1998. Tecnología de cultivo de *Chlorella vulgaris* en los efluentes líquidos de la industria pesquera y subproductos derivados. Anais dos 4 Congr. Latino-americano de Ficologia, II Reuniao Ibero-americana de Ficología e 7 Reuniao Brasileira de Ficologia, Socieda de Ficologica da America Latina e Caribe, pp 475-495.
- ROMERO L., T. Y L. H. ECHEVERRÍA. 1998. Concentración de clorofila total en el extracto etanólico procedente de *Chlorella* sp. cultivada en efluentes de la industria pesquera. Bol. Centro Invest. Biol. 32(3): 153-178. Maracaibo, Venezuela.
- TAKEMI, T., T. FUKUSHIMA, M. FUJII Y S. MORISUE. 1980. Curing and preventive agent for digestive ulcer. Patente No. JP.55133315-19801017, Japón.
- UNESCO. 1966. Determination of photosynthetic pigments in sea water. Monograph on oceanographic methodology, 69 pp.

YUCHI, S., T. TAKEMOTO Y Y. UCHIDA. 1985. Antitumor agent. PN: JP.60105627-19850611.

APÉNDICE

PATOGENIA DE LOS ORGANISMOS SENSIBLES A LA CUPROCLOROFILA

Citrobacter, *Providencia*, *Klebsiella* y *Enterobacter* son organismos que constituyen una gran parte de la flora normal aerobia del intestino. Sólo se transforman en patógenos cuando alcanzan tejidos fuera del intestino, particularmente en las vías urinarias, las vías biliares, los pulmones, el peritoneo o las meninges, provocando inflamaciones en estos sitios. Cuando las defensas normales del huésped son inadecuadas, particularmente en la lactancia, senectud, etapas terminales de otros padecimientos o empleo de catéteres uretrales a permanencia, las bacterias coliformes pueden alcanzar la corriente sanguínea y provocar septicemias.

Citrobacter puede provocar enteritis y septicemia y se parece a las *Salmonellas*. Se encuentran comúnmente en pacientes hospitalizados, produciendo infecciones oportunistas.

Las especies de *Providencia* se encuentran en la flora intestinal normal, pero ocasionalmente pueden producir alteraciones diarreicas. A menudo se asocian con infecciones hospitalarias que involucran las vías urinarias, sangre, vías respiratorias y heridas.

Klebsiella pneumoniae es un agente patógeno muy común, principalmente en las infecciones de los sistemas respiratorio y urinario de hospital. *Klebsiella pneumoniae* es el agente causal responsable de una pequeña proporción de las neumonías bacterianas. Puede provocar una extensa consolidación hemorrágica necrosante del pulmón, la cual si no es tratada a tiempo provoca una elevada tasa de mortalidad. Ocasionalmente produce infecciones de las vías urinarias o enteritis en los niños y bacteriemia con lesiones focales en pacientes debilitados.

Enterobacter aerogenes es capaz de producir enfermedad en cualquier tejido corporal, pero con más frecuencia ha sido aislado en infecciones de las vías urinarias.

Candida albicans es un miembro de la flora normal de las mucosas en los sistemas respiratorios, digestivos y genital femenino. En tales lugares puede ganar dominio y hallarse asociado con otras enfermedades. Puede producir infección en la sangre, tromboflebitis, endocarditis o infección en los ojos y otros órganos cuando es introducido por vía intravenosa. El desarrollo de *Candida* en la saliva puede dar lugar a infección bucal (algodoncillo), la que ocurre fundamentalmente en los lactantes sobre la mucosa de la boca. La vulvovaginitis en los genitales femeninos produce irritación, prurito intenso y secreción. La infección de la piel ocurre fundamentalmente en las partes húmedas del cuerpo, como las axilas, pieles interglúteas, ingle o pliegues submamarios, siendo muy común en individuos obesos y diabéticos. En las uñas produce una hinchazón enrojecida dolorosa, puede conducir al engrosamiento y a la formación de surcos transversos de las uñas y finalmente a la pérdida de la uña.

En pulmones y otros órganos, la infección por *Candida* puede ser un invasor secundario de los pulmones, riñones y otros órganos donde la enfermedad previa se hallaba presente.

Salmonella paratyphi puede ser ingerida con alimentos o bebidas contaminadas y alcanzar el intestino delgado, a partir del cual penetra en los linfáticos intestinales. Estos microorganismos pueden llegar a la corriente sanguínea, diseminándose a muchos órganos, incluyendo los riñones y los intestinos. Pueden ser arrojados del cuerpo a través de las heces, aunque existen dosis infectantes para el hombre, produciendo fiebres intestinales, por ejemplo la fiebre paratifoidea.

Salmonella typhimurium produce la gastroenteritis, muchas veces llamada intoxicación alimentaria. Una ingestión grande del organismo resulta de una irritación violenta de las mucosas.

Shigella dysenteriae produce la disentería bacilar. Cuando existe una invasión del epitelio de la mucosa o microabscesos de la pared del intestino grueso, da lugar a necrosis de la mucosa, ulceración superficial, hemorragia y formación de pseudomembranas en las áreas ulceradas.

Escherichia coli es la causa más común de infección de las vías urinarias en el hombre. También es la causa más frecuente de sepsis por gramnegativos y ha sido aislado en neumonía, heridas y líquidos cefalorraquídeo. Es una importante causa de meningitis neonatal. Ha sido asociada con enfermedad gastrointestinal en el hombre y animales. Causa diarrea en adultos.

Staphylococcus aureus es notorio como productor de enfermedades supurativas: mastiti, furúnculus, antrax, impétigo infantil, abscesos internos e intoxicaciones alimentarias.

Las enfermedades atribuibles a la invasión por *Streptococcus* del grupo A pueden ser: Erisipela (si la puerta de entrada es la piel) fiebre puerperal (si penetra por el útero después del parto), infección generalizada (contaminación de heridas traumáticas o quirúrgicas).

Las enfermedades atribuibles a la infección local por *Streptococcus* son la faringitis estreptocócica; impétigos, etc. Entre otras infecciones se pueden citar las del sistema urinario; en la boca y sistema genital femenino. Solo o asociado con otros microorganismos puede causar lesiones supurativas.

[Información recopilada de: Ewing (1973), Joklik *et al.* (1983), OXOID (1993), Jawetz *et al.* (1984), Machado (1996), Peláez (1996), Guerra (1994) y Mims *et al.* (1995)].