

## ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA CUPROCLOROFILA

Nidia Rojas Hernández<sup>1</sup>, Layna Riera Ojeda<sup>2</sup>,  
Sonia Lugo Marante<sup>2</sup>, Teresita Romero López<sup>3</sup>  
y Daysí Lugo Moya<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, UH. Calle 25 No. 455  
entre J e I, Vedado. C. Habana, Cuba. E-mail: nmrojas@mail.com

<sup>2</sup>Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB),  
Finca Tirabeque, Km 1½, Carretera Cacahual, Bejucal, P. Habana

<sup>3</sup>Centro de Investigaciones Pesqueras 5ta Ave. Y Calle 1ª, Barlovento, Santa Fé,  
Playa. C. Habana. E-mail: terges@mixmail.com

**Resumen.** Se evalúa la acción antimicrobiana de la cuproclorofila preparada a partir de clorofila extraída de la microalga *Chlorella* sp. Se emplearon 33 cultivos microbianos, de los cuales 25 eran bacterias (9 Gram positivas y 16 Gram negativas), y 8 hongos (5 de ellos levaduras). La actividad antimicrobiana, se determinó por los métodos de difusión radial en medio agarizado con cortes cilíndricos y por dilución seriada en caldo. Se detectó que la cuproclorofila a una concentración del 8% es antimicrobiana frente al 92% de las bacterias, así como frente al 62,5% de los hongos, bacteriostática a concentraciones entre 0,8 y 1,0 y bactericida para las cepas sensibles probadas al 2,0% o superiores. *Recibido:* 25 Mayo 2001, *aceptado:* 11 Diciembre 2001.

**Palabras clave:** Actividad antibacteriana, antifúngica, antimicrobiana, *Chlorella* sp., cuproclorofila.

## ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CUPROCHLOROPHYLL

**Abstract.** The anti-microbial action of cupro-chlorophyll prepared from *Chlorella* sp. was evaluated. Of thirty three microbial strains, 25 were bacteria (9 Gram positives and 16 Gram negatives), and eight fungi were analysed. Agar diffusion with cylindrical wells and serial broth dilution methods were employed to determine the antimicrobial action. We concluded that this product at 8% of concentration, presents anti-microbial action against 92% of bacteria found and against 62,5% of fungi strains tested. This product inhibit bacterial growth in a range from 0,8 to 1,0% of concentration, and possesses a lethal action at 2,0% or more for sensitive strains. *Received:* 25 May 2001, *accepted:* 11 December 2001.

**Key words:** Antibacterial activity, antifungal and antimicrobial action, cuprochlorophyll, *Chlorella* sp.

### INTRODUCCIÓN

A pesar de los crecientes avances en la biotecnología, los recursos naturales siguen constituyendo una fuente importante de compuestos biológicamente activos. Entre ellos se encuentran las plantas (Mongelli 1995, Jatem Lasser 1998) y los productos animales. (Cuesta *et al.* 1999).

Particularmente en el caso de aquellos compuestos con actividad antimicrobiana, la vigencia de su estudio es evidente, dado el alto número de publicaciones destinadas a esta temática (Meckes *et al.* 1995, Meckes *et al.* 1997). Este interés se hace mayor debido a la creciente aparición de cepas bacterianas patógenas que se han tornado multiresistentes a los quimioterapéuticos, incluyendo los de última generación debido al mal uso y abuso que se ha hecho de estos medicamentos (Ram 2000, Bush 1999, Ginestre 1999). Si a esto se suma el surgimiento de las denominadas enfermedades infecciosas emergentes y la prolongación de la esperanza de vida, se entiende claramente la necesidad de descubrir nuevas armas que enfrenten el problema del control de los microorganismos patógenos (Talwani y Horvath 2000).

El alga *Chlorella* es una fuente rica de carotenoides, aceites esenciales y clorofila, es obvio el interés de los científicos en desarrollar tecnologías que permitan el cultivo de este género y el máximo aprovechamiento de sus subproductos (Romero 1998).

A partir de la extracción de clorofila de una pasta algal obtenida de *Chlorella*, se puede obtener la cuproclorofila por sustitución del metal central (magnesio) de esta metaloporfirina, por cobre en medio ácido. Ambos pigmentos tienen gran utilidad en la industria cosmética para la formulación de cremas, champúes, dentífricos y en la industria farmacéutica (Inoue y Nishimura 1990).

Sin embargo, las posibilidades del empleo de la cuproclorofila pueden ser superiores como antimicrobiano, ya que la combinación de sus propiedades puede ofrecer resultados muy favorables para la conservación o restablecimiento de la salud, para lo cual, es indispensable previamente el conocimiento profundo de su actividad antimicrobiana y la potencialidad de esa acción, siendo éstos los objetivos del presente trabajo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La cuproclorofila empleada en este trabajo fue elaborada a partir de la clorofila extraída de la pasta algal procedente de los cultivos de *Chlorella* sp. desarrollados en las lagunas de la Organización Económica Estatal Industrial de Alimentos (OEE INDAL) perteneciente al Ministerio de la Industria Pesquera (Romero 1998) y fue obtenida por el método descrito por Romero y Echevarría (1998).

La Cuproclorofila fue preparada y extraída de la masa algal concentrada procedente del cultivo de *Chlorella* sp., según metodología descrita por Romero y Echevarría 1998, Se partió de una concentración del 8% (p/v), la cual se utilizó para realizar el tamizaje inicial y determinar su actividad antimicrobiana frente a todos los cultivos probados. A partir de ella, se prepararon las restantes concentraciones de este compuesto.

Se emplearon 33 cultivos microbianos, 25 de bacterias y 8 de hongos. Estos procedieron del cepario del Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana y del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Su relación se describe en la Tabla 1.

La determinación de la actividad antimicrobiana se efectuó por difusión radial en medio agarizado con cortes cilíndricos según el método descrito en el Comité Nacional de Estandarización de Laboratorios Clínicos (NCCLS) (1997).

Para determinar la presencia de actividad bactericida, se empleó el método de dilución seriada en tubos de caldo, según NCCLS (1997). El inóculo empleado consistió en 0,1 mL de una suspensión microbiana en solución salina fisiológica estéril, que contenía aproximadamente  $3 \times 10^8$  UFC/mL (NCCLS, 1997), el cual se adicionó a cada tubo con caldo nutriente que contenía las concentraciones de cuproclorofila a probar. Las concentraciones empleadas estuvieron en el rango entre 0,12 y 4% (p/v) en esta prueba. La actividad biocida se determinó por siembra en la superficie de placas con medio Agar Nutriente, o Agar Sangre para las bacterias (según los requerimientos nutricionales de la cepa) y en Sabouraud Glucosa Agar para los hongos y levaduras. Esta siembra se efectuó luego de la incubación de los tubos a 35°C para las bacterias y a 25° para los hongos y levaduras tras 24 horas. Las placas inoculadas se incubaron a las mismas temperaturas por 24 h para las bacterias y 48 h para las levaduras. En los hongos filamentosos la incubación de las placas se realizó hasta que en la placa inoculada con la muestra del tubo control sin cuproclorofila se observó crecimiento. Todo el trabajo se realizó con tres réplicas por cultivo.

Previo al uso de la cuproclorofila se verificó su estado de esterilidad por siembra directa del producto en la superficie de placas con medios Agar Nutriente, Agar Sangre y Sabouraud Glucosa Agar, las cuales se incubaron hasta 7 días a temperaturas de 25°C en el medio para hongos y a 35°C en los medios para bacterias.

TABLA 1. Relación de cultivos microbianos empleados.

Clave	Microorganismo	Clave	Microorganismo
S. a	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	PM-C	<i>Proteus mirabilis</i> **
St.A	<i>Staphylococcus aureus</i> *	YP-2	<i>Proteus mirabilis</i> *
SP	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Pm-CC96	<i>Pasteurella multocida</i> **
S. P-1	<i>Streptococcus pyogenes</i> *	BB-A	<i>Bordetella bronchiseptica</i> ATCC 4617
S. PA-2	<i>Streptococcus pyogenes</i> *	Bp-CC89	<i>Bordetella bronchiseptica</i> **
S. P-2	<i>Streptococcus pyogenes</i> *	YC-1	<i>Citrobacter sp.</i> *
S. P-4	<i>Streptococcus pyogenes</i> *	YE-2	<i>Enterobacter cloacae</i> *
B. S	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	YS-1	<i>Serratia marcescens</i> *
B S-!	<i>Bacillus subtilis</i> *	CA-A	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
EC-1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	CA-1	<i>Candida albicans</i> *
YE-1	<i>Escherichia coli</i> *	CK	<i>Candida krusei</i> *
S.Ty	<i>Salmonella typhi</i> ATCC 14028	CG	<i>Candida glabrata</i> *
Ps a	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> *
YP-1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	RR	<i>Rhodotorula rubra</i> *
Ps-C	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> **	BB	<i>Bauberia bassiana</i> cepa LABERLAM**
K-C	<i>Klebsiella ozaenae</i> **	PL	<i>Paecilomyces lilacinuz</i> cepa LABERLAM**
YK-1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> *		

\*: Fac. Biol, aislamientos ambientales o de origen clínico humano.

\*\*: CENPALAB, aislamientos ambientales o de origen veterinario.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La prueba de esterilidad efectuada a la cuproclorofila demostró su adecuado estado para estos fines, ya que no mostró crecimiento microbiano alguno.

Como se observa en la Tabla 2, de las 25 cepas bacterianas probadas frente a la cuproclorofila, 23 fueron sensibles, lo cual indica una actividad antibacteriana del 92% frente a las cepas bacterianas probadas. Las únicas cepas resistentes fueron *Salmonella typhi* y *Pasteurella multocida*.

De todas las cepas bacterianas inhibidas, en 8 de ellas el halo de inhibición midió entre 14 y 18 mm, mientras que sólo en una cepa fúngica, el halo de inhibición alcanzó esas dimensiones.

No hubo diferencias notables entre los resultados obtenidos en una misma especie o género con cepas ATCC de origen clínico humano o en aquellos aislados de animales, lo cual habla a favor de este producto como posible agente terapéutico. Es de señalar que especies de interés clínico como son *Staphylococcus aureus* y *Strepto-*

TABLA 2. Relación de cepas bacterianas inhibidas por la cuproclorofila.

Clave	Inhibic.	Clave	Inhibic.	Clave	Inhibic.	Clave	Inhibic.
S. a	B	B. S	B	Ps-C	B	Bp-CC89	A
St.A	B	B S-1	B	K-C	B	YC-1	A
SP	A	EC-1	A	YK-1	B	YE-2	A
S. P-1	A	YE-1	A	PM-C	A	YS-1	A
S. PA-2	A	S.Ty	-	YP-2	B		
S. P-2	A	Ps a	A	Pm-CC96	-		
S. P-4	A	YP-1	B	BB-A	A		

- No halo de inhibición.

A Halo entre 8 y 13 mm de diámetro.

B Halo entre 14 y 18 mm de diámetro.

C Halo mayor o igual a 19 mm de diámetro.

*coccus pyogenes* fueron afectadas por la cuproclorofila. Dada la necesidad de disponer de nuevos agentes quimioterapéuticos para controlar la proliferación de cepas patógenas multirresistentes a los antibióticos convencionales, estos resultados hablan a favor de las posibilidades de aplicación de la cuproclorofila, aunque para ello, deben realizarse estudios que definan su inocuidad, de los cuales no se han encontrado publicaciones en la literatura científica revisada. No obstante, el empleo de este compuesto como componente de formulaciones para uso dental en Japón constituye un buen indicio en este sentido (Inoue y Nishimura 1990).

De acuerdo a los resultados de la determinación de actividad antifúngica en la cuproclorofila (Tabla 3), la cepa ATCC de *Candida albicans*, mostró una gran sensibilidad frente a este producto, ya que el halo de inhibición en ella alcanzó los 20 mm de diámetro. Este producto también afectó el crecimiento, pero con halos de inhibición menores en otras cepas de esta misma especie, mientras otra especie de este mismo género de levaduras, *C. glabrata*, no fue sensible a este producto. No se detectó actividad inhibitoria frente a las cepas de hongos filamentosos probadas.

En la Tabla 4 se evidencia que la cuproclorofila no sólo presenta una fuerte actividad bacteriostática, ya que es activa como inhibidora del crecimiento a concentraciones iguales o menores al 1% (p/v) y presenta actividad bactericida a concentraciones superiores, en el rango entre 2% (p/v) y 4% (p/v) frente al grupo de bacterias seleccionadas para este estudio.

Por no haber encontrado otras publicaciones anteriores similares en la literatura científica sobre la actividad antimicrobiana de este compuesto, estos resultados sólo pueden ser comparados con los obtenidos en el trabajo realizado por Romero y Pérez (1999), quienes no encontraron actividad antimicrobiana cuando emplearon concentraciones inferiores al 3% de cuproclorofila, y aún con esta concentración, la actividad bacteriostática se demostró sólo para el 44% de los cultivos microbianos probados por estos autores. Entre las cepas resistentes se encontraban dos especies de levaduras del género *Can-*

TABLA 3. Relación de hongos susceptibles a la cuproclorofila

Clave	Inhibición	Clave	Inhibición
CA-A	C	SC	A
CA-1	A	RR	A
CK	A	BB	-
CG	-	PL	-

- No halo de inhibición.

A Halo entre 8 y 13 mm de diámetro.

B Halo entre 14 y 18 mm de diámetro.

TABLA 4. Valores de CMI y CMB de cuproclorofila (%).

Cepa/Género	CMI	CMB
S.a ( <i>S. aureus</i> )	0,8	3,2
YE-1 ( <i>E. coli</i> )	1,0	2,0
YP-1 ( <i>P. aeruginosa</i> )	0,8	2,0
YK-1 ( <i>K. pneumoniae</i> )	0,8	2,0
YP-2 ( <i>P. mirabilis</i> )	1,0	4,0
YC-1 ( <i>Citrobacter</i> sp.)	0,5	2,0
YS-1 ( <i>S. marcescens</i> )	1,0	2,0

*didá*: *C. albicans* y *C. utilis*, de las cuales la primera fue activa en el presente trabajo. Las discrepancias encontradas entre estos resultados y los de los autores citados pueden deberse al empleo de diferentes métodos de detección de la actividad antimicrobiana, ya que los autores emplearon el método de los discos de papel, y es sabido que siempre queda parte del compuesto a probar embebido en el papel del disco y por tanto, las concentraciones difundidas siempre son menores que las aplicadas al disco.

El método de diluciones seriadas en tubos con caldo, no pudo emplearse para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de este compuesto, ya que la fuerte coloración verde oscura de la cuproclorofila sólo permite distinguir la inhibición del crecimiento en concentraciones muy diluidas interfiriendo

con las lecturas al no permitir detectar la turbidez debida al crecimiento bacteriano, por lo que sólo se empleó para la determinación de las concentraciones mínimas bactericidas (CMB). Esta problemática ocurre con los productos pigmentados o con aquellos que ocasionan la formación de opalescencias como es el caso del propóleo por su poca solubilidad en el medio acuoso, trayendo como consecuencia la necesidad de emplear en estos casos el método de difusión radial en medio agarizado por las CMI.

### CONCLUSIONES

La cuproclorofila preparada a partir de la microalga *Chlorella* presenta actividad antibacteriana frente al 92% de las cepas probadas, con un amplio espectro de actividad antimicrobiana tanto frente a bacterias Gram positivas como a Gram negativas independientemente de su origen. Esta actividad bacteriostática se evidenció a concentraciones entre 0,5% (p/v) y 1,0% (p/v)

Es posible encontrar efecto biocida entre las cepas sensibles a concentraciones superiores que las bacteriostáticas.

### RECOMENDACIONES

Dados los resultados encontrados, es recomendable continuar con el estudio de la actividad antimicrobiana de este compuesto para definir los valores de CMI y CMB y CMF de las cepas bacterianas y fúngicas restantes, ya que ofrece perspectivas de uso terapéutico animal o humano.

### LITERATURA CITADA

- BUSH, K. 1999. B-lactamases: of increasing clinical importance. *Curr. Pharm. Des.* 5(11): 839-845.
- CUESTA O., A. CUELLAR, N. ROJAS, H. VELEZ, R. RASTRELI y R. AQUINO. 1999. A polyisoprenilated benzophenone from Cuban propolis, *J. Nat. Prod.* 62(7): 1013-1015.

- GINESTRE, M. 1999. Evaluación de la resistencia de Bacilos Gram negativos a betalactámicos: Un estudio de seis años. *Kasmera* 27(2): 53-59
- INOUE C. y Y NISHIMURA 1990. Production of chlorophyll preparation. Patente No. JP02083329-19900323, Japan.
- JATEM LASSER A., M.M. RICARDI y G. ADAMO 1998. Herbal traditional medicine from Venezuela Andes: an ethnopharmacological study. *Phytotherapy Research (UK)*, 12 (supplement): s53-s59.
- MECKES M., M.L. VILLARREAL, J.TORTORIELLO, B. BERLIN y E.A. BERLIN 1995. A microbiological evaluation of medicine plants used by the Maya people of Southern Mexico. *Phytotherapy Research, (UK)* 9(4): 244-250
- MECKES M., J. TORRES, F. CALZADA, J. RIVERA, M. CAMORLINGA, H. LEMUS y G. RODRÍGUEZ 1997. Antibacterial properties of *Helianthemum glomeratum*: a plant used in Maya traditional medicine to treat diarrhoea. *Phytotherapy Research. (UK)* 11(2): 128-131
- MONGELLI E., C. DESMARCHELIER, J. COUSSIO y G. CICCIA 1995. Antimicrobial activity and interaction with DNA of medicinal plants from the Peruvian Amazon region. *Rev Argent Microbiol (Oct-Dec)* 27(4):199-203
- NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that growth aerobically, M7- A4, NCCLS, 771, Villanova, PA.
- RAM S. 2000. Prevalence of multidrug resisten-organisms in an intensive care burn unit. *Indian. J. Medical. Res. Apr.*111: 118-120
- ROMERO L. T. 1998. Tecnología de cultivo de *Chlorella vulgaris* en los afluentes líquidos de la industria pesquera y subproductos derivados. Anais dos IV Congresso Latino-americano de Ficología, II Reuniao Ibero-americana de Ficología e VII Reuniao Brasileira de Ficología, Sociada de Ficología da America Latina e Caribe, pp: 475-495
- ROMERO L. T. y L. H. ECHEVARRIA 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.

- ROMERO L. T y M. PEREZ 1999. Grado de sensibilidad de organismos patógenos a la cuproclorofila. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas de la Univ. De Zulia, Maracaibo, Venezuela, 33 (1): 1-13
- TALWANI R. y J. A. HORVARTH 2000. Tuberculosis peritonitis in patients undergoing continuous ambulatory peritoneal dialysis: case report and review. Clin. Infet. Dis. 31 (1): 70-75.