

Laboratorio de Medicina Herbaria

CREMA EPITELIZANTE DE CLOROFILA, CAROTENOS Y VITAMINAS APLICADA EN HERIDAS ABIERTAS EXPERIMENTALES

Dr. Mario González-Quevedo Rodríguez,¹ Dra. María C. Sotolongo Baró,² Lic. Rolando Quert Álvarez,³ Lic. Aida Corral Salvadó⁴ y Dra. Mirta Batista Veranes⁵

RESUMEN

La crema con 5 % de un concentrado de clorofila, carotenos y vitaminas, extraído de *Pinus caribaea* Morelet, fue aplicada diariamente sobre heridas abiertas en ratones Balb/c durante todo el período de regeneración hística. El examen de las biopsias tomadas a los 21 días de realizadas las heridas dio como resultado una epitelización altamente significativa al compararlas con las del grupo control.

DeCS: PLANTAS MEDICINALES/uso terapéutico; EXTRACTOS VEGETALES/uso terapéutico; HERIDAS Y TRAUMATISMOS/terapia; HERIDAS Y TRAUMATISMOS/ patología; CLOROFILA/uso terapéutico; CAROTENO/uso terapéutico; VITAMINAS/ uso terapéutico; CICATRIZACION DE HERIDA; RATONES CONSANGUINEOS BALB C.

La clorofila es el pigmento verde de las plantas que por fotosensibilización toma energía de los rayos solares para formar los azúcares, grasas y proteínas necesarios para su desarrollo, a partir del gas carbónico atmosférico y de los nitratos y agua de la tierra. Durante este fenómeno, conocido como fotosíntesis, la planta entrega oxígeno al aire circundante.

En la actualidad la fotosensibilización con productos derivados de la hemato porfirina se utiliza en medicina como tera-

pia antitumoral.¹ Esta práctica se conoce con el nombre de terapia fotodinámica. Hay algunos autores que han investigado la acción antitumoral de productos de clorofila en modelos de animales.²⁻⁵

Todas las plantas con clorofila poseen pigmentos carotenoides y vitamina C. Los beta-carotenos con los alfa y gamma-carotenos son muy abundantes en las hortalizas,⁶ que una vez ingeridas se convierten en vitamina A en las células hepáticas. Esta vitamina es imprescindible para

¹ Doctor en Ciencias Médicas. Investigador Titular.

² Especialista de I Grado en Anatomía Patológica. Investigadora Agregada.

³ Licenciado en Química.

⁴ Licenciada en Farmacia.

⁵ Médico Veterinario. Especialista en Bioestadística.

el normal crecimiento de las células corporales y en particular de los epitelios. Cuando la vitamina A está en déficit, los epitelios se estratifican y se queratinizan, lo que facilita la acción de los hongos y bacterias.⁷

En la década de los 30, dado el alto contenido de vitamina A que el aceite de hígado de bacalao posee, se comenzó a aplicar sobre heridas abiertas con el fin de estimular el crecimiento histico.⁸

*Seifter y Rettura*⁹ consideran que la vitamina A y principalmente los beta-carotenos tienen una acción antiulcerogénica en aquellos pacientes que necesitan tomar altas dosis de ácido acetilsalicílico. Es posible que la acción regeneradora epitelial de esos productos evite las lesiones de la mucosa gastroduodenal en esos pacientes.

Por otro lado, en estudios experimentales fue comprobado que los beta-carotenos tienen un efecto protector en el modelo de sepsis intraabdominal,¹⁰ y que producen además una mayor resistencia a las heridas, a los 5 días de evolución.¹¹

Rojas y otros,¹² estudiaron en la sangre de pacientes con úlceras crónicas de las piernas de difícil cicatrización los niveles de carotenos, vitaminas A y E, además de algunos microelementos, y detectaron que estaban por debajo de los valores normales, bien por consumo o por una nutrición deficiente.

Recientemente *Blacky Mathews-Roth*¹³ publicaron que los carotenos y en especial, los beta-carotenos son capaces de inhibir la fotocarcinogénesis por radiación ultravioleta en animales, mediante un mecanismo de atrapamiento de oxígeno que disminuye la oxidación y ruptura de las cadenas de queratina del estrato córneo de la piel, e impide que dicha radiación penetre a capas más profundas y afecte las células diana.

Existen muchas patentes de medicamentos y cosméticos que contienen beta-carotenos y clorofila, combinados o no.¹⁴⁻¹⁹

Otras incluyen la acción anticancerígena de los alfa-carotenos,²⁰ y numerosas pastas dentales y desodorantes con clorofila se comercializan en el mercado.

Entre las muchas propiedades de la vitamina C hay una relacionada con la presente investigación, su participación en la síntesis de hidroxiprolina, necesaria para la formación de colágeno. Su deficiencia produce retardo de la cicatrización en las heridas y quemaduras y en la formación del callo óseo de las fracturas. Esta vitamina también posee propiedad antioxidante, interviene en la absorción de hierro y en la maduración de los eritrocitos, así como aumenta el título del complemento en la sangre, entre otras funciones.

La vitamina E participa en la formación de la sustancia intercelular del tejido conectivo, en la formación y actividad del epitelio y en el metabolismo de las proteínas, hidratos de carbono y grasas. Actúa también como antioxidante, además de poseer otras propiedades no menos importantes.

Todos los elementos antes mencionados, clorofila, carotenos y vitaminas C y E, están contenidos en la crema objeto de estudio (crema CCV). Como hipótesis de trabajo se planteó que la clorofila a causa de su actividad anabólica en las plantas, es capaz de ejercer alguna acción estimulante sobre la regeneración celular, particularmente sobre la epitelial, la que sumada a las reconocidas acciones restauradoras de los carotenos y vitaminas C y E pudieran sinérgicamente dar lugar a una cicatrización más rápida y de mejor calidad.

MÉTODOS

La crema CCV fue preparada en el Laboratorio de Medicina Herbaria del Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto", con una base hidrosoluble que contiene 5 % de un concentrado

obtenido a partir de las ascúculas de *Pinus caribaea* Morelet según técnica de Quert y otros (Quert Álvarez R, Martínez JM, Gelabert F. Obtención de extractos naturales del follaje de *Pinus caribaea*. Parte II. Informe parcial del experimento 004-35-07-01. Instituto de Investigaciones Forestales, 1992). El análisis químico del concentrado mostró: 48 mg% de clorofila "a", 105 mg% de clorofila "b", 2,80 mg% de beta-carotenos, 17,7 mg% de vitamina E, 7,7 mg% de vitamina D2 y además vitamina C.

A un total de 78 ratones UMRI, machos y con pesos entre 28 y 32 g, adquiridos en el Centro de Producción de Animales de Laboratorio de Cuba, se les practicó en cada dorso una herida abierta circular de 20 mm de diámetro, según técnica creada por el autor,²¹ y mediante tabla de números aleatorios fueron separados en 2 grupos de 39 animales cada uno (grupo control y grupo experimental).

A partir de las 24 h de realizarse las heridas, a los animales del segundo grupo se les inició el tratamiento con la crema CCV. Se les aplicó diariamente una fina capa sobre las áreas cruentas hasta la aparición de la costra, que solo permitió seguir aplicando la crema en sus bordes y en algún defecto ocasional de ella, hasta su caída y cierre total de las heridas al completarse la epitelización. Durante ese tiempo, los animales fueron expuestos a la luz solar indirecta, aproximadamente 10 h diarias y observados para anotar la evolución de sus heridas y precisar el día de aparición de las costras y de la epitelización total, además de otros signos locales o generales que podían aparecer en ese corto período.

Al término de los 21 días, los ratones fueron sacrificados para extirparles a cada uno un fragmento rectangular de piel con la cicatriz centrada. Los fragmentos una

vez fijados con formol neutro, se procesaron en el Departamento de Anatomía Patológica, donde los cortes histológicos fueron teñidos con los colorantes hematoxilinaeosina y Van Giesson.

Para el diagnóstico se siguió el criterio de los 3 grados de maduración que para este estudio de cicatrización posee el método creado por el autor y otros: grado I o de dermis inmadura, grado II o de dermis medianamente madura y grado III o de dermis completamente madura.²¹

En el estudio estadístico se aplicó la prueba de comparación de medias basada en el estadígrafo Z para el análisis de la variable "cierre total de la herida" y la prueba de chi cuadrado para evaluar "maduración dérmica", ambas con una significación del 95 %.

RESULTADOS

Durante los primeros días murieron 4 ratones en ambos grupos y quedaron 35 animales en cada uno. Las costras en el grupo tratado con la crema CCV se formaron precozmente a los 2 días, a diferencia del grupo control en que aparecieron a los 5 días, de modo similar a lo sucedido en otros estudios precedentes. En cuanto al color de las costras también hubo diferencias; las del grupo experimental se mostraron más oscuras que las del grupo control, con aspecto mantenido que recuerda al caramelo. Su caída ocurrió entre el oncenno y decimotercer días en ambos grupos, pero no sucedió así con la epitelización, que en el grupo tratado se adelantó en un número mayor de casos en los primeros 21 días (tabla 1).

Atendiendo a la calidad de maduración dérmica, no hubo diagnóstico de dermis inmadura en ninguno de los 2 grupos estudiados mientras que de dermis media-

TABLA 1. Cierre total del epitelio en las heridas de los grupos control y tratamiento con la crema CCV a los 21 días de evolución

Día de cierre	Grupo control	Grupo tratado
14	0	1
15	0	1
16	5	10
17	1	6
18	6	8
19	7	5
20	2	2
21	7	2
Totales	28	35

$p < 0,01$.

namente madura hubo 6 más en el grupo experimental que en el grupo control, de modo contrario al diagnóstico de dermis completamente madura en que hubo 6 menos (tabla 2).

En cuanto al peso, todos los animales aumentaron progresivamente sin aparición de complicaciones.

TABLA 2. Grados de maduración dérmica de las cicatrices en ambos grupos de estudio

Grados de maduración	Grupo control	Grupo tratado
I	0	0
II	5	11
III	30	24
Totales	35	35

DISCUSIÓN

Hubo 7 heridas del grupo control que no cerraron totalmente (tabla 1). Al com-

parar los resultados del cierre de las heridas entre grupo, el análisis estadístico mostró una diferencia altamente significativa ($p < 0,01$) a favor de las heridas tratadas con la crema CCV, lo que permite pensar que este producto pueda actuar como un buen epitelizante y cubrir con más rapidez el tejido de granulación neoformado de las excoriaciones y de las heridas abiertas superficiales.

De forma diferente ocurrió con la calidad de maduración dérmica, pues al hacer el análisis de los resultados con la técnica X2, no hubo diferencias significativas entre los grupos, lo que hizo obvio que la crema CCV es incapaz de actuar en ese sentido.

Los resultados obtenidos son importantes para el tratamiento de las heridas abiertas superficiales con retardo de la epitelización. La crema no se indica para las heridas abiertas profundas, que deben ser tratadas con productos estimulantes del tejido de granulación principalmente, como lo hace el *Aloe barbadensis* inyectable.²² En cambio, la crema de *Aloe barbadensis* al 50 % tiene una acción similar a la de la crema CCV, pues solo estimula el crecimiento epitelial.²³

Otra posibilidad de uso de la crema CCV es en la especialidad de Caumatología, ya que las quemaduras necesitan un cierre epitelial precoz y la formación prematura de costra, que en el caso de esta crema se hizo efectiva a los 2 días de ser aplicada en las heridas dérmicas del ratón.

SUMMARY

The cream with chlorophyll concentrate 5 %, carotenes and vitamins extracted from *Pinus caribaea* Morelet was daily applied on open wounds in inbred Balb/c mice during the whole period of histic regeneration. The examination

of the biopsies taken 21 days later showed a highly significant epithelization on comparing them with those of the control group.

Subject headings: PLANTS, MEDICINAL/therapeutic use; PLANT EXTRACTS/therapeutic use; WOUNDS AND INJURIES/pathology; CHLOROPHYLL/therapeutic use; CAROTENE/therapeutic use; VITAMINS/therapeutic use; WOUND HEALING; MICE, INBRED BALB C.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Evrard S. Photodynamic therapy in oncological digestive tract surgery. *Press Med* 1991;20(38):1892-8.
2. Higashi-Okai K, Okai Y. Potent suppressive activity of chlorophyll a and b from green tea (*Camelia sinensis*) against tumor promotion in mouse skin. *Sabgyo Ika Daigaku Zasshi* 1998;20(3):181-8.
3. Higashi-Okai K, Otani S, Okai Y. Potent suppressive activity of pheophytin a and b from the non-polyphenolic fraction of green tea (*Camelia sinensis*) against tumor promotion in mouse skin. *Cancer Lett* 1998;129(2):223-8.
4. Magne ML, Rodríguez CO, Autry SA, Edwards BF, Theon AP, Madewell BR. Photodynamic therapy of facial squamous cell carcinoma in cats using a new photosensitizer. *Laser Surg Med* 1997;20(2):202-9.
5. Nakamura Y, Muraki A, Koshimizu K, Ohigashi H. Inhibitory effect of pheophorbide a, a chlorophyll-related compound on skin tumor promotion in ICR mouse. *Cancer Lett* 1996;108(2):247-55.
6. Fullerton E. *Farmacia práctica médica de Remington*. 10 ed. México, DF: UTEHA, 1993:1043-4.
7. Guyton A. *Tratado de Fisiología Médica*. 2 ed. La Habana: Instituto Cubano del Libro, 1966:857-8. (Edición Revolucionaria).
8. Fomon S. *Cirugía plástica y reparadora*. Buenos Aires: Labor, 1943:257-9.
9. Seifter E, Rettura G. Reduction of high dose aspirin toxicity by dietary vitamin A. USA: 1985 Patent 4491574.
10. Demetriou AA, Franco L, Bark S, Rettura G, Seiffer E, Levenson SM. Effects of vitamin A and beta-carotene on intra-abdominal sepsis. *Arch Surg* 1984;119(2):161-5.
11. Gerber LE, Erdman JW Jr. Effect of dietary retinyl acetate, beta-carotene and retinoic acid on wound healing in rats. *J Nutr* 1982;112(8):1555-64.
12. Rojas AL, Phillips TJ. Patients with chronic leg ulcers show diminished levels of vitamins A and E, carotenoids, and zinc. *Dermatol Surg* 1999;25(8):601-4.
13. Black HS, Mathews-Roth MM. Protective role of butylated hydroxytoluene and certain carotenoids in photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol* 1991;55(5):707-18.
14. Rudov D. *Pharmacological cosmetic preparation*. USA: 1990 Patent 279984.
15. Noorlander D. *Non toxic germicide and healing compositions*. USA: 1987 Patent 4670263.
16. Chernomorsky SA. *Use an anorectal composition*. USA: 1989 Patent 4797392.
17. Mintz-Morris Y. *Ointment for the treatment of decubital ulcers*. USA: 1989 Patent 4847084.
18. Fiaschetti MG. *Dermal cosmetic composition and application therefor*. USA: 1989 Patent 4885157.
19. Schaeffer HA. *Methods of improved skincare and the treatment of dermatological conditions*. USA 1992 Patent 5124313.
20. Lion Corporation. [Alfa-caroteno como inhibidor del crecimiento de células cancerosas] Japón: 1989 Patente 0302421.
21. González-Quevedo Rodríguez M, Abela I, Hurtado de Mendoza J, Larionova M, López-Calleja C. Estudio preclínico de la acción cicatrizante que ejerce sobre las heridas abiertas los extractos inyectables elaborados con dos variedades de Aloe que crecen en Cuba. En: *Compendio sobre investigaciones del Aloe barbadensis Miller (sábila) cultivado en Cuba*. La Habana: Imprenta Dirección Política FAR, 1980:36-48.
22. González-Quevedo Rodríguez M, Martínez Carlés J, López Calleja C. *Aloe barbadensis* inyectable como estimulante de la cicatrización en heridas abiertas. Ensayo Clínico. En: *Compendio sobre investigaciones del Aloe barbadensis Miller (sábila) cultivado en Cuba*. La Habana: Imprenta Dirección Política FAR, 1990:36-48.
23. González-Quevedo Rodríguez M, Abín G, Wolff N, Batista M. Quemaduras dérmicas tratadas con una crema de *Aloe barbadensis* Miller cultivado en Cuba. En: *Compendio sobre investigaciones del Aloe barbadensis Miller (sábila) cultivado en Cuba*. La Habana: Imprenta Dirección Política FAR, 1990:36-48.

Recibido: 20 de julio del 2001. Aprobado: 30 de agosto del 2001.

Dr. Mario González-Quevedo Rodríguez. Laboratorio de Medicina Herbaria. Instituto Superior de Medicina Militar "Dr. Luis Díaz Soto". Avenida Monumental, Habana del Este, CP 11700, Ciudad de La Habana, Cuba.