

## Actividad citostática, citotóxica, antibacteriana y cicatrizante de extractos de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (pino macho)

Cytostatic, cytotoxic, antibacterial and healing activity of extracts from *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (male pine)

Betty Mancebo Dorvigny,<sup>I</sup> Ada Ivis Regalado Veloz,<sup>I</sup> Edinelson Lorenzo Hernández,<sup>II</sup> Susana Díaz Aguirre,<sup>II</sup> Elena Cordero Machado,<sup>II</sup> Luz María Sánchez Perera<sup>I</sup>

<sup>I</sup> Grupo de Desarrollo Biofarmacéutico. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Mayabeque, Cuba.

<sup>II</sup> Universidad de Pinar del Río. Pinar del Río, Cuba.

---

### RESUMEN

**Introducción:** el follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (Barret y Golfari) presenta una variada composición química y es una planta forestal de abundancia en Cuba, que puede ser utilizada para la obtención de productos con actividad biológica, proporciona beneficios económicos, sociales y ambientales.

**Objetivo:** evaluar el efecto citostático, citotóxico, antibacteriano y cicatrizante de cuatro extractos obtenidos del follaje verde de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (Barret y Golfari) (pino macho).

**Métodos:** se determinó el efecto citostático mediante el ensayo de inhibición de la germinación de semillas de *Solanum lycopersicum*. La toxicidad se evaluó mediante el ensayo de letalidad frente a *Artemia salina*. La actividad antibacteriana se determinó *in vitro* mediante la técnica de Difusión en Agar por la aparición de halos de inhibición frente a tres cepas de microorganismos patógenos. El efecto cicatrizante se evaluó en un modelo *in vivo* en heridas abiertas en ratas.

**Resultados:** los resultados del presente trabajo indican que tres de los extractos evaluados mostraron toxicidad en ambos ensayos, donde Clorofilina de sodio constituyó la fracción más promisoría. Los extractos sin diluir de Pasta Clorofila Caroteno y Concentrado provitamínico mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus*, con valores que se encuentran en el límite mínimo que se considera con actividad antimicrobiana. Se comprobó el efecto cicatrizante de la Pasta Clorofila Caroteno a una dosis de 150 mg/mL.

**Conclusiones:** los resultados demostraron la actividad citostática y citotóxica de tres de los extractos evaluados. Los extractos de Pasta Clorofila Caroteno y Concentrado

provitamínico mostraron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y se demostró el efecto favorable de la Pasta Clorofila Caroteno en el proceso de curación de heridas abiertas, comparable a los efectos de medicamentos desarrollados con *Rhizophora mangle* L.

**Palabras clave:** *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (Barret y Golfari); actividad citostática; citotoxicidad; efecto antibacteriano; efecto cicatrizante.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (Barret y Golfari) foliage has a varied chemical composition and it is an abundant forest plant in Cuba, which can be used for the production of biological active products, it provides economic, social and environmental benefits.

**Objective:** to evaluate the cytostatic, cytotoxic, antibacterial and healing effect of four extracts obtained from green foliage of *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (Barret y Golfari) (male pine).

**Methods:** the cytostatic effect was determined using inhibition of germination of *Solanum Lycopersicum* seeds test. Toxicity was evaluated using *Artemia salina* lethality test. The antibacterial activity was determined in vitro using diffusion in agar technique by the appearance of inhibition halos against three strains of pathogenic microorganisms. The healing effect was evaluated performing an in vivo rat model in open wounds.

**Results:** the results of this study indicate that three of the tested extracts showed toxicity in both assays, where FI fraction was the most promising. Undiluted extracts of PCC and F-III showed activity against *Staphylococcus aureus*, with values considered in the lower limit for antimicrobial activity. The healing effect of the Carotene Chlorophyll Paste to a dose of 150 mg/mL was found.

**Conclusions:** the results demonstrated cytostatic and cytotoxic activity of three extracts evaluated. Extracts of Carotene Chlorophyll Caste and Provitamin Concentrate showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and the favorable effect of the Carotene Chlorophyll Paste in the healing process of open wounds was demonstrated, comparable to the effect of drugs developed with *Rhizophora mangle* L.

**Key words:** *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (Barret y Golfari); citostatic activity; citotoxicity; antibacterial effect; healing effect.

---

## INTRODUCCIÓN

El follaje que queda en el suelo del bosque aporta beneficios como el reciclaje de nutrientes y la protección del suelo contra la erosión, sin embargo, su acumulación excesiva en los bosques puede suscitar problemas como mayor riesgo de enfermedades e incendios forestales. En este sentido resulta importante evitar que la acumulación de este recurso pase a convertirse en un agente contaminante del medio ambiente.<sup>1</sup>

En el follaje de las especies forestales se encuentra una composición variada de excelentes propiedades, muchas de ellas con actividad farmacológica cicatrizante, insecticida, antimicrobiana y antioxidante. La mayoría de las especies constituyen fuentes de energía para la alimentación tanto humana como animal, y otras sirven como cofactores o coadyuvantes de diversas funciones biológicas y son necesarios para el crecimiento normal y el mantenimiento de la vida en los animales, entre ellos el hombre.<sup>2</sup>

El aprovechamiento de Recursos Naturales no Maderables (RNNM) o Productos Forestales no Madereros o Maderables (PFNM) es una opción interesante para la conservación y el desarrollo sustentable de los bosques.<sup>3</sup> Los PFNM y su correspondiente utilización han tomado más auge, ya que el uso y reciclaje de los residuos forestales constituye una vía factible para el desarrollo de nuevos productos de alto valor agregado y en particular el follaje, posterior a la tala de los árboles, representa una fuente de biomasa aprovechable para la obtención de derivados como: ceras, extractos vegetales y residuos forrajeros. El método más rápido y перспекivo para la utilización del follaje es el tratamiento químico que permite obtener alimentos, sustancias biológicamente activas y diferentes productos para múltiples usos.<sup>4,5</sup>

Los biopreparados obtenidos a partir de extractos del follaje de especies forestales contienen altos niveles de clorofilas y carotenoides, por lo que poseen una amplia gama de aplicación en diferentes campos como la industria farmacéutica, la cosmética y la medicina veterinaria. A la especie *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (Barret y Golfari) se le han descrito usos en la hemorragia posparto, en el tratamiento de la impotencia, la estimulación del sistema inmune, así como antibacteriano, antitumoral y antiviral.<sup>6</sup> Además, se conoce que el follaje de *P. caribaea* presenta una variada composición química constituida por 32,56 % de compuestos neutrales y 67,44 % de ácidos libres; donde los ácidos grasos palmítico, oleico, linoleico y linolénico representaron más de 80 % del total de ácidos grasos presentes. La actividad biológica de estas sustancias ha sido informada por algunos investigadores.<sup>7,8</sup>

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto citostático, citotóxico, antibacteriano y cicatrizante de cuatro extractos obtenidos del follaje verde de *P. caribaea*.

## MÉTODOS

### Material vegetal

La colecta del follaje de *P. caribaea* se realizó en la unidad silvícola (US) de Viñales de la Empresa Forestal Integral del municipio de viñales (EFI), Pinar del Río. Una muestra de la planta en estudio se depositó en el herbario de la Universidad de Pinar del Río con el número de voucher UPR-03. Se recolectaron 30 kg de follaje de 30 árboles, entre los meses de octubre y noviembre de 2012. El follaje verde se trasladó al Laboratorio de investigaciones del Centro de Estudios Forestales de la Universidad de Pinar del Río donde se desfibró en un molino de martillo para facilitar la extracción de los componentes activos.<sup>5</sup>

### Obtención de los extractos

Los extractos obtenidos del follaje del *P. caribaea* fueron: Pasta Clorofila Caroteno (PCC), Clorofilina de sodio (F-I), Concentrado de ácidos grasos resinosos (F-II) y Concentrado provitamínico (F-III), se obtuvieron en el Centro de estudios forestales de la Universidad de Pinar del Río según la metodología de *Cordero y colaboradores*.<sup>9</sup>

### Evaluación del efecto citostático de los extractos mediante el ensayo de Inhibición de Germinación de Semillas de *Solanum lycopersicum*

La germinación de las semillas se realizó en placas petri con algodón húmedo (agua destilada) como sustrato para estimular la germinación a temperatura ambiente sin exposición directa al sol. Se mantuvo una observación periódica durante cuatro días hasta que las radículas alcanzaron 0,5 cm de longitud. Se depositaron siete semillas en cada placa a muestrear en iguales condiciones de germinación, a continuación se adicionaron los extractos a concentraciones de 1000, 100, 10 y 1 ppm, con tres réplicas de cada muestra, como control negativo se utilizaron semillas germinadas con agua destilada. Las placas se mantuvieron durante cuatro días a estas mismas condiciones y transcurrido este tiempo se realizó la lectura de la longitud de las raíces y se calculó el porcentaje de inhibición según las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Crecimiento} = \frac{\text{Long. Raíz con la muestra evaluada}}{\text{Long. Raíz en Control}} \times 100 \quad (\text{I})$$

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \% \text{ Crecimiento} \quad (\text{II})$$

Los resultados se interpretaron como:

- poco activos (+) cuando  $0 < \% I < 29 \%$ .
- activos (++) cuando  $30 < \% I < 59 \%$ .
- muy activos (+++) cuando  $60 < \% I \leq 100 \%$ .

### Evaluación de la toxicidad de los extractos mediante el ensayo de letalidad con *Artemia salina*

Se valoró la actividad tóxica *in vitro* de los extractos PCC, F-I, F-II y F-III mediante el ensayo de letalidad con *Artemia salina*.<sup>10-13</sup> Se evaluaron 4 concentraciones de cada extracto en un vaso de precipitado, con un volumen total de 10 mL de agua de mar natural se colocaron 10 larvas de *A. salina* y cada extracto a concentración final de 1 000, 100, 10 y 1  $\mu\text{g/mL}$ . Después de 24 h de contacto, se contaron las larvas que sobrevivieron. La toxicidad se expresó en valores de concentración letal media (CL-50) y se interpretó:  $\text{CL-50} > 1,000 \mu\text{g/mL}$  no tóxico,  $1000 < \text{CL-50} < 100 \mu\text{g/mL}$  moderadamente tóxico,  $100 > \text{CL-50} > 10 \mu\text{g/mL}$  altamente tóxico y  $\text{CL-50} < 10 \mu\text{g/mL}$  extremadamente tóxico. Las muestras se evaluaron por triplicado. Los resultados se procesaron mediante el programa Probit (STAFI 2009) donde se efectuó una regresión lineal (método de los mínimos cuadrados) para determinar la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>).

### Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos

La actividad antibacteriana de las sustancias en estudio se evaluó *in vitro* mediante la técnica de Difusión en Agar por la aparición de halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 y *Pseudomonas*

*aeruginosa* ATCC 9027. Las muestras se diluyeron en agua destilada para obtener concentraciones de 0,5 mg/mL, 1 mg/mL y se evaluaron además las muestras puras. El extracto F-I se diluyó en dimetilsulfóxido al 1 % y se evaluó la muestra pura y una concentración de 1 mg/mL.

Los microorganismos se sembraron en agar gelosa sangre 20 h antes de comenzar el ensayo. Las placas de agar sangre sembradas con 18 h de incubación, se revisaron para determinar las colonias características y después se adicionaron colonias a un tubo con solución salina estéril hasta que se llegó a una turbidez comparable con el tubo 2 o 3 de la escala Mac Farland ( $3 \times 10^8$  o  $9 \times 10^8$  UFC/mL). Se comprobó la pureza de los inóculos por medio de la Tinción de Gram. Para comprobar la pureza de los inóculos se realizaron 7 diluciones volumen seriadas 1:10 y se sembraron 0,1 mL de las diluciones en 2 placas de Triptona Soya Agar (TSA) y se diseminaron con ayuda de una varilla V. Las placas invertidas se incubaron 24 h a 37 °C.

La concentración del inóculo se determinó mediante la fórmula:

$$\text{UFC/mL} = \text{UFC p1} + \text{UFC p2} \times \text{dilución de siembra} \times \text{volumen de siembra} (10^1).$$

Se sembró 0,1 mL de cada inóculo en cada placa. Se perforó el agar con un orador estéril (se extrajeron los tacos de agar con una punta estéril). Se aplicó 100 µL de cada una de las muestras en los pocillos con cuidado para evitar la formación de burbujas. Se incubaron 1 h a 4 °C para lograr la predifusión y transcurrido este tiempo se incubaron a 37 °C por 24 h. Transcurrida la incubación se midió el diámetro de difusión de las muestras con una regla milimetrada.

#### **Evaluación del efecto cicatrizante de los extractos PCC y F-I en heridas abiertas en ratas**

Se emplearon 20 ratas machos *Sprague dawley*, adultas jóvenes, de 180-200 g de peso corporal, clínicamente sanos, procedentes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Los animales se alojaron de forma individual en cajas plásticas. Las condiciones ambientales del local de experimentación se controlaron cada día registrándose valores de temperatura y humedad relativa de  $22 \pm 2$  °C y 50 - 60 %, con un ciclo de luz/oscuridad de 12 x 12 h. El alimento y el agua se suministraron *ad libitum*. El presente estudio se realizó conforme a las reglamentaciones y principios éticos existentes para la investigación en animales.

Para la evaluación del efecto cicatrizante de los extractos se eliminó la posibilidad de presencia de infecciones secundarias en las heridas, se mantuvo los animales durante todo el ensayo en condiciones asépticas en un box con filtro bacteriológico de alta eficiencia antes sometido a desinfección mecánica y química. Los animales se anestesiaron en una cámara con éter dietílico, se empleó una dosis de 50 mg/kg y se provocaron 4 heridas a cada uno, utilizando un biótomo de 9 mm de diámetro. En este estudio sólo fue posible evaluar el extracto PCC y F-I debido a que los dos restantes se agotaron durante los estudios anteriores y quedaron pendientes para un estudio posterior. Las heridas se mantuvieron abiertas y se trataron de manera tópica cada 48 h, una vez al día con una dosis de 150 mg/mL de PCC y 100 mg/mL de F-I. Se decidió evaluar una dosis de PCC superior en busca de una dosis que mostrara un mejor efecto farmacológico al observado por *Murgia* en el 2010.<sup>5</sup> Con relación a F-I, es un extracto que no había sido estudiado con anterioridad, por lo que se propone esta dosis inicial para evaluar la presencia o no de efecto. Se aplicó un volumen de 0,5 mL de sustancia durante once días. Como control positivo se empleó el medicamento registrado CIKRON-V (formulación cicatrizante obtenida a partir del

extracto acuoso de la corteza de mangle rojo). Los grupos de tratamiento se muestran en la tabla 1.

**Tabla 1.** Grupos experimentales

| Grupos experimentales |                 |        |
|-----------------------|-----------------|--------|
| Grupo                 | Tratamiento     | N/sexo |
|                       |                 | Machos |
| Control negativo      | Agua destilada  | 5      |
| Control positivo      | CIKRON 24 mg/mL | 5      |
| Tratado PCC           | PCC 150 mg/mL   | 5      |
| Tratado F-I           | F-I 100 mg/mL   | 5      |

Los tratamientos por herida se distribuyeron de forma aleatorios, tal que estuvo presentes en las cuatro posiciones posibles. Cada grupo se conformó por 20 heridas.

Las heridas se identificaron durante el estudio de la forma siguiente:

- Anterior izquierda
- Anterior derecha
- Posterior izquierda
- Posterior derecha

Se realizó observación clínica diaria de todas las heridas antes de cada aplicación para explorar la posible presencia de inflamación, costra o exudado. Se analizó el aspecto de los bordes de la herida, reacciones adversas y coaptación. El tamaño de cada herida se midió al inicio (día cero), octavo, y oncenno día del estudio a través de la evolución del área (mm<sup>2</sup>) mediante el Sistema de Procesamiento Digital de Imágenes MADIP 3.0 Lab Lapdis del Hospital *Carlos J. Finlay*. Las imágenes se obtuvieron con una cámara fotográfica y una tarjeta digitalizadora Eyegraber.

#### Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el software IBM® SPSS versión 21. Como prueba de bondad de ajuste para comprobar la normalidad de los datos se empleó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Los datos se expresaron como media ± desviación estándar (DE) y se analizaron por ANOVA (análisis de varianza de una vía) seguido del test de Duncan para determinar las diferencias significativas entre los grupos tratados y el control negativo. Un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

La actividad citostática de los extractos se muestra en la tabla 2. Ninguno de los extractos estudiados mostró un porcentaje de inhibición con valores de ( $60 < \% I \leq 100 \%$  (+++)), que se corresponde al rango de los más activos. Sin embargo, el extracto F-I tuvo el valor más cercano al límite inferior de ese rango con 56 % para la menor concentración (1 ppm), lo que representó una acción fuerte a bajas concentraciones, seguido de la PCC con el 40 % de inhibición a esta misma concentración y a la concentración de 100 ppm, el extracto F-III con un 35 % para una concentración de 10 ppm y el extracto F-II mostró poca actividad en todas las concentraciones evaluadas.

**Tabla 2.** Inhibición de la germinación de semillas de *S. lycopersicum* por los extractos obtenidos del follaje de *P. caribaea*

| Muestras   | Promedio longitud raíz (cm) | % Crecimiento | % Inhibición | Clasificación |
|------------|-----------------------------|---------------|--------------|---------------|
| PCC-1000   | 0,50                        | 100           | 0            | +             |
| PCC-100    | 3,17                        | 59,95         | 40           | ++            |
| PCC-10     | 4,70                        | 69,63         | 30           | ++            |
| PCC-1      | 4,20                        | 59,93         | 40           | ++            |
| F-I-1000   | 0,50                        | 100           | 0            | +             |
| F-I-100    | 3,04                        | 57,43         | 43           | ++            |
| F-I-10     | 3,91                        | 57,99         | 42           | ++            |
| F-I-1      | 3,10                        | 44,35         | 56           | ++            |
| F-II-1000  | 0,50                        | 100           | 0            | +             |
| F-II-100   | 4,95                        | 93,62         | 6            | +             |
| F-II-10    | 5,33                        | 79,01         | 21           | +             |
| F-II-1     | 5,81                        | 82,99         | 17           | +             |
| F-III-1000 | 0,50                        | 100           | 0            | +             |
| F-III-100  | 4,00                        | 75,65         | 24           | +             |
| F-III-10   | 4,36                        | 64,62         | 35           | ++            |
| F-III-1    | 4,89                        | 69,80         | 30           | ++            |

El bioensayo de letalidad con *Artemia salina* mostró valores de CL-50 menores de 50  $\mu\text{g/mL}$  para el extracto F-I como se puede apreciar en la tabla 3.

**Tabla 3.** Valores de CL-50 de extractos de follaje de *P. caribaea* frente a larvas de *Artemia salina*

| Muestras | Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ ) | CL50 ( $\mu\text{g/mL}$ ) Toxicidad | Toxicidad            |
|----------|------------------------------------|-------------------------------------|----------------------|
| PCC      | 1                                  | 289,410                             | Moderadamente tóxico |
| F-I      | 1                                  | 11,318                              | Altamente tóxico     |
| F-II     | 1                                  | 983,835                             | Moderadamente tóxico |
| F-III    | 1                                  | 1954,784                            | No tóxico            |

Los resultados de la evaluación antibacterial mostraron que no hubo actividad antimicrobiana de las sustancias estudiadas frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans* en ninguna de las muestras evaluadas. Sin embargo, las muestras sin diluir de Pasta Clorofila Caroteno y de Concentrado de ácidos grasos y resinosos mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus*, con valores que se encuentran en el límite mínimo que se considera con actividad antimicrobiana (tabla 4).

**Tabla 4.** Diámetros obtenidos a partir de los ensayos con *Staphylococcus aureus*, determinantes de la susceptibilidad o resistencia

| Muestras | Concentración (µg/mL) | Diámetro promedio (mm) | Puntos de corte       |                      |
|----------|-----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|
|          |                       |                        | Susceptible (≥ 11 mm) | Resistente (≤ 11 mm) |
| PCC      | pura                  | 11,3                   | +                     | -                    |
|          | 1 mg/mL               | 0                      | -                     | +                    |
|          | 0,5 mg/mL             | 0                      | -                     | +                    |
| F-I      | pura                  | 0                      | -                     | +                    |
| F-II     | pura                  | 0                      | -                     | +                    |
| F-III    | pura                  | 11,6                   | +                     | -                    |
|          | 1 mg/mL               | 0                      | -                     | +                    |
|          | 0,5 mg/mL             | 0                      | -                     | +                    |

La evaluación del efecto cicatrizante de la PCC y el extracto F-I mostró de forma satisfactoria el estado clínico de las heridas sin reflejar ninguna alteración en la piel o lesiones provocadas durante todo el ensayo.

En la tabla 5 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la evolución del área de las heridas, al ser analizadas los días ocho y once, donde se puede observar que el grupo tratado con PCC presenta la mayor disminución del área de las heridas con diferencias significativas ( $p \leq 0,05$ ) con respecto al grupo control negativo. Por su parte el grupo tratado con el extracto F-I no mostró efecto en ninguno de los días analizados.



**Tabla 5.** Valores de área de las heridas en los días cero, ocho y once del estudio del efecto cicatrizante de los extractos PCC y F-I

| Grupos | (Área (mm <sup>2</sup> ))Día 0 | (Área (mm <sup>2</sup> ))Día 8 | (Área (mm <sup>2</sup> ))Día 11 |
|--------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| C-(-)  | 203,7905 ± 33,73654            | 42,681 ± 16,35142              | 11,8245 ± 5,23037               |
| C-(+)  | 177,774 ± 37,88615             | 29,3135 ± 11,47579*            | 6,6345 ± 4,42506*               |
| PCC    | 166,2905 ± 29,17266            | 32,7375 ± 14,68363*            | 5,4705 ± 4,72033*               |
| F-I    | 187,2475 ± 33,32611            | 50,9255 ± 14,17995             | 9,93 ± 4,90818                  |

Valores medios ± DE (n = 20). \*p < 0,05 comparado con el control negativo (*Test de Duncan*).

## DISCUSIÓN

El método para la evaluación de la letalidad en *Artemia salina*, así como el ensayo de inhibición de germinación de semillas de diversas especies vegetales como *S. lycopersicum*, se consideran un instrumento útil para la evaluación preliminar de toxicidad. Por la simplicidad de dichos procedimientos se utilizan para el monitoreo de toxicidad en extractos vegetales, así como en fraccionamientos biodirigidos.<sup>10,11</sup>

Los resultados del presente trabajo indican que tres de los extractos evaluados mostraron toxicidad en ambos ensayos. De los extractos evaluados se encontró que F-I constituye la fracción más promisoría para su evaluación posterior en modelos específicos *in vitro* e *in vivo* (sobre diversas líneas celulares tumorales y modelos experimentales en animales de laboratorio). Estos resultados coinciden con lo planteado por *Irahola* y colaboradores, así como otros autores sobre la analogía que existe entre la prueba de *Artemia salina* y la existencia de potencialidad de sustancias con propiedades antitumorales, antiparasitarias e insecticidas, debido a la existencia de una correlación positiva según el autor, entre la mortalidad de las larvas de *Artemia* y la citotoxicidad frente a las células causantes de carcinomas.<sup>10,12</sup> De igual forma, la actividad detectada a través de este ensayo puede ser considerada como un indicador de toxicidad frente a plagas de insectos y patógenos agrícolas y forestales. Si este efecto estuviese dado por derivados de ácidos grasos de cadena larga, presentes en los extractos evaluados, sobresaldría su actividad insecticida, ya que estas sustancias se consideran tóxicos estomacales de acción lenta, en particular efectivos frente a insectos tales como lepidópteros y *Leptinotarsa decemlineata* (escarabajo de la patata o dorífora). Los extractos PCC y F-II pudieran tener un efecto similar debido a su toxicidad moderada.<sup>13,14</sup>

Los extractos de PCC y de F-II mostraron actividad frente a *Staphylococcus aureus*, con valores que se encuentran en el límite mínimo que se considera con actividad antimicrobiana. Estudios previos desarrollados por *Murguía* y colaboradores, demostraron al evaluar el efecto antimicrobiano del extracto conífero apolar precursor de la PCC, que el mismo tuvo actividad frente a las bacterias Gram positivas: *Streptococcus Beta hemolítico* y *Staphylococcus coagulasa positiva*, sin embargo, no se observó halo de inhibición frente a la levadura *Candida albicans*, lo cual coincide con los resultados de este trabajo.<sup>5</sup> Los resultados del presente trabajo están en correspondencia con los reportados sobre actividad biocida de extractos naturales así como otros descritos en la literatura, como la actividad demostrada de extractos

alcohólicos de follaje de *Corymbia citriodora* y *P. caribaea* frente a algunos de los microorganismos que provocan biodeterioro en el patrimonio cultural (*Bacillus sp.*; *Bacillus cereus* *Enterobacter agglomerans*; *Bacillus polimixa*; *Streptomyces sp.*; *Pseudomonas fluorescens*; *Pseudomonas putida*; *Pseudomonas sp.*).<sup>15-18</sup> Se ha reportado el efecto antifúngico *in vitro* frente a hongos filamentosos de los extractos acuoso y alcohólico de hojas de pino macho (*P. caribaea*).<sup>6</sup>

Los resultados obtenidos hacen notar a la PCC con un efecto cicatrizante superior al del grupo control positivo (CIKRON), igual, se demuestra un efecto superior a resultados obtenidos por *Murguía* y colaboradores, debido a un aumento en la disminución del área de las heridas respecto a los resultados reportados por este autor, al aplicar un nivel de dosis superior y realizar el estudio en condiciones similares para aumentar dosis-respuesta de este extracto, se obtuvo efectos favorables por lo cual se propone continuar estudios para su aplicación con la dosis empleada en este trabajo científico.<sup>5</sup>

Diversos autores plantean que las clorofilas y los carotenos son importantes pigmentos de las plantas que favorecen el proceso de cicatrización. Los beneficios de la clorofila incluyen también un efecto cicatrizante, al contener vitaminas y minerales que regeneran los tejidos dañados por heridas, previene también la formación de nuevas cicatrices y el riesgo de infección. La presencia de clorofilas y carotenos en la pasta clorofila-caroteno tiene una relación directa con la actividad biológica de la misma.

Los resultados obtenidos coinciden con reportes previos de la literatura que destacan la actividad cicatrizante de una crema con 5 % de un concentrado de clorofila, carotenos y vitaminas, extraído de *P. caribaea* según *González-Quevedo* y colaboradores, a su vez otros autores destacan la importancia de la Pasta Clorofila Caroteno de diversas especies de coníferas dentro de las cuales se encuentra el *P. sylvestris* en cremas para heridas, quemaduras y piel dañada.<sup>17,18</sup>

Estudios previos realizados con la Pasta Clorofila-Caroteno sobre la actividad cicatrizante en quemaduras experimentales en ratas demostró el efecto de concentraciones de 2-4 % de la misma sobre la cicatrización y este proceso en relación con la peroxidación lipídica y el mejoramiento de la actividad antioxidante total del suero.<sup>19</sup> *Murguía* y colaboradores, demuestra la acción cicatrizante de la PCC en heridas provocadas en ratas y destaca la importancia de esta en la formulación adecuada para su utilización como medicamento natural.<sup>5</sup>

Los resultados obtenidos demuestran la actividad citostática y citotóxica de tres de los extractos evaluados. Los extractos de PCC y F-III mostraron actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y se demostró el efecto favorable de la PCC en el proceso de curación de heridas abiertas, comparable a los efectos de medicamentos desarrollados con *Rhizophora mangle* L.

Se recomienda que se realice una formulación adecuada de la Pasta clorofila-caroteno del follaje de *P. caribaea* que permita su empleo en la práctica médica, una vez que se realicen otros estudios, según las regulaciones nacionales para fitofármacos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Germonne K. Influencia del manejo forestal en la densidad de la madera de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* en la EFI Macurijes. Revista Científico Estudiantil Ciencias Forestales y Medio Ambiente. 2013;1(1).
2. Mancebo B, Sánchez LM, Díaz S, Bulnes C, Regalado AI, Medina A, et al. Efecto cicatrizante de la pasta de clorofila-caroteno de *Pinus caribaea* var. *caribaea* sobre heridas abiertas asépticas. Rev Cubana Plant Med. 2011;16(1):24-33.
3. Martínez Y, Fernández RR, Álvarez D, Barrero H, García M. Estimación del volumen potencial de aserrín en plantaciones de *Pinus Caribaea* Morelet var. *caribaea* en la Empresa Forestal Integral Macurije. CIGET. 2012;14(2):140-48.
4. MONOGRAFIA. Resina de pino: renovable y de gran versatilidad. 2010 [citado 14 Jun 2010]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos57/resina-de-pino/resina-depino>.
5. Murguía I. Evaluación de la acción antibacteriana, cicatrizante y biocida de extractos de follaje verde de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* y *Corimbia citriodora*. Tesis en opción al título de ingeniero Forestal. Cuba: Universidad de Pinar del Río; 2010.
6. Fernández F, Marín JE, Teixeira Z, Carvalho MM, Escalona JC. Evaluación de las condiciones de extracción por hidrodestilación-cohobación del aceite esencial del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea* (droga seca). Rev Cubana Quím. 2013;25(1):100-8.
7. Díaz S, Alessandrini M, Herrera A. Comportamiento del follaje de *Pinus caribaea* var. *caribaea* y *Pinus tropicalis* en el desarrollo de una metodología para la obtención de cera conífera, pasta clorofila-caroteno y residuo forrajero a escala de banco. Rev Cubana Química. 2007;19(1):81-3.
8. Cordero E, Carballo LR, Orea U. Composición química del residuo del follaje de *P. caribaea* Morelet var. *caribaea*, *E. Citriodora hook* y *E. Saligna smith* con fines para la alimentación animal. CIGET. 2005 [citado 7 May 2013];7(3). Disponible en: <http://www.ciget.pinar.cu/Revista/No.2005-3/follaje.htm>.
9. Cordero E. Influencia de la época del año en el contenido de sustancias extraíbles y rendimiento de los productos con actividad biológica que se obtienen del follaje de *Pinus caribaea* Morelet var. *caribaea*, *Eucalyptus citriodora Hook* y *Eucalyptus saligna Smith*. Tesis Doctoral. Cuba: Universidad de Pinar del Río; 2001.
10. Yi Z, Jun M, Jinyuan H, Xiaojie G. An improved brine shrimp larvae lethality microwell test method. Toxicology Mechanisms & Methods. 2012;22(1):23-30.
11. Paudel B, Bhattarai H, Kim I, Lee H, Sofronov R, Ivanova L, et al. Estimation of antioxidant, antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of plants collected from Oymyakon region of the Republic of Sakha (Yakutia), Russia. Biol Res. 2014;47(1):10-20.
12. Irahola P, Gimenez A. Inhibición de germinación de semillas y toxicidad en *Artemia Salina*, como indicadores de actividad antitumoral. BIOFARBO. 2000;8:81-5.

13. Jegathambigai N, Rusli I, Sreenivasan S. Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of Methanol Extract of *Mentha Spicata* L (Lamiaceae). Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 2014;13(1):101-7.
14. Guiamet PS, Gómez de Saravia SG, Arenas P, Pérez ML, De la Paz J, Borrego SF, et al. Natural products isolated from plants used in biodeterioration control. Pharmacology online. 2006;3:537-44.
15. De la Paz J, Guiamet P, Gómez de Saravia S. Evaluación fitoquímica de extractos naturales de *Eucalyptus citriodora* y *Pinus caribaea* con actividad biocida. BLACPMA. 2009;8(5):445-8.
16. González-Quevedo M, Sotolongo Baró MC, Quert Álvarez R, Corral Salvadó A, Batista Veranes M. Crema epitelizante de clorofila, carotenos y vitaminas aplicada en heridas abiertas experimentales. Rev Cubana Med Milit. 2001;30(4):236-40.
17. Gómez de Saravia SG, de la Paz J, Guiamet P, Arenas P, Borrego SF. Biocide activity of natural extracts against microorganisms affecting archives. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat. 2008;7(1):25-9.
18. Hasamnis AA, Mohanty BK, Muralikrishna S. Evaluation of wound healing effect of topical phenytoin on excisional wound in albino rats. Pharmacology. 2010;2(1):59-62.
19. Betancourt Villalba I. Estudio de la actividad cicatrizante de la Pasta de clorofila caroteno obtenida del *Pinus caribaea* var. *caribaea*. Trabajo de Diploma. Centro de Investigaciones y Evaluaciones Biológicas. La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana; 1997.

Recibido: 9 de marzo de 2015.

Aprobado: 16 de octubre de 2015.

*Betty Mancebo Dorvigny*. Grupo de Desarrollo Biofarmacéutico. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Mayabeque, Cuba.  
Correo electrónico: betty@censa.edu.cu