

Caracterización y usos del biogel del Balneario San Diego de los Baños, Cuba.

AUTORES. Maritza Pérez¹, Genoveva Popowski², Georgina Pérez¹, Hugo Alonso¹.

¹Centro de Estudios de Productos Naturales. Facultad de Química. Universidad Habana
Tel (537) 8702102. Email: maritza@fq.uh.cu o maritzcu@yahoo.es

² Centro Nacional de Termalismo "Víctor Santamarina". Ciudad Habana. MINSAP.
Teléfono(537) 453599, e.mail:popowski@infomed.sld.cu

RESUMEN. Se exponen los resultados obtenidos del análisis químico y biológico del biogel obtenido en las aguas de la piscina El Templado del Balneario San Diego de los Baños, Cuba. La cianobacteria *Leptothrix subtilissima* Kütz es la cianobacteria productora de este biogel, con un 87% de azufre elemental y evidencias de polisacáridos, magnesio, calcio y proteínas. Sin presencia de irritabilidad dérmica ni oftálmica, ni toxicidad aguda. Se describe el proceso de secado al cual fue sometido el material. El polvo fue utilizado en la elaboración de un jabón de tocador, en la producción de una crema y aceite de masajes de los cuales se ofrecen los beneficios terapéuticos y cosmetológicos, así como de los usos potenciales de esta cianobacteria en biomedicina, como biofertilizante en la agricultura y en el propio balneario dadas sus propiedades biológicamente activas.

Palabras claves. Microalgas, yacimiento termal, bioactivos, productos naturales.

ABSTRACT.

The results obtained in the chemical and biological analysis of the biogel of San Diego de los Baños SPA, are discussed. The cyanobacteria *Leptothrix subtilissima* Kütz, is the one that produces this biogel that contain 87% of elemental sulfur, polysaccharides, magnesium, calcium and proteins. This work describe the process to obtain a powder with biological activity, used to produce soaps, creams and massage oil to be utilized in this SPA. This cyanobacteria has other potential uses in biomedicine and agriculture (biofertilization).

Keywords: Microalgae, thermal field, bioactives, naturels products.

INTRODUCCION

Las algas son organismos con los que el hombre ha estado en contacto durante sus ya miles de años de historia vivida. El interés despertado por las algas no sólo se fundamenta en el uso tradicional que se les ha dado como fuente alimenticia en muchos países asiáticos, sino también en la variedad de propiedades biológicas que se han descubierto y que aún hoy continúan asombrando a los científicos en todas partes del mundo (Jimenez-Escrig y Goni Cambrodon, 1999).

En lo referido a sus propiedades biológicas, se han acumulado muchos trabajos durante los últimos años que enriquecen este tópico. Posiblemente este gran interés se sustente

en las ventajas que ofrece la búsqueda de los compuestos responsables de tales propiedades biológicas de las algas, en comparación con otros organismos. Las algas son fuentes naturales fácilmente renovables y de fácil acceso, unido al hecho de que es posible cultivarlas bajo condiciones controladas, de establecimiento. Adicionalmente, son muy poco tóxicas, lo que facilita su uso en la industrias farmacéutica y alimenticia. (Grabley y Thiericke, 1999).

Las fuentes termales, salinas y ciertos ecosistemas donde prevalecen condiciones extremas del medio como cambios bruscos de temperatura, salinidad, ph, concentración elevadas de determinadas sustancias (azufre, arsénico, hierro, carbonatos, bicarbonatos, magnesio, calcio entre otros) tienen determinadas ventajas en este campo de la cosmetología, ya que las cianobacterias que habitan en estos medios son cepas resistentes y producen sustancias termotolerantes.

Algunas microalgas y cianobacterias han sido explotadas en la cosmetología, ya que han desarrollado un sistema adaptativo diferentes a las existentes en los vegetales terrestres, que les permite producir una serie de moléculas orgánicas como: pigmentos naturales (ficocianina, ficoeritrina, carotenoides liposolubles, clorofilas, β caroteno, cantoxantina y astaxantina); antioxidantes naturales: vitaminas C, E y superoxidismutasa; ácidos grasos polinsaturados: EPA, DHA; proteínas: aminoácidos, proteínas selénicas; vitaminas, oligoelementos y alcaloides y terpenos, entre otras.

Estas sustancias químicas se emplean en la industria farmacéutica y cosmética, por sus propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes, desinfectantes, antifúngicas, antioxidantes, protectoras solares, antivirales, nutritivas, antiestrés. (Harvey, 2000)

Así estas microalgas y cianobacterias tienen un excepcional poder de penetración a través de la piel y una rápida asimilación en el organismo por los oligoelementos que poseen. Se nutren por ósmosis y retienen los elementos activos del acuatorio en que se encuentran, y los transfieren al medio sin perder ninguna de sus cualidades originales.

La atención hidrotermal no tiene solo funciones curativas, sino que se valoran, cada vez más, sus resultados preventivos y de rehabilitación. Los productos elaborados de estas fuentes termales van ganando en la actualidad un espacio más amplio.

Las fuentes termales de Cuba han sido poco estudiadas en lo que respecta a las microalgas que la habitan y al contenido de sus principios activos por lo que el presente trabajo investigativo tiene como objetivos caracterizar y evaluar biológica y químicamente el biogel que se produce en el balneario San Diego de los Baños, y las potencialidades que el mismo ofrece a la salud, la cosmética y la agricultura.

MATERIALES Y METODOS

Las microalgas fueron colectadas en la piscina El Templado del balneario San Diego de los Baños, ubicado en la provincia de Pinar del Río, en septiembre del 2001.

Las muestras de las microalgas fueron observadas vivas y procesadas siguiendo la metodología de Popowski y Borrero (1989). Las concentraciones de microalgas se expresan en cel/l.

El biogel, concentrado de la cianobacteria dominante, fue secada a temperatura ambiente durante 48 horas y pulverizada posteriormente para las pruebas toxicológicas y los análisis químicos.

El material biológico para las pruebas toxicológicas: Irritabilidad Dérmica, Irritabilidad Oftálmica y Toxicidad aguda fueron congelados y preservado hasta su utilización en los laboratorios de Control Biológico del Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), de Cuba según las normas ISO 10993-10:1998 y OECD (1987).

Para el análisis químico además se preparó una muestra sin contenido de azufre, que permitió determinar los componentes inorgánicos minoritarios enmascarados por el alto contenido de azufre en la misma mediante el método de extracción sólido-líquido. (Birg, 1963)

Los espectros infrarrojos con Transformada de Fourier fueron obtenidos en un Espectrómetro FTIR (USA) modelo MIDAC de la serie M- 2000 con detector DTGS y software Grams /32. Resolución de $\pm 4 \text{ cm}^{-1}$ en el rango de $4000 - 500 \text{ cm}^{-1}$. Las muestras se prepararon en pastillas de KBr (relación muestra: KBr 1:300), mortereando y homogenizando cuidadosamente la misma. La mezcla finamente triturada se prensa a 10 T durante cinco minutos hasta obtener un disco transparente.

El análisis Espectral de Emisión se realizó en un espectrógrafo PGS-2 de la firma Carl Zeiss, Alemana. Las muestras se mezclaron 1: 1 con polvo de grafito en un mortero de ágata, y 40 mg de esta muestra se colocaron en electrodos de grafitos. El material se excitó en un arco de corriente directa a una intensidad de 10 A hasta su total combustión. Los espectros se registraron en placas fotográficas. La identificación de los elementos se realizó por comparación de las líneas más sensibles de cada elemento.

Mediante la Espectroscopia Foelectrónica de Rayos X en un equipo Phillips XPERT se determinó el porcentaje de azufre en la muestra. La muestra y el patrón de azufre fueron preparados en forma de tabletas, utilizando ácido bórico como agente aglutinante.

Con el polvo fue elaborado un jabón dermocosmético, una crema, y un aceite para masajes con bases convencionales sometido a las pruebas de estabilidad según las normas nacionales (NC26-211:1999). Los análisis realizados fueron: desgaste del jabón por ablandamiento, índice de saponificación, rajadura en húmedo, contenido de álcalis libre, contenido de ácidos grasos e insaponificables, contenido de cloruros, contenido de materia insoluble y estudios de envejecimiento a 49°C, en ventana, en anaquel y envueltos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las aguas mineromedicinales sulfuradas suelen estar acompañadas de iones, tales como SO_4^{2-} , Cl^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , así como componentes minoritarios: Rn, As, Fe, Cu, Co, Si, F, etc., los cuales le confieren otras propiedades beneficiosas en las curas balnearias. (San Martín y Armijo-Castro, 1994).

Las aguas del balneario San Diego están clasificadas como sulfatadas cálcicas sulfhídricas, con una mineralización entre 2000-3000 mg/l y una temperatura entre 30 y 34°C. (Fagundo et.al.,2001)

El biogel de hilachas compactas blancas está constituido por un 94.4% de cianobacterias y un 5.57% de diatomeas (*Navicula* sp). Fig.1

La especie dominante es *Leptothrix subtilissima* con una abundancia de 13×10^6 cel/l, su tricoma es filamentosos, muy fino con división celular casi imperceptible, la terminación apical es truncada. Su color es verde amarillo. (Fig.2)

En los ensayos de Irritabilidad oftálmica después de aplicada la solución de microalgas en las estructuras oculares (córnea, iris y conjuntiva) se observó la presencia de eritema, edema y secreciones de grado I en los animales a la hora de aplicada la solución, a las 24 horas sólo se observó eritema y a las 48 horas esta lesión desapareció en todos los animales.

El índice de Irritación ocular calculado fue dos, por lo que la solución de la microalga *Leptothrix subtilissima* no presenta efectos tóxicos irritantes sobre la mucosa ocular.

En los ensayos de irritabilidad dérmica se observó la presencia de eritema en uno de los animales a las 24 horas. En las observaciones posteriores no se evidenciaron signos de irritación sobre piel, obteniéndose un índice de irritación primaria con un valor de 0.11 por lo cual se determinó que la solución de microalgas no presentó efectos tóxicos sobre la piel de los conejos.

Al administrar la sustancia de microalgas en el ensayo de Toxicidad aguda dérmica no se observó la presencia de síntomas tóxicos y al retirar el parche, no se encontraron alteraciones en la piel. No se presentó mortalidad en el período de observación, ni

decremento en el peso corporal en los grupos experimentales, durante el estudio. En la autopsia realizada no se encontraron evidencias en las alteraciones patológicas en los órganos analizados, al no presentar mortalidad a la dosis empleada la solución de microalgas se considera no tóxica.

Descripción de muestras.	Espectroscopia Infrarroja.	Análisis Espectral de Emisión.	Espectroscopia fotoelectrónica de Rayos X.
Muestra en polvo	Señales características de polisacáridos.	Ca	87 %de S
Muestra sin azufre.	Espectro del anión SO_4^{2-}	Ca (3), Al(2), Mg(2).	-

Tabla 1. Resultados del análisis instrumental.

La muestra en polvo de la cianobacteria se caracteriza por un alto contenido de azufre elemental (87%). Por otro lado, la muestra sin azufre mostró en el espectro infrarrojo las señales típicas del anión sulfato, infiriendo a partir del resultado del análisis de emisión que se trata de la sal sulfato de calcio, resultados lógicos dado el medio en que vive esta cianobacteria. (Tabla.1)

En el espectro fotoelectrónico de Rayos X se observa la coincidencia entre la muestra y el patrón de azufre y en el espectro infrarrojo se muestran un grupo de señales anchas y solapadas en la región de $1000\text{-}1100\text{ cm}^{-1}$ atribuibles a las absorciones de deformación de tensión de los grupos alcoholes (C-OH) y de éteres cíclicos (C-O-C, de 6 o más anillos) presentes en los compuestos polisacáridos que forman parte de las paredes celulares de la cianobacteria estudiada. (Fig. 3 y 4 respectivamente)

Además, presenta una débil señal de grupo carbonílico en 1735 cm^{-1} y un conjunto de bandas de intensidad media en la región de $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ que puede deberse a la presencia de proteínas en la microalga. (Fig.4)

En la muestra sin azufre el espectro infrarrojo mostró las señales típicas del anión sulfato y en el análisis espectral de emisión se determina como mayoritario el elemento calcio además de magnesio y aluminio, todo lo que infiere que el componente fundamental de esta muestra es una sal de sulfato de calcio. (Fig.5)

Estos elementos encontrados en la cianobacteria *Leptothrix subtilissima* nos permiten señalar el valor terapéutico y cosmetológico que le aportan a estas aguas y peloides de San Diego de los Baños, si tenemos presente que el azufre es un reparador de lesiones de la piel, al ser absorbido a través de ella tiene una acción estimuladora de los linfocitos, de la regeneración celular y de los linfoblastos por lo que estimula los mecanismos de defensa del organismo. Rodríguez (2002) sugiere que 100g de piel fresca contiene entre 0,74 y 2,48g de azufre elemental y que el 8% del peso de la cara es azufre, de ahí la potencialidad que representa *Leptothrix subtilissima* en las aguas del balneario San Diego de los Baños.

El azufre tiene preferencias sobre las articulaciones y es muy efectivo en los procesos osteomioarticulares; además se ha comprobado que contenidos en azufre pueden estimular enzimas que inhiben el crecimiento bacteriano. Las plantas requieren para su crecimiento de 16 elementos esenciales y el azufre es uno de ellos que se utiliza en cantidades medias entre un macro y un micronutriente, en la actualidad es muy utilizado y se considera de suma importancia en el crecimiento y rendimiento de los cultivos porque es parte constituyente de tres aminoácidos esenciales (cistina, cisteína y metionina) los cuales intervienen en la formación de varias proteínas. Este elemento participa también en la formación de clorofila y de aceites y en la síntesis de vitaminas. (Melgar,1999)

Hayashi et.al., 1996 y Hayashi y Hayashi,1996 han demostrado la actividad contra el virus del Herpes simplex y contra el virus de inmunodeficiencia humana de un polisacárido sulfatado natural en *Spirulina platensis* denominado spirulan de calcio. Freile (2001) cita estudios recientes sobre la inhibición de los mecanismos de coagulación de los polisacáridos sulfatados, donde se inhibe la acción de la trombina y que esta inhibición es directamente proporcional al peso molecular y al contenido de sulfatos del polisacárido; la presencia de polisacáridos sulfatado cálcico en esta microalga nos muestra otra potencialidad a explotar en este recurso termal.

El magnesio interviene en la mayoría de las funciones fisiológicas, se encuentra en las células oséas y tiene una acción beneficiosa sobre numerosas enfermedades infecciosas de origen microbiana y viral, es un regenerador tisular, desempeña un papel antiinflamatorio, antialérgico y antistress pero además actúa favorablemente en los trastornos circulatorios y cardiacos ocasionados por la disminución de depósitos cálcicos en arteriosclerosis. Calma todos los aumentos de la resistencia a la fatiga y de la actividad cerebral. Como la tasa de magnesio disminuye con la edad, un suplemento natural puede retardar el envejecimiento celular. Intervienen en la transmisión neuromuscular, contracción muscular y como cofactor de enzimas en la síntesis de proteínas y ácidos grasos.

El calcio por su parte, representa el 2% en el organismo y es indispensable en la osificación, sin él los huesos pueden ser frágiles. Mientras que el silicato de aluminio tiene poder cicatrizante y a él se le atribuyen el no dejar apenas señales en las cicatrices.

Las proteínas de las algas son fácilmente asimilables y garantizan una mayor nutrición favoreciendo la renovación y la reparación celular activando el metabolismo de las células.

Las propiedades activas de la cianobacteria, *Leptothrix subtilissima*, dominante en las aguas del balneario San Diego de los Baños permiten hacer uso de ellas como cataplasma, en tratamientos dentro de la propia piscina, y liofilizadas o secadas para elaborar bioproductos con propiedades biomédicas, cosméticas y de biofertilizantes, pero también para añadir en bañeras donde se busque producir un restablecimiento del equilibrio fisiológico, los oligoelementos que poseen las algas favorecen todas las funciones y todos los cambios biológicos que permiten a un organismo vivo funcionar armónicamente.

La experiencia realizada en productos dermocosméticos a escala de laboratorio en la obtención de un jabón, una crema y un aceite para masaje, nos permite afirmar su potencialidad de uso, así como que se hallan en los límites normales

En las pruebas de estabilidad realizadas al jabón de tocador utilizando como principio activo la cianobacteria al 1%, el porcentaje de desgaste y el rendimiento es comparable a otros jabones de tocador, el nivel de espuma producida fue igual al obtenido en otras formulaciones, lo que implica que el nivel de sólidos utilizados fue el adecuado. No se observaron rajaduras en húmedo, en las pruebas de envejecimiento no se observaron cambios de color.

Las cremas en envase de polietilenglicol duro son estables, en estudios realizados por un año, no se detectó afectación en el PH, el conteo de microorganismo se halló en los límites normales, no se detectó presencia de microorganismos patógenos, no tuvo cambio de color, no hubo índice de descomposición.

La preparación del aceite de masajes tuvo como inconveniente la poca solubilidad del polvo en el vehículo utilizado, por lo que quedaron partículas en suspensión.

CONCLUSIONES

- 1- El biogel de San Diego de los Baños está constituido por un 94.4% de cianobacterias. *Leptothrix subtilissima* es la especie dominante.
- 2- Esta cianobacteria se caracteriza químicamente por un alto contenido de azufre elemental (87%), con señales características de polisacáridos. Se evidencia la presencia del sulfato de calcio como componente mayoritario en la muestra tratada para la eliminación del azufre, además de magnesio y aluminio.
- 3- Las pruebas de estabilidad a escala de laboratorio indican la posibilidad de uso de esta cianobacteria al 1% como principio activo en la elaboración de jabón de tocador, crema y aceite de masaje.

- 4- De acuerdo con las propiedades químicas y las pruebas toxicológicas realizadas a este biogel tiene potencialidades de uso en la biomedicina, cosmética y como fertilizante en la agricultura.

REFERENCIAS

Birg, E. W., Physical and Chemical Methods of Separation. New York: McGraw-Hill Book Company, 1963., 60-62.

Fagundo, J.R., P. González, M. Suárez, J. Fagundo-Sierra, L. Sánchez, B. Peña y C. Melián. 2001. Origen de la composición química de las aguas del sistema hidrotermal San Diego de los Baños-Los Bermejales, Pinar del Río. En: Memorias del VII. Taller de la Cátedra de Medio Ambiente, ISCTN, La Habana. Soporte electrónico. 1-8

Freile, Y. 2001. Algas en la "botica". Avance y Perspectiva. Volumen 20:283-292.

Grabley S. y Thiericke R. 1999. The impact of natural products on drug discovery. *En: Drug discovery from nature.* Eds. Grabley S. y Thiericke R. New York, USA, Springer. 1-7

Hayashi, K.; Hayashi, T. And Kojima, I. 1996. A natural sulfated polysaccharide, calcium spirulan, isolated from *Spirulina platensis*: In vitro and ex vivo evaluation of anti-herpes simplex virus and anti-human immunodeficiency virus activity. *AIDS-Res.-Hum.Retroviruses* 12, 15:1463-1471.

Hayashi, T. and Hayashi, K. 1996. Calcium spirulan an inhibitor of enveloped virus replication, from a blue-green alga *Spirulina platensis*. *Journal Natural Product.* 59(1):83-87.

Harvey A. 2000 Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today.* 5:294-300.

Hedman, B., Frank, P., Penner-Hahn, J. E., Roe, A. L., Hodgson, K. O., Carlson, R. M.K., Brown, G., Cerino, J., Hettel, R., Troxel, T., Winick, H., Yang, J. 1986. Sulfur K-Edge X-Ray Absorption Studies Using the 54-Pole Wiggler at SSRL in Undulator Mode. *Nucl. Instr. and Meth.* A246: 797-800.

ISO 10993-10:1998. Biological Evaluation of Medical Devices parts 10. Test for irritation and delayed type hypersensitivity. 9-33.

Jimenez-Escrig A. y Goni Cambrodon I. 1999. Nutritional evaluation and physiological effects of edible seaweeds. *Arch. Latinoam. Nutr.* 49:114-120.

Melgar, R. 1999. Azufre disponible. La herramienta adecuada. *Fertilizar* N° 17:1-10

NC 26-211: 1999. Buenas Prácticas de Producción Farmacéuticas. 1-10

OECD 1987. Guideline for testing of chemical "Acute dermal toxicity" 402. 26pp

Pickering, I. J., George, G. N., Yu, E. Y., Brune, D. C. Tuschak, C., Overmann, J., Beatty, J. T., Prince, R. C. 2001. Analysis of Sulfur Biochemistry of Sulfur Bacteria Using X-ray Absorption Spectroscopy, *Biochemistry* 40: 8138-8145.

Popowski, G. y N. Borrero, 1989. Utilización de fijadores en flagelados y su aporte a la concentración del fitoplancton en el Golfo de Batabanó. *Reporte de Investigaciones* 11:1-8.

Potterat O. 1997. Antioxidants and free radicals scavengers of natural origin. *Current Organic Chemistry.* 1: 415-440.

Rodríguez,L. (2002). Belleza Natural con Recursos Termales. II Taller Científico Habanabel. Resúmenes. La Habana, marzo 13 al 17.
San Martín J. y M. Armijo-Castro. 1994. El azufre en las aguas mineromedicinales: aguas sulfatadas y aguas sulfuradas. *En: Curas Balnearias y Climáticas. Talasoterapia y Helioterapia*, Ed. Complutense, Madrid, 243-256.

FIGURAS

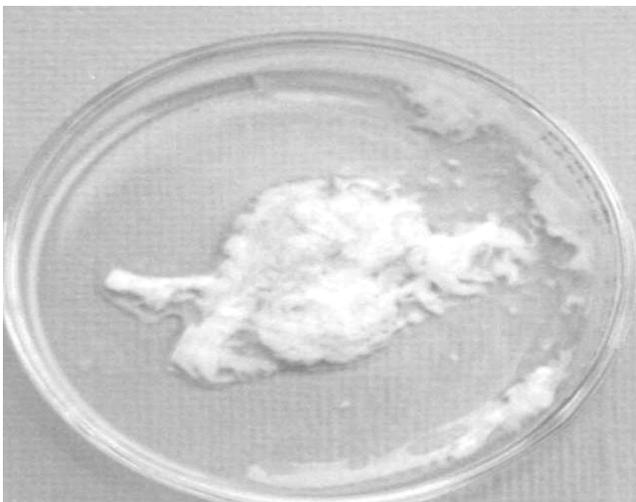


Fig. 1 Biogel obtenido en la Piscina El Templado del Balneario San Diego de los Baños.

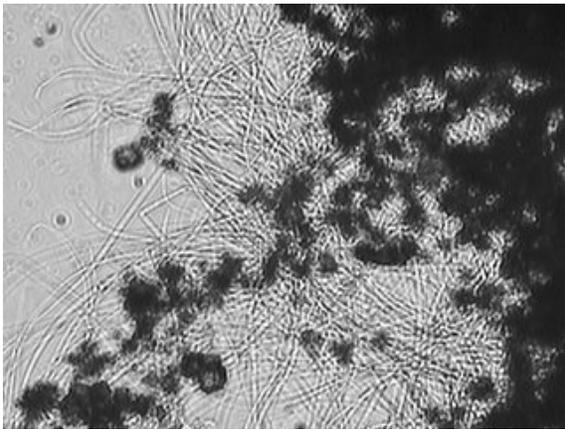


Fig. 2. Imagen a microscopía óptica de la cianobacteria *Leptothrix subtilissima*.

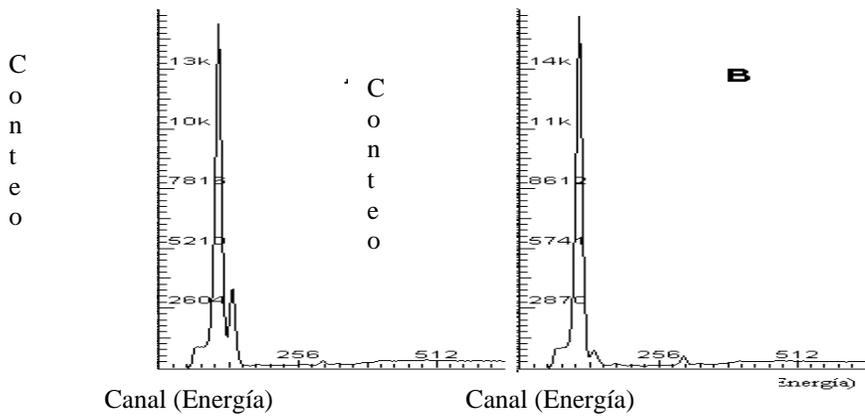


Fig. 3. Espectro fotoelectrónico de rayos x. A patrón de azufre y B muestra.

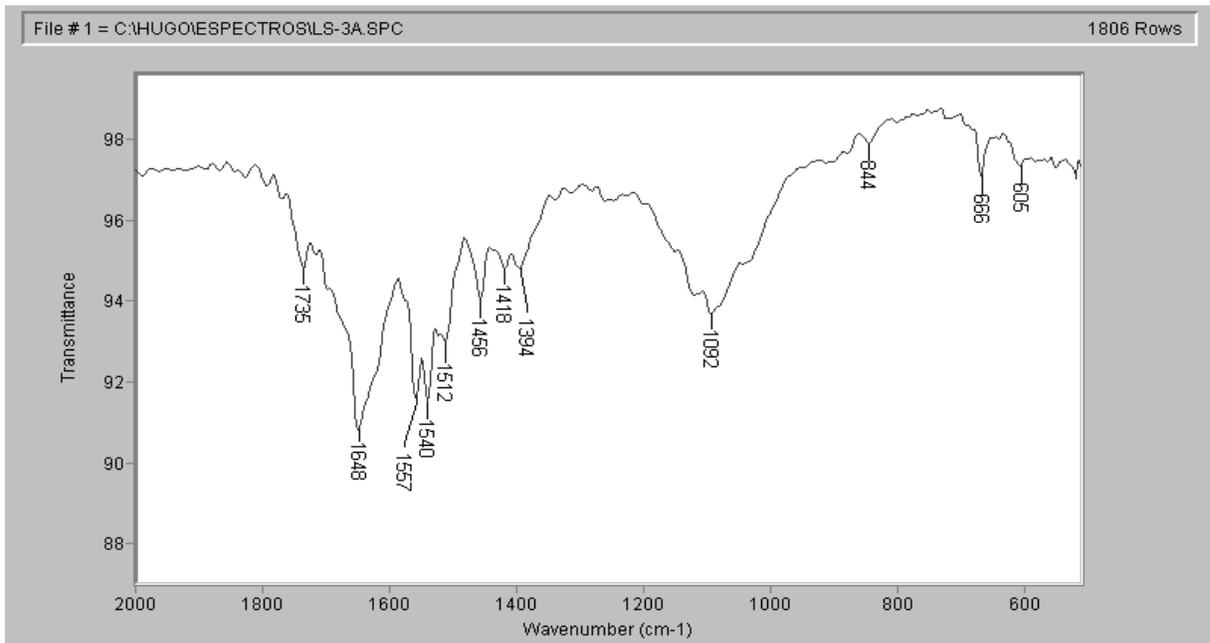


Fig.4. Espectro Infrarrojo de la muestra en polvo.

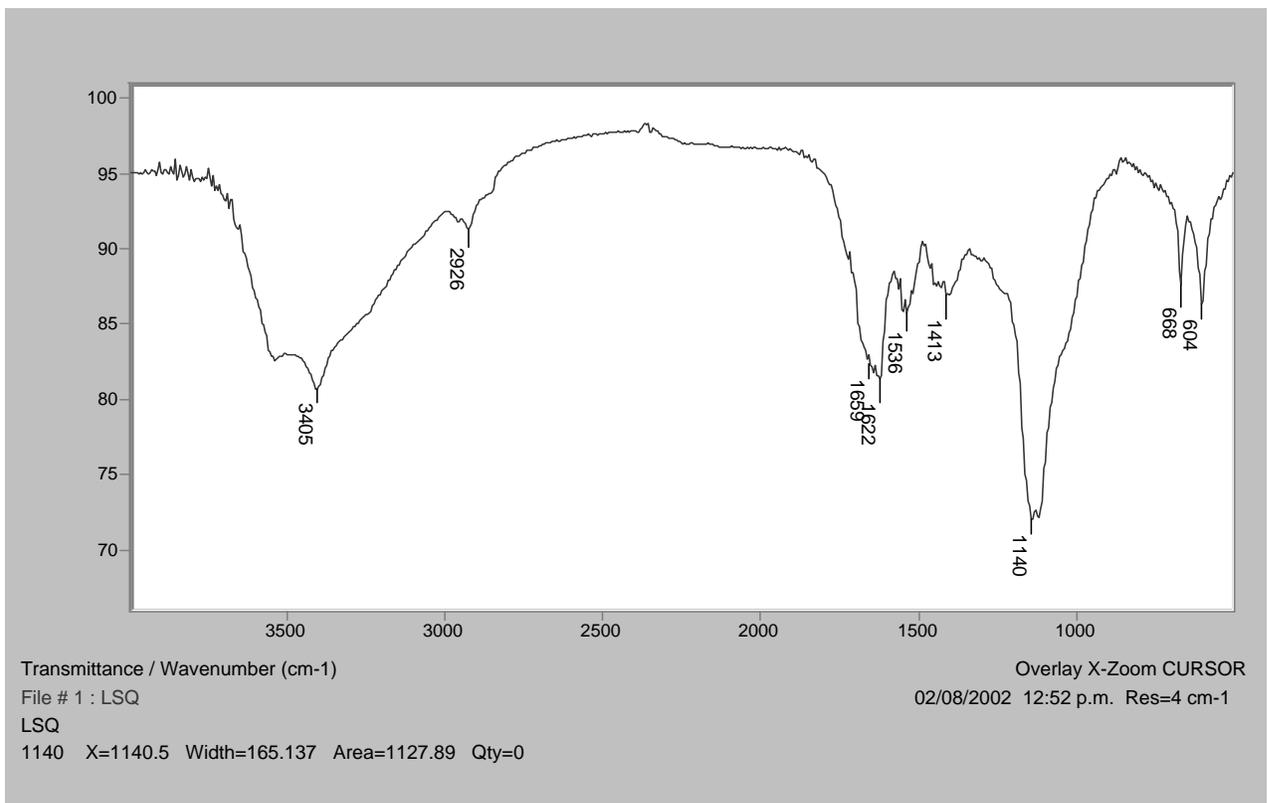


Fig.5. Espectro infrarrojo de la muestra sin azufre.