

# ENSAYOS BIOLOGICOS CON ALGAS TERMALES ARGENTINAS

*Promotores potenciales de crecimiento celular en Algas del Domuyo (Provincia de Neuquén, República Argentina).\** (Segunda parte)

JUAN ACCORINTI(\*\*) Y MARIA TERESA WENZEL

Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. (1428) Buenos Aires, Argentina.

## Resumen

Se investigó la presencia de promotores del crecimiento celular en matas algales seleccionadas y cosechadas en el Arroyo Aguas Calientes, en el área del Domuyo (Neuquén, Argentina). Los análisis cromatográficos demostraron la presencia de péptidos intracelulares, aminoácidos, derivados indólicos y ácidos nucleicos. Estas sustancias, potencialmente inductoras y aisladas de matas algales frescas, serían responsables de los rápidos efectos curativos al aplicarse directamente sobre la epidermis de pacientes con dolencias dermatológicas. El ecotipo más activo correspondió al definido como "verde-azulado" que incluye diferentes especies del género *Phormidium* y *Mastigocladus laminosus*. Los análisis comparativos entre los extractos de hidrólisis moderada y los de hidrólisis drástica demostraron que los péptidos detectados son de relativo bajo peso molecular y de estructura dimérica y biológicamente inactivos.

## BIOLOGICAL ESSAYS IN ARGENTINE THERMAL ALGAE

*2. Potential growth promoters in algae from Domuyo (Neuquen Province, Argentina).*

## Summary

Chromatographic screening of cellular growth stimulants were performed on selected cyanobacterial algal mats collected in the Aguas Calientes stream at the Domuyo area (Neuquén, Argentina). The analysis showed the presence of intracellular peptides, aminoacids, indol and nucleic acid derivatives. These potentially inductive substances would be responsible for the fast curative effects, previously obtained with fresh algal

**Palabras Claves:** Matas algales termales, Cyanophyceae, Cyanobacteria, promotores potenciales de crecimiento in vitro.

**Key words:** Thermal algal mats, Cyanophyceae, Cyanobacteria, potencial growth promoters in vitro.

\* Extensión del Proyecto nº EX-086,(UBA).

(\*\*) Lab. de Fisiología Vegetal. Dpto. de Ciencias Biológicas. Fac. de Ciencias Exactas y Naturales, Pab. 2, 4º piso,(1428) Buenos Aires. República Argentina.

mats, directly applied on damaged human skin. The most active ecotypes analyzed were the those called "bluish-green" which included different *Phormidium* species and *Mastigocladus laminosus*. The comparative analysis between moderately and drastically hydrolized products showed that the detected peptides probably have a dimeric molecular structure and biologically inactive.

## Introducción

Los efectos curativos obtenidos con matas algales frescas aplicadas sobre la piel enferma de pacientes con distintas dolencias fueron señalados por Alvarez<sup>(1,2,3)</sup> y serían debidos a un posible efecto antibiótico y a las propiedades simultáneas regenerativas de las matas algales de cianobacterias "verde azuladas". Los ejemplares de matas "rosadas", derivadas del anterior por exposición natural a temperaturas más elevadas, evidenciaron un efecto biológico menor. Estas propiedades antimicrobianas de los diferentes ecotipos de las matas algales fueron demostradas en los resultados de un trabajo anterior<sup>(4)</sup>.

La actividad antibiótica fue detectada frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, luego de extraer respectivamente los hidrolizados de los extractos de las matas algales con metanol, acetato de etilo y éter etílico. Las propiedades antibacterianas se relacionaron con el posible efecto sinérgico de ácidos orgánicos y fenólicos, mientras que los antifúngicos, muy activos, se atribuyeron a moléculas volátiles no saturadas.

Los extractos más activos de las matas algales normales incluyen cinco especies de *Phormidium*: *P. tenue* (Menegh.) Gom; *P. treleasei* Gom., *P. subuliforme* Gom., *P. fragile* (Menegh.) Gom. y *P. laminosum* (Ag.) Gom. y *Mastigocladus laminosus* Cohn en interacción con otras cianobacterias menos abundantes.

La existencia de un tercer ecotipo "blanco", sobreviviente en el hábitat bajo condiciones de temperatura extrema, sugiere la gradual destrucción de los pigmentos fotosintéticos y el empobrecimiento del contenido algal. La temperatura (65 °C) y el pH (7,7) alcalino del agua del arroyo produciría la lixiviación "in situ" de las sustancias activas.

La bibliografía refiere diferentes metabolitos obtenidos de cianofíceas continentales que podrían actuar como posibles promotores de crecimiento, tales como el 1-aminopropano de *Microcystis* sp.<sup>(5)</sup>; la excreción de aminoácidos en *Calothrix brevissima* West<sup>(6)</sup>, en *Aulosira fertilissima* y *Anacystis nidulans* (Richt.) Dr.<sup>(7)</sup>; aminoácidos, péptidos y amidas, purinas y pirimidinas de células hidrolizadas de *Nostoc muscorum* (Ag) ex Bornet & Flah<sup>(8,9)</sup>. Se indica la producción de vitamina B<sub>12</sub> en cultivos de *Anabaena flos-aquae* (Lyngbye) Brebisson<sup>(10)</sup>.

Por otro lado, Gupta & Shukla<sup>(11)</sup> y Gupta & Argwal<sup>(12)</sup> refieren en sus bioensayos, la presencia de sustancias similares a la giberelina en los extractos de *Phormidium faveolarum* Gom. También otros autores citan la posible presencia de ácido indol-acético en *Nostoc muscorum* n° 79 a<sup>(13)</sup>.

Además, otros trabajos consideran los efectos promotores del crecimiento, ya sea como morfogenéticos en *Nostoc muscorum*<sup>(14)</sup>, o como inductores en diferentes especies de algas azules<sup>(15, 16, 17, 18)</sup>.

Las únicas referencias de promoción de crecimiento por cianofíceas termales son las que citan Tassigny & Lefèvre<sup>(19)</sup> quienes consideran la excreción de "cianoestimulinas" como inductoras de la división celular en plantas y animales.

Luego de los trabajos de Feller<sup>(20)</sup>, los posibles usos de las cianobacterias termales se han extendido a la terapéutica veterinaria, y los efectos promotores de crecimiento se ensayaron sobre fibroblastos de ratas y cobayos. Otros procesos, como los efectos balsámicos y sedantes sobre procesos curativos ulcerosos, también han sido citados por Feller.

El objetivo de este trabajo es comparar el contenido de aminoácidos y péptidos de los diferentes ecotipos de matas algales. Se detectaron, además, otros derivados indólicos y nucleicos; se supone que representan potenciales inductores bioterapéuticos, ya sean nutricionales, hormonoidales o de naturaleza más específica. Por esta razón, no solo se explicarían los efectos antibióticos sino también los resultados preliminares obtenidos por Alvarez<sup>(1)</sup> sobre la regeneración de tejidos epidérmicos (ficoterapia).

## Materiales y métodos

Las muestras de matas algales fueron recolectadas en el Arroyo Aguas Calientes en marzo de 1990 y preservadas en metanol. Posteriormente se trataron siguiendo las secuencias de extracción descriptas por Accorinti & Wenzel<sup>(4)</sup> (Tabla 1).

| Muestras algales<br>ecotipos     | Temperatura<br>Arroyo °C | Volumen<br>mata<br>ml | Agregado<br>metanol<br>ml/pH | Extracto<br>filtrado<br>ml | Extracto crudo |           |
|----------------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------|----------------------------|----------------|-----------|
|                                  |                          |                       |                              |                            | metanol        | ac. etilo |
| 1. verde-azulado<br>mucilaginoso | 40 - 45                  | 100                   | 100                          | 90/5.5                     | 1m             | 1 ae      |
| 2. verde-azulado<br>desflecado   | 59 - 60                  | 50                    | 50                           | 45/6.0                     | 2m             | 2 ae      |
| 3. rosado                        | 60 - 65                  | 30                    | 30                           | 25/5.5                     | 3m             | 3 ae      |
| 4. blanco                        | 60 - 65                  | 30                    | 30                           | 25/5.5                     | 4m             | 4 ae      |
| 5. mezcla<br>(1+3+4)             | 40 - 45                  | 30                    | 30                           | 25/5.5                     | 5m             | 5 ae      |

Tabla 1: **Extracciones de las matas algales (1-5)**

Las cromatografías de los extractos "crudos" extraídos con metanol o con acetato de etilo se realizaron según las técnicas de Smith<sup>(21)</sup> para las sustancias solubles en agua. Las resoluciones de péptidos y aminoácidos se obtuvieron de los extractos crudos y de sus subfracciones gradualmente hidrolizadas.

La hidrólisis suave se obtuvo agregando gotas de HCl 2N hasta un valor de pH:2-

3, en tubos de ensayo "abiertos" y calentando en baño de agua a 100 °C durante 15 minutos o 5 horas.

La hidrólisis drástica se llevó a cabo agregando HCl 6N y calentando las muestras en ampollas cerradas durante 22 hs. El hidrolizado de este tratamiento drástico permitió la detección individual de los aminoácidos que se analizaron por cromatografía gaseosa (GLC) en un aparato Beckmann 119 CL corriendo muestras de 10 µl.

Las muestras hidrolizadas (10 y 30 µl) se corrieron sobre papel Whatman 1 o 3MM con el sistema de solventes butanol: ácido acético: agua (120:30:50).

Para la separación de péptidos y aminoácidos se sembraron 300 µl del extracto crudo 5 ae a lo largo de la línea de partida sobre papel Whatman 3MM. Tomando como testigo de revelado una fracción representativa del total del cromatograma el resto fue fraccionado a distintos Rf, y eluido con metanol. Posteriormente, los extractos correspondientes a distintos Rf fueron concentrados sobre pequeños volúmenes de agua destilada y finalmente evaluados en antibiogramas frente a *S. aureus* y *C. albicans*.

Se utilizaron reactivos reveladores: ninhidrina (N), ninhidrina-pirimidina (NP) y ninhidrina-ácido acético glacial (NA), ensayados a 80 °C.

Se usó el reactivo de Ehrlich (E) para la detección preliminar de los productos indólicos, azul de bromofenol-nitrato de plata (ABF-NP) para los derivados de ácidos nucleicos (purinas y pirimidinas, nucleósidos y nucleótidos), complementando con exposición a lámparas de U.V. (250 µm, tipo chromatolite).

## Resultados

Las figuras 1 y 2 señalan los resultados obtenidos.

| Ecotipos de matas algales |          |     |    |    |     |
|---------------------------|----------|-----|----|----|-----|
|                           | 1m       | 2m  | 3m | 4m | 5m  |
| 1.00                      |          |     |    |    |     |
| .90                       | .89 p    | .90 |    |    | .90 |
| .85                       | .87 p-r  | .88 |    |    | .86 |
| .80                       | .82 Az-p | .82 |    |    | .79 |
| .75                       | .77 Mr   | .79 |    |    | .78 |

Condiciones: W1, BAA, 26 hs., 10 µl, H2, N. - Ref promedio: .76; .80; .86; .90 (3 corridas, 12 lecturas)

Fig. 1: Análisis comparativo de los diferentes extractos de los ecotipos (1m-5m) con hidrólisis suave (\*)

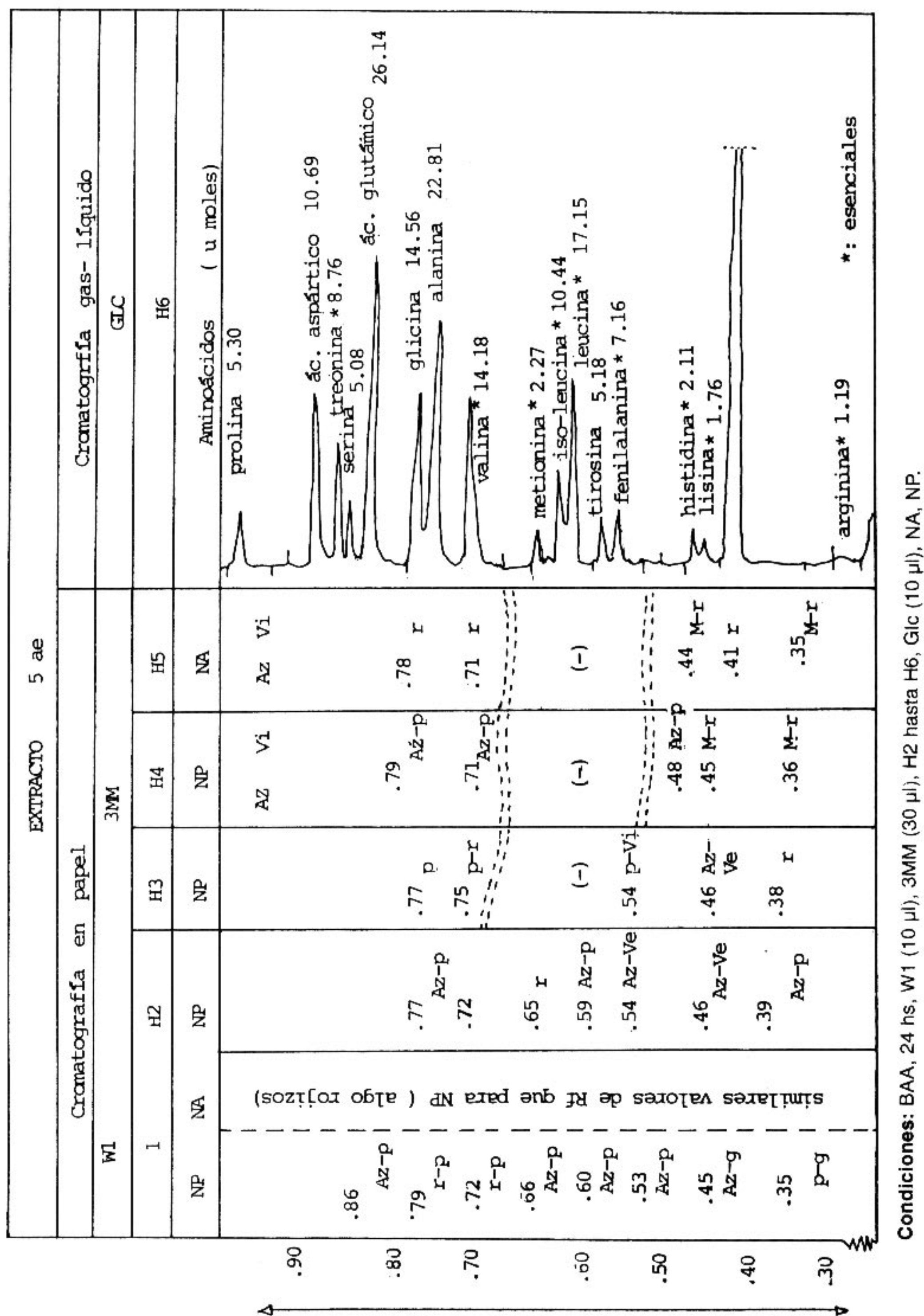


Fig. 2: Análisis comparativo del extracto "crudo" 5 ae (ecotipos1; 1+3+4) gradualmente hidrolizados hasta el tratamiento drástico. (\*)

### (\*) Referencias y abreviaturas

Ecotipos de matas algales (1-5): 1. verde-azulado mucilaginoso; 2. verde-azulado desflecado; 3. rosados; 4. blancos; 5. mezcla (1+3+4).

Extractos: ecotipos metanólicos (1m a 5m); ecotipos con acetato de etilo (1 ae a 5 ae)

Condiciones de hidrólisis: extracto crudo. 1- crudo -; H2 - hidrólisis suave (2N HCl/15'/100°C) -; H3 - hidrólisis suave (5N HCl/15'/100°C)-; H4 - hidrólisis drástica (5N HCl/5hs/100°C, NP)-; H6 - hidrólisis drástica (6N HCl/22 hs/100°C, GLC)

Condiciones cromatográficas: - W1: Whatmann (10-30 µl); 3MM: Whatmann (15-30 µl); BAA: butanol: ácido acético-agua: (120:30:50); tiempo de corrida ascendente: hs.

Reactivos de revelado: N: ninhidrina (péptidos y aminoácidos); NA: ninhidrina - ácido acético glacial - agua; NP: ninhidrina pirimidina; GLC: cromatografía líquida - gaseosa. E: Ehrlich (derivados indólicos). ABF/NP: azul de bromofenol / nitrato de plata (derivados de ácidos nucleicos).

Reacciones de color: Az: azul; M: marrón; Ve: verde; g: gris; p: púrpura; r: rosado; R: rojo; C: celeste; Vi: violeta; Am: amarillo.

Al comparar los diferentes extractos de los ecotipos 1m, 2m y 5m de las matas algales, luego de aplicar hidrólisis suave (H2), mostraron manchas nítidas ninhidrina positivas. Los extractos de los ecotipos "rosado" 3m y "blanco" 4m no reaccionaron (Fig.1).

El extracto crudo 5ae rindió manchas ninhidrina positiva (Fig.2). Alícuotas de los extractos sometidos a hidrólisis graduales mostraron resultados similares con excepción de las áreas centrales H3, H4 y H5, que fueron negativas debido al ácido clorhídrico residual adsorbido en la zona. Este ácido residual causó la excesiva digestión de los productos correspondientes, previamente detectados como derivados en la proximidad del frente del solvente (cromatogramas H4 y H5).

Además, el extracto crudo 5 ae permitió, en forma preliminar, poner en evidencia varios compuestos indólicos (Rf 0.43, 0.52, 0.74, 0.94 y 0.98) que se identificaron con el reactivo de Ehrlich.

Alícuotas de los extractos 1m, 3m y 4m, luego de la hidrólisis suave (H2) aplicando ABF/NP, dieron reacción positiva (azul "real"- "royal-blue"- del complejo de plata) para derivados de ácidos nucleicos (Rf 0.40).

La elución metanólica de un cromatograma preparativo del extracto crudo 5 ae rindió 8 bandas de reacción positiva a la ninhidrina (N). Todas resultaron inocuas frente a *S. aureus* y *C. albicans*.

Se comprobó que el acetato de etilo resultó más efectivo que el metanol para el aislamiento de los péptidos.

## Discusión

Las reacciones negativas de ninhidrina para las muestras 3m y 4m (Fig.1) confirman la hipótesis previa de que los ecotipos rosados y blanco derivarían del normal "verde-azulado" y se hallan en un proceso destructivo gradual.

Además, se comprobó que las matas algales rosadas presentan un menor efecto antibiótico que el ecotipo normal(4). La ausencia de aminoácidos y péptidos sugiere

que esas matas no resultan convenientes como inductoras de crecimiento de tejidos epiteliales.

Los ecotipos azul-verdosos resultan los más adecuados para utilizar en ficoterapia, ya sea por aplicación directa de los especímenes frescos, o por el uso de los respectivos extractos "crudos" hidrolizados debido a sus efectos antibióticos e inductivos.

El contenido total de péptidos de la mata normal verde-azulada, detectada en los diferentes extractos hidrolizados y analizados por cromatografía en papel, parecen mantener una relación constante 1:2 respecto del número total de unidades de aminoácidos del análisis por GLC. Estas relaciones permiten asumir que la detección peptídica correspondería a productos de bajo peso molecular (probablemente dipéptidos). Este aspecto se está analizando mediante el aislamiento del tamaño molecular y los correspondientes bioensayos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. Santomé, de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) por el análisis GLC; al E.PRO.TE.N (Ente Provincial Termas del Neuquén) y a la Universidad de Buenos Aires, extensión del Proyecto n° EX-086.

## Bibliografía

1. Alvarez, G. (1976 a). Algas termales del Domuyo y su utilización en Dermatología. **XII Congreso Internacional de Técnica Hidrotermal. INCYTH-CITH** (Argentina).
2. Alvarez, G. (1976 b). Un caso de psoriasis palmar y artropatía falángica tratado con algas termales del Volcán Domuyo y su utilización en dermatología. **XII Congreso Internacional de Técnica Hidrotermal. INCYTH-CITH** (Argentina).
3. Alvarez, G. (1979). El Domuyo y sus misterios. **Universidad Nacional del Comahue**, Neuquén, Argentina:97.
4. Accorinti, J. y Wenzel, M.T. (1991). Valoraciones biológicas de algas termales argentinas. 1. Propiedades antibacterianas y antifúngicas de algas termales del Domuyo (Provincia del Neuquén) **Dominguezia** 9 (1): 40-48.
5. Herrmann V. y Juettnner F. (1977). Excretion products of algae: Identification of biogenic amines by gas liquid chromatography and mass spectrometry of their trifluorocetamides. **Ann. Biochem.** 78:365-373.
6. Watanabe, A. (1951). Production in cultural solutions of some aminoacids by the atmospheric nitrogen fixing blue-green algae. **Ach. Bioch. Bioph.** 34:50.
7. Singh, V.P. y Trehan, K. (1973). Extracellular protein aminoacids of the blue-green algae. I. The production of the extracellular aminoacids by *Aulosira fertilissima* and *Anacystis nidulans*. **Phykos** 12 : 36-41.
8. Magee, W.E. y Burris, R.H. (1954) Fixation of N and utilization of combined nitrogen by *Nostoc muscorum*. **Am. J. Bot.** 41:772-782.
9. Walsby, A.E. (1965) Biochemical studies on the extracellular polypeptides of *Anabaena cylindrica*. **Lemm. Brit. Phycol. Bull.** 2 :514-515.
10. Grieco, E. y Desrochers, R. (1978). Production of vitamin B12 by a blue-green algae. **Can. J. Microbiol.** 24:1562-

- 1566.
11. Gupta, A.B. y Shukla, A.C. (1969). Effect of algal extracts of **Phormidium** species on growth and development of rice seedlings. **Hydrobiologia** 34:77-84.
12. Gupta, A.B y Argwal, P.R. (1973) Extraction, isolation and bioassay of giberelin-like substance from **Phormidium foveolarum**. **Ann. Bot.** 37 :737-741.
13. Caire, G.Z, Mulé, M.C y Cano, M.S. (1979). Productos extracelulares de **Nostoc muscorum** Ag. (nº79 a) obtenidas en medio con y sin nitrógeno combinado.I. Sus efectos sobre plántulas de arroz. **Phyton** 37 :1-13.
14. Lazaroff, N. y Vishniac, W. (1961) The effect of ligh on the development cycle of **Nostoc muscorum**, a filamentous blue-green algae. **J. Gen. Microbiol.** 25 :365-374.
15. Gupta, A.B. y Gupta, K.K (1970). The effect of **Phormidium foveolarum** extract on growth and development of pea seedling. **Labder. I. Sci.Technol. part b**, 8:151.
16. Accorinti, J. , Caire, G.Z. y Mulé, M.C. (1974). Sustancias biológicamente activas en cultivos axénicos de Cyanophyta. **Phyton** 32(1): 23-33.
17. Caire, G.Z. Mulé,M.C., Doallo, S., Halperin, D.R. y Halperin, L. (1976). Acción de los extractos algales, acuosos y etéreos de **Nostoc muscorum** Ag.(nº 79 a).I -Efecto sobre plántulas de mijo (**Panicum miliaceum** L.) mediante tratamiento con semillas. **Bol. Soc. Arg. Bot.** 17:289-300.
18. Behal, K.K. y Gupta, A.B.(1980) Note on effect of **Phormidium foveolarum** extract on "Varona" Indian mustard. **Indian J. Agr. Sci.** 51:124-127.
19. Tassigny, M. y Lefevre, M. (1971). Autohetero-antagonisme et autres consequences des extractions d' algues d' eau douce ou thermale. **Intern. Vereing.Theor. Limnol. Mitt.** 19:26-38.
20. Feller, B.(1948) Contribution à l' etude des plaïs traités par un antibiotique dérivé des Algues. **These Veter.**, Paris (Alfort) en: Tassigny y Lefevre, 1971).
21. Smith, I. (1963). Chromatographic and electrophoretic techniques. **Chromatography**. 1:617. W. Heineman, London and Interscience Public., New York.