Valoraciones biológicas de algas termales argentinas

I. Propiedades antibacterianas y antifúngicas de algas termales del Domuyo (Provincia del Neuquén)

JUAN ACCORINTI y MARIA T. WENZEL

Cátedra de Fisiología Vegetal, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Univ. de Buenos Aires. Ciudad Universitaria, 1428, Buenos Aires, Argentina.

Resumen: Matas algales y pelides, termominerales y vegetales, del arroyo Aguas Calientes contienen principios antimicrobianos.
Se definieron tres ecotipos en correlación al aumento de la temperatura del agua; el normal (verde-azulado) incluía cianobacterias con predominancia de *Phormidium* sp. y *Mastigocladus laminosus*.
Los extractos, seguidos de hidrólisis ácida, se evaluaron frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.
Los análisis cromatográficos señalaron actividad relacionada con ácidos grasos y fenólicos (antibacterianos) y con radicales volátiles no saturados (antifúngicos).
El pH alcalino y el gradiente térmico, in situ, producirían la lixiviación natural de los principios activos.
Los resultados se relacionan con la primera ficoterapia.

Algal mats and thermomineral and thermovegetable peloides from Aguas Calientes stream, contain antimicrobial principles.

Summary: Three ecotypes were defined, correlated with water temperature increment; the normal (bluish-green) included cyanobacteria, with *Phormidium sp.* and *Mastigocladus laminosus* predominance.
Extracts followed by acid hydrolysis, were evaluated facing

PALABRAS CLAVES: Matas algales termofílicas - cianobacterias - antibacterianos - antifúngicos - ficoterapia.
KEY WORDS: Thermophilic algal mats. Cyanobacteria. Antibacterial. Antifungal. Phycotherapy.

Staphylococcus aureus and *Candida albicans*.
Chromatographic analysis showed activity related to fatty and phenolic acids (antibacterial) and to non satured volatile radicals (antifungal).
The *in situ* alkaline pH and the thermal gradient, would be the ecological factores producing the natural lixiviation of those active principles.
Results are related with primary phycotherapy.

Introducción

La bibliografía registra numerosas evaluaciones in vitro de principios bioactivos con efectos antibacterianos y antifúngicos producidos por algas verde-azuladas o cianobacterias (1-12).

Las referencias incluyen principalmente estudios realizados con especies mesotermales, continentales y marinas. En los últimos diez años de revisión sobre el tema no hemos hallado ensayos de antibiosis procedentes de algas termales procariotas.

Las cianobacterias de fuentes termales de altos registros térmicos, son herramientas adecuadas para la investigación del origen de la vida en nuestro planeta (13, 14).

Los productos bioactivos de cianobacterias termales se generarían a través de similares vías metabólicas a las de las mesotermales (aunque evolutivamente éstas últimas serían derivadas de las primeras).

Se sugiere que debido a su hábitat tan particular, las especies de altas temperaturas producirían metabolitos poco comunes. Estas especies podrían exhibir estructuras químicas diferentes debido a sus distintivas biomoléculas fundamentales.

Por otra parte, la adaptación al termalismo se relaciona, a nivel molecular de estructura-función, con el primitivismo orgánico como el originado durante la biogénesis.

En general, existen pocas referencias puntuales sobre el uso de algas termales en terapéutica (15, 16).

En la década del 70 el doctor Gregorio Alvarez, pionero en nuestro país en aplicar la ficoterapia con especímenes similares a los empleados en este trabajo, comprobó efectos curativos en diversas afecciones epidérmicas.

A partir de los resultados preliminares obtenidos por el doctor Alvarez nos propusimos realizar la evaluación in vitro de los efectos curativos de las matas algales objeto de nuestro estudio, suponiendo que podrían corresponder, entre otros, a principios anatibacterianos y antifúngicos.

Materiales y métodos

Las matas algales se cosecharon en el arroyo Aguas Calientes y las consideradas normales o verde-azuladas, incluyeron las siguientes especies referidas de acuerdo con su gradiente de abundancia: *Phormidium tenue, Ph. trelasei, Ph. subulivorme, Ph. fragile, Ph. laminosum* (+++); seguidos por *Mastigocladus laminosus* (++), *Aphanocapsa sesciasensis* (+); *Lyngbya allorgei* y con menor representatividad *Plectonema dangeardii, Microchæte bulbosa, Nostoc nuscorum* y *N. calcicola* (Wenzel y Halperin, com. pers.).

Dichas matas formaban una estructura mucilaginosa que incluía una red heterogénea de filamentos de las diversas especies, aunque limitadas en su parte externa por las especies predominantes en creciminto laminar superpuesto. Las matas crecían sobre rocas o fijadas al suelo fangoso del arroyo, siendo constantemente lavadas por la corriente.

Las muestras se cosecharon a lo largo de 2 kilómetros del gradiente térmico, entre 40 y 65°C. Los diferentes ecotipos se clasificaron en correlación con la temperatura del agua. Además de los especímenes fijados para el estudio de clasificación sistemática, se obtuvieron duplicados para las extracciones químicas, fijándolas en metanol.

Los ecotipos fueron primariamente clasificados por su coloración natural. Las muestras verde-azuladas crecían entre 40 y 45°C; las rosadas y las decoloradas o blanquecinas, entre 60 y 65°C.

Las extracciones de los metabolitos solubles en agua, con metanol y acetato de etilo se programaron de acuerdo con Stahl y Schorn (19). Las secuencias de extracciones se indican en la Tabla 1.

Los extractos se obtuvieron moliendo las muestras en un mortero, usando el mismo solvente en que fueron preservadas.

Luego de filtrar y medir el pH, los extractos se concentraron por evaporación del solvente.

Los distintos extractos crudos dieron volúmenes diferentes, de acuerdo con el contenido acuoso de la masa algal original. Cada muestra residual de la extracción alcohólica fue reextraída con acetato de etilo como segundo solvente y ensayada por separado.

Los efectos antibióticos se evaluaron usando la técnica de antibiogramas de discos en cajas de Petri, contra la bacteria *Staphylococcus aureus* sembrada en superficie sobre medio sólido Oxoid-agar y contra el hongo *Candida albicans* sobre medio sólido Sabouraud-agar. En todos los ensayos se usó 0,05 ml de extracto crudo y/o hidrolizado y los resultados se leyeron a las 24 horas de incubación a 35°C. La actividad se refirió a milímetros de halo de inhibición.

Las biocromatografías se hicieron con el papel cromatográfico desarrollado, cortando áreas del mismo y aplicándoselas según la técnica de antibiogramas, previa detección química de una zona estándar del papel usada como guía

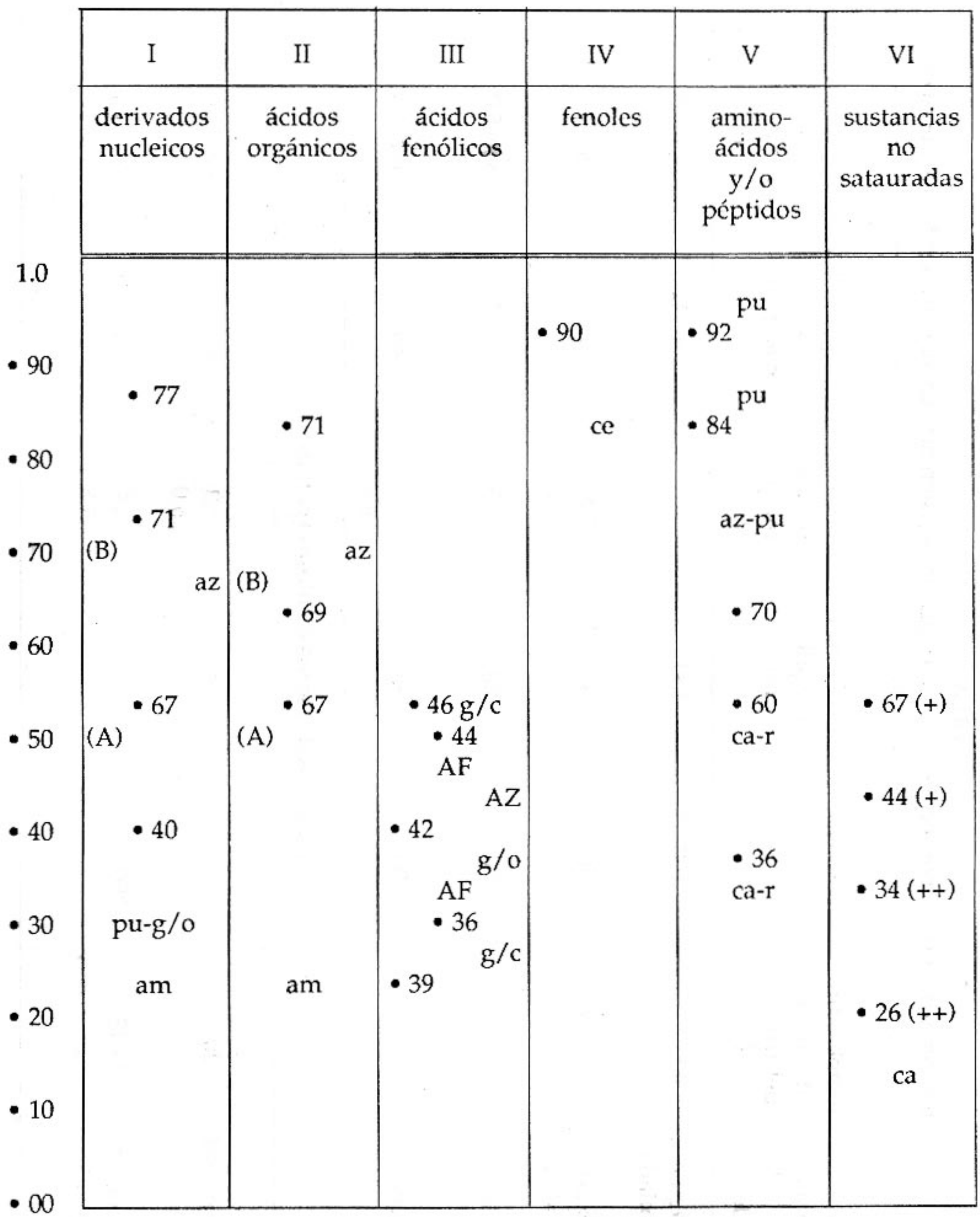

FIGURA 1: Referencias y abreviaturas:

Reactivos de revelado: I. Purinas, pirimidinas, nucleótidos/nucleósidos (nitrato de plata-azul de bromofenol). II. Acidos orgánicos (verde de bromocresol). III. (1) Acidos fenólicos (nitrato de plata); (2) azúcares (AZ) (nitrato de plata-hidróxido de amonio/90°C). IV. Fenoles (cloruro férrico acidulado con ácido clorhídrico). V. Aminoácidos y/o péptidos (ninhidrina).VI: Sustancias no saturadas (vapores de iodo en cámara saturada). **Reacciones de color:** A (reacción ácida); B (reacción básica); az (azul); pa (pardo); g/o (gris oscuro); ca(castaño); ce (celeste); g/c (gris claro); pu (púrpura); r (rosado); am (amarillo); AF (ácidos fenólicos)

TABLA 1

Antibiogramas realizados con extractos etéreos (ecotipos 1, 3 y 4), previa transferencia en auga e hidrólisis ácida suave

Muestras de matas algales y peloides	Temperatura del agua del arroyo °C	Volumen de las matas ml	Metanol agregado ml	Extracto filtrado ml/pH	ml Extracto crudo (m) metanólico	(ae) acetato de etilo
1 • mucilaginosa verde-azulada	40 - 45	100	100	90 5.5	1m: 32.0	1ae: 8.5
2 • deflecada verde-azulada	59 - 60	50	50	45 6.0	2m: 3.5	2ae: 4.0
3 • rosada	60 - 65	30	30	25 5.5.	3m: 1.9	3ae: 5.0
4 • blanquecina	60 - 65	30	30	25 5.5	4m: 2.5	4ae: 4.0
(1) peloides: muestras de barros arcillosos (pardos)						
6 • termomineral	20	350 g	50	50 6.0	6m: 13.5	6ae: 6.4
7 • termovegetal verde-azulado	40 - 45	250 ml	50	45 5.5	7m: 12.0	7ae: 5.0

comparativa. La hidrólisis ácida suave se realizó con HCl 2N, hasta ajustar a pH 2-3, en tubos de vidrio abiertos, calentando en baño de agua a 100°C durante 15 minutos y procediendo luego a la extracción con éter sulfúrico.

Los análisis cromatográficos se hicieron siguiendo las técnicas de Smith (20), sobre papel Whatman Nº1, usando (BAA): butanol-ácido acético-agua (120:30:50) como solvente de corrida ascendente, sembrando 10 µl de extracto crudo y/o hidrolizado. Las cromatografías preparativas se corrieron con papel Whatman Nº3 MM, sembrando 300 µl a lo largo de la línea de partida.

Luego de la correspondiente detección química, realizada sobre un sector estándar del cromatograma desarrollado, las zonas a usar en las evaluaciones se eluyeron con metanol.

Los extractos eluidos se concentraron sobre pequeños volúmenes de agua destilada.

Los reactivos de revelado para sustancias hidrosolubles correspondieron también a las técnicas indicadas en Smith (20) y los resultados se registran en la figura 1.

Resultados

Los antibiogramas preliminares, realizados con alícuotas de los extractos crudos (0,05ml) y procedentes de las extracciones con sendos solventes (Tabla 1), rindieron resultados inocuos frente a los microorganismos patrones.

Alícuotas de 1 ml de los extractos metanólicos crudos (1m, 3m y 4m) se transfirieron respectivamtne a 1 ml de agua destilada. Luego de provocar la hidrólisis ácida suave, cada extracto acuoso fue reextraído con éter sulfúrico (5ml) y las respectivas fases etéreas de nuevo transferidas a 1 ml de agua destilada hasta la total evaporación del solvente.

Los antibiogramas evidenciaron importante inhibición contra *S. aureus* y mayor efecto antibiótico contra el crecimiento de *C. albicans* (Tabla 2).

Similares resultados se obtuvieron con los peloides termovegetales (barros más algas) luego de tratarlos con el mismo procedimiento de extracciones de hidrólisis.

Ensayos cromatográficos

Aplicando las técnicas indicadas en Smith (20), la investigación de metabolitos hidrosolubles en los extractos activos permitieron la detección positiva de aminoácidos, derivados del metabolismo nucleico, azúcares, fenoles, ácidos fenólicos, como también varias reacciones positivas de áreas no saturadas (Figura 1).

TABLA 2

Antibiogramas realizados con extractos etéreos (ecotipos 1, 2 y 4), previa transferencia en agua e hidrólisis ácida suave

extractos etéreos (ecotipos)	pH	Antibiogramas (mm de halo de inhibición), B: bactericida b: bacteriostático	
		S. aureus	*C. albicanas*
1	6.0	20 B	35 B
3	6.0	---	25 B
4	5.0	17 b	---

Ensayos biocromatográficos

Los eluidos de cromatografías preparativas corridos con extractos hidrolizados de matas algales que resultaron activas en las valoraciones demostraron antibiosis coincidentes con ácidos orgánicos y fenólicos alejados de las zonas básicas, que fueron inocuas.

Discusión

Aunque los principios antibacterianos y antifúngicos fueron hidrosolubles, resultaron inocuos cuando se les ensayó como extractos crudos.

La liberación de los metabolitos activos, luego de provocar la hidrólisis ácida de los extractos crudos, señalan, junto con los análisis cromatográficos, la posible liberación de agliconas solubles en éter. Se trataría de sustancias alelopáticas de bajo peso molecular que incluyen moléculas volátiles no saturadas. Estas últimas explicarían el efecto antibiótico total, repetidas veces obtenido contra el hongo *C. albicans*.

De los tres ecotipos estudiados y correlativos al aumento de la temperatura del hábitat, la mata verde-azulada fue la más activa. Estas muestras estaban integradas por la completa flora de cianobacterias con su pigmentación fotosintética normal.

En cambio, los ecotipos rosado y blanquecino serían derivativos del normal y se hallarían en paulatino proceso de degradación (verde-azulada->rosada-> decolorada), mostrando anormalidades en sus contenidos de pigmentos. La anormalidad podría ser debida a la interrupción de la síntesis de porfirinas, quizá por inactivación enzimática, a nivel del ecotipo rosado (de 40-45°C a 60-65°C).

El color de las muestras rosadas sugieren que la biosíntesis de clorofilas podría interrumpirse al llegar a la etapa de protoporfirina IX rosada.

Las valoraciones biocromatográficas indican que la actividad sería debida al efecto sinérgico de los ácidos orgánicos y fenólicos (antibacterianos) y a radicales volátiles no saturados (antifúngicos).

El gradiente térmico registrado in situ, junto al pH levemente alcalino del agua del arroyo (7, 7), permiten suponer la producción de una hidrólisis natural constante que liberaría los metabolitos activos de todos los ecotipos estudiados, en forma paulatina.

La completa lixiviación coincidente con la máxima temperatura del agua terminaría con la muerte de la flora incluida en la mata algal y se alcanzaría con el ecotipo blanquecino.

Las matas algales más activas y útiles en ficoterapia serían, por sus efectos antibióticos, los ejemplares verde-azulados y rosados. Los extractos de ambos tipos, en particular los procedentes del normal, podrían ser muy activos al aplicarlos contra diferentes micosis epidérmicas y de mucosas, particularmente útiles en tratamientos de candidiasis.

Se han iniciado los cultivos unialgales de las distintas especies incluidas en las matas, con el objeto de obtener los cultivos axénicos y evaluar los efectos antibióticos singulares. Cuando éstos se valoren, podrá confirmarse si los principios activos son similares o diferentes a los producidos por la interacción natural, que en este caso interesaba evaluar para avalar los efectos terapéuticos evidenciados in situ por el Dr. Gregorio Alvarez.

Esta evaluación permitirá confirmar si los principios activos propios de cada especie corresponden a los mismos principios de la resultante de la interacción comunitaria de la mata.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Fundación Instituto Cosmobiofísico de Investigaciones (F.I.C.I.) por la invitación a la zona del Domuyo y a la Universidad de Buenos Aires por el subsidio otorgado (Extensión del Proyecto Nº EX-086). Esta contribución está dedicada en memoria del Dr. G. Alvarez.

Bibliografía

1. Burkholder, P.R.; Burkholder, L.M.; Almodovar, L.R. (1960). **Bot. Mar.** 2 (1/2): 149-156.
2. Davidson, F.F. (1961). **Am. J. Bot.** 48: 542.
3. Magee, W.E; Burris, R.H. (1962). **Am. J. Bot.** 41: 477.
4. Welch, A.M. (1962). **J. Bacteriol.** 83: 93-99.
5. Gerham, P. (1964) **In Algae and Man**, pp 307. EdD. Jackson, N.Y. Plenum.
6. Gupta, A.B.; Shrivastava (1965). **Hydrobiologia** 25: 285-288.
7. Martínez Nadal, N.G. (1970) **X Intern. Congress of Microbiol.** México (August).
8. Accorinti, J.; Caire, G.Z.; Mulé, M.C.Z. (1974fd) **Phyton** 32: 23.
9. Mulé, M.C.Z.; Caire, G.Z.; Accorinti, J. (1976). **Phyton** 34: 185.
10. Accorinti, J. (1983). **Rev. Intern. D'Oceanogr. Med.** 72: 45-53.
11. Cano, M.S.; Mulé, M.C.; Caire, G.Z.; Halperin, D.R. (1986). **Phyton** 46 (2): 153-156.
12. Caire, G.Z.; Cano, M.S.; Mulé, M.C.; Halperin, D.R. (1990). **Phyton** 51 (1): 1-14.
13. Brock, T.D. (1969). **Symp. Soc. Gen. Microbiol. XIX Microbial Growth.** 41 pp.
14. Brock, T.D. (1970). **Ann. Rv. Ecol. and Systematics.** 1: 191-219.
15. Tassigny, M; Lefèvre, M. (1971). **Mitt. Internat. Verein. Limnol.** 19: 26-38.
16. Cuvelier, R.; Lamarche, M. (1972). **Les techniques des cures thermales**, in Bert, J. et al: **Therapeutique thermale et climatique**, Masson et Cie., Ed. Paris: 113-132.
17. Alvarez, G. (1976). **XII Congr. Internac. Técnica Hidrotermal**, INCYTH-CITH. Argentina.
18. Alvarez, G. (1979). **El Domuyo y sus misterios**. Univ. del Comahue, Neuquén, Argentina, 95 pp.
19. Stahl, E.; Schorn, P.J. (1965). **Hydrophilic constituents of plants**, in Stahl, E. Ed.: **Thin Layer Chromatography. A Laboratory Handbook**, Springer-Verlag, Berlin: 371.
20. Smith, I. (1963): **Chromatographic and Electrophoretic Techniques**, vol. I. **Cromatography**. William Heineman Med. Books Ltd.