

Análisis complementarios de nucleósidos-nucleótidos en algas termales del Domuyo (provincia de Neuquén, Argentina)

Juan Accorinti^{1,2}, María Teresa Wenzel^{1*} y Néstor Hugo Ficosecco³

¹ Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Pabellón 2, 4.º piso, UBA. Ciudad Universitaria C1428EHA, Buenos Aires. República Argentina. Correo electrónico: wenzel@bg.fcen.uba.ar.

² Ex Profesor Titular de Fisiología Vegetal, Fac. Cs. Ex. y Naturales, UBA. Correo electrónico: jpaccorinti@yahoo.com.ar.

³ Ex Director Médico del Complejo Termal Copahue, Neuquén, República Argentina. Correo electrónico: ficosecco@ciudad.com.ar.

* Autor a quien enviar la correspondencia.

Resumen

Los extractos metanólicos y de acetato de etilo de las matas termales algales verde-azuladas, fotosintéticamente activas y con actividad antibiótica, mostraron la presencia de derivados de ácidos nucleicos.

Los análisis por cromatografías diferenciales permitieron la detección de azúcar-fosfato y nucleósidos: purina/pirimidina (guanósina y/o citidina).

Las coincidencias en los valores de relación de flujo (Rf) con aquellos derivados mediante una detección peptídica previa, sugieren la presencia de un probable "factor inductor de división" formado por compuestos nucleósidos-peptídicos como los que fueron detectados en los extractos celulares de un alga chlorococcal.

Complementary Analysis For Nucleosides-Nucleotides In Thermal Algae From Domuyo (Neuquén Province, Argentina)

Summary

Methanolic and ethyl acetate extracts from antibiotic and photosynthetically active thermal blue-green algal mats, showed respectively the presence of nucleic acid derivatives.

Differential chromatographic analysis allowed the proximal detection of sugar-phosphate and purine/pyrimidine nucleoside (guanosine and/or cytidine).

The Rf values coincidences between those derivatives with the previous peptide detections, suggest the presence of a probable "Inducing Factor Complex" containing nucleoside-peptide compounds, like the ones evidenced from chlorococcal algal cell extracts.

Introducción

Los trabajos anteriores (Accorinti y Wenzel, 1991 y 1995) forman parte de una serie correspondiente a: "Ensayos biológicos con Algas termales Argentinas". Las matas algales termales, recolectadas en el arroyo Aguas Calientes del área adyacente al Volcán Domuyo, incluyen varias cianofíceas-cianobacterias con predominancia de 5 especies pertenecientes al género *Phormidium* y *Mastigocladus laminosus*. Se determinaron sus propiedades biológicas experimentalmente que demostraron el efecto antibiótico (antibacteriano y antifúngico) de las algas fotosintéticamente activas (Accorinti y Wenzel, 1991).

Los análisis cromatográficos preliminares (Accorinti y Wenzel, 1995) indicaron la posible presencia de potenciales promotores de crecimiento

Palabras clave: algas termales - Cyanophyceae - Cyanobacteria - inductores crecimiento celular - nucleótidos/nucleósidos - péptidos.
Key words: thermal algals - Cyanophyceae - Cyanobacteria - potencial celular inductores - nucleósidos/nucleotides - peptides.

to celular como derivados de ácidos nucleicos (Accorinti y Wenzel, 1995).

En este trabajo se realizaron los análisis cromatográficos complementarios específicos de los compuestos nucleosídicos-nucleotídicos detectados en los ensayos preliminares y se los relacionaron con los compuestos peptídicos evidenciados en el trabajo de Accorinti y Wenzel (1995).

Materiales y métodos

Siguiendo el mismo protocolo indicado por Accorinti y Wenzel (1991 y 1995), los extractos metanólicos y de acetato de etilo, procedentes de las extracciones de los ecotipos normales (1m) y mezclados (5ae) fueron respectivamente analizados por cromatografía ascendente en papel Whatman 1, corriendo alícuotas de ambos extractos “crudos” y de hidrólisis suave.

Referencias y abreviaturas de las condiciones experimentales

Ecotipos de las matas algales

Cyanobacteria/Cyanophyceae (Accorinti y Wenzel 1991 y 1995).

1. verde-azulado mucilaginoso (normal), desarrollado a temperaturas entre 40 y 45 °C).
3. rosado (derivado ecológico del normal, inducido a temperaturas de entre 60 y 65 °C).
4. blanco (derivado ecológico terminal del ecotipo rosado).
5. mezcla (1+3+4).

Extractos

1 m, 3 m y 4 m: numeración de los ecotipos; m: metanólicos.

5 ae: ecotipo 5; ae: con acetato de etilo.

Procedimiento hidrolítico

D₂: hidrólisis suave, en “tubo abierto” 2N HCl durante 15 minutos, en baño de agua a 100 °C.

D₃: hidrólisis suave, en “tubo abierto” 5N HCl durante 15 minutos, en baño de agua a 100 °C.

D₄: hidrólisis drástica, en “tubo cerrado” durante 22 h, en baño de agua a 100 °C.

Condiciones cromatográficas

W1: cromatografía ascendente en papel Whatman 1,

distancia del frente de la fase móvil 20 cm, siembra puntual de 10 µl.

BAA: sistema de solventes: butanol- ácido acético glacial-agua (120:30:50).

BPA: sistema de solventes: butanol-piridina-agua (65:65:65).

A: agua.

h: horas de corrida ascendente.

Reactivos de revelado. Según Smith (1963) para, *Aminoácidos y péptidos.* N: ninhidrina; Np: ninhidrina piridina; Na: ninhidrina acético.

Ácidos nucleicos y derivados. ABF/NP: azul de bromofenol/nitrato de plata.

Exposición a la luz UV, longitud de onda 250 nm.

Azúcares. NP/Am-OH: nitrato de plata/hidróxido de amonio, calor a 80 °C.

Derivados nucleosídicos

C-3MP (3- monofosfato de citidina).

G-3MP (3- monofosfato de guanosina).

OH-P (hidroxi-purina).

Reacciones de color

az: azul; g/o: gris oscuro; g/c: gris claro; p: púrpura; v: violeta, v/o: violeta oscuro; g/p: gris/púrpura (UV); p: púrpura (ABF); p/c: púrpura claro; ro: rosado y m: marrón.

UV: luz ultravioleta.

Fluorescencia en líneas punteadas.

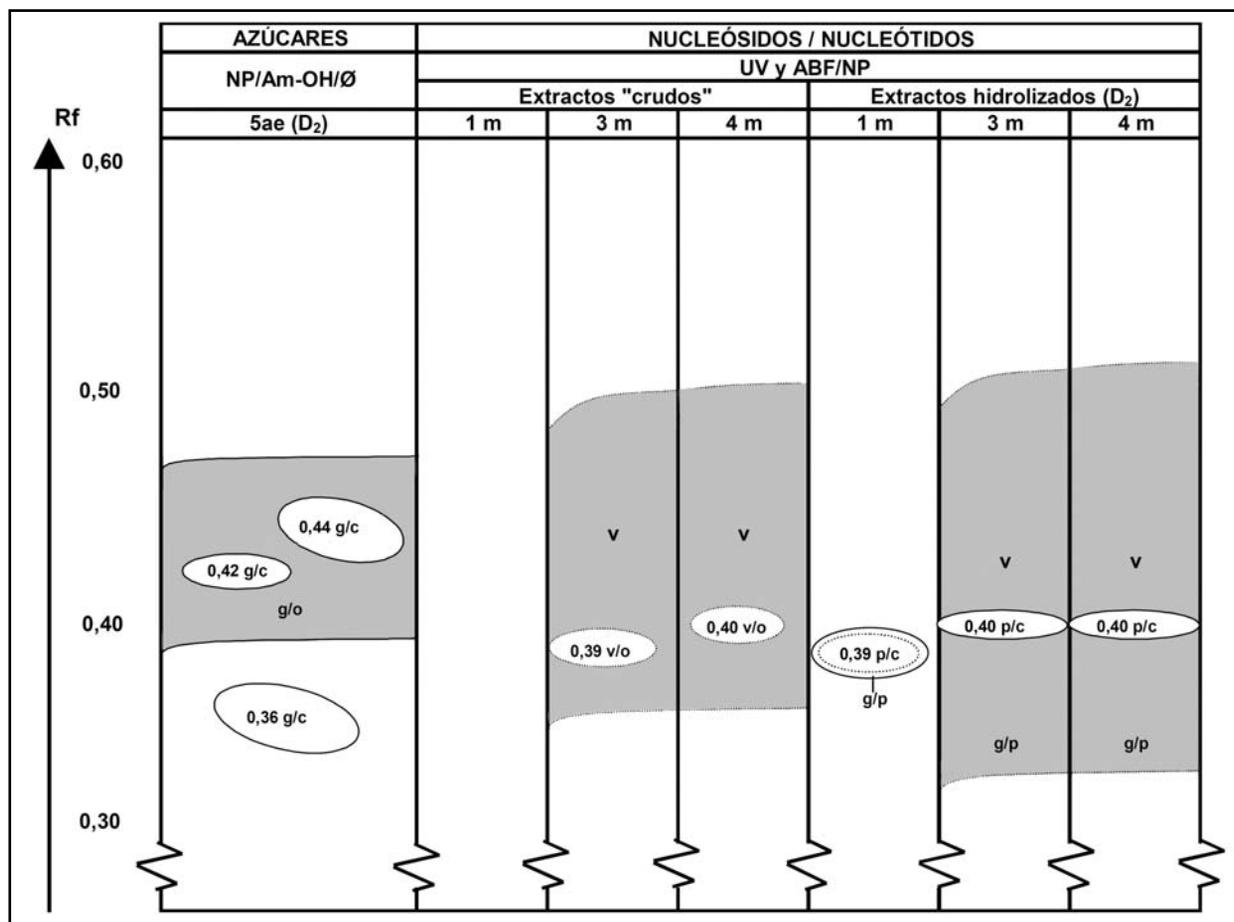
Resultados

Resultados de las cromatografías

Figura 1. Luego de la reacción con azul de bromofenol/nitrato de plata de una alícuota del extracto 5 ae con hidrólisis suave, se obtuvo una zona difusa de color gris claro, centralizada en la relación de flujo (Rf) 0,42 y dos manchas del mismo color y de menor intensidad en el Rf 0,36 y 0,44. Este extracto no mostró una reacción típica de color gris oscuro para la detección de los azúcares.

Las cromatografías comparativas entre los extractos “crudos” (1 m, 3 m y 4 m) con sus correspondientes hidrolizados suaves, señalaron que el extracto “crudo” (1 m) resultó negativo, mientras que los extractos (3 m y 4 m) mostraron tinción positiva de color violeta oscuro y fluorescencia en

Figura 1.- Detección de azúcares y de nucleósidos/nucleótidos



Condiciones cromatográficas: W1: papel cromatográfico Whatman 1, 20 h corrida ascendente, siembra puntual: 10 µl. Reactivos de revelado: NP-Am-OH Ø: nitrato de plata/hidróxido de amonio calor, ABF/NP: azul de bromofenol/nitrato de plata, UV: luz ultravioleta. Extractos: 5ae: con acetato de etilo, 1, 3 y 4 m: metanólicos. D₂: hidrólisis suave. Reacciones de color: g/c: gris claro, g/o: gris oscuro, g/p: gris púrpura, p: púrpura, p/c: púrpura claro, v: violeta, v/o: violeta oscuro. Fluorescencia: en líneas punteadas.

Tabla 1.- Corridas cromatográficas diferenciales comparativas del ecotipo 1 m con distintos solventes

Extracto del ecotipo 1 m hidrolizado (D ₂)		
S o l v e n t e s		
BAA (120: 30: 50)	BPA (65: 65: 65)	A
0,25	0,35-0,59	0,96
C-3MP	OH-P	C-3MP
		G-3MP

Condiciones cromatográficas: W1: cromatografía en papel Whatman 1, 18 h: horas de corrida ascendente, siembra puntual: 10µl; BAA: butanol: ácido acético: agua, BPA: butanol:piridina:agua, A: agua. Detección de nucleósidos/nucleótidos y bases (valores de Rf): C-3MP: 3- monofosfato de citidina, OH-P: hidroxipurina, G-3MP: monofosfato de guanosina, según Tablas de Smith (1963).

Tabla 2.- Esquema integral de los resultados

Extractos de los distintos ecotipos de matas algales					
		5 ae	1 m	3 m	4 m
Condiciones de hidrólisis	péptidos	azúcares	nucleósidos-nucleótidos		
“crudo”				0,39 v/o v	0,40 v/o v
D ₂	Np 0,39 az/p	0,42 g/o	0,39 g/p	0,40 v g/p	0,40 v g/p
D ₃	Np 0,39 ro				
D ₅	Na 0,41 m/ro				

Valores de Rf para péptidos, azúcares y compuestos nucleosídicos-nucleotídicos de los distintos ecotipos: 5ae, con acetato de etilo; 1, 3 y 4 m, metanólicos. Hidrólisis graduales progresivas: D₂, D₃ y D₅. Reactivos de revelado: NA: ninhidrina acético, NP: ninhidrina pirimidina. Reacciones de color: az/p: azul púrpura, m/ro: marrón/rosado g/o: gris oscuro, g/p: gris púrpura, V: violeta. Los resultados de péptidos proceden de valores anteriores (Accorinti y Wenzel, 1995).

el Rf 0,39 y 0,40 además de una extensa área sombreada de color violeta.

Luego de realizar una hidrólisis suave con los mismos extractos, se evidenciaron resultados distintos: 1 m rindió una nítida mancha fluorescente de color gris púrpura en 0,39, mientras 3 y 4 m dieron cada uno, una mancha de color púrpura claro en el 0,40, además de una extensa área sombreada de color violeta como la observada en los extractos “crudos”.

Tabla 1. Las cromatografías diferenciales comparativas del extracto del ecotipo 1 m con hidrólisis suave, corridas con los sistemas de solventes indicados en la figura, rindieron mejor resolución. Se demostró, según las Tablas de Smith (1963), que los compuestos detectados coincidieron con guanosina (nucleósido de purina) y/o citidina (nucleósido de pirimidina).

Tabla 2. Algunas de las manchas de péptidos, obtenidas en análisis anteriores (Accorinti y Wenzel, 1995) mostraron coincidencias de Rf con estos nuevos análisis para azúcares y nucleósidos-nucleótidos, indicados en la figura 1.

Cada una de estas manchas correspondieron al

promedio de cinco corridas cromatográficas y mostraron para todos los compuestos detectados, un valor de Rf cercano a 0,40.

Conclusiones

La detección de azúcares (Figura 1) sugiere un producto combinado, como azúcar-fosfato.

La reacción negativa del extracto metanólico del ecotipo 1 m, se debe probablemente a la necesidad de aplicar una hidrólisis previa para liberar los compuestos nucleosídicos-nucleotídicos. Las detecciones positivas obtenidas con los extractos “crudos” 3 m y 4 m (ecotipos “rosados” y “blancos”), ambos procedentes de la degradación natural térmica del ecotipo normal, se produce en un medio de leve alcalinidad y alta temperatura, lo cual provocaría en esos ecotipos, una hidrólisis ecológica (Accorinti y Wenzel, 1991).

Estos resultados confirmarían nuevamente los obtenidos a partir de los extractos hidrolizados: 1 m rindió una conspicua mancha fluorescente de color gris púrpura en el 0,39 y 3 m y 4 m de color

púrpura claro en el 0,40, posiblemente por la excesiva digestión hidrolítica, además de una reacción residual señalada en la figura 1, como un área sombreada.

Los valores de Rf coincidentes entre péptidos, azúcares y compuestos nucleosídicos señalados en forma integral en la figura 3, sugieren un probable producto complejo, similar a los evidenciados en extractos de microalgas Chlorococcales. Esos extractos demostraron poseer propiedades inductoras y fueron definidos en forma genérica como "Factor Inductor de División" (DIF). Los extractos obtenidos a partir de *Chlorella ellipsoidea* (Hase, y col., 1959 a, 1959 b; Vrana y Fencel, 1964) fueron caracterizados como un complejo azufrado-nucleotídico-peptídico. Un factor inductor de la división celular fue señalado también para otros microorganismos por Shirota y col. (1961).

Además, se registraron propiedades inductoras en los extractos acuosos de *Scenedesmus acutus* que contenían adenina, hipoxantina y aminoácidos (Zelke y col., 1978) y en los de *Coelastrum sphaericum* var. *dilatatum* (Varone y col., 1979) que resultaron inductores del crecimiento de bacterias lácticas. Por último, según Accorinti (inédito) luego de realizar una hidrólisis alcalina suave en los extractos de *Coelastrum sphaericum* var. *dilatatum*, fue detectada la presencia de un factor potencial inductor derivado de la tiamina, en cuya estructura química presentó un anillo pirimidínico (citosina).

Se programan nuevos aislamientos y detecciones químico-cromatográficas paralelas y complementarias de las referidas matas algales termales, para aproximar a un mejor entendimiento del potencial complejo inductor del crecimiento celular.

Agradecimiento

Al Sr. Eugenio C. Wenzel por su ayuda en el diseño de la figura del trabajo.

Referencias bibliográficas

- 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, Argentina)". *Dominguezia* 9 (1): 40-48.
- Accorinti, J. y Wenzel, M. T. (1995). "Ensayos biológicos con algas termales argentinas. 2. Promotores potenciales de crecimiento celular en algas del Domuyo (Provincia de Neuquén, Argentina)". *Dominguezia* 12 (1): 16-23.
- Accorinti, J. (inédito). "Extracellular thiamine detection from *Coelastrum phaericum* var. *dilatatum* Bohlin et Vischer (Chlorophyta) axenic culture".
- Hase, E., Mihara, S., Otsuka, H. y Tamiya, H. (1959 a). "Sulfur-containing peptide-nucleotide complex isolated from *Chlorella* and yeast cells". *Arch. Bioch. Biophys.* 83: 170-177.
- Hase, E., Mihara, S., Otsuka, H. y Tamiya, H. (1959 b). "New peptide-nucleoside compounds obtained from *Chlorella* and yeast". *Bioch. Biophys. Acta* 32: 298-300.
- Shirota, M., Nagamatsu, N. y Takechy, Y. (1961). "Method for cultivating lactobacilli". United States Patent Office n.º 3, 123-538, serial number 103, 195 (CI 195-48).
- Smith, I. (1963). *Chromatographic and Electrophoretic Techniques I. Chromatography*. Ed. William Heinemann Medical Books. Intersc. Publ. Inc. N. York, USA: 617.
- Vrana, D. y Fencel, Z. (1964). "Specific factor inducing cell division of the alga *Chlorella pyrenoidosa* and of the yeast *Candida utilis*". *Folia Microbiol.* 12: 432-440.
- Zielke, H., Kneifel, H. Webb, L. E. y Soeder, C. J. (1978). "Stimulation of lactobacilli by an aqueous extract of the alga *Scenedesmus acutus*". *Microbiol. Biotechnol.* 1: 1-8.

