

PRESENCIA DE LECTINAS, TANINOS E INHIBIDORES DE PROTEASAS EN ALGAS MARINAS DE LAS COSTAS VENEZOLANAS

Sonia Perez-Lorenzo^{1*}, Abraham Levy-Benshimol¹ y Santiago Gomez-Acevedo²

1. Centro de Biología Celular, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, U.C.V., Apdo. 47114, Caracas 1041-A, Venezuela.

2. Centro de Botánica Tropical, Instituto de Biología Experimental, Facultad de Ciencias, U.C.V., Apdo. 47114, Caracas 1041-A, Venezuela.

Recibido: 06/08/96 ; Revisado: 10/09/97 ; Aceptado: 20/01/98

RESUMEN: Se estudió la presencia de lectinas, taninos e inhibidores de proteasas, en 27 especies de algas colectadas en barreras coralinas de cuatro regiones de Venezuela. Sólo seis de las especies estudiadas, presentaron actividad hemaglutinante atribuible a lectinas, obteniéndose los mayores títulos de hemaglutinación con eritrocitos tratados con pronasa. En cuatro de las especies, las lectinas fueron inhibidas por más de un azúcar sencillo y por la mucina de glándula submaxilar de bovino: *Caulerpa sertularioides*, *Enteromorpha intestinalis*, *Codium repens* y *Codium isthmocladum* (Chlorophyta). La lectina de *Grateloupia filicina* fue inhibida solamente por NAcGal. Ninguno de los compuestos probados inhibió la hemaglutinación causada por *Halimeda opuntia*. El tratamiento de los extractos con polivinilpirrolidona eliminó la actividad hemaglutinante de las algas pardas y rojas, menos en dos especies de rodofitas: *Grateloupia filicina* e *Hypnea cervicornis*, lo que hace presumir la presencia de lectinas en ambas. Los taninos presentes en las Phaeophyta y Rhodophyta estudiadas son aparentemente del tipo florotaninos con un mayor contenido en las primeras. Sólo se encontró actividad inhibidora de tripsina en: *Padina gymnospora* (Phaeophyta) y *Acantophora spicifera* (Rhodophyta). En ningún caso se encontró actividad inhibidora contra subtilisina. **Palabras clave:** Lectinas, taninos, inhibidores de proteasas, algas marinas.

PRESENCE OF LECTINS, TANNINS AND PROTEASE INHIBITORS IN VENEZUELAN MARINE ALGAE

ABSTRACT: The presence of lectins, tannins and protease inhibitors was studied in 27 algae species collected at four Venezuelan coral rift sites. Among the species studied, only six had hemagglutinating activity, apparently due to their lectin content. Higher hemagglutinating titers were obtained when the extracts were tested on pronase-treated erythrocytes. Hemagglutination was inhibited by simple sugars and by bovine submaxillary gland mucine. GalNAc was the only inhibitor of the hemagglutination caused by *Grateloupia filicina* extracts. None of the compounds tested inhibited the hemagglutination caused by *Halimeda opuntia*. The polyvinylpyrrolidone treatment abolished the hemagglutinating activity of both brown and red algae. However, in *Grateloupia filicina* and *Hypnea cervicornis* (Rhodophyta) hemagglutinating activity persisted after the polyvinylpyrrolidone treatment, presumably due to the presence of true lectins in those algae. Tannin content (presumably phlorotannins) was higher in the Phaeophyta as compared to the Rhodophyta. The brown alga *Padina gymnospora* had the higher content of these polyphenols. Trypsin inhibitors were detected, in minute amounts, only in *Padina gymnospora* (Phaeophyta) and *Acantophora spicifera* (Rhodophyta). No subtilisin inhibition was observed whatsoever. **Key Words:** Lectins, tannins, protease inhibitors, marine algae.

INTRODUCCION

Las algas constituyen un grupo heterogéneo, caracterizado por su capacidad invasiva de todos aquellos ambientes susceptibles de ser colonizados, son las mayores productoras de materia orgánica de las cadenas tróficas.

Como todos los seres vivos, las algas poseen una diversidad de compuestos químicos como carbohidratos y lípidos para sus funciones energéticas y proteínas que cumplen las más diversas funciones. Entre las proteínas descritas en las algas se encuentran las lectinas, definidas como proteínas de carácter no inmune, capaces de interactuar con carbohidratos en forma específica y reversible¹⁸. Debido a sus propiedades las lectinas poseen un enorme interés biomédico⁴². Han sido ampliamente estudiadas en

plantas superiores y otros organismos^{29,35}. La presencia de lectinas en algas marinas fue reportada por primera vez en 1966⁵.

Las lectinas de algas se caracterizan por ser de naturaleza glicoprotéica como la mayoría de las lectinas de plantas superiores, pero a diferencia de estas últimas poseen en su mayoría estructura monomérica. En el alga *Agardhiella tenera* (Rhodophyta), se ha descrito la presencia de una lectina con conformación β -plegada, como en las lectinas de leguminosas⁴³. Las lectinas de algas no necesitan iones bivalentes para su actividad ni son inhibidas por monosacáridos¹ y polisacáridos, aunque se ha encontrado que la lectina del alga verde *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*, es inhibida por N-acetil-D-galactosamina⁴¹, en contraste con las lectinas de plantas superiores, donde la inhibición por azúcares sencillos está ampliamente

* Calle Vázquez Varela, No. 27, 7-A, Vigo, Pontevedra, España.

documentada³⁴.

Por otra parte, Blunden y col.⁴ demostraron en varias especies de algas pardas (Phaeophyta) que la actividad hemaglutinante era debida a la presencia de taninos, con lo cual se sugirió que los reportes previos sobre hemaglutinación en esas algas, pudieron deberse más bien a la presencia de dichos compuestos y no a la de lectinas⁴. De ahí que el efecto aglutinante de los taninos se denomina agregación no específica, para diferenciarla de la hemaglutinación producida por las lectinas. Luego, al usar el ensayo de hemaglutinación con algas, hay que tener cuidado en la interpretación de los resultados obtenidos.

Los taninos pertenecen a una familia de compuestos denominados polifenoles, los cuales son producto del metabolismo secundario de algunas plantas, presentan grandes variaciones en cuanto a su estructura y complejidad, y han sido definidos como compuestos fenólicos solubles en agua, que poseen pesos moleculares comprendidos entre 500 y 3.000 D⁷ y la capacidad de precipitar proteínas y alcaloides⁷. Tradicionalmente se ha dividido a los taninos de acuerdo a su composición química en taninos hidrolizables y taninos condensados. Posteriormente, se ha añadido un tercer tipo, denominados florotaninos³⁸, que se encuentran en las algas pardas.

Existen inhibidores de proteasas de diversa naturaleza. Los que están presentes en las plantas se caracterizan por ser proteínas con pesos moleculares comprendidos entre 4.000 y 80.000 D⁹ y ser resistentes a la desnaturalización. En 1968 se reportaron inhibidores de tripsina en dos especies de algas marinas del Japón, los cuales son estables a altas temperaturas y capaces de ejercer su actividad inhibidora en un intervalo de pH entre 2 y 9²⁷. No hay muchos reportes sobre la presencia de estos compuestos en algas marinas.

En Venezuela se han realizado dos estudios sobre la presencia de lectinas en semillas de leguminosas de la flora del país, ambos realizados en nuestro laboratorio^{8,34} y uno sobre algas marinas venezolanas³.

Sin embargo no se han hecho estudios sistemáticos que involucren la búsqueda y caracterización de los compuestos arriba señalados. En el presente trabajo, se reporta un estudio preliminar sobre la presencia de lectinas, taninos e inhibidores de proteasas en algas marinas de la flora venezolana recolectadas en sitios diferentes del país.

MATERIALES Y METODOS

Algas

La recolección de macroalgas marinas bentónicas se realizó en dos localidades de las costas del Distrito Federal y en dos del Estado Falcón (Tabla 1). Todos los especímenes se obtuvieron en el litoral rocoso, zona intermareal. De cada especie se tomaron aproximadamente 300 g (peso fresco) en agua de mar, transportándolas de inmediato al laboratorio en hielo. Los especímenes de *Padina gymnospora* y *Digenea simplex*, fueron recogidos en dos localidades diferentes (DF1 y EF1) y estudiados por separado

en cada caso. De *Halimeda opuntia* se estudiaron dos formas, la minua y la cordata.

Para la identificación taxonómica de las especies se guardaron muestras de cada uno de los especímenes en formol al 4% en agua de mar. La identificación se realizó en el laboratorio mediante el análisis morfoanatómico de cada espécimen y la consulta de la bibliografía adecuada^{10,12-16,19-21,23,25,31,32}.

Preparación de los extractos

Se siguió el procedimiento de Chiles y col.¹¹ ligeramente modificado. Las muestras fueron lavadas exhaustivamente con agua corriente y secadas con una toalla. Luego fueron colocadas en una estufa a 37°C durante 12 horas y molidas en un molinillo eléctrico. Los extractos se prepararon al 8% en buffer fosfato, 66 mmol/L, pH 7,2 en NaCl 150 mmol/L (PBS). En cada paso de la extracción se realizaron pruebas de hemaglutinación y se determinó la concentración de proteínas³⁶, usando como patrón Concanavalina A (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., EEUU).

Preparación de los eritrocitos

Se emplearon eritrocitos de: ratón, hamster y conejo; y humanos de los tipos A, B y O. Para la sangre humana se utilizó heparina como anticoagulante. Las otras muestras de sangre fueron recogidas en solución modificada de Alsever⁶. Para las pruebas de hemaglutinación se usaron eritrocitos al 4% en NaCl 0,15mol/L, preparados siguiendo el procedimiento descrito por Jaffé y col³⁰.

Los eritrocitos de conejo, hamster y ratón fueron tratados con pronasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., EEUU) de acuerdo con el procedimiento ya descrito por nuestro laboratorio²⁸.

Determinación del título hemaglutinante

El título hemaglutinante se calculó por el método de Kilpatrick y Yeoman³³. Para ello se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los extractos en NaCl 0,15mol/L en placas de microtitulación (Dynatech Lab. Inc. Alexandria, Vi. EEUU). Se tomó como dilución final el último pozo (n) en el cual se observó aglutinación macroscópica luego de 90 minutos en reposo a temperatura ambiente. La actividad hemaglutinante se expresó en Unidades/mg de proteína, donde cada unidad corresponde a la relación 2ⁿ/ mL de extracto. Para estos ensayos, se emplearon eritrocitos con y sin tratamiento con pronasa.

Inhibición de la hemaglutinación por azúcares y glicoproteínas

Para los ensayos de inhibición, se utilizaron solamente eritrocitos de conejo tratados con pronasa, por su mayor sensibilidad. La inhibición se estableció comparando el título hemaglutinante en presencia y ausencia del azúcar o la

Tabla 1. Título de hemaglutinación de extractos de algas marinas con distintos tipos de eritrocitos.

Especie	Lugar de Recolección	Eritrocitos								
		Conejo	Conejo Pronasa	Hamster	Hamster Pronasa	Ratón	Ratón Pronasa	Humanos A	B	O
División Chlorophyta										
<i>Codium isthmocladum</i>	DF1	2 (2)	7 (7)	2 (2)	112 (112)	0,4 (0,4)	14 (14)	<1 (<1)	0 (0)	0 (0)
<i>C. repens</i>	DF1	3 (3)	6 (6)	3 (3)	382 (382)	0,7 (0,7)	48 (48)	<1 (<1)	<1 (<1)	0 (0)
<i>Caulerpa mexicana</i>	EF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. racemosa</i>	EF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>C. sertularioides</i>	DF1	0,4 (0,4)	2 (2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	DF1	2 (2)	13 (13)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Halimeda opuntia</i> forma minua	EF1	8 (8)	34 (34)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Halimeda opuntia</i> forma cordata	EF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Ulva fasciata</i>	EF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
División Phaeophyta										
<i>Chnoospora minima</i>	DF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Dictyota jamaicensis</i>	DF1	0 (0)	640 (0)	0 (0)	20 (0)	0 (0)	0 (0)	20 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Padina gymnospora</i>	DF1	0,3 (0)	1 (0)	0 (0)	1 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>P. gymnospora</i>	EF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sargassum cymosum</i>	DF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. filipendula</i>	EF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. rigidulum</i>	EF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
División Rhodophyta										
<i>Acanthophora spicifera</i>	EF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Centroceras clavulatum</i>	DF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Champia parvula</i>	DF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Digenea simplex</i>	DF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>D. simplex</i>	EF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Galaxaura marginata</i>	EF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Gelidium serrulatum</i>	DF1	258 (0)	1030 (0)	4 (0)	16 (0)	258 (186)	1030 (186)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Grateloupia cuneifolia</i>	DF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>G. filicina</i>	DF1	1 (93)	10 (156)	0 (3)	1 (12)	1 (186)	1 (186)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>Gymnogongrus tenuis</i>	DF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hypnea cervicornis</i>	DF1	2 (3)	13 (6)	2 (0)	206 (0)	0,4 (0)	3 (0)	0 (0)	2 (0)	0 (0)
<i>Laurencia obtusa</i>	EF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>L. papillosa</i>	DF1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Pterocladia bartlettii</i>	EF2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Lugares de recolección: DF: Distrito Federal (1: Taguao; 2: Carmen de Uría); EF: Estado Falcón (1: Cayo Borracho; 2: San Juan de los Callos). Los extractos de la algas se usaron al 4% (p/v). El título de hemaglutinación se expresa como Unidades/mg de proteína (ver Materiales y Métodos).

Los valores en los paréntesis corresponden a los títulos de hemaglutinación de los extractos tratados con polivinilpolipirrolidona (10% (p/v) en PBS). <1: valores menores que 1; 0: no hemaglutinación.

glicoproteína correspondiente. Otros ensayos fueron diseñados para calcular la cantidad mínima del azúcar capaz de inhibir la hemaglutinación.

Todos los azúcares empleados fueron de la configuración D, salvo en el caso de la fucosa, donde se utilizaron los isómeros D y L. Los azúcares: fructosa (Fru), glucosa (Glc), manosa (Man), galactosa (Gal), N-acetil-D-galactosamina (NAcGal), fucosa (D-Fuc y L-Fuc), Acido

N-acetil-neuramínico (NaNH), xilosa (Xil), maltosa (Mal), sacarosa (Sac), se emplearon a una concentración 0,4 mol/L en NaCl 0,15 mol/L y las glicoproteínas Fetuina (Fet), Glicoproteína α 1-ácida (Gli) y Mucina de glándula submaxilar de bovino (Muc) fueron utilizadas al 1% en NaCl 0,15 mol/L. Todos los azúcares y las glicoproteínas fueron de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., EEUU.

Tabla 2. Efecto inhibitor de la actividad hemaglutinante de extractos de algas marinas por azúcares sencillos y glicoproteínas.

Especie	Agentes Inhibidores														
	Control	Fru	Glc	Man	Gal	NAcGal	L-Fuc	D-Fuc	NaNa	Xil	Mal	Sac	Fet	Gli	Muc
Rhodophyta															
<i>Grateloupia filicina</i>	186	186	186	186	186	5	186	186	186	186	186	186	186	186	186
Chlorophyta															
<i>Caulerpa sertularioides</i>	2	2	2	0,2	2	2	2	2	0,04	2	2	2	2	2	2
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	13	13	13	0,3	0,3	13	13	13	13	13	13	13	13	13	13
<i>Codium repens</i>	6	6	6	6	6	1,4	6	6	1,4	6	6	6	6	6	5
<i>Codium isthmocladum</i>	7	7	7	7	7	2	7	7	2	7	7	7	7	7	0,04
<i>Halimeda opuntia</i> (forma minua)	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34	34

Los valores representan el título de hemaglutinación usando eritrocitos de conejo tratados con pronasa (Unidades/mg proteína). Fru: D-fructosa, Glc: D-glucosa, Man: D-manosa, Gal: D-galactosa, NAcGal: N-Acetil-D-galactosamina, L-Fuc: fucosa, D-Fuc: fucosa, NaNa: Acido N-Acetilneuramínico, Xil: D-xilosa, Mal: maltosa, Sac: sacarosa, Fet: fetuína, Gli: glicoproteína a 1 ácida, Muc: mucina submaxilar de bovino.

Precipitación de los taninos con polivinilpolipirrolidona (PVPP)

Se siguió el método de Blunden y col.⁴. Los extractos se prepararon como se explicó anteriormente, pero en presencia de PVPP al 10% en PBS. La actividad hemaglutinante se determinó antes y después del tratamiento con PVPP.

Determinación del contenido de taninos

Esta determinación se hizo solamente en las algas pardas y rojas. Para la extracción de los taninos se siguió el método de Carmona⁷ empleando como solvente metanol-HCl al 1%. La estimación de los tipos de taninos, se hizo siguiendo tres procedimientos: una modificación del método del azul de Prusia de Price y Butler, empleando como patrón ácido tánico (1 mg/mL)⁴⁰; el del Butanol-HCl de Porter y col.³⁹, empleando como patrón taninos purificados de *Phaseolus vulgaris* L., variedad Tacarigua, a una concentración de 1 mg/mL; y el del sulfato férrico amoniacal³⁷, en el cual se usó como patrón ácido tánico (1 mg/mL).

Inhibidores de proteasas

Se siguió la metodología de Tovar⁴⁴ para su detección. Se ensayaron los extractos de todas las algas, los cuales se prepararon a una concentración del 20% en PBS. Como controles se emplearon extractos al 10% en NaCl 0,15 mol/L de semillas de *Phaseolus vulgaris* L. de las variedades Mérida y Tacarigua. La tripsina y subtilisina fueron de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., EEUU.

RESULTADOS

La actividad hemaglutinante de los extractos de algas, detectada con eritrocitos de diferentes especies, incluyendo los humanos del sistema ABO, se reporta en la Tabla 1. Los títulos de aglutinación con los eritrocitos humanos fueron menores de uno. Para la especie *D. jamaicensis*, se obtuvo un título de 20 U/mg con los eritrocitos humanos del tipo A (Tabla 1), pero luego del tratamiento con PVPP, dicha actividad desapareció. Se obtuvo un mayor título de hemaglutinación con los eritrocitos que fueron tratados con pronasa, independientemente del origen de los mismos, como se puede apreciar en la Tabla 1.

Luego del tratamiento con PVPP todos los extractos de Chlorophyta mantuvieron el título de hemaglutinación previo (Tabla 1). En el caso de *G. filicina* (Rhodophyta) el título de hemaglutinación con los diferentes eritrocitos no humanos aumentó considerablemente después del tratamiento con PVPP. Para *H. cervicornis* (Rhodophyta) el tratamiento con PVPP eliminó la actividad hemaglutinante con los eritrocitos humanos, de ratón y de hamster, no obstante, la aglutinación de los de conejo se mantuvo (Tabla 1).

En la Tabla 2 se presentan los resultados de la inhibición de la hemaglutinación por azúcares y glicoproteínas de los extractos que resultaron positivos a la hemaglutinación después del tratamiento con PVPP. No se incluyó el extracto de *H. cervicornis*. Se observó que cinco de las seis especies con lectinas presentaron inhibición de la hemaglutinación. Destaca el caso de *G. filicina*, en la cual la hemaglutinación fue inhibida específicamente por NAcGal (Tabla 2). Las lectinas de las dos especies del género

Tabla 3. Cantidad mínima de hapteno necesaria para inhibir la actividad hemaglutinante de extractos de algas marinas.

Especie	Agente Inhibidor	μ moles
<i>Caulerpa sertularioides</i>	Acido N-Acetilneuramínico	0,8
	Manosa	3
<i>Codium isthmocladum</i>	Mucina	12,5*
	N-Acetilgalactosamina	125
	Acido N-Acetilneuramínico	1.000
<i>Codium repens</i>	Mucina	0,1*
	N-Acetilgalactosamina	8
	Acido N-Acetilneuramínico	16
<i>Grateloupia filicina</i>	N-Acetilgalactosamina	4
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	Galactosa	4
	Manosa	16

Los haptenos fueron diluidos en forma seriada, agregando luego una cantidad fija del extracto y los eritrocitos de conejo tratados con pronasa. La concentración inicial de los azúcares fue 0,4 mol/L; la de mucina 1 mg/mL.

*Los valores de mucina se expresan en μ g.

Codium fueron inhibidas por los mismos azúcares. De las glicoproteínas utilizadas, sólo la mucina de glándula submaxilar de bovino inhibió la hemaglutinación de las especies del género *Codium*. La actividad hemaglutinante de *H. opuntia* no fue inhibida por ninguno de los haptenos empleados.

La Tabla 3 muestra las cantidades mínimas requeridas de algunos azúcares y de mucina para inhibir la hemaglutinación. Entre los compuestos probados, NaNa resultó ser el mejor inhibidor de lectinas porque bastó 0,8 μ mol de ese azúcar para inhibir la actividad hemaglutinante del extracto de *C. sertularioides*. NAcGal fue el único azúcar en inhibir la lectina de *G. filicina* (4 μ mol). En cuanto a las dos especies del género *Codium*, la mucina resultó el mejor inhibidor. La galactosa fue un inhibidor cuatro veces más potente que la manosa para *E. intestinalis*.

En relación al contenido de polifenoles, se puede observar en la Tabla 4 que, en general, las algas pardas resultaron más ricas en estos compuestos que las rojas. *P. gymnospora* presentó el mayor contenido (11,0 mg/g de harina); el valor más alto para el grupo de las algas rojas, fue para *G. tenuis* (3,5 mg/g de harina).

Los extractos de *P. gymnospora* y *A. spicifera* fueron los únicos que mostraron actividad inhibidora de tripsina (resultados no mostrados). En el caso de la subtilisina, no se evidenció efecto inhibidor alguno.

DISCUSION

El mayor número de especies con actividad hemaglutinante se observó en la División Chlorophyta: cinco de un total de ocho especies estudiadas. Como se muestra en la Tabla 1, los eritrocitos de hamster tratados con pronasa resultaron los más sensibles (16 veces con respecto a los de

Tabla 4. Contenido de taninos en algas marinas Phaeophyta y Rhodophyta estimados por el método del azul de Prusia*

Especie	mg/g harina
División Phaeophyta	
<i>Sargassum cymosum</i>	1,2
<i>Sargassum rigidulum</i>	2,0
<i>Sargassum filipendula</i>	2,1
<i>Chnoospora minima</i>	3,5
<i>Dictyota jamaicensis</i>	5,0
<i>Padina gymnospora</i>	11,0
División Rhodophyta	
<i>Grateloupia filicina</i>	0,2
<i>Gelidium serrulatum</i>	0,5
<i>Digenea simplex</i>	0,6
<i>Laurencia obtusa</i>	0,6
<i>Centroceras clavulatum</i>	0,7
<i>Laurencia papillosa</i>	0,8
<i>Champia parvula</i>	1,2
<i>Grateloupia cuneifolia</i>	1,2
<i>Pterocladia bartlettii</i>	1,3
<i>Galaxaura marginata</i>	1,3
<i>Acanthophora spicifera</i>	1,5
<i>Gymnogongrus tenuis</i>	3,5

El contenido de taninos se expresa como equivalentes de ácido tánico (mg/g de harina).

*De acuerdo a la modificación de Price y Butler⁴⁰.

conejo-pronasa y 8 más que los de ratón-pronasa) frente a las lectinas de estas especies. Blunden y col.², encontraron que, nueve de las doce algas verdes por ellos estudiadas, mostraron actividad hemaglutinante con los eritrocitos humanos del sistema ABO tratados con papaína. En trabajos previos de nuestro laboratorio^{8,34}, realizados con semillas de leguminosas, el mayor número de especies donde se detectó actividad hemaglutinante se obtuvo con eritrocitos de conejo y hamster tratados con pronasa. Los resultados del presente trabajo confirman la utilidad del tratamiento previo de los eritrocitos con pronasa en la búsqueda de lectinas.

En las Divisiones Phaeophyta y Rhodophyta, solamente los extractos de dos especies - *G. filicina* y *H. cervicornis* - presentaron actividad aglutinante luego de ser tratados con PVPP. Estos resultados confirman lo reportado por otros autores⁴, en el sentido de que la actividad hemaglutinante en las algas pardas (*Phaeophyta*), es debida mayormente a la presencia de taninos. El aumento en el título de hemaglutinación luego del tratamiento de los extractos de *G. filicina* (Rhodophyta) con PVPP, pudo ser debido a que en ausencia de los taninos u otros compuestos, eliminados por la precipitación con PVPP, la lectina reconoce plenamente sus receptores en la superficie de los eritrocitos. Cabe señalar que la concentración de taninos en esta alga es particularmente baja, de allí que cobra fuerza la posible presencia de algún otro inhibidor de la lectina precipitable con PVPP. Puesto que la concentración de PVPP empleada fue la misma que la utilizada por los autores

arriba citados⁴, la persistente actividad hemaglutinante observada puede ser atribuida a la presencia de lectinas y no a la de taninos remanentes luego de la precipitación.

El hecho de no haber detectado actividad hemaglutinante en algunas de las especies de algas estudiadas, no descarta la posibilidad de la existencia de lectinas en las mismas, ya que el tipo de eritrocitos empleados en el presente trabajo fue limitado. Estudios previos de nuestro laboratorio³⁴, empleando un número mucho mayor de especies animales como fuente de eritrocitos, permitieron detectar actividad hemaglutinante en algunas semillas de leguminosas que hubieran sido consideradas carentes de lectinas al emplear un número más restringido de eritrocitos.

En este contexto cabe señalar que Ingram²⁶ ha propuesto como las posibles causas de la diferencia de título y reactividad de las lectinas de algas, la influencia de los factores ambientales y geográficos de las áreas en las cuales son recolectados los especímenes a estudiar y que las fluctuaciones estacionales en la cantidad de lectina son el reflejo de la etapa de maduración de los órganos reproductivos, debido a que en esta etapa el contenido de lectina es mayor con respecto a las otras etapas del ciclo de vida de las algas. En el presente trabajo se encontró actividad hemaglutinante en el extracto proveniente de la forma minua de *H. opuntia* mientras que la forma cordata de la misma especie resultó carente de dicha actividad. Este es un hallazgo interesante que podría contribuir a la distinción de formas de una misma especie.

Dada la especificidad de las lectinas, la inhibición de la aglutinación por determinados azúcares permite conocer cuales de estos compuestos están presentes en la superficie de las células aglutinadas. Los azúcares sencillos no inhibieron de manera específica las reacciones de hemaglutinación, excepto en el caso de la lectina de *G. filicina*, la cual sí lo fue por NAcGal. En la literatura consultada no se encontraron informes previos que indicaran especificidad por este azúcar a nivel de género o especie de algas. En consecuencia, este es un hallazgo significativo que ameritaría el aislamiento de esta lectina para estudiar, con más detalle, su especificidad. Las dos especies del género *Codium* fueron inhibidas por los azúcares NAcGal y NaNa, concordando con lo reportado previamente por Rogers y Loveless⁴¹ para la lectina de *Codium fragile* ssp. *tomentosoides*, la cual es inhibida por NAcGal y

es una excepción a lo reportado por Hori y col.²⁴, quienes encontraron que los monosacáridos y polisacáridos eran inefectivos como inhibidores de la aglutinación causada por péptidos de bajo peso molecular obtenidos del alga *Hypnea japonica*; en cambio, las glicoproteínas como fetuina y ovomucoide resultaron excelentes inhibidores. En el presente trabajo, al igual que en el de Hori y col.²⁴, fue una glicoproteína el mejor inhibidor de la hemaglutinación causada por los extractos de las dos especies del género *Codium*.

Para la estimación de los taninos se utilizaron tres métodos, de los cuales sólo con el Azul de Prusia pudieron detectarse polifenoles reactivos, mientras que con los otros dos procedimientos los valores de taninos se encontraron por debajo de los límites de resolución. En el primer caso, la estimación se basa en el poder reductor de polifenoles presentes y, por lo tanto, se estiman los fenoles totales, debido a que el método no distingue entre taninos y otros compuestos fenólicos⁷. Considerando que los métodos del Butanol-HCl³⁹ y del sulfato férrico amoniacal³⁷ reconocen taninos condensados e hidrolizables, respectivamente, y a los reportes de la literatura, puede inferirse que los taninos presentes en las algas estudiadas son florotaninos, derivados del floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenceno), los cuales difieren de aquellos encontrados en las plantas terrestres²². Por ejemplo, Glombitza y col.¹⁷, aislaron y caracterizaron quince florotaninos del extracto etanólico del alga parda *Carpophyllum maschalocarpum*.

Solamente con los extractos de dos de las algas estudiadas se observó un halo de inhibición muy tenue con tripsina (resultados no mostrados), dada la alta sensibilidad del método empleado (5×10^{-3} mg de inhibidor) estos resultados indican un contenido muy bajo de inhibidores de tripsina en estas algas. No se observó inhibición alguna de la actividad proteolítica de la subtilisina.

Este estudio preliminar permite encaminar futuras investigaciones destinadas a la búsqueda de compuestos de posible interés biológico y medicinal en un extenso grupo vegetal, ampliamente representado en nuestros mares.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan su agradecimiento al Dr. Andrés Carmona por su lectura crítica del manuscrito.

REFERENCIAS

1. Bird, K.T., Chiles, T.C., Longley, R.E., Kendrick, A.F. y Kinkema, M.D. Agglutinins from marine macroalgae of southeastern United States. *J. Appl. Phycol.* 5: 213-218, 1993.
2. Blunden, G., Rogers, D.J. y Farham, W.F. Haemagglutinins in British marine algae and their possible taxonomic value. In D.E.G. Irvine y J.H. Price. Modern approaches to the taxonomy of red and brown algae. The Systematics Association Special Vol. No. 10, Academic Press, Inc. New York, 1978, pp. 21-45.
3. Blunden, G., Rogers, D.J., Carpenter, B.C., McLellan, D.S. y Smith B.E. Lectinas, agentes antihemostáticos y compuestos positivos al reactivo de Dragendorff en algas marinas de Venezuela y Túnez. *Rev. Facultad Farmacia* (Mérida, Venezuela) 28: 25-28, 1992.
4. Blunden, G., Rogers, D.J., Loveless, R.W. y Patel, A.V.

- Haemagglutinins in marine algae-lectins or phenols? Walter de Gruyter y Co., Berlin, 1986 Lectins, V: pp. 139-145.
5. **Boyd, C.W., Almodóvar, L.R. y Boyd, L.G.** Agglutinins in marine algae for human erythrocytes. *Transfusion* 6: 82-83, 1966.
 6. **Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.E. y Susdorf, D.H.** Methods in Immunology. Second Edition. W.A. Benjamin, Inc. EEUU, 1970, p. 454.
 7. **Carmona, A.** Aislamiento, cuantificación, purificación y caracterización parcial de los taninos de caracas negras (*Phaseolus vulgaris*) variedad Cubagua. Trabajo de Ascenso para optar a la Categoría de Profesor Asistente. Escuela de Biología. UCV. p. 57, 1981.
 8. **Casotto, M., Palozzo, A.I., Agostini, G. y Levy-Benshimol, A.** Estudio de las lectinas presentes en semillas de Papilionioideae (Leguminosae) de Venezuela. *Acta Cient. Venez.* 35: 248-252, 1984.
 9. **Casaretto, J.A. y Corcuera, L.J.** Plant protein inhibitors a defensive response against insects. *Biol. Res.* 28: 239-249, 1995.
 10. **Chapman, V.J.** The marine algae of Jamaica. Part II. Phaeophyceae and Rhodophyceae. *Publ. Inst. of Jamaica* 12(1): 1-201, 1963.
 11. **Chiles, T.C. y Bird, K.T.** A comparative study of animal erythrocyte agglutinins from marine algae. *Comp. Biochem. Physiol.* 94B: 107-111, 1989.
 12. **Cordeiro-Marino, M.** Rodófitas bentónicas marinhas do estado de Santa Catarina. *Rickia* 7: 1-123, 1978.
 13. **Dawes, C.J.** Botánica Marina, De Limusa, México, 1986, p. 673.
 14. **Fan, K.C.** Morphological studies of Gelidiales. *Univ. Calif. Pub. Bot.* 32: 315-368, 1961.
 15. **Ganesan, E.K.** Evaluación de la flora macrobentónica (macroalgas y fanerógamas marinas) de la cuenca Tuy-Cariaco, Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente* 22: 145-175, 1983.
 16. **Ganesan, E.K.** A catalog of benthic marine algae and seagrasses of Venezuela, Conicit Fondo Editorial, Caracas, 1989, p. 237.
 17. **Glombitza, K.W. y Lis, S.M.** Further Phlorotannins from *Carpophyllum maschalocarpum*. *Planta Med.* 56: 558-560, 1990.
 18. **Goldstein, I.J., Hughes, D.C., Monsigny, M., Osawa, M. y Sharon, N.** What should be called a lectin? *Nature* 285: 66-70, 1980.
 19. **Gómez, S.** Estudio sistemático de algas macrobentónicas marinas de las islas coralinas Cayo Borracho y Cayo Sal, Parque Nacional Morrocoy, Edo. Falcón. Trabajo de Ascenso, Escuela de Biología, UCV. p. 154, 1982.
 20. **González, A.C.** Estudio ficoecológico de una región del litoral central (Punta Tarma), Venezuela. *Acta Bot. Venez.* 112: 207-240, 1977a.
 21. **Hammer, L. y Gressner, F.** La taxonomía de la vegetación marina en la costa oriental de Venezuela. *Bol. Inst. Oceanogr. Univ. Oriente* 6: 186-265, 1967.
 22. **Hay, M.E. y Fenical, W.** Marine plant-herbivore interactions: The ecology of chemical defence. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 19: 111-145, 1988.
 23. **Hommersand, M.H.** The morphology and classification of some Ceramiaceae and Rhodomelaceae. *Univ. Calif. Pub. Bot.* 35: 165-366, 1963.
 24. **Hori, K., Miyazawa, K., Fusetani, N., Hashimoto, K. e Ito, K.** Hyprins, low molecular weight peptidic agglutinins isolated from a marine red alga *Hypnea japonica*. *Biochim. Biophys. Acta* 873: 228-236, 1986.
 25. **Huisman, J.M. y Borowitzka, M.A.** A revision of the Australian species of *Galaxaura* (Rhodophyta, Galaxauraceae), with a description of *Tricleocarpa* gen. nov. *Phycology* 29: 150-172, 1990.
 26. **Ingram, G.A.** Lectins and lectin-like molecules in lower plants - 1. Marine Algae. *Developmental and Comp. Immun.* 9: 1-10, 1985.
 27. **Ishihara, T., Yasuda, M. y Suchimoto, T.** Protease inhibitors contained in algae (1): Trypsin inhibitors in Purple Laver. *J. Jap. Soc. Food and Nutr.* 21: 45-48, 1968.
 28. **Jaffé, W.G., Brücher, O. y Palozzo, A.** Detection of four types specific Phytohemagglutinins in different lines of beans (*Phaseolus vulgaris*). *Z. Immun. Forsch.* 142: 439-447, 1972.
 29. **Jaffé, W.G.** Hemagglutinins (Lectins). En: Toxic Constituents of Plant Foodstuffs. Liener, I.E. (Editor), Academic Press, 1980, pp. 73-98.
 30. **Jaffé, W.G., Montbrun, M., Callejas, A. y Jaffé, M.** Studien mit agglutinierenden ei weiss fractionen aus *Phaseolus vulgaris* and *Vicia faba* in ihrer werkund auf die erythrozyten verschiedener. *Z. Immun. Alleg.* 129: 190-196, 1965.
 31. **Joly, A.B.** Flora marinha do litoral norte do Estado de Sao Paulo e regios circumvizinhas. *Bol. Filos. Fac. Cien. Let. Univ. Sao Paulo. Ser. Bot.* 294: 1-393, 1965.
 32. **Joly, A.B.** Generos de algas marinhas da costa atlantica latinoamericana, Editora da Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo Brazil, 1967, p. 464.
 33. **Kilpatrick, D.C. y Yeoman, M.M.** Purification of the lectin of *Datura stramonium*. *Biochem. J.* 175: 1151-1153, 1978.
 34. **Levy-Benshimol, A., Melito, C. y Ramírez, N.** Presencia de lectinas en semillas de leguminosas de la flora venezolana. *Acta Cient. Venez.* 44: 341-348, 1994.
 35. **Liener, I.E., Sharon, N. y Goldstein, I.J.** En: The Lectins. Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine. Academic Press, Inc. London/New York, 1986, pp. 1-600.
 36. **Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J.** Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.
 37. **Maxson, E.D. y Rooney, L.W.** Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chemistry* 49: 719-729, 1972.
 38. **Porter, L.J.** Tannins. *Methods in Plant Biochem.* 1: 389-419, 1989.
 39. **Porter, L.J., Hrstich, L.N. y Cahn, B.G.** The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and dephnidin. *Phytochemistry* 25: 223-230, 1986.
 40. **Price, M.L. y Butler, L.G.** Rapid visual estimation on spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. *J. Agric. Food Chem.* 25: 1268-1273, 1977.

41. **Rogers, D.J. y Loveless, R.W.** Receptor-specificity differences in the lectins from subspecies of *Codium fragile*. *Br. Phycol. J.* 20: 190-191, 1985.
42. **Sharon, N. y Lis, H.** Lectins: cell agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* 177: 951-959, 1972.
43. **Shiomi, K., Kamiya, H. y Shimizu, Y.** Purification and characterization of an agglutinin in the red alga *Agardhiella tenera*. *Biochim. Biophys. Acta* 576: 118-127, 1979.
44. **Tovar, J.** Rapid detection of proteinase inhibitors in agar plates. *Acta. Cient. Venez.* 34: 370-371, 1983.