



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS DEL MAR Y LIMNOLOGÍA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA
(QUÍMICA ACUÁTICA)**

“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS DE *Microcystis aeruginosa*”

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

BIÓL. IVÁN RAMÍREZ ROBLES

DIRECTOR DE TESIS

DR. LEOVIGILDO QUIJANO¹

COMITÉ TUTOR

DR. ROBERTO ARREGUÍN ESPINOSA DE LOS MONTEROS¹

DR. JOSÉ S. CALDERÓN PARDO¹

DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ²

DRA. IRMA ESTHELA SORIA MERCADO³

1. Instituto de Química, UNAM.
2. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM - Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Puerto Morelos.
3. Universidad Autónoma de Baja California, UABC - Facultad de Ciencias Marinas, Unidad Ensenada

MÉXICO, CD. MX. (Diciembre) 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM)

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS DE
Microcystis aeruginosa”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
(Química Acuática)**

P R E S E N T A:

BIÓL. IVÁN RAMÍREZ ROBLES

DIRECTORA DE TESIS: DR. LEOVIGILDO QUIJANO¹

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO AREGUÍN ESPINOSA DE LOS
MONTEROS¹
DR. JOSÉ S. CALDERÓN PARDO¹
DRA. JUDITH SÁNCHEZ RODRÍGUEZ²
DRA. IRMA ESTHELA SORIA MERCADO³

1. Instituto de Química, UNAM.
2. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM - Unidad Académica de Sistemas Arrecifales, Puerto Morelos.
3. Universidad Autónoma de Baja California, UABC - Facultad de Ciencias Marinas, Unidad Ensenada

MÉXICO, CD. MX. - (Diciembre), 2016.



El presente estudio se realizó en el laboratorio de 2-6, del departamento de productos naturales del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y por medio del Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL). Bajo la dirección del Dr. Leovigildo Quijano y con una beca proporcionada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Dedicatoria.

El esfuerzo realizado en este trabajo, va dedicado a todas aquellas personas que estuvieron conmigo durante el día a día, con quienes compartí estrés, diversión, mucho trabajo, comidas, salidas etc... siempre con la mejor vibra, una sonrisa, un buen consejo y la mejor compañía. A mi mamá, “mi jefa” quien por sobre todas las cosas me apoya en cada decisión, siempre guiándome y motivandome con sabias palabras y platicas interminables. A mi papá, quien siempre a sido una gran inspiración y ejemplo, por enseñarme infinidad de cosas, pero, ante todo compartirme esa gran pasión por la ciencia. Al mas reciente integrante de esta familia, mi sobrino Mateo, quien esta comenzando su vida, pero quien después de que yo fui aceptado en el posgrado fue la siguiente buena noticia.

¡Muchas Gracias ¡

Agradecimientos.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT) por el apoyo brindado a la realización de este proyecto por medio de la beca otorgada durante mis estudios de maestría (becario 336646).

A mi director de Tesis el Dr. Leovigildo Quijano. Gracias a su apoyo y confianza en mi trabajo, su paciencia y su gran capacidad de enseñanza, para explicarme todos los conceptos y técnicas necesarias. Le agradezco el haberme facilitado los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades, así como nuevas ideas propuestas durante el desarrollo de este trabajo. Muchas gracias.

A los miembros de mi comité tutorial: Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros, Dra. Irma Esthela Soria Mercado, Dra. Judith Sánchez Rodríguez y Dr. José S. Calderón Pardo, por el tiempo dedicado a la revisión, corrección y todas las recomendaciones realizadas durante los exámenes tutorales y la mejor redacción de este trabajo.

Al personal técnico de espectroscopia y cromatografía del Instituto de Química – UNAM: Q. Rocio Patiño (IR), Dra. Beatriz Quiroz García, Dra. Isabel Chávez Uribe, Dr. Rubén Gaviño Ramírez, M. en C. Elizabeth Huerta Salazar, Q. Ma. de los Ángeles Peña González, M en C. Héctor Ríos Olivares (RMN), I. Q. Luís Velasco, Dr. Javier Pérez (EM) y M. en C. Lucía del Carmen Marquéz Alonso (CG).

A mi hermano, por tus buenos deseos, apoyo incondicional en todo momento y por ser mi mejor amigo.

A mis amigos, por estar presentes en todo momento, buenos y malos ratos, soportar mi estrés, echar el chisme, pero sobre todo gracias por su valiosa e incondicional amistad.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ABREVIATURAS, FÓRMULAS Y ACRÓNIMOS.....	VIII

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPITULO I.

INTRODUCCIÓN.

	Página
1.1 <i>Generalidades</i>	1
1.2 Antecedentes.....	3
1.2.1 Clasificación de las cianobacterias.....	3
1.2.2 Características físicas, químicas y biológicas de <i>Microcystis aeruginosa</i> y su hábitat.....	5
1.2.2.1 Intensidad de luz y flotabilidad.....	5
1.2.2.2 Temperatura.....	5
1.2.2.3 Nutrimentos.....	6
1.2.2.4 Asociaciones.....	7
1.2.3 El metabolismo.....	8
1.2.3.1 Metabolitos de las cianobacterias.....	9
1.2.3.2 Importancia de los metabolitos y sus diferentes usos.....	22
1.2.3.2.1 Ácidos grasos y lípidos.....	24
1.2.3.2.2 Microcistinas.....	25
1.2.3.2.3 Aeruginosinas.....	25
1.2.3.2.4 Nodularinas.....	26
1.2.3.2.5 Saxitoxinas.....	27
1.2.3.2.6 Anatoxinas.....	27
1.2.3.2.7 Cilindrospermopsinas.....	28
1.2.3.2.8 Lipopolisacáridos.....	29
1.2.3.2.9 Otras toxinas.....	30
1.2.3.3 Metabolitos de <i>Microcystis. aeruginosa</i>	32
1.3 Hipótesis.....	37
1.4 Objetivos.....	37
1.5 Justificación.....	37

ÍNDICE

CAPITULO II.	MÉTODOS.	Pagina
2.1 Trabajo de campo.....		39
2.1.1 Colecta, procesamiento de muestras e identificación de especies.....		39
2.1.2 Aislamiento de <i>Microcystis. aeruginosa</i>		39
2.2 Diseño experimental.....		40
2.2.1 Cultivo de <i>M. aeruginosa</i>		40
2.2.1.1 Medio de cultivo.....		40
2.2.2 Aislamiento y caracterización de metabolitos de <i>Microcystis. aeruginosa</i>		41
2.2.2.1 Material y equipo empleado para la identificación de metabolitos.....		41
2.2.2.1.2 Cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía en columna (CC).....		41
2.2.2.1.3 Resonancia magnética nuclear protónica (¹ H) y de carbono (¹³ C)		42
2.2.2.1.4 Espectrometría de Masas.....		42
2.2.2.1.5 Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplado a Espectrometría de Masas (EM).....		43
2.2.3 Obtención del extracto crudo de <i>Microcystis aeruginosa</i>		43
2.2.4 Cromatografía en columna (CC) Primera extracción (extracto crudo)		43
2.2.4.1 Extracto de metanol (MeOH).....		44
2.2.5 Cromatografía en columna (CC) Segunda extracción (Extracto “Met-AR)		45
2.2.5.1 Cromatografía en columna (CC), de gel de sílice de la fracción MeOH – D.....		45
2.2.5.2 Cromatografía en columna (CC), de Sephadex - LH20 de la fracción MeOH – H.....		46
2.2.5.3 Cromatografía en columna (CC), de gel de sílice de la fracción MeOH – HA.....		46
2.2.6 Extracción Líquido-Líquido de la fracción CYST-M.....		47

CAPITULO III**RESULTADOS.**

Pagina

3.1 Identificación de ésteres metílicos de la fracción MeOH – DC por resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹ H) y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM)	48
3.2 Identificación de Fitol (19) y esteroides de las fracciones MeOH – DG, DG ² y HA1 por resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹ H) y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).....	55

CAPITULO IV**DISCUSIÓN**

Pagina

4.1 Discusión.....	64
--------------------	----

CAPITULO V**CONCLUSIONES**

Pagina

5.1 Conclusiones 1 – 5.....	68
5.2 Perspectivas.....	69

REFERENCIAS	70
ANEXOS	105

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Células de <i>Microcystis aeruginosa</i> , a) <i>M. aeruginosa</i> , b-d) colonias de <i>M. aeruginosa</i> tomadas de Ferreira-Rosini <i>et. al.</i> , 2013)	5
Figura 2. Esquema de cultivo escalonado, a) Cultivo de <i>M. aeruginosa</i> (1L) y b) (20L)	40
Figura 3. Diagrama de flujo de la obtención del extracto de <i>M. aeruginosa</i> y procedimiento seguido con la fracción obtenida con MeOH (Met).....	44
Figura 4. Esquema de la cromatografía en columna (Sephadex-LH20) de la fracción primaria Met-AR.....	45
Figura 5. Esquema de la cromatografía en columna (Gel de sílice) de la fracción MeOH – D.....	45
Figura 6. Esquema de la cromatografía en columna (Sephadex-LH20) de la fracción MeOH – HA.....	46
Figura 7. Esquema de la cromatografía en columna (Gel de sílice) de la fracción MeOH – HA.....	46
Figura 8. Obtención de metabolitos por lisis celular (Congelación y Descongelación) de <i>Microcystis aeruginosa</i>	47
Figura 9. Espectro de Resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹ H), de ésteres metílicos de la fracción MeOH-DC.....	50
Figura 10. Cromatograma de la mezcla de ésteres metílicos de la fracción MeOH-DC, analizada por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM)	51
Figura 11. Espectro de Resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹ H) del fitol (19), aislado de la fracción MeOH-DG.....	57
Figura 12. Cromatograma de la fracción MEOH-DG. El pico mayoritario con TR = 20.45 min corresponde al fitol (19), . Los picos minoritarios corresponden a isómeros del fitol, TR = 20.53 dehidrofitol (20), TR = 20.77 isofitol (21) y TR = 21.00 <i>cis</i> -fitol (22).....	58

Figura 13. Ampliación del espectro obtenido por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) de la fracción MeOH-DG. El pico con tiempo de retención TR = 20.45 min correspondiente al Fitol (19) $M^+ = 278$	59
Figura 14. Cromatograma de la fracción MeOH-DG ² , Los picos con tiempo de retención TR = 35.16, 35.41, 35.68, que corresponden a los compuestos Estigmasterol (20) , 7, 22-ergostadien-3-ona (21) y β -sitosterol (22)	60
Figura 15. Cromatograma de la fracción MEOH-HA1(*). Los picos con tiempo de retención TR = 34.84 y 35.2, que corresponden a los compuestos Cholesta-4,6-dien-3-ona (26) y 4,22-Stigmastadiene-3-ona (27) respectivamente.....	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisiológicas y bioquímicas de los metabolitos primarios y secundarios (Gokulan <i>et al.</i> , 2014)	8
Tabla 2. Compuestos aislados de cianobacterias. (#) refiere al número de compuestos aislados provenientes de esa misma familia (Burja <i>et al.</i> , 2001)	11
Tabla 3. Cianotoxinas comúnmente observadas en agua dulce, estuarina y marina (Codd <i>et al.</i> , 2005a; Fristachi <i>et al.</i> , 2008; Isaacs, 2011)	14
Tabla 4. Estructura química de metabolitos de Cianobacterias. Adaptado de Rezanka y Dembitsky, (2006)	15
Tabla 5. Metabolitos secundarios (MS) y sus efectos probables (Rastogi y Sinha 2009)	32
Tabla 6. Metabolitos aislados de <i>Microcystis aeruginosa</i> . Adaptado de Lifshits y Carmeli, (2012); Lodin-Friedman y Carmeli (2013)	33
Tabla 7. Contenido de nutrientes del fertilizante comercial (vita).....	41
Tabla 8. Composición de Ácidos grasos y ésteres metílicos (%) presentes en <i>M. aeruginosa</i> donde: A.R = Abundancia relativa.....	49
Tabla 9. Ésteres metílicos y ácidos grasos, identificados por CG-EM, donde PB = Pico base, FM = Fórmula Molecular, PM = Peso Molecular y TR = Tiempo de retención.....	52
Tabla 10. Composición de diterpenos identificados de la fracción DG, correspondientes a los isómeros del fitol (19), dehidrofitol (20), isofitol (21) y <i>cis</i> -fitol (22). PM = Peso molecular, FM = Fórmula molecular y AR = Abundancia relativa (%)	56
Tabla 11. Composición de esteroides (%) de <i>Microcystis aeruginosa</i>	56
Tabla 12. Compuestos identificados por espectrometría de masas CG-EM correspondientes a Esteroides, donde: TR = Tiempo de retención.....	61

ABREVIATURAS, FÓRMULAS y ACRÓNIMOS

AcOET	Acetato de Etilo.
Ar	Argón.
Arg	Arginina.
CC	Cromatografía en columna.
CCF	Cromatografía de capa fina.
CCFa	Cromatografía de capa fina analítica.
CCFp	Cromatografía de capa fina preparativa.
CD ₃ OD	Metanol deuterado.
CDCl ₃	Cloroformo deuterado.
CG-EM	Cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas.
CO ₂	Dióxido de Carbono.
CH ₃ CN	Acetonitrilo.
DART	Análisis directo en tiempo real.
DCM	Diclorometano.
DMS	Dimetilsulfóxido.
EM	Espectroscopia de Masas.
ESI	Ionización por Electro-spray.
FM	Fórmula Molecular.
H	Hidrógeno.
H ₂ D	Agua deuterada.
He	Helio
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia.
HPLC-EM	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia acoplado a Espectrometría de Masas.
HRMS	Espectrometría de masas de alta resolución.
iPr	Isopropilo.
K	Potasio.
Leu	Leucina.
LR	Leucina-Arginina.
LRMS	Espectrometría de masas de baja resolución.
M ⁺	Ion aducto.
Mcist-LR	Microcistina-LR (Leucina-Arginina).
Mcist-RR	Microcistina-RR (Arginina-Arginina).
MeOH	Metanol.

MHz	MegaHertz.
MM	Masa Molecular.
N₂	Nitrógeno.
Na	Sodio.
PB	Pico base.
Phe	Fenilalanina.
PM	Peso Molecular.
rADN	Ácido desoxirribonucleico ribosomal.
R_F	Distancia de la muestra al origen.
RMN ¹³C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono.
RMN ¹H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RR	Arginina-Arginina.
RT	Tiempo de Retención.
TMS	Trimetilsilano.
Tyr	Tirosina.

RESUMEN

Se realizó la recolecta de muestras de agua del lago de Chapultepec, con la finalidad de aislar cepas puras de la especie *Microcystis aeruginosa*, se emplearon métodos de cultivo escalonado para la obtención de biomasa necesaria para el análisis químico de los componentes de la cianobacteria estudiada. Se obtuvieron 50 g de material seco del cual se realizaron extracciones con eluyentes con polaridad ascendente (hexano, diclorometano y metanol), posteriormente las fracciones de interés se analizaron por resonancia magnética nuclear (RMN) protónica (^1H) y de carbono (^{13}C), espectrometría de masas (EM) acoplada a cromatografía de gases (CG), así como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) acoplado a espectrometría por electrospray (ESI). Se obtuvieron datos de 18 ésteres metílicos de ácidos grasos, cuatro diterpenos correspondientes dehidrofitol, fitol e isómeros del fitol, cinco esteroides. Los compuestos identificados fueron comparados en bibliotecas de acceso público, así como con compuestos previamente aislados de la especie en otros estudios. La composición relativa de ácidos grasos saturados corresponde al 41.75 % de la composición total de este tipo de compuestos y el 58.25 % se reportó como ácidos grasos insaturados, residiendo la mayor abundancia en el 9-octadecenoato de metilo y 9-hexadecanoato de metilo con abundancias de 18.04 y 16.49 % respectivamente. El diterpeno Fitol se identificó con la mayor abundancia, seguido de los diterpenos *cis* e isofitol. La composición de esteroides se encuentra mayoritariamente conformada por Estigmasterol con un 54.07 %. Los compuestos identificados se ven influenciados por diferentes factores fisicoquímicos, ya que las producciones de estos metabolitos están fuertemente asociadas.

Palabras Clave. Aislamiento, caracterización, *M. aeruginosa*, metabolitos métodos espectroscópicos y cromatográficos, ésteres metílicos, diterpenos, esteroides.

CAPITULO I.

INTRODUCCIÓN

1.1 *Generalidades.*

Las cianobacterias pertenecen al conjunto de microorganismos fotosintéticos (fitoplancton), adaptados a vivir en suspensión en la columna de agua, y se encuentran difundidas por todo el mundo, y se les puede localizar, prácticamente en todos los ecosistemas incluidos los ambientes extremos (Crispin y Gaylarde, 2004). No obstante, los medios límnicos y marinos son los más importantes para las cianobacterias (Whitton, 1992; Mur *et al.*, 1999; Graham y Wilcox, 2000; Sitte *et al.*, 2004). Las cianobacterias son organismos unicelulares y pueden llegar a formar colonias o filamentos. Las formas unicelulares, poseen formas esféricas, ovoides o cilíndricas, cuyas células pueden arreglarse en colonias irregulares, quedando unidas gracias a la matriz secretada durante su crecimiento. La morfología filamentosa es el resultado de múltiples divisiones celulares en un solo plano en ángulo recto al eje principal del filamento. La estructura celular consistente de una cadena de células llamada tricoma, cuyas células vegetativas pueden diferenciarse en heterocistos y aquinetos (Arzate, 2008). Cuentan con los fotosistemas I y II, además de tener la capacidad de sintetizar pigmentos accesorios para captar la luz de manera más eficiente, ya que pueden sintetizarlos de acuerdo a la calidad de la luz a la que estén expuestas (Mur *et al.*, 1999), los pigmentos fotosintéticos de las cianobacterias están localizados en la zona tilacoidal de la membrana citoplasmática. Generalmente, el color verde de la clorofila- α es enmascarado por los carotenoides y pigmentos accesorios como la ficocianina, aloficocianina y ficoeritrina, los cuales se encuentran almacenados en los ficobilisomas, que se encuentran organizados en filas en la superficie externa de la zona tilacoidal (Douglas, 1994).

Otra formidable propiedad de las cianobacterias es su gran capacidad para almacenar nutrientes y metabolitos. Esta afinidad, así como el que algunas especies posean vesículas de gas, les proporcionan ventajas en un determinado cuerpo de agua, ya que regulan su profundidad y ubicación vertical en la columna de agua cuando las condiciones son favorables para su desarrollo (Walsby, 1987), esto les permite proliferar de manera masiva

bajo determinadas circunstancias ambientales. Esta proliferación provocan alteraciones en las condiciones físico-químicas del agua, modificando el pH, la cantidad de oxígeno disuelto y llega a producir olor y sabor indeseable, así como una alteración estética en las masas de agua, además, son capaces de producir toxinas así como variedad de metabolitos inusuales incluidas las cianotoxinas, (Sivonen y Jones, 1999; Azevedo *et al.*, 2002) estos compuestos con gran potencial tóxico, como es el caso de las microcistinas, saxitoxinas y anatoxina-a, que pueden afectar a organismos vertebrados en dosis muy bajas (Carmichael, 1997; Codd *et al.*, 1999; Kuiper-Goodman *et al.*, 1999), y provocar cuadros de intoxicación agudos o crónicos en animales y plantas.

Por otro lado, las cianobacterias se han identificado como un grupo de organismos de los cuales se pueden obtener nuevos productos naturales bioquímicamente activos (Moore *et al.*, 1988; Patterson *et al.*, 1991; Patterson *et al.*, 1993; Gerwick *et al.*, 1994). Las cualidades medicas de las cianobacterias fueron por primera vez apreciadas por los años 1500 AC, siendo la especie *Nostoc sp.* utilizada para el tratamiento de gota, fistulas y diferentes formas de cáncer (Pietra, 1990). Sin embargo, la investigación sobre el aislamiento de productos naturales biológicamente activos en cianobacterias es muy limitados. No obstante, durante la década de los años noventa los científicos comenzaron a vislumbrar y realizar experimentos sobre extractos de cianobacterias, mayoritariamente en cepas de *Anabaena* y *Microcystis sp.*, en los cuales se usó diferentes mecanismos para identificar actividad biológica, mediante ensayos en los cuales se comprobó los componentes químicos por medio de pruebas base-enzima (Schwartz *et al.*, 1990; Moore, 1996).

Las toxinas producidas por las cianobacterias constituyen la mayor fuente de productos naturales que pueden encontrarse en suministros superficiales de agua dulce y agua marina. Todas las especies y cepas de todas las cianobacterias planctónicas comunes en las cuales se incluye especies de los géneros, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrispermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Scytonema* y *Tolypothrix* producen toxinas biológicas. Sin embargo, otras especies incluidas en los géneros, *Coelosphaerium*, *Fisherella*, *Gomphosphaeria*, *Hapalosiphon*, *Schizothrix*, *Spirulina*, *Symploca* y

Trichodesmium se han identificado como especies tóxicas, pero, no se ha aislado, ni caracterizado alguna toxina proveniente de estos géneros (Scott, 1991; Skulberg *et al.*, 1992).

Actualmente se han publicado cerca de 4000 compuestos de cepas de cianobacterias marinas y agua dulce. Esta alta incidencia de nuevos componentes biológicamente activos, indican que las cianobacterias son una fuente rica de productos naturales potencialmente útiles; ya que cerca del 6% de los compuestos aislados tienen propiedades anticancerígenas (Moore, 1996), además de tener actividades asociadas como antifúngicas, antimicrobianas, antimalaria y anti-VIH, debido a su actividad citotóxica (Burja *et al.*, 2001).

1.2 Antecedentes.

1.2.1 Clasificación de las cianobacterias.

Las cianobacterias son conocidas como cloroxibacterias, algas-azuladas y cianofíceas (Margulis y Schwartz 1999; Graham y Wilcox, 2000; Briand *et al.*, 2003). En un inicio fueron agrupadas junto con las algas verde-azules, esto debido a que tienen la capacidad de realizar fotosíntesis oxigénica. Para ello cuentan con el pigmento clorofila A en su fotosistema, además de pigmentos accesorios como las ficobiliproteínas, de las cuales deben su nombre inicial a la ficocianina de color azul (ciano-κβανο) (Arzate, 2008).

Las algas verde-azules, o cianobacterias, han sido tradicionalmente clasificadas con base en a sus características morfológicas y fisiológicas además de ser descritas bajo las reglas de la botánica (Shigeto *et al.*, 2001). Sin embargo, las secuencias del 16S y 5S rDNA situaron a este phylum dentro del reino de las *Bacteria* (Woese, 1987). Actualmente son clasificadas dentro del Reino Monera, Phylum Cyanobacteria, pues comparten características comunes con los demás procariontes, como la ausencia de núcleo y organelos membranosos, poseen pared celular de peptidoglicano parecida a la de las bacterias Gram negativas, contiene ribosomas 70 S en vez de 80 S, como los eucariontes (Bryant, 1994). Además, comparte con los organismos del reino vegetal la capacidad fotosintética (Whitton y Potts, 2000).

Geitler, (1932) describió veintitrés especies de *Microcystis*, en las cuales incluyó tanto especies con vesículas de gas como sin ellas. Stanier y colaboradores (1971) sugirió que solo las células que contienen vesículas de gas deberían ser consideradas como *Microcystis*. Y de acuerdo a la más reciente edición del manual de determinación bacteriológica *Bergey's* (Holt *et al.*, 1994), *Microcystis* es caracterizada por tener vesículas de gas, células en forma de cocoides, además de tener la tendencia de formar agregados o colonias y poseer un mucílago amorfo o vaina. Por otro lado, debe notarse que algunas veces las vesículas de gas se pierden durante el cultivo subsecuente (Shigeto *et al.*, 2001). Algunos autores describen estas vacuolas de gas como un ensamble entre muchas vesículas como si formarían aerotopos incidentalmente (Komárek y Anagnostidis, 1998).

Watanabe (1996), logro diferenciar cinco especies *Microcystis* las cuales se adecuaron a este tipo de criterios en aguas japonesas, siendo estas: *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing 1846, *Microcystis ichtyoblabe* Kützing 1843, *Microcystis novacekii* (Komárek) 1974, *Microcystis viridis* (A. Braun) Lemmermann 1903 emend. Kondrateva 1975 y *Microcystis weserbergii* (Komárek) Komárek en Kondrateva 1968. Adicionalmente a estas cinco especies Komárek (1991) distinguió otra especie *Microcystis flos-aquae* (Wittrock) Kirchner 1898.

De acuerdo con Kützing en 1846 la cianobacteria estudiada *Microcystis aeruginosa* se clasifica de la siguiente manera:

Reino: Bacteria.
Phylum: Cyanobacteria.
Clase: Cyanophyceae.
Orden: Chroococcales.
Familia: Microcystaceae.
Género: *Microcystis*.
Especie: *M. aeruginosa*.

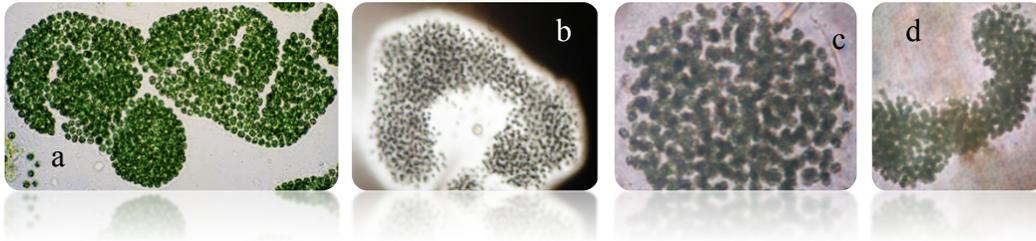


Figura 1. Células de *Microcystis aeruginosa*, a) *M. aeruginosa*, b-d) colonias de *M. aeruginosa* tomadas de (Ferreira-Rosini *et. al.*, 2013).

1.2.2 Características físicas, químicas y biológicas de *Microcystis aeruginosa* y su hábitat.

Microcystis aeruginosa es una especie cosmopolita importante entre las cianobacterias planctónicas (Balaji-Prasath, *et. al.*, 2014). Los florecimientos de *Microcystis* ocurren en aguas templadas, turbias y de movimiento lento donde los niveles de nutrientes (fósforo y/o nitrógeno) son elevados; tratándose entonces de medios acuáticos eutroficados.

1.2.2.1 Intensidad de luz y flotabilidad.

Microcystis requiere de suficiente intensidad luminosa, incidencia directa y esta se alcanza durante la primavera y el verano, cuando el crecimiento masivo de las cianobacterias se

acumula en la superficie de la columna de agua. Por otro lado la intensidad luminosa también puede producir un efecto de fotoinhibición en algunas especies y ocasionar la muerte y sedimentación de algunos organismos (De León, 2002). El aporte de sedimentos por diferentes fuentes, incrementa la turbidez de la columna de agua limitando el crecimiento del fitoplancton, sin embargo, las especies de cianobacterias y en este caso *M. aeruginosa* poseen aerotopos (vesículas de gas) que les permiten regular su posición en la columna de agua y permanecer en las capas superiores iluminadas, y mantener una tasa alta de fotosíntesis.

1.2.2.2 Temperatura.

La temperatura óptima para el crecimiento de las cianobacterias es entre los 20 y 25 °C, este intervalo es alto para otras especies fitoplanctónicas como las diatomeas y las algas verdes (Kardinaal y Visser, 2005); por lo tanto, las cianobacterias no se ven afectadas cuando las condiciones de temperatura son extremas y por el contrario su crecimiento se ve favorecido (Pineda, 2009), ya que disponen de más recursos para su reproducción y crecimiento, permitiéndoles, desplazar a otras especies evitando con esto la competencia. Se ha visto que la variación de temperatura está relacionada con cambios en la concentración y composición de las cianotoxinas, ya que especies como *Anabaena* producen microcistina-Leucina-Arginina (LR) o Mcist-LR a los 25 °C y a mayor temperatura producen microcistina-Arginina-Arginina (RR) o Mcist-RR (Msagati *et al.*, 2006).

1.2.2.3 Nutrientes.

El nitrógeno y el fósforo son nutrientes esenciales para el crecimiento de las cianobacterias (Kaebernick y Neilan, 2001) y se ha documentado que estos microorganismos crecen mejor que otros organismos del fitoplancton en condiciones limitadas de nitrógeno y/o fósforo, debido a que tienen una gran capacidad de almacenar estos nutrientes, la cual es suficiente para realizar de dos a cuatro divisiones celulares, que corresponden a un incremento de la biomasa de 4 a 32 veces (Kaebernick y Neilan, 2001; Heavens *et al.*, 2003).

1.2.2.4 Asociaciones.

Las especies dominantes de cianobacterias son clasificadas de acuerdo al tipo de asociación de grupos funcionales. Y de acuerdo a Reynolds (1997) y Reynolds *et al.*, (2002) estas asociaciones están referidas a conjuntos de especies con morfología, rasgos fisiológicos y ecología similar. Este tipo de asociaciones están descritas por un código de letras (M, H, S_N, S), refiriéndose a las propiedades del hábitat, géneros y/o especies representativas, tolerancia y sensibilidad a condiciones medioambientales.

- Asociación M. Representantes típicos: *Microcystis* y *Sphaerocavum*; Hábitat: Capa de mezcla diaria de pequeños lagos eutróficos; Tolerancia: Intensidad y tiempo de exposición a la luz (Alto); Sensibilidad: Baja intensidad de luz total y sofocamiento.
- Asociación H. Representantes típicos: *Anabaena*, *Aphanizomenon* y *Gloeotricha*; Hábitat: Lagos mesotróficos relativamente largos; Tolerancias: niveles bajos de nitrógeno; Sensibilidad: baja intensidad de luz y bajas concentraciones de P.
- Asociación S. Representantes típicos: *Planktothrix agardhii*, *Limnothrix redekei* y *Pseudanabaena*; Hábitat: Capa mezclada turbia; Tolerancia: Intensidades de luz extremadamente bajas; Sensibilidad: Sofocamiento.
- Asociación S_N. Representantes típicos: *Cylindrospermopsis*, y *Anabaena minutissima*; Hábitat: Capa caliente mezclada; Tolerancia: Baja intensidad de luz y bajas concentraciones de nitrógeno; Sensibilidad: Sofocamiento.

En este tipo de asociaciones pueden representarse agrupaciones de otras especies de cianobacterias diferentes a las más comunes, refiriéndose al tipo de asociación (M, H, S o S_N) en referencia únicamente al tipo de hábitat, tolerancia y sensibilidad.

1.2.3 El Metabolismo.

El metabolismo es un proceso bioquímico constante y colectivo, que ocurre durante el ciclo de vida de cualquier organismo unicelular o multicelular. Estos procesos bioquímicos pueden ser clasificados como dos procesos catabolismo y anabolismo; en donde los productos finales de estas dos vías, son usados en la formación de substratos e intermediarios para otras vías metabólicas y este tipo de sustancias son conocidas como metabolitos (Gokulan *et al.*, 2014). Estas sustancias son clasificadas como metabolitos primarios y secundarios, según la función que desempeñen en los organismos (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades Fisiológicas y bioquímicas de los metabolitos primarios y secundarios (Gokulan *et al.*, 2014).

Metabolitos primarios	Metabolitos secundarios
<ul style="list-style-type: none">• Moléculas pequeñas.• Producen algunos productos intermedios o finales.• Los productos finales construyen bloques para la formación de macromoléculas.• Son esenciales para el crecimiento y viabilidad de la célula.• Su función fisiológica es conocida.• Compuestos por estructuras químicas simples.• Los productos finales son utilizados para la síntesis de coenzimas.• Proveen de energía para las diferentes actividades celulares.	<ul style="list-style-type: none">• Moléculas grandes..• Producen arreglos de moléculas.• Sintetizan a nuevos componentes.• No son vitales para el crecimiento celular, el análisis de la función fisiológica es difícil.• Son productos de complejas e inusuales estructuras químicas.• La producción ocurre en las fases de latencia y tardías.• Los metabolitos secundarios son utilizados en la industria (cosmética, agricultura, farmacéutica).• Protegen a los organismos de condiciones medioambientales difíciles.

Los metabolitos primarios, sirven como fuente primaria de energía, con los que se activan y preforman varias de las funciones bioquímicas y fisiológicas de las células como los aminoácidos, el piruvato, el ácido cítrico y el ácido láctico. Los metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento de la célula, pero en algunos casos funcionan como parte de las estrategias de supervivencia de los organismos durante situaciones adversas (Madigan *et al.*, 2009).

1.2.3.1 Metabolitos de las cianobacterias.

Las cianobacterias son organismos unicelulares, que han sido estudiados primordialmente por su morfología como organismos procariontes, su mecanismo fotosintético, su capacidad de fijación de nitrógeno, así como algunos aspectos de su estructura y su genética (Packer y Glazer, 1988). Por otro lado, la comprensión y visión general de los metabolitos en las cianobacterias incluye desde lípidos, compuestos parecidos a lípidos, metabolitos nitrogenados, oligopéptidos y complejos derivados de aminoácidos. (Rezanka y Dembitsky 2006).

A pesar del gran interés en estas estructuras y actividades biológicas únicas descritas en las cianobacterias, solo en algunos de estos metabolitos, han podido ser estudiadas sus rutas biosintéticas (Chang *et. al.*, 2004). Esta es una consecuencia de los métodos de cultivo en laboratorio de las diferentes especies, ya que las cianobacterias son difíciles de purificar y separar de las colonias bacterianas, el crecimiento puede ser nulo o muy lento, se tienen requerimientos nutricionales poco definidos, así como una caracterización bioquímica poco desarrollada y en etapas tempranas (Rorrer *et. al.*, 1995; Burja *et. al.*, 2002).

El análisis de más de 200 productos naturales reportados hasta la fecha de cianobacterias, resultan en patrones estructurales que reflejan diferentes tendencias metabólicas intrigantes para este grupo (Chang *et. al.*, 2004). Adicionalmente las cianobacterias tienen una cantidad inusual de enzimas adaptadoras que activan la oxidación catalítica, metilación y la halogenación, así como algunos grupos funcionales adicionales, resultan en productos naturales que poseen haluros vinílicos (cloro, bromo, yodo) y alquílos donde se incluyen grupos diclorometano y triclorometilo e incluso funcionalidad bromuro acetilénico (Gerwick *et. al.*, 2001).

Las cianobacterias se les ha reconocido como uno de los grupos microbianos más prometedores, de los cuales se realizan investigaciones en busca de nuevos componentes bioactivos (Sivonen *et. al.*, 2010). Ya que se han identificado péptidos de bajo peso molecular,

distribuidos en un intervalo de aminoácidos proteinogénicos y no-proteinogénicos como la mayor clase de compuestos producida por las cianobacterias (Burja *et. al.*, 2001), así como pequeñas moléculas de péptidos lineares o cíclicos con un alto nivel de variaciones estructurales (Welker y von Döhren 2006; Sivonen y Börner 2008). Este tipo de péptidos son producidos por dos vías biosintéticas ribosomales y no-ribosomales (Sivonen *et. al.*, 2010).

La primera ruta, biosintética (no-ribosomal) fue descrita, en cepas de *Anabaena sp.* (Rouhiainen *et. al.*, 2000) y *Microcystis aeruginosa* (Tillet *et. al.*, 2000) en compuestos como anabeopeptinas, microcistinas y nodularinas. Los metabolitos secundarios frecuentemente reportados son una mezcla de péptidos originados por la ruta biosintética policétido/no-ribosomal (Chang *et. al.*, 2004). Este tipo de biosíntesis híbrida requiere de una actividad integrada de la sintasa policétida (PKS) y la sintasa péptida no-ribosomal (NRPS), estos procesos son comúnmente encontrados en algunos grupos de microorganismos, siendo los más comunes las cianobacterias y las mixobacterias (Gerwick *et. al.*, 2001; Silakowski *et. al.*, 2001), por otro lado, la ruta biosintética (ribosomal) fue descrita en 2005 en cepas de *Prochloron didemni* en el compuesto cianobactin patelamida (Schmidt *et. al.*, 2005). Las patelamidas son péptidos, característicamente compuestos por dímeros cíclicos pseudo-simétricos, que ejemplifican estas únicas características estructurales y con potentes actividades como son los productos naturales, ya que la patelamida A es moderadamente citotóxica y las patelamidas B, C y D su actividad ha sido reportada con resistencia inversa a múltiples fármacos (Williams y Jacobs, 1993; Fu *et. al.*, 1998).

Existen tres órdenes de cianofitas (Chroococcales, Oscillatoriales y Nostocales) que producen una vasta colección de componentes tóxicos, que son producidos por diferentes géneros de cianobacterias como: *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Aulosira*, *Cylindrospermopsis*, *Cylindrospermum*, *Microcystis*, *Nodularia* y *Richelia* (Rezanka y Dembitsky 2006). Se han descrito cerca de 40 especies diferentes de Nostocales, en su mayoría dentro de las especies *Anabaena* y *Nostoc* que son capaces de producir más de 120 productos naturales (Tabla. 2), conformados en su mayoría por metabolitos secundarios (Burja *et al.*, 2001).

Tabla 2. Compuestos aislados de cianobacterias. (#) refiere al número de compuestos aislados provenientes de esa familia (Burja *et al.*, 2001).

Origen	Compuesto	Actividad	Tipo
Orden chroococcales			
<i>Aphanothece sp.</i>	Poli-3.hidroxiálcanoatos	Sin Actividad	Alcano
<i>Microcystis sp.</i>	Toxina diarreaica	Citotóxico	Lipopéptido
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Aeruginosina(6), kawagucipeptina, microcistilido, microcistina(6), micropeptina(3), microviridina(2), toxina BE-4, saxitoxina	Inhibidor enzimático, citotóxico, diferenciador celular, promotor tumoral, endotóxico, hepatotóxina, antibiótico, anticáncer, sin actividad tóxica, tóxico, antibiótico,	Lipopéptido
<i>Microcystis aeruginosa</i> y <i>M. weserbergii</i>	β-ciclocitral	Sin actividad	Ciclocitral
<i>Microcystis viridis</i>	Cianoviridina RR	Tóxico	Lipopéptido
<i>Synechococcus sp.</i>	Ácido linoleico, ficocianina	Antibiótico, sin actividad	Ácido graso,
<i>Synechocystis sp.</i>	35-O-β-6-amino-6-deoxiglucopiranosil bacteriohopanetrol, glicoglicerolípidos nakitriol, nakienona(3)	Sin actividad, citotóxico	lipopéptido
	Didemmina(7)	Anticáncer, Antiviral, inmunosupresor	Triterpeno, Ácido graso, Metabolitos C-11
Orden pleurocapsales			
<i>Hyella caespitose</i>	Caazostatina, clorohiellazol	Antifúngico, sin actividad	Lipopéptido,
Orden oscillatoriales			
<i>Lyngbya bouillonii</i>	Laingolida(2), lyngbyalosida	Citotóxico, sin actividad	Lipopéptido
<i>Lungbya gracilis</i>	Lyngbyapeptina, madangolida	Sin actividad, citotóxico	Alcaloide, lipopéptido
<i>Lyngbya lagerheimii</i>	Azabicliclonona, debramoaplisiatóxina	Sin actividad, citotóxico	Alcaloide, lipopéptido
<i>Lyngbya majuscula</i>	Sulfolípidos(4)	Actividad anti-VIH	Ácido graso (sulfo)
	Antillatoxina(2), aplisiatóxina(3), Apramida(6), barbamida	Anticáncer, antialimentaria	Alcaloide, amida
	Γ-lactona(4), carmabina(2), curacina(4), n,7- dimetilindol- 3- carboxaldehído, dolastatina(5), frontalina, goniautoxina, grenadadiena(2), grenadamida, hermitamida(2), kalkipirona, kalkitoxina, koroamida, laxaficina (2), lyngabellina, lyngbyacarbonato, lyngbyatoxina(3), majusculamida(6), maleimida, malyngamida(26), ácido malyngático, malyngolida(2), ácido enoico 4-metiltetradecano-7-metoxi, ácido enoico 4-metilhexadecano-9-metoxi, microcolina(3), pitamida(2), pukelemida(7), quinolina (2), tanikolida, teleocidina(5), yaoamida, yanacamida(2), Sulfolípidos	Antimicrobiano, antimicótico, antiproliferativo, antiviral, anti-VIH, toxicidad en salmuera de camarón, citotóxico, disrupción del citoesqueleto, herbicida, ictiotóxico, inmunosupresor, moluscida, neurotóxico, sin actividad, unión PBDu, promotor tumoral, activador de la proteína quinasa, irritante de la piel, toxina.	(bromo, cloro y pirrol), amina, ácido graso (cloro, sulfo y tiazolina), imidazola, lactonas, Lipopéptidos, malyngolida
<i>Oscillatoria sp.</i>	Ocillariolida, toxina diarreaica	Sin actividad, citotóxico	Macrolida, lipopéptido
<i>Oscillatoria acutissima</i>	Acutificina(21), (+)-trans-20,21-didehidroacutificina	Anticáncer, citotoxicidad	Cetales, lactonas, macrociclo, macrolidas
<i>Oscillatoria agardhii</i>	anabaenopeptina(8), microcistina(2), oscillamida, oscillapeptina(6)	Inhibidor enzimático, hepatotóxina	Lipopéptido
	Oscillatoxina(15) Raociclamida (2), digalaptolipidos (4)		
	30-metilaoscillatoxina D, 31-noroscillatoxina, oscillatoxina(3), ácido tumanóico(5), escitonemina		
	Hierridina, 2,4-dimetoxi-6-heptadecil-fenol	Tóxico general, anticáncer citotóxico	
<i>Oscillatoria nigroviridis</i>	Sulfolípidos(4)	Citotóxico, sin actividad, pigmento antisol	Aromático, lipopéptido-bromo
<i>Oscillatoria raoi</i>	Radiosumina, tubercidina	Antiplasmodial, antibiótico	Ester, ácido graso, indol aromático
<i>Oscillatoriaceae sp.</i>	(-)-E-1-Clorotridecano-1-ene-6,8-diol, aplisiatóxina(2)	Actividad anti-VIH	Derivados de fenol

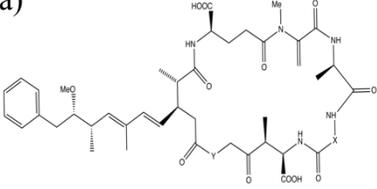
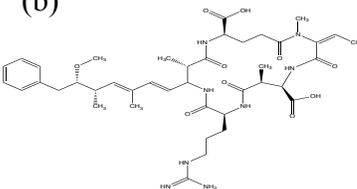
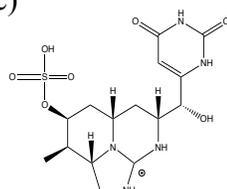
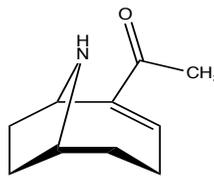
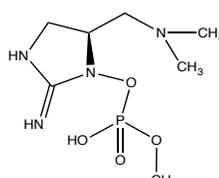
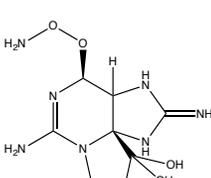
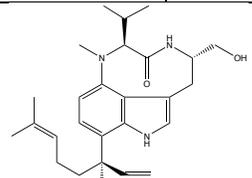
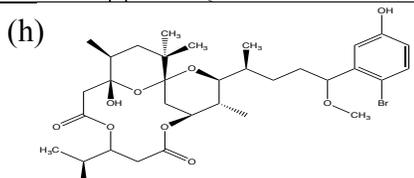
<i>Phormidium ectocarpi</i>	hidroxibutirato, ficocianina(2)	Inhibidor enzimático	Ácido graso (sulfo)
<i>Phormidium tenue</i>	Simplostatina(2) Acilo de tuniclorina	Antibiótico, anticáncer, citotóxico	Lipopéptido Indol, aromático
Orden nostocales			
<i>Anabaena sp.</i>	Microcistina (3), puwainaficina	Cardioactivo, hepatotóxica	Lipopéptido
<i>Anabaena basta</i>	Bastadina(20), bastadina <i>O</i> -sulfato ester (3)	Antibiótico, antiinflamatorio, citotoxicidad	Lipopéptido, ésteres
<i>Anabaena circinalis</i>	Circinamida, microcistina	Inhibidor enzimático, tóxico	Lipopéptido
<i>Anabaena flos-aquae</i>	2;9-Diacetil-9-azabicyclo(4;21)non-2;3-ene, anatoxina(2), saxitoxina	Tóxico, neurotoxina, antibiótico anticáncer	Lipopéptido, alcaloide
<i>Anabaena variabilis</i>	Bis(<i>X</i> -butirolactona), plastocianina	Antibiótico, sin actividad	Lipopéptido
<i>Anabaena sp.</i>	Afanorfina(2), saxitoxina	Citotóxico	Lipopéptido
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	Aulosirazol(2)	Sin actividad, antibiótico, anticáncer tóxico	Lipopéptido
<i>Aulosira fertilissima</i>	Calothrixina(2)	Anticáncer	Aromático, pirrol, Lipopéptido
<i>Calothrix sp.</i>	4-O-[1-Carboxietil]manosa, N-acetilglucosamina	Antimalaria, anticáncer	Aromático
<i>Cyanospira capsulata</i>	Cilindrociclofano(3)	Sin actividad	Indoles
<i>Cylindrospermum licheniforme</i>	Cilindrospermopsina(2)	Anticáncer citotóxico	Exopolisacárido
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	Hormotamnina(2), Toxina diarrea	Citotóxico	Alcaloide, macrociclo,
<i>Hormothamnion enteromorphoides</i>	Nodulapeptina(2), espumigina(3)	Anticáncer, antibiótico	Cloro alcaloide
<i>Nodularia sp.</i>	(3R,25R)-3,25-Dihidroigexacosil-a-D-glucopiranosida	Citotóxico	Lipopéptido,
<i>Nodularia spumigena</i>	ADDA nodularina, Toxina nodularina, espumigina, suomilida	Sin actividad	Estirilcromona
<i>Nodularia harveyana</i>	Criptoficina(52), nostoficina,	Sin actividad	Lipopéptido
<i>Nodularia spumigena</i>	nostociclamida, nostoclicida(2)	Hepatotóxica, enzima tóxica inhibitoria, sin actividad	Lipopéptido
<i>Nostoc sp.</i>	Nostodione, microsporina diterpenoide(6)	Anticáncer citotoxicidad, antifungicida, antibiótico, sin actividad	Glucolípido
<i>Nostoc commune</i>	Cianovirina	Antifungicida, antibiótico, antimicótico, citotóxico, pigmento antisol	Lipopéptido, terpeno,
<i>Nostoc ellipso sporum</i>	Boroficina, nostociclofano	Anti-VIH, antiviral	oligosacárido
<i>Nostoc linckia</i>	Muscorida	Citotoxicidad	Péptidos y proteínas
<i>Nostoc muscorum</i>	Estaurosporina, indolcarbazol(2)	Antibiótico	Ésteres, cetales, piranos,
<i>Nostoc sphaericum</i>	Nostocina A, tenueciclamida(4)	Antiviral, citotóxico	Lipopéptidos
<i>Nostoc spongiaeforme</i>	Polibrominato bisindol(6), rivularina	Antibiótico, antialgas, pigmento citotóxico	Indoles
<i>Rivularia firma</i>	Didehidromirabazole(2), isonitrilo, mirabazole(2), tantazole,	Anti-inflamatorio, sin actividad	Lipopéptido
<i>Scytonema mirabile</i>	Halichondrina, citoficina, swinholida	Antibiótico, citotoxicidad, sin actividad.	Lipopéptido
<i>Scytonema pseudohofmanni</i>	Kalkipirona	Citotóxico, antifungicida, antiviral, antimicótico	Indoles, bromo
<i>Tolypothrix sp.</i>	Nonametoxi-1-pentacosenona,	Citotoxicidad	Alcaloides
<i>Tolypothrix conglutinata</i>	polimetoxi-1-alqueno (7), citoficina,	Citotoxicidad, anticáncer, sin actividad	Lipopéptido
<i>Tolypothrix nodosa</i>	tolitoxina		γ-pirona
<i>Tolypothrix tenuis</i>			
Orden Stigonematales			
<i>Fischerella muscicola</i>	Fischerellina Anhidrohapaloindol, hapalindol(5)	Antifungicida, herbicida	Lipopéptido
<i>Hapalosiphon fontinalis</i>	Hapalosina, welwistatina,	Antibiótico, antifungicida	Alcaloides, indoles
<i>Hapalosiphon welwitschii</i>	welwitindolinona	Anticáncer, antibiótico, antimicótico, citotóxico	Alcaloides, Lipopéptido
<i>Prochlorothrix hollandica</i>	Triterpenoides(3)	Sin actividad	Terpenos (hofanos)
<i>Westiellopsis prolifcans</i>	Westielamida	Citotóxico	Lipopéptido

Hasta el momento, no se sabe por qué las cianobacterias producen toxinas, podemos suponer que la producción de este tipo de compuestos tiene la función de proteger al organismo contra la depredación (Carmichael, 1986; Carmichael, 1992; DeMott *et al.*, 1991) e incluso que estos tengan funciones alelopáticas que les permita desplazar a otras especies y competir de manera más eficiente por los recursos disponibles. Un ejemplo de este tipo de función, se encuentra en los florecimientos de cianobacterias en fuentes de abastecimiento de agua para consumo humano en México, donde especies del género *Microcystis sp.*, se encuentran mayormente distribuidas en lagos urbanos (Alva, 1999). Otro ejemplo en donde se refleja la afectación de las cadenas tróficas, se observó en bioensayos realizados en especies de cladóceros, concluyendo que conforme aumenta la concentración de la cianobacteria la tasa de reproducción se ve afectada (Alva-Martínez *et al.*, 2007).

Las toxinas en las cianobacterias se agrupan en dos grandes categorías basadas de acuerdo al tipo de bioensayo empleado para monitorear su actividad. Las citotoxinas son nombradas así debido a que los métodos de bioensayos utilizados para detectarlas, son frecuentemente cultivadas en células de mamíferos, especialmente en células tumorales; las biotoxinas son nombradas de esa manera debido a que los bioensayos son practicados con pequeños animales (ratones o invertebrados acuáticos). No existen reportes sobre las citotoxinas en las que se les encuentre responsables de la muerte de animales. Sin embargo, las biotoxinas han sido responsables de casos intermitentes en el mundo, de enfermedades e incluso la muerte, de ganado, mascotas y especies en vida silvestre, por ingestión de agua contaminada por algas tóxicas (Carmichael, 1988a, b; Codd y Poon, 1988; Carmichael *et al.*, 1990).

Los géneros de cianobacterias formadores de florecimientos, contienen especies referidas como cianobacterias dañinas, algunos ejemplos incluyen especies: *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Raphidiopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, y *Planktothrix* (Carmichael *et al.*, 1992; Codd *et al.*, 2005a, 2005b; Gademann *et al.*, 2008). Estos géneros toxigénicos son responsables de producir una importante diversidad de arreglos químicos de metabolitos secundarios, que pueden ser agrupados acorde a sus estructuras químicas y efectos biológicos (Tabla. 3)

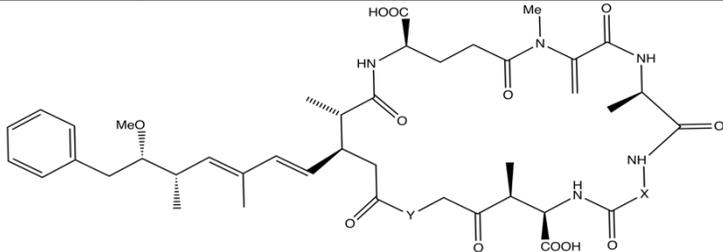
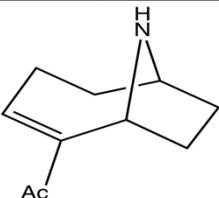
Tabla 3. Cianotoxinas comúnmente observadas en agua dulce, estuarina y marina (Codd *et al.*, 2005a; Fristachi *et al.*, 2008; Isaacs, 2011).

Toxina	Tipo y número de congéneres	Modo de acción
Hepatotoxinas		
Microcistinas.(a)	Heptapéptidos cíclicos (>70).	Inhibidor de la proteína fosfatasa, promotor tumoral.
Nodularinas.(b)	Pentapéptidos cíclicos (9).	Inhibidor de la proteína fosfatasa, promotor tumoral carcinogénico.
Cilindrospermopsinas.(c)	Alcaloide guanidina (3).	Inhibidor de la proteína fosfatasa, daño genotóxico y necrótico en el hígado y otros órganos.
(a)	(b)	(c)
		
Neurotoxinas		
Anatoxina-a (d) Incluida la homoanotoxina-a.	Alcaloide Azobiocíclico (5).	Agente bloqueador de la sinapsis neuromuscular y antagonista de la acetilcolinesterasa.
Anatonina-a (S).(e)	Guanidina ester metil fosfato (1).	Inhibidor de la acetilcolinesterasa.
Saxitoxinas.(f)	Alcaloide Carbonato (>20).	Bloqueador del canal de Sodio.
B-Metilamino alanina.	Modifica aminoácidos.	Agente Neurodegenerativo.
(d)	(e)	(f)
		
Dermatotoxinas		
Lyngbyatoxina-a. (g)	Alcaloide Indol (1).	Agente inflamatorio y activador de la proteína Quinasa C.
Aplisiatoxina.(h)	Alcaloide poliacetato (2).	Agente inflamatorio y activador de la proteína Quinasa C.
(g)	(h)	
		
Endotoxinas		
Lipopolisacáridoss.	Lipopolisacáridoss (muchos).	Irritantes gastrointestinales y agentes inflamatorios.

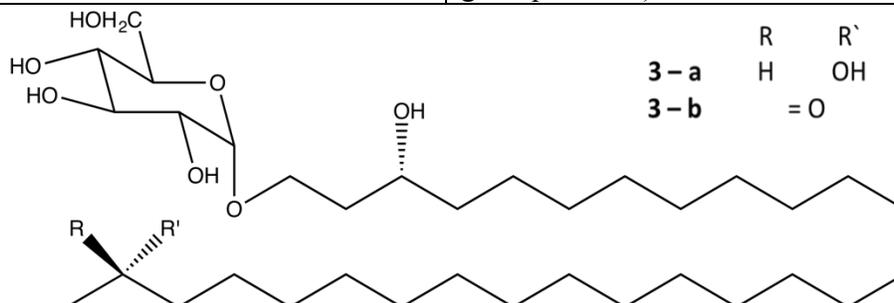
Estructuras químicas de metabolitos secundarios donde: (a) Microcistina-LR, (b) Nodularina, (c) Cilindrospermopsina, (d) Anatoxina-a, (e) Anatoxina-(S), (f) Saxitoxina, (g) Lyngbyatoxina y (h) Aplisiatoxina.

Las citotoxinas no son letales para los animales, pero tienen un amplio espectro de bioactividad en contra de algas, bacterias, hongos y líneas celulares de mamíferos. Su descubrimiento en su mayoría fue aportado por investigaciones en la búsqueda de nuevos componentes farmacéuticos, agroquímicos, (Cannell *et al.*, 1988; Schwartz *et al.*, 1990) antibióticos, (Flores y Wolk, 1986; Mason *et al.*, 1982; Schwartz *et al.*, 1990) y agentes anticancerígenos (Kashiwagi *et al.*, 1980; Rinehart *et al.*, 1981; Patterson *et al.*, 1984; Gerwick *et al.*, 1989). Los bioensayos usados durante estos estudios mostraron que los componentes aislados tienen actividad antineoplásica, es decir que son empleados para impedir el desarrollo, crecimiento, o proliferación de células tumorales malignas (Carmichael, 1992). Estudios en antibióticos citotóxicos incluyeron compuestos como: acutificinas, indolcarbozoles, isonitrilos miranilenos, paraciclofanos, citoficinas, tantazoles, tolitoxinas, toyocamicinas y turbencidinas, la mayoría de estos compuestos fueron aislados de Nostocales y Stigonematales (Tabla 4) (Patterson *et al.*, 1991).

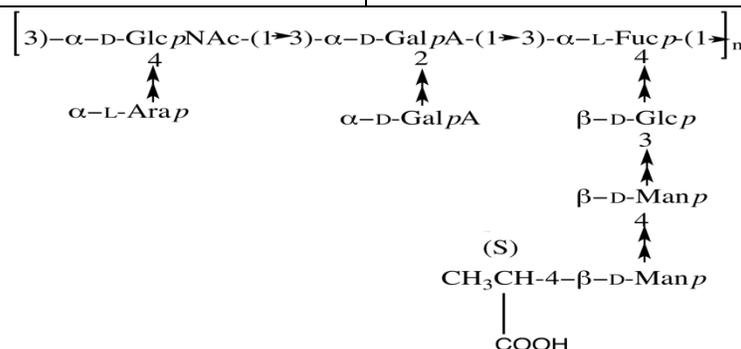
Tabla 4. Estructura química de metabolitos de Cianobacterias. Adaptado de (Rezanka y Dembitsky, 2006)

Especie	Metabolito
<p><i>Anabaenopsis circularis</i> y <i>A. milleri</i> (Lanaras and Cook 1994). <i>Microcystis aeruginosa</i> y <i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (Jurczak <i>et al.</i> 2004) <i>Arthrospira fusiformis</i>, <i>Anabaenopsis abijatae</i> (Ballot <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>Microcistina, LR(1a), RR(1b), LA(1c), YR(1d), MC-LR, RR, YR, MC-RR y MC-YR, Variantes de monodimetil y didimetil</p>
<p>X 1-a Leu 1-b Arg 1-c Leu 1-d Tyr</p>	
<p><i>Arthrospira fusiformis</i>, <i>Anabaenopsis abijatae</i> (Ballot <i>et al.</i>, 2005)</p>	<p>Neurotoxina anatoxina-A</p>
	

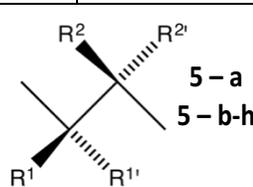
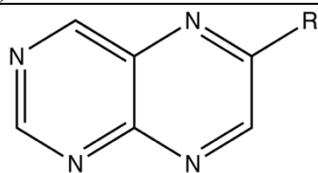
<i>Anabaenopsis rippkae</i> (Soriente <i>et al.</i> , 1993)	1-(<i>O</i> - α -D-glucopiranosil)-3R,27R-octacosanediol(3a), 1-(<i>O</i> - α -D-glucopiranosil)-27-oxo-3R-octacosanol(3b)
---	---



<i>Anabaenopsis capsulata</i> (Garozzo <i>et al.</i> , 1998)	Oligosacárido
--	---------------

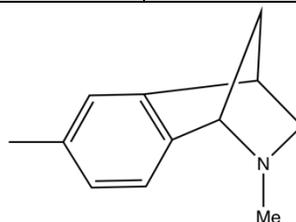


<i>Aphanizomenon flos-aquae</i> (Ikawa <i>et al.</i> , 1995)	Glucósido-1, Xilosa, glucósido-2
--	----------------------------------



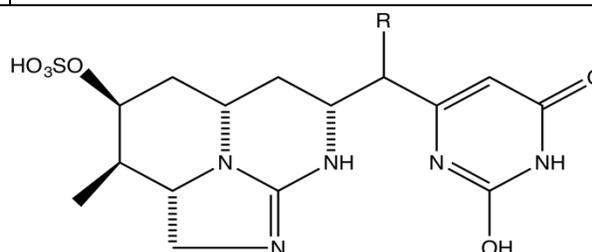
R	R ¹	R ^{1'}	R ²	R ^{2'}
5-b	= O		H	H
5-c	= O		OH	CH ₃
5-d	OH	H	OH	CH ₃
5-e	H	OH	CH ₃	OH
5-f	OH	H	CH ₂ OH	OH
5-g	H	OH	OH	CH ₂ OH
5-h	H	OH	CH ₂ OH	OH

<i>A. flos-aquae</i> (Gulavita <i>et al.</i> , 1988), <i>Anabaena</i> , <i>Aphanizomenon</i> y <i>Planktothrix</i> (Rezanka y Dembitsky, 2006)	Afanorfina, alcaloide Neurotoxina, Anatoxina-A,
--	--

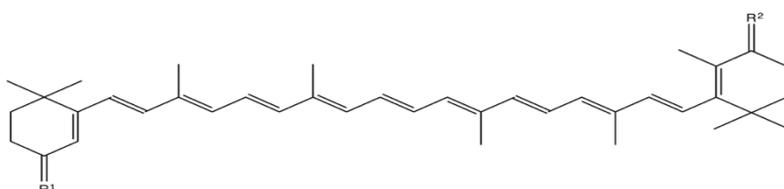


<p><i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>, <i>Aphanizomenon ovalisporum</i> y <i>Umezakia natans</i> (Kaebernick y Neilan, 2001), <i>Raphidiopsis curvata</i> (Li <i>et al.</i>, 2001) <i>Cylindrospermopsis raciborskii</i> (Norris <i>et al.</i>, 1999; Rezanka y Dembitsky 2006).</p>	<p>Toxina citotóxica deoxicilindrospermopsina (16a) cilindrospermopsina (16b), -7-epicilindrospermopsina (16c)</p>
--	--

	R
16a	H
16b	(R) – OH
16c	(S) – OH

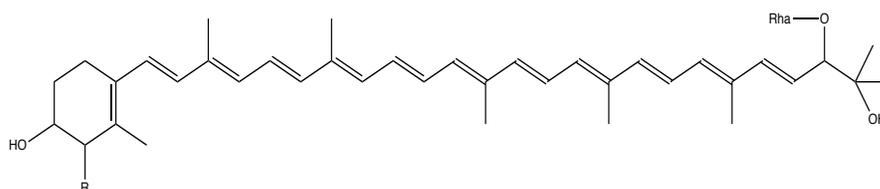


<p><i>A. flos-aquae</i> (Tischer, 1938; 1939).</p>	<p>β-caroteno(9a), pigmentos como flavacina, afanina y afanicina, echinenona(9b) y cantaxantina(9c)</p>
--	--



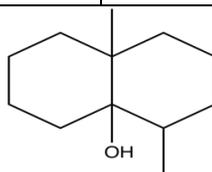
	R ¹	R ²
9 – a	2H	2H
9 – b	O	2H
9 – c	O	O

<p><i>A. flos-aquae</i> (Fiksdahl, <i>et al.</i>, 1983)</p>	<p>Mixoxantofilla (10a), afanizofilla (oscillaxatina) (10b)</p>
---	---



	10 a,b
	R
10 – a	H
10 – b	OH

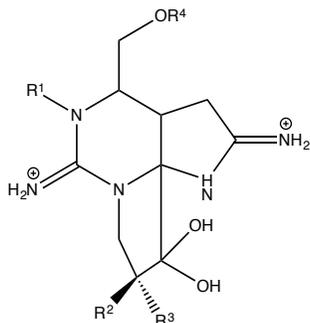
<p><i>Aphanizomenon</i> y <i>Planktothrix</i>. <i>Synechococcus sp.</i>, <i>Anabaena sp.</i> (Vanderploeg <i>et al.</i>, 1992)</p>	<p>Geosmina(11)</p>
--	---------------------



A. flos-aquae (Rapala *et al.*, 2005)

Microcystis aeruginosa
(Pereira *et al.*, 2000).

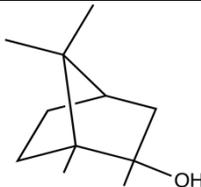
Saxitoxina (7g), decarbamoilsaxitoxina (7a),
neosaxitoxina(7h), GTX1 (goniatoxina)(7j),
de GTX(7c), GTX(7l), GTX8 (7q),



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
7-a	H	H	H	H
7-b	OH	H	H	H
7-c	H	H	OSO ₃ ⁻	H
7-d	OH	H	OSO ₃ ⁻	H
7-e	H	OSO ₃ ⁻	H	H
7-f	OH	OSO ₃ ⁻	H	H
7-g	H	H	H	CONH ₂
7-h	OH	H	H	CONH ₂
7-i	H	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂
7-j	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONH ₂
7-k	H	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂
7-l	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONH ₂
7-m	H	H	H	CONHSO ₃
7-n	OH	H	H	CONHSO ₃
7-o	H	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃
7-p	OH	H	OSO ₃ ⁻	CONHSO ₃
7-q	H	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃
7-r	OH	OSO ₃ ⁻	H	CONHSO ₃

Planktothrix chalybea (Vanderploeg *et al.*,
1992).

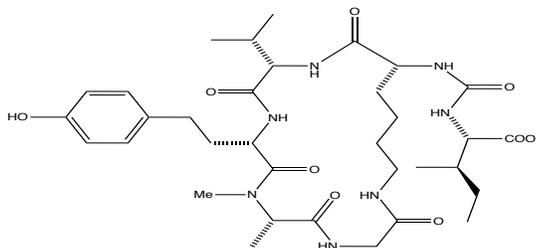
Geosmina(12) 2-metilisoborneol



A. flos-aquae (Murakami *et al.*, 2000)

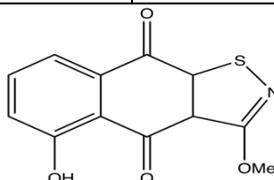
Anabaenopeptinas I(14a) y J(14b)
Carboxipeptidasa-A, Péptidos cíclicos

14 a,b
R
14 - a iPr
14 - b Phe



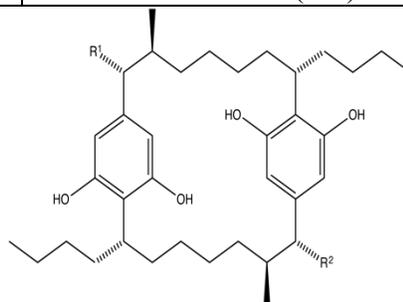
Aulosira fertilissima
(Corbett *et al.*, 1992; Stratmann *et al.*,
1994)

Aulosirazolena(15)

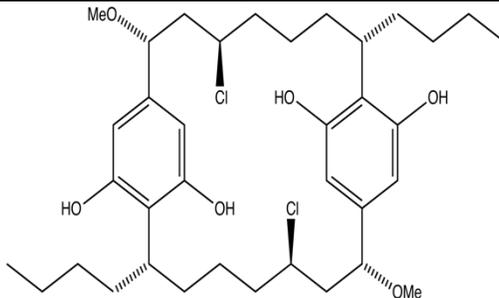


<i>Cylindrospermum stagnale</i> (Gugger et al., 2002)	Ácido Palmítico, palmitoléico, octadecadienoico y octadecatrienoico
<i>C. licheniforme</i> (Moore, 1992)	paraciclofanos cilindrociclofano A-F(17a-f) cilindrociclofano D (17f)

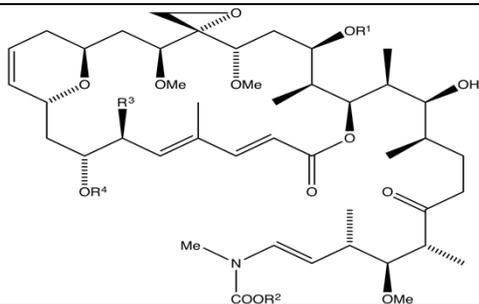
17 a-f	R ¹	R ²
17 - a	H	H
17 - b	OH	H
17 - c	OH	OH
17 - d	OAc	H
17 - e	OH	OAc
17 - f	OAc	OAc



<i>C. licheniforme</i> (Moore, 1992)	Nostociclofano
--------------------------------------	----------------

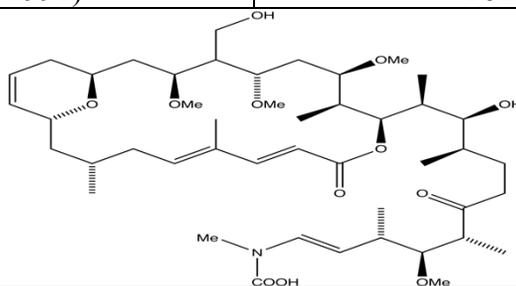


<i>C. musicola</i> (Jung et al., 1991)	Escitoficina B(19a), 6-hidroxiscitoficina B (19b), Tolitoxina (19c)
--	---

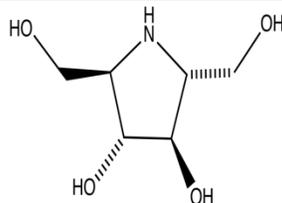


19 a-c	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
19 - a	Me	H	H	H
19 - b	Me	H	OH	H
19 - c	H	Me	OH	Me

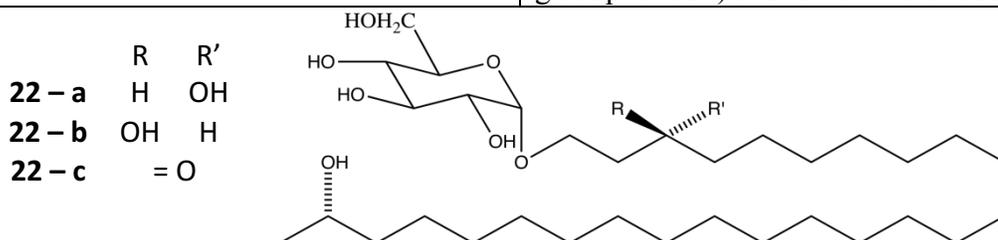
<i>C. musicola</i> (Jung et al., 1991)	Tolitoxina(20)
--	----------------



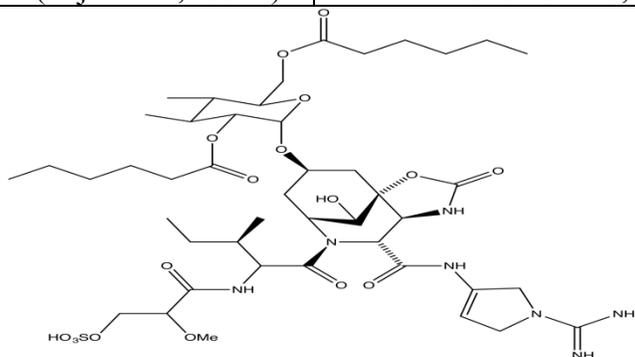
<i>Cylindrospermum sp.</i> , (Juttner y Wessel, 2003)	(2,5.hidroxiometil)Priolidina-3,4-diol(21)
---	--



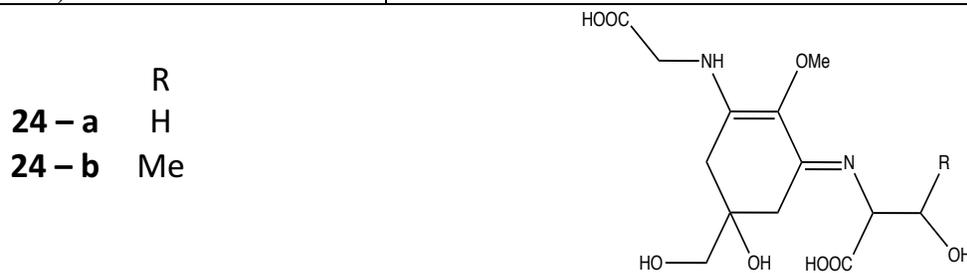
<i>Nodularia spumigena</i> (Rezanka <i>et al.</i> , 2003)	Glicolípidos 1-(<i>O</i> - α -D-glucopiranosil)-3R,25R-hexacosanodiol(22a), 1-(<i>O</i> - α -D-glucopiranosil)-3S,25R-hexacosanodiol(22b) y 1-(<i>O</i> - α -D-glucopiranosil)-3 oxo-25R-hexacosano(22c)
<i>Nodularia harveyana</i> (Soriente <i>et al.</i> , 1992)	



<i>Nodularia spumigena</i> (Fujii <i>et al.</i> , 1997a)	Glucosídico, suomilido
--	------------------------



<i>N. baltica</i> , <i>N. harveyana</i> y <i>N. spumigena</i> (Sinha <i>et al.</i> , 2003)	Shinorina (24a) Porfira-334 (24b)
--	-----------------------------------



1.2.3.2 Importancia de los metabolitos y sus diferentes usos.

Dentro del género de las cianobacterias se han descrito un gran número de metabolitos con un alto potencial biactivo, no obstante, algunos de estos compuestos no han sido del todo estudiados, ya que la obtención, aislamiento y purificación de los mismos dificulta este tipo de estudios. Por otro lado, se ha hecho énfasis en compuestos conformados por péptidos, ya que este tipo de moléculas (microcistinas y/o nodularinas) tienen múltiples efectos inhibitorios sobre las proteínas fosfatasas (Claeysens *et. al.*, 1995; Rabauille *et. al.*, 1995; Hayakawa y Kohoma 1995; Murphy *et. al.*, 1995), otros péptidos cíclicos con estructura similar a la Bristamida, como la westielamida aislada de *Westiellopsis prolifica* (Prinsep *et. al.*, 1992) que actúan como agentes antitumorales (LoRusso *et. al.*, 1990, Prinsep *et. al.*, 1992, Sivonen *et. al.*, 2010), dentro de estos compuestos antitumorales, también se encuentra el compuesto Curacina A, aislada de la especie, *Lyngbya majuscula*, la cual posee una estructura única, compuesta por un posicionamiento secuencial de un anillo de tiazolina y ciclopropilo, que actúan como potentes agentes de toxicidad celular, que interactúan con el sitio de unión colchicina en los microtúbulos (Chang *et. al.*, 2004).

Este tipo de metabolitos han sido recopilados en la literatura de los productos naturales de las cianobacterias (MarinLit, 2001), han mostrado que aproximadamente un 68% de estos compuestos contienen nitrógeno, probablemente derivado del metabolismo de los aminoácidos, contiendo fragmentos derivados de aminoácidos unidos a porciones de ácidos grasos de los cuales se forman 72 lipopéptidos conocidos, con diversas propiedades biactivas descritas (inhibidores enzimáticos, antibióticos, anticáncer, antifungicidas, antivirales y citotóxicos) (Burja *et. al.*, 2001), algunos de estos nuevos compuestos bioquímicamente activos, han sido aislados de la cianobacteria *L. majuscula* en diferentes partes del mundo como Australia (O'Neil *et. al.*, 2000), Curaçao (Rossi *et. al.*, 1997), Florida (Beutler *et. al.* 1990), Granada (Sitachitta *et. al.*, 1998), Guam (Nagle *et. al.*, 1996), Hawaii (Moore *et. al.* 1988), Indonesia (Moore, y Bartolini, 1981), Madagascar (Singh *et. al.*, 1999), Islas Marshall (Orjala y Gerwick 1996), Mozambique (Silva *et. al.*, 1991), Okinawa (Todd y Gerwick

1995), Filipinas (Beutler *et. al.*, 1990), Puerto Rico (Ainsle *et. al.*, 1986), Tahiti (Burja *et. al.*, 2001), Venezuela (Koehn y Carter 2005) e Islas Virgenes (Marquez *et. al.*, 1998).

Las investigaciones no solo se han enfocado en el aislamiento, caracterización y purificación de metabolitos secundarios con potencial bioactivo. Otro tipo de estudios se han implementado en las cianobacterias como posibles fuentes en la producción de biocombustibles (Nozzi *et. al.*, 2013; Witcover *et. al.*, 2013), esto debido a la habilidad de las cianobacterias de producir grandes cantidades de lípidos, que son usados para la producción de biodiesel (Pate *et. al.*, 2011), debido a estas características, las cianobacterias han sido empleadas en la bioingeniería, ya que producen un gran número de componentes relacionados con los biocombustibles (Machado y Atsumi, 2012).

Algunos de estos ejemplos en la producción de biocombustibles en cianobacterias, se han realizado en cepas *Synechococcus elongatus sp.*, ya que la producción de etanol pudo lograrse mediante la bioingeniería a través de la adición de piruvato descarboxilasa y alcohol deshidrogenasa, redirigiendo el carbón del piruvato (Deng y Coleman, 1999). La obtención de isobuteraldehído, componente químico importante para los hidrocarburos, que normalmente son obtenidos del petróleo, el cual es producido por la cianobacteria *S. elongatus*, redirigiendo el flujo de carbono de la biosíntesis de valina, mediante la adición de cetoácido descarboxilasa (Atsumi *et. al.*, 2009). Otros tipos de químicos producidos por cianobacterias, por vías biosintéticas heterólogas se incluyen compuestos como 1-butanol (Lan y Liao, 2012), 2-metil-1-butanol (Shen y Liao, 2012), acetona (Zhou *et. al.*, 2012), etileno (Takahama *et. al.*, 2003), isopreno (Lindberg *et. al.*, 2010) y ácidos grasos (Liu *et. al.*, 2011).

La producción de ácidos grasos es de particular interés ya que estos pueden ser usados como materia prima para la síntesis de biocombustibles (Karatay y Dönmez, 2011; Costa y Morais, 2011; Taher *et. al.*, 2011), además las cianobacterias son veinte veces más productivas por unidad de área que algunos de los mejores ácidos grasos obtenidos por cultivos (Da Rós *et. al.*, 2012). Respecto a algunas especies de cianobacterias, estas producen grandes cantidades

de aceites vegetales como productos de almacenamiento (Costa y Morais, 2011; Taher *et. al.*, 2011; Demirbas y Demirbas, 2011). Dependiendo de la especie, las cianobacterias producen diferentes grupos de lípidos, hidrocarburos y otros aceites de estructuras complejas (Costa y Morais, 2011; Huang *et. al.*, 2010), sin embargo, no todos los ácidos grasos, tienen la calidad y características que se requieren como materia prima para biocombustibles (Da Rós *et. al.*, 2012), algunos de estos ácidos grasos identificados como γ -linoleato, α -linoleato y (n-3) octadecatrenoato, han sido propuestos como posibles fuentes ácidos grasos en la nutrición (Gunstone *et. al.*, 2007).

1.2.3.2.1 Ácidos grasos y lípidos.

Las cianobacterias son un largo grupo de bacterias oxigénicas fotoautótrofas y, al igual que las plantas y las algas capturan CO₂ por la vía del ciclo de Calvin-Benson y convierten una serie de compuestos orgánicos como carotenoides, pigmentos, vitaminas, compuestos aromáticos y lípidos (metabolitos primarios) (Da Rós *et. al.*, 2013).

Los lípidos son acumulados en grandes cantidades como material de reserva en las membranas tilacoidales, y debido a que las cianobacterias tienen ventajas naturales (altos niveles fotosintéticos e intervalos de crecimiento rápido), son capaces de producir grandes cantidades de lípidos a mayor velocidad, que otras especies de microalgas que, sólo almacenan lípidos en condiciones de estrés y en bajo crecimiento (Rittmann, 2008; Da Rós *et. al.*, 2013). Es por esto que los lípidos producidos por cianobacterias, son empleados en la producción de materia prima para la producción de biocombustibles (Karatay y Dönmez, 2011; Costa y Morais, 2011; Taher *et. al.* 2011). Si se considera que una de las propiedades de los combustibles es la de depender de una vasta composición de ácidos grasos como materia prima, en el cual el biocombustible preparado, requiere de un perfil de ácidos grasos en el cual se emplea un monitoreo para la selección de lípidos de cianobacterias con grandes cantidades de ácidos grasos monoinsaturados (Da Rós *et. al.*, 2013). Además. la presencia de ácidos grasos con dobles enlaces está relacionada con la complejidad morfológica de las cianobacterias (Kruger, *et. al.*, 1995; Vargas *et. al.*, 1998).

1.2.3.2.2 Microcistinas.

Las microcistinas son una familia sobresaliente de toxinas con más de 65 heptapéptidos cíclicos descritos, producidos por un amplio intervalo de cianobacterias en las que se incluyen especies del genero *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* y *Oscillatoria* (Rinehart *et. al.*, 1994; Sivonen, 1996). Este tipo de compuestos han sido identificados como potentes inhibidores de las proteínas fosfatasas eucarióticas serina/treonina (1) y (2A) (Dawson, 1998; Dittmann y Wiegand, 2006) y comparten una estructura cíclica común (Adda-D-Glu-Mdha-D-Ala-L-X-D-MeAsp-L-Z-), donde X y Z son L-aminoácidos variables. Adda identificado como ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10fenil-1-4,6-decadienoico, D-MeAsp identificado como ácido 3-metilaspártico y Mdha como N-metil-dehidroalanina (Honkanen *et. al.*, 1990; Rinehart *et. al.*, 1994; Tillet *et. al.*, 2000). Dittmann y colaboradores (1997) identificó parcialmente genes sintetetasas de cepas de cianobacterias tóxicas y confirmo que las microcistinas son sintetizadas por vías no-ribosomales.

La microcistina más comúnmente aislada (Microcistina-LR) es caracterizada por estar compuesta por Leucina (L) y arginina (R) así como diferentes L-aminoácidos en posiciones 2 y 4 ($Xaa^2 = L$; $Yaa^4 = R$) (Gulledge *et. al.*, 2002) que pueden inducir estrés oxidativo, el cual resulta en daño oxidativo indirecto del ADN (Lankoff *et. al.* 2004). Por otro lado, se ha observado que el efecto de la toxicidad de la Microcistina-LR depende de la ingestión de la misma (Rastogi y Sinha 2009), ya que primeramente afecta los hepatocitos que acumulan la toxina (Li *et. al.* 2007), asociándola con la hepatotoxicidad en mamíferos y otros vertebrados (Dawson, 1998; Dittmann y Wiegand, 2006)

1.2.3.2.3 Aeruginosinas.

La familia de las aeruginosinas ha recibido especial atención, debido a su potencial por diversas actividades biológicas (Trost, *et. al.*, 2012), ya que exhiben actividades inhibitorias de las proteasas serinas, en especial la trombina y tripsina, este tipo de acción puede ser explicado, por su perfil de actividad debido a su alto nivel farmacofórico y estructura

homóloga dentro de la familia, este tipo de compuestos se caracterizan por la unidad inusual 2-carboxi-6-hidroxi-octahidroindol (Choi), ácido láctico p-hidroxifenilo o su derivado en la N-terminal y una unidad contenida de guanidina derivada de la arginina en el C-terminal (Mundt *et. al.*, 2001). Este tipo de características, tanto estructurales como funcionales son responsables de su alta afinidad de unión catalítica a la tripsina, trombina y otras proteasas serinas (Trost, *et. al.*, 2012), involucradas en la coagulación de la sangre. Este tipo de compuestos, han sido descritos como nuevos agentes anticoagulantes, para el tratamiento de la trombosis (Vacca, 1998). Debido a que el mecanismo de acción de las aeruginosinas ha sido identificado mayoritariamente en la enzima trombina (Wipf y Methot, 2000), enzima primordial en la coagulación, ya que cataliza la conversión de fibrógeno a fibrina, la cual posteriormente se polimeriza para formar un tapón hemostático (Buchanan *et. al.*, 1995).

1.2.3.2.4 Nodularinas

Las nodularinas son pentapéptidos cíclicos compuestos de Adda y ácido D-eritro- β -metilaspártico (D-Masp), así como de *N*-metildehidrobuterina (Mdhb), el cual es similar al *N*-metildehidroalanina encontrado en las microcistinas (Riheart *et. al.*, 1994; Rastogi y Sinha, 2009). Este tipo de compuestos fue aislado por primera vez de la cianobacteria *Nodularia spumigena* (Rinehart *et. al.*, 1988), otro tipo de variantes estructurales de la nodularina fue reportada en la cepa *Nodularia* PCC7804 y su composición consiste en homoarginina en vez de arginina (Saito *et. al.*, 2001).

La bioactividad de las nodularinas se encuentra reportado dentro de la inhibición de las subunidades catalíticas de proteínas fosfatasas serina/treonina específicas (1) y (2A), el tipo de actividad que desempeñan es muy similar al de las microcistinas (Ohta *et. al.* 1992), sin embargo, las nodularinas despliegan toxicidad acumulativa y son promotores tumorales sin ninguna capacidad de iniciación (Sueoka *et. al.*, 1997). Por otro lado, de acuerdo a la agencia internacional de investigación sobre el cáncer (IARC) las nodularinas no son clasificables en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos, debido a la cantidad insuficiente de los datos disponibles (Rastogi y Sinha 2009)

1.2.3.2.5 Saxitoxinas.

Las Saxitoxinas, también conocidas como toxina paralizante de crustáceos (PSPs), son alcaloides neurotóxicos producidos por diversas cianobacterias entre las que se destacan las especies *Aphanizomenon sp.*, *Anabaena sp.*, *Lyngbya sp.* y *Cylindrospermopsis raciborskii* (Humpage *et. al.*, 1994), son compuestos tricíclicos, conformados por un grupo tetrahidropurina y dos subunidades de guanidina (Rastogi y Sinha 2009). El efecto toxico de este tipo de toxinas ha sido reportado mayormente con organismos marinos y existe poca información disponible de la afectación de las saxitoxinas en cianobacterias en agua corriente.

La toxicidad de las saxitoxinas ha sido reportada como bloqueadores de la comunicación neuronal, mediante la unión a los canales de sodio (Na⁺) dependientes del voltaje de las células nerviosas, lo cual provoca la suspensión de entrada del flujo de sodio que conduce a la parálisis de los músculos y final mente la muerte por paro respiratorio en mamíferos (Strichartz *et. al.*, 1986; Su *et. al.*, 2004). Además, han elucidado que los fluidos circulatorios de varios animales de los receptores hidrofílicos de las saxitoxinas, (anfibios, peces, reptiles y artrópodos) proveen defensas contra esta toxina (Llewellyn, 1997). Por otro lado, el transporte a través de las cadenas tróficas y bioacumulación del zooplancton es un importante mecanismo para la viabilidad de estas toxinas a niveles tróficos superiores (Turner *et. al.*, 2000).

La bioactividad descrita en las saxitoxinas, ha sido descrita en la corriente de bloques de sodio, que viaja a través de los canales de sodio activados por voltaje por una reacción de unión directa (Sherwood *et. al.*, 1990).

1.2.3.2.6 Anatoxinas.

Las anatoxinas son una familia usualmente conocida como factores de muerte rápido, la anatoxina-a y homoanatoxina-a, son capaces de afectar el sistema nervioso, la piel y/o el

tracto gastrointestinal y su estructura está compuesta por alcaloides neurotóxicos (Mansell, 1996). La homoanatoxina-a, por otro lado, contiene adicionalmente un grupo metileno, sus propiedades toxicológicas son similares y se encuentran relacionadas a la estructura de moléculas de anatoxina-a (Namikoshi *et. al.*, 1993), que por primera vez fue sintetizada (Wonnacott *et. al.*, 1992), y posteriormente fue aislada de la cianobacteria *Planktothrix formosa* (Skulberg, *et. al.* 1992), además se ha reportado que la anatoxina-a, ha sido aislada e identificada de diferentes especies de cianobacterias como *Anabaena flos-aquae*, *A. circinails*, *Aphanizomenon sp.*, *Cylindrospermum sp.*, *Planktothrix sp.* y *M. aeruginosa* (Edwards *et. al.*, 1992; Park *et. al.*, 1993).

Por otro la anatoxina-a(s), además de tener una estructura similar a anatoxina-a, esta contiene un ciclo ester fosfático *N*-hidroxiguanidina, este compuesto fue aislado de las cianobacterias *Anabaena flos-aquae* y *A. lemmermannii* y es un potente inhibidor de la acetilclorinesterasa (AChE), el modo de acción de este inhibidor, afecta directamente al agente nervioso sarín, y es diez veces más letal que la anatoxina-a (Matsunaga *et. al.*, 1989). La anatoxina es empleada como un potente agente bloqueador de-polarizador neuromuscular, el cual posee bioactividades ambas muscarinas y nicotínicas (Carmichael *et. al.*, 1978)

1.2.3.2.7 Cilindrospermopsinas.

Las toxinas policétidas alcaloides (cilindrospermopsina), son producidas por un gran número de especies de cianobacterias de agua corriente (Harada *et. al.*, 1994; Banker *et. al.*, 1997; Li *et. al.*, 2001; Bernard *et. al.*, 2003). Y está compuesta por uracilo de hidroximetilo unido a un grupo guanidina sulfatado, un anillo integral de pirimidina esencial para la toxicidad del compuesto, además, de ambas substituciones de un protón por un átomo de cloro o una oxidación de carbono que promueve un cambio en la cilindrospermopsina a una forma no-tóxica (Banker *et. al.*, 2001; Rastogi y Sinha, 2009). Las cilindrospermopsinas pueden inducir la formación de aductos en el ADN, provocando una ruptura en las hebras del mismo, mediante la disrupción del husillo cinetocoro, seguido por la pérdida cromosómica

(aneuploidía), exhibiendo una bioactividad mutagénica y carcinogénica (Humpage *et. al.*, 2000; Shen *et. al.*, 2002).

Las cilindrospermopsinas, así como su análogo las deoxicilindrospermopsinas no detienen las proteínas fosfatasa, sin embargo, son inhibidores permanentes de la biosíntesis de proteínas (Frosio *et. al.*, 2003; Neumann *et. al.*, 2007), por otro lado, se ha sido identificado al hígado y riñón como los objetivos en los cuales las cilindrospermopsinas indican su toxicidad, incrementando los niveles de colesterol en el plasma y el hígado, además de variaciones en los parámetros de la sangre (hematocritos elevados y deformación de las eritrocitos) (Sukenik *et. al.*, 2006; Rastogi y Sinha 2009).

1.2.3.2.8 Lipopolisacáridos.

Los lipopolisacáridos (LPS) son un componente común en las paredes celulares de las bacterias Gram-negativas, así como de la mayoría de las cianobacterias, los LPS están compuestos por glicolípidos acetilados, un núcleo de polisacáridos y una cadena exterior conformada por polisacáridos (Wiegand y Pflugmacher, 2005), normalmente se les clasifican como endotoxinas, y se encuentran localizadas en la superficie externa de las membranas celulares, consta de polímeros de carbohidratos, un núcleo de oligosacáridos y un glicolípido acetilado (≈lípidos-A) (Stewart *et. al.*, 2006).

La producción y aislamiento de LPS se ha realizado en diversos géneros de cianobacterias (*Microcystis sp.*, *Anabaena sp.*, *Spirulina sp.* y *Oscillatoria*) (Smith *et. al.*, 2008), la producción difiere ligeramente de los producidos por bacterias entéricas, ya que este tipo de lipopolisacáridos poseen una gran variedad de largas cadenas insaturadas de ácidos grasos, así como ácidos grasos hidroxilados y la falta de fosfato (Rastogi y Sinha, 2009). Por otro lado, la glucosamina suele ser la columna de azúcar, la cual suele variar en cantidades de 2-quetos-3-deoxioctadecanoato, galactosas y heptosas (Martin *et. al.*, 1989).

Los LPS de las cianobacterias han sido asociados con numerosas enfermedades en humanos, desde irritación de la piel, hasta dolores agudos en el tracto gastrointestinal y respiratorio, sus síntomas son similares a los presentados por la influenza; caracterizados por, tos, escalofríos y garganta irritada. Además, se encuentran involucrados en las fiebres presentadas por otros mamíferos, así como, el síndrome de shock séptico, en el cual las toxinas dañan el hígado (Choi y Kim, 1998), mediante la liberación de mediadores inflamatorios, como tumores necróticos factor- α (TNF- α) interferón- γ , interleucina (IL), leucotrienos, prostanoïdes y óxido nítrico (Hewett y Roth, 1993). Se ha determinado que el lípido-A es responsable de su acción tóxica, mientras que el antígeno-O es distinguido por el sistema inmune, promoviendo la producción de un anticuerpo (Rietschel *et. al.*, 1993). Por otro lado, se ha demostrado que la vía de acción inflige la biotransformación de los sistemas enzimáticos, directamente o mediados por factores de reacción del sistema inmune, además las endotoxinas afectan el sistema de desintoxicación de diversos organismos (Wiegand y Pflugmacher, 2005).

1.2.3.2.9 Otras toxinas.

Las cianobacterias son una fuente potencial de metabolitos secundarios como: kalkitoxina, aplisiatoxina, debromoaplisiatoxina, jamaicamidas y lyngbiatoxinas etc., que son obtenidas de cianobacterias que se desarrollan en ambientes de agua corriente, marinos e incluso especies que logran desarrollarse en aguas salobres. Estas son altamente tóxicas para organismos acuáticos y vertebrados, incluidos los mamíferos, estos organismos presentan síntomas como úlceras bucales, ardor de la mucosa bucal, gastritis aguda, pápulas en la lengua, salivación, cefaleas, fiebres y debilidad. (Mynderse *et. al.*, 1977; Berman *et. al.*, 1999; Wu *et. al.*, 2000; Edwards *et. al.*, 2004).

La kalkitoxina es un lipopéptido neurotóxico producido por algunas especies de cianobacterias como *L. majuscula* (Berman *et. al.*, 1999) que bloquean los canales de sodio al nervio, promoviendo una parálisis y eventualmente la muerte por fallo respiratorio (Wu *et.*

al., 2000; Edwards *et. al.*, 2004; Rastogi y Sinha 2009) además de inhibir la división celular en los erizos de mar (Rastogi y Sinha 2009).

La Besarhamida A y B, son dos tipos de amidas de ácidos grasos, aislados de la cianobacteria marina *L. majuscula* y exhiben una moderada toxicidad con las crías de camarones (Tan *et. al.*, 2008).

Aplysiatoxina es una bislactona fenólica, aislada de la cianobacteria *L. majuscula* (Mynderse *et. al.*, 1977), así como de algunas algas rojas (*Gracilaria coronopifolia*) (Ito y Nagai, 2000), tiene efectos letales como la dilatación de los vasos linfáticos, congestión de los capilares, diarrea, deposición de fibrina en la arteria pulmonar, promoviendo el sangrado y promotor tumoral (Fujuki *et. al.*, 1982).

Además de los metabolitos mencionados, existen otro tipo de compuestos bioactivos, dentro de los que, destacan los péptidos como, las microviridinas, microgininas, cianopeptolinas y β -N-metilamino-L-alanina, pero sus efectos toxicológicos, ambientales y de salud humana, no son tan bien conocidos (Welker and von Dohren, 2006). Algunos de estos efectos neurotóxicos han sido reconocidos (Tabla 5) (Lobner *et. al.*, 2007)

En años recientes las propiedades toxicológicas y ecotoxicológicas de las toxinas han sido analizadas (Codd *et. al.*, 2005b; Zurawell *et. al.*, 2005; Dittmann y Wiegand, 2006; van Apeldoorn *et. al.*, 2007), por lo que un intervalo de metabolitos bioactivos provenientes de las cianobacterias han sido empleados como diferentes aleloquímicos ecológicos, es decir químicos que son capaces de inhibir la competencia simpátrica de macrófitas, algas y microorganismos, además de desarrollar aplicaciones de estos compuestos como algicidas, herbicidas e insecticidas (Schlegel *et. al.*, 1998; Berry *et. al.*, 2008).

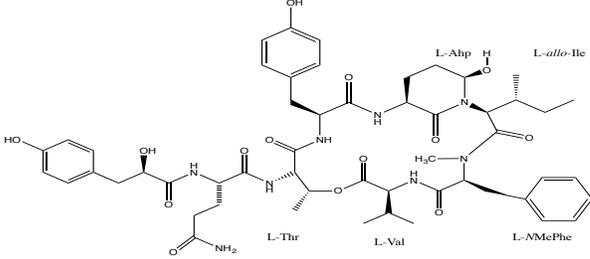
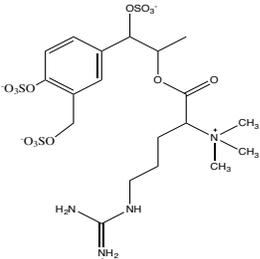
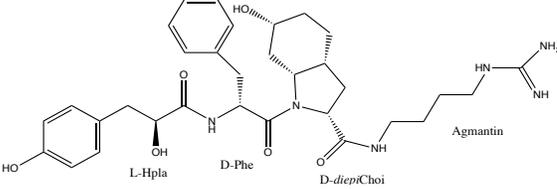
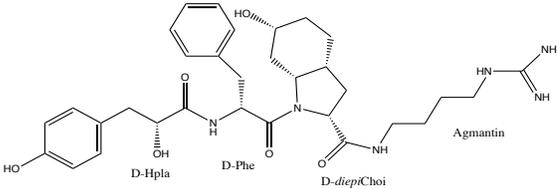
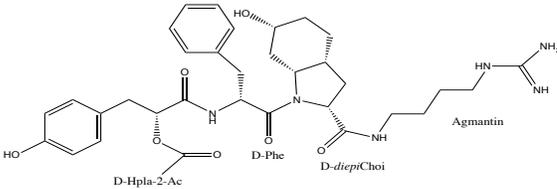
Tabla 5. Metabolitos secundarios (MS) y sus efectos probables (Rastogi y Sinha 2009).

MS	Fuente/Especie	Efectos
Microcistina	<i>Microcystis sp.</i> , <i>Anabaena sp.</i> , <i>Oscillatoria sp.</i> , <i>Anabaenopsis sp.</i> , <i>Nostoc sp.</i> , <i>Hapalosiphon sp.</i>	Inhibición de las proteínas fosfatasas serina/treonina 1 y 2a.
Nodularina	<i>Nodularia sp.</i>	Inhibición de las subunidades catalíticas de la serina/treonina 1y 2a.
Saxitoxina	<i>Aphanizomenon sp.</i> , <i>Anabaena sp.</i> , <i>Lyngbya sp.</i> , <i>C. raciborskii</i>	Bloqueo de la comunicación neuronal por la unión a los canales de Na ⁺ de las células nerviosas.
Anatoxina-a	<i>A. flos.aquae</i> , <i>A. circinalis</i> , <i>Aphanizomenon sp.</i> , <i>Cylindrospermun sp.</i> , <i>Planktothrix sp.</i> , <i>M. aeruginosa</i> .	Unión irreversible a los receptores nicóticos acetilcolina.
Anatoxina-a(s)	<i>A. flos-aquae</i> , <i>A. lemmermannii</i>	Bloquea la actividad de la acetilcolinaesterasa.
Homoanatoxina-a	<i>P. formosa</i>	Similar a la anatoxina-a.
Cylindrospermopsina	<i>C. raciborskii</i> , <i>U. natans</i> , <i>A. ovalisporum</i>	Inhibidor de las biosíntesis de proteínas, daño al ADN.
Lipopolisacáridos	Cianobacteria <i>sp.</i> ,	Irritante potencial; afecta cualquier tejido expuesto.
Kalikitoxina	<i>L. majuscula</i>	Bloqueo de los canales nerviosos de sodio.
Anatillatoxina	<i>L. majuscula</i>	Estimula los canales de sodio.
Lyngbyatoxina A	<i>L. majuscula</i>	Causa dermatitis, ampollas y necrosis en mamíferos, potentes promotores tumorales
Aplysiatoxina	<i>L. majuscula</i>	Activadores de la proteína quinasa C y promotores tumorales.

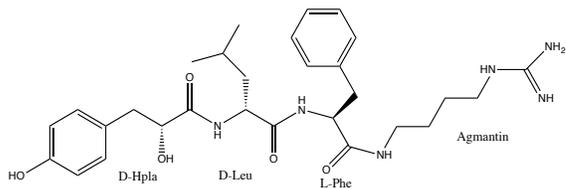
1.2.3.3 Metabolitos de *Microcystis aeruginosa*.

La cianobacteria *Microcystis aeruginosa* ha mostrado ser una fuente rica de metabolitos potencialmente biactivos y únicos, en especial aquellos componentes formados por péptidos (Namikoshi y Rinehart 1996). A los que se les ha prestado gran atención por sus múltiples efectos inhibitorios (Weckesser *et. al.*, 1996). Los metabolitos aislados y caracterizados recientemente en *M. aeruginosa*, se han identificado compuestos como: micropeptinas, aeruginosinas, cianopeptolinas, anabaenopeptinas, microguanidinas y dos tipos diferentes de isómeros de planctociclocinas-S-oxido, (Tabla. 6) (Elkobi-Peer *et. al.*, 2012; Lifshits y Carmeli, 2012; Lodin-Friedman y Carmeli, 2013), que corresponden a este tipo compuestos peptídicos.

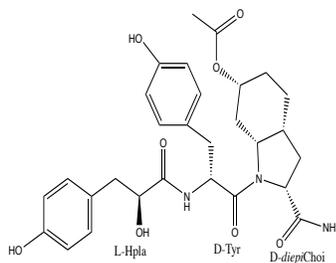
Tabla 6. Metabolitos aislados de *Microcystis aeruginosa*. Adaptado de (Elkobi-Peer et. al., 2012; Lifshits y Carmeli, 2012; Lodin-Friedman y Carmeli 2013;).

Metabolito	Estructura Química
Micropeptina KT1042	
Microguanidina KT636	
Aeruginosina KT608A	
Aeruginosina KT608B	
Aeruginosina KT650	

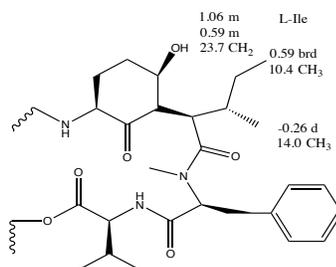
Pseudoaeruginisina
KT554



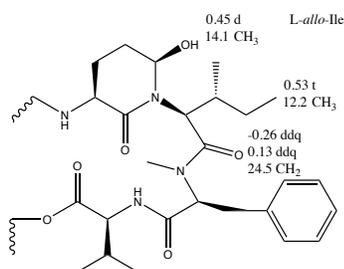
Aeruginosina
GH553



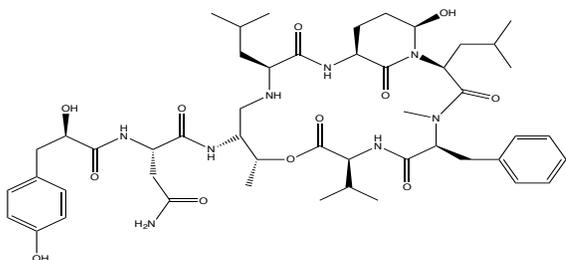
Micropeptina
HM978



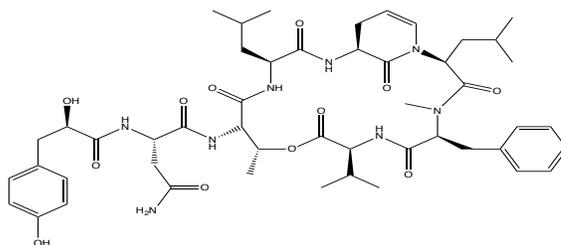
Micropeptina
KT1042



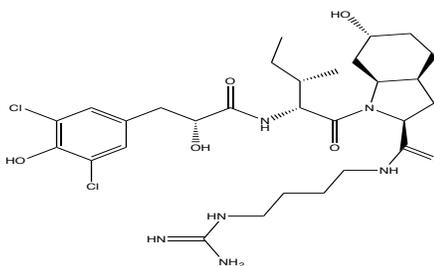
Micropeptina
HH978



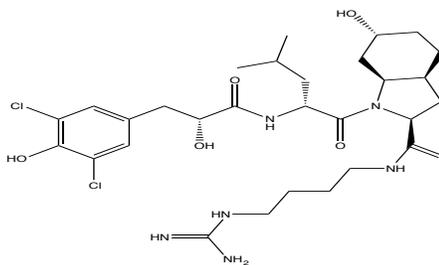
Micropeptina
HH960



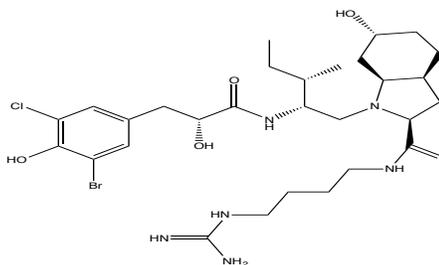
Aeruginosina
KY642



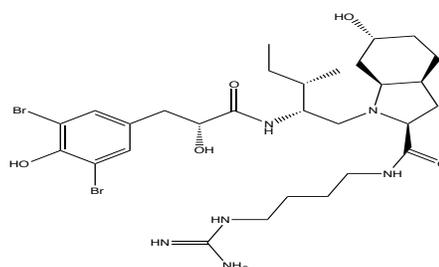
Aeruginosina
GE642



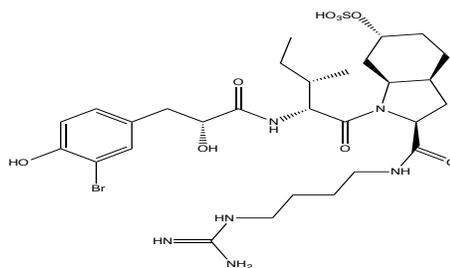
Aeruginosina
GE686



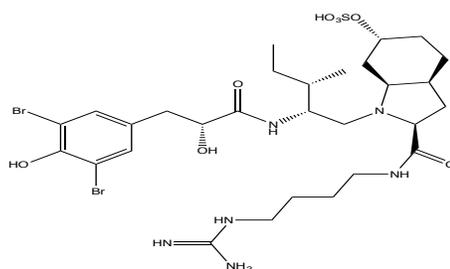
Aeruginosina
GE730



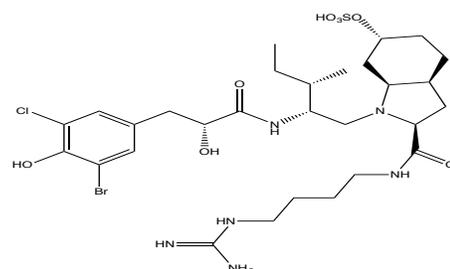
Aeruginosina
98-C



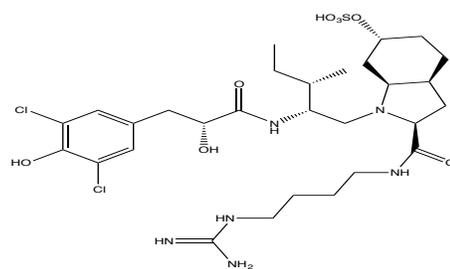
Aeruginosina
GE810



Aeruginosina
GE766



Aeruginosina 101



1.3 Hipótesis

La composición y estructura química de los metabolitos de *Microcystis aeruginosa* de cepas aisladas y cultivadas, es similar respecto a otras especies del mismo género o géneros a fines.

1.4 Objetivos.

1.4.1 General.

Contribuir al conocimiento de los recursos naturales acuáticos, mediante el aislamiento y caracterización de metabolitos de *Microcystis aeruginosa*.

1.4.2 Específicos.

1. Cultivar cepas puras de *Microcystis aeruginosa*.
2. Aislamiento y purificación de metabolitos mediante técnicas cromatográficas.
3. Identificar por métodos espectroscópicos los compuestos químicos aislados (metabolitos) de *Microcystis aeruginosa*.

1.5 Justificación.

La mayoría de los estudios sobre cianobacterias en México, están basados en la acuicultura, florística y sistemática, que son de gran importancia y han proporcionado grandes hallazgos sobre su uso, composición y distribución de estos organismos, también se á realizado algunos estudios sobre su toxicidad y capacidad de impacto ambiental, que ocasionan el desbalanceo de los procesos biogeoquímicos de la columna de agua, provocando la eutrofización y modificando la cadena trófica además de ser nocivos para la salud humana. Hoy en día el estudio sobre la obtención y caracterización de metabolitos en los medios acuáticos, se encuentra aún en etapas tempranas, a pesar de que ha demostrado que se puede obtener un extraordinario aporte de componentes, compuestos y productos naturales con grandes potenciales activos, el estudio sobre estos es aún es escaso. Se estima que solo el 15% de las

especies conocidas pertenecen a hábitats acuáticos, y dentro de esta porción se encuentra la diversidad inexplorada de las comunidades microbianas (bacterias, hongos, levaduras, protozoos, virus y algas) (Briggs, 1994). Se ha hecho importante el estudio de los microorganismos de ambientes acuáticos, para comprender el papel que juegan en los procesos biológicos que ocurren dentro del sistema (Azam *et al.*, 1983).

Las investigaciones actuales respecto a las cianobacterias se han visto diezmadas ya que una gran mayoría de estas, se encuentran referidas a la toxicidad sobre plantas, animales e incluso el ser humano, y en su minoría en la identificación de metabolitos a través de su estructura y composición química. Sin embargo, gracias al esfuerzo de muchos investigadores, que han proporcionado un conteo de más de 4000 sustancias bioquímica y biológicamente activas, de las diferentes especies de cianobacterias, gracias a esto se ha podido contemplar a las cianobacterias como microorganismos de gran potencial para la obtención de productos naturales.

Microcystis aeruginosa por otro lado es una cianobacteria considerada de gran riesgo para la salud, ya que se le encuentra casi en todos los lagos urbanos eutroficados y tiene un gran potencial tóxico, no obstante, el descubrimiento de nuevos metabolitos con un posible potencial biactivo, hace evidente la necesidad de desarrollar investigaciones sobre los procesos metabólicos en los cuales *M. aeruginosa* produce metabolitos con gran potencial, químico, biológico y/o biotecnológico. La química y bioquímica sobre estos organismos es insuficientemente estudiada en México, y aunque existen investigaciones ya relacionadas con la obtención de toxinas y metabolitos, los estudios relevantes a esto aún se encuentran en sus primicias. El análisis de los metabolitos presentes en *M. aeruginosa*, permitirá contribuir al conocimiento de la diversidad química de los recursos naturales acuáticos mediante el aislamiento y caracterización de los mismos, en los diferentes campos (ciencia, medicina, industria, agricultura, etc.).

CAPITULO II.

MÉTODOS.

2.1 Trabajo en campo.

2.1.1 Colecta, procesamiento de muestras e identificación de especies.

Las muestras fueron recolectadas, del lago ubicado en segunda sección del Bosque de Chapultepec el día 22 de septiembre de 2011, se colectó 2 L de agua en botellas de plástico de 500 ml, en donde se observó un florecimiento de cianobacterias, también se tomaron datos de pH, conductividad, % Oxígeno empleando el conductímetro (YSI-30). La muestra recolectada se procesó en el laboratorio y se realizaron observaciones de muestras de agua (1ml)

Para la identificación de los organismos, se empleó el microscopio (Carl Zeiss Axio Lab.A1) y se lograron identificar por medio de claves taxonómicas (Barreno y Pérez-Ortega, 2003), especies de fitoplancton de géneros de *Chlorella sp.*, *Desmodesmus sp.* y una dominancia de *Microcystis aeruginosa*.

2.1.2 Aislamiento de *Microcystis aeruginosa*.

Una vez identificadas la especie se hizo una serie de diluciones de la muestra bruta, las diluciones se realizaron en viales de 20 ml en concentraciones de (50:100, 25:100, 12.5:100, 6.25:100) (Castillo-Morales, 2004), en un medio de cultivo enriquecido con N, P y K como nutrientes (17:17:17) (Alva-Martínez *et al.*, 2007), con el objetivo de aislar la especie deseada.

Se realizaron observaciones y conteos de células al microscopio (Carl Zeiss Axio Lab.A1) mediante el uso de un citómetro, para obtener conteo de células/L y se aislaron cepas puras de *M. aeruginosa*.

Para las diluciones se tomó directamente un conjunto de células de *M. aeruginosa* y se aisló del resto de la muestra, colocando de 1 a 5 células/L (1 ml aproximadamente) en 10 ml de medio de cultivo N, P y K (17:17:17), posteriormente se realizaron nuevas observaciones para corroborar que el aislamiento de las cepas no estuviera contaminado otras microalgas, cianobacterias y bacterias asociadas a este tipo de entorno. Este procedimiento se realizó por triplicado hasta obtener cepas puras de *M. aeruginosa*.

2.2 Diseño experimental.

2.2.1 Cultivo de *M. aeruginosa*.

Los cultivos se realizaron de manera intensiva y paulatina y se escalaron en matraces de 25, 100, 500, 1000ml hasta garrafones de 20 L (Figura. 1), bajo condiciones controladas de luz, pH, temperatura, aireación y calidad del agua (Barreiro-Gümes y Signoret-Poillon, 1999; Castillo-Morales, 2004), para obtener la mayor cantidad de biomasa posible (50 g – 3 kg) necesaria en la caracterización de metabolitos.

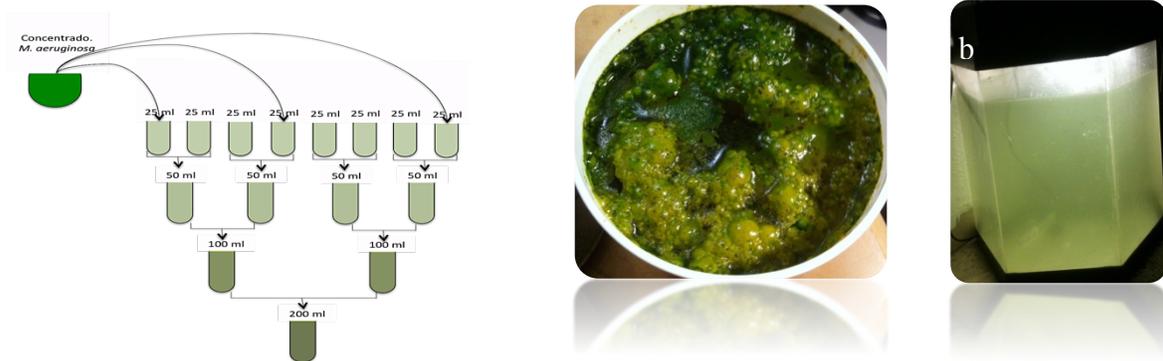


Figura 2. Esquema de cultivo escalonado, a) cultivo *M. aeruginosa* (1L) y b) (20 L).

2.2.1.1 Medio de Cultivo.

El medio de cultivo que se empleó fue un fertilizante comercial (vita Plant Nutrition, fertilizante para floración, nutriente líquido foliar para crecimiento rápido) (Tabla 6), a una

concentración de 1ml de fertilizante en 1L de agua, adicionalmente se le agregó bicarbonato de sodio para una mayor fijación de carbono por *M. aeruginosa*, debido a que las cianobacterias son organismos fotosintéticos se requiere de dióxido de carbono, luz y nutrientes para su crecimiento.

Tabla 7. Contenido de nutrientes del fertilizante (vita).

Nutrimentos	Porcentaje en 1 L
Nitrógeno amoniacal	2.0%
Fósforo (P ₂ O ₅)	3.0%
Potasio (K ₂ O)	1.0%
Hierro y Zinc	55 ppm c/u
Magnesio y Manganeso	10 ppm c/u
Boro	8 ppm
Cobre	1 ppm
Gibelerinas	3 ppm
Foliscentenia	275 ppm
Ácidos Húmicos	7.0%

2.2.2 Aislamiento y caracterización de metabolitos de *Microcystis aeruginosa*.

2.2.2.1 Material y equipo utilizado para la identificación de metabolitos.

2.2.2.1.2 Cromatografía en capa fina (CCF) y cromatografía en columna (CC).

Para las cromatografías en capa fina (CCF) se utilizaron cromatófilos de aluminio con una capa de gel de sílice 60 F₂₅₄ de 0.25 mm de espesor (Merck). Para visualizar las placas se utilizó una lámpara UV Spectroline modelo CX-20 a longitudes de onda (λ) 254 y 365 nm y/o una solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2 N seguido de calentamiento a 120 °C aproximadamente por 1 o 2 minutos en una parrilla eléctrica.

Para las cromatografías en columna (CC) se utilizó gel de sílice para cromatografía en capa fina (Merck), Sephadex LH-20 (SIGMA) o Amberlita XAD-4 (SIGMA) según sea el caso. El cual se empaqueta en columnas de vidrio de diferente grosor y altura, dependiendo de la fracción empleada, así como del peso obtenido de la misma, se utilizó un porcentaje 1:20 (1g de muestra por cada 20g de sílica).

2.2.2.1.3 Resonancia magnética nuclear protónica (^1H) y de carbono (^{13}C)

Los experimentos se realizaron en disolventes deuterados como: cloroformo (CDCl_3), metanol (CD_3OD), agua (H_2D) y/o dimetil sulfoxido (DMS) según la polaridad del compuesto y se usó como referencia interna el Tetrametilsilano (TMS). Los experimentos se realizaron en espectrómetros JEOL 300 a 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C y BRUKER[®], AVANCE 400 y 500 según las necesidades.

2.2.2.1.4 Espectrometría de Masas.

La espectrometría de masas de baja (LRMS) y alta resolución (HRMS) se determinó en el Espectrómetro de masas Jeol The AccuToF JMS-T1000LC, The MStation JMS-700, Jeol SX 102 A y cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas Jeol GCMate II. Las muestras se aplicaron por introducción directa a la temperatura de la fuente de ionización (230 – 500 °C).

En caso del análisis directo en tiempo real (DART) se utilizó Helio (He) y Nitrógeno (N_2) como gas de arrastre.

La inyección de la muestra se realizó a través de una columna HP5 (30 mm x 0.25 mm D.I x 0.25 μm espesor de película), se inyectó un volumen aproximado de 20 μL y un flujo de 1ml/min, la temperatura fue variable, debido a los diferentes compuestos posibles en una muestra, esta variación de temperatura permitió una separación de los mismos la temperatura empleada comenzó en 30 °C por 1 min con un aumento de 7 °C/min hasta 305 °C y se mantuvo por 5 min. Posteriormente se obtuvo un espectrograma el cual se analizó y se comparó con las bibliotecas de espectros de masas disponibles en el Instituto de Química y bibliotecas de acceso público como: MassBank High Quality Mass Spectral Database, NIST Standard Reference Database, Wiley Registry of Mass Spectral Data y GNPS: Global Natural Products Social Molecular Networking.

2.2.2.1.5 Cromatografía Líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplado a espectroscopia de masas (EM).

Las condiciones cromatográficas empleadas durante este proceso, se realizaron en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 Series Binary SL y un espectrómetro de masas Bruker Esquire 6000, por medio de ionización por Electro-spray (ESI) y un nebulizador a 30 psi, posteriormente en el detector se utilizó un flujo de gas de secado de 7 L/min y una temperatura de secado de 300 °C, los escaneos se realizaron entre los 100-2000 m/z. Se montó una columna Synergi Polar 80 A 4 um 150 x 2.0 mm, y como eluyente empleado se utilizó acetonitrilo (CH₃CN) – agua, con una relación inicial de CH₃CN al 35% y agua al 65% por aproximadamente 5 min, hasta finalmente obtener una concentración final de CH₃CN al 100% mediante un flujo de 0.2 mL/min por 30 min.

2.2.3 Obtención del extracto crudo de *Microcystis aeruginosa*.

Se recolectaron 6 L de concentrado de *M. aeruginosa*, para obtener la biomasa necesaria empleada en la extracción por cromatografía, los 6 L fueron separados en matraces bola (250, 500 y 1000 ml) y posteriormente se congelaron con hielo seco. El medio congelado se liofilizó utilizando una liofilizadora (LABCONCO Freeze dry System / Freezone 4.5) y se obtuvieron 50 g del material seco.

2.2.4 Cromatografía en columna (CC) Primera extracción (extracto crudo).

El Extracto seco se empaquetó en una columna de vidrio vertical (50 cm x 4.3 cm), posteriormente se realizó la extracción con eluyentes de polaridad creciente hexano, diclorometano (DCM), metanol (MeOH) (Figura. 4). Para cada eluyente se obtuvieron 8 fracciones de 200 ml c/u, se utilizó (CCF), que se siguieron mediante cromatófilos de aluminio para corroborar y reunir las fracciones similares de acuerdo a su Relación frontal (R_F), mediante la utilización de eluyentes a diferentes concentraciones (ej. DCM- MeOH 9:1, 8:2, 7:3, 6:4 y 5:5).

2.2.4.3 Extracto de Metanol (MeOH).

De la columna original se obtuvieron ocho eluatos y se reunieron en base a la semejanza de sus componentes, quedando entonces dos fracciones primarias. La primera donde se concentraron los eluatos 3, 4, 5, 6, 7 y 8 por su alto contenido en sales (2.3 g), y la segunda conformada por los eluatos 1 y 2, que también contenían una cantidad de sales, y se separó eluyendo con acetona, acetato de Etilo (AcOEt) y MeOH (Figura 3), posteriormente cada una de estas eluciones fueron filtradas y se separaron las sales retenidas en el filtro (2.31 g), se reunió el material y se eliminó el disolvente por medio de destilación a presión reducida y 60 °C de temperatura esta fracción fue nombrada como “Met-AR” con peso de 5.2 g.

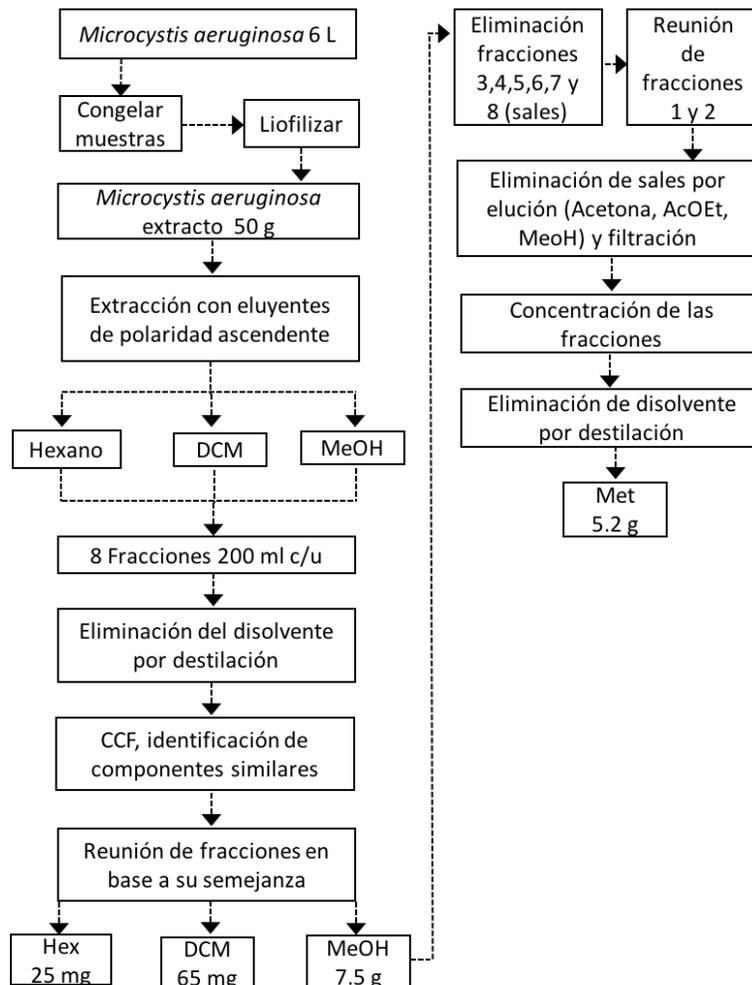


Figura 3. Diagrama de flujo de la obtención del extracto de *M. aeruginosa* y procedimiento seguido con la fracción obtenida con MeOH (Met).

2.2.5 Cromatografía en columna (CC) Segunda extracción (Extracto “Met-AR”)

Se colocó 1g del extracto “Met-AR” en una columna de vidrio previamente empaquetada con Sephadex-LH 20, la cual se eluyó con metanol y se obtuvieron 25 eluatos de 20 ml, los cuales se reunieron en base al R_F observado en (CCF) obteniendo diez fracciones definitivas (Figura 4).

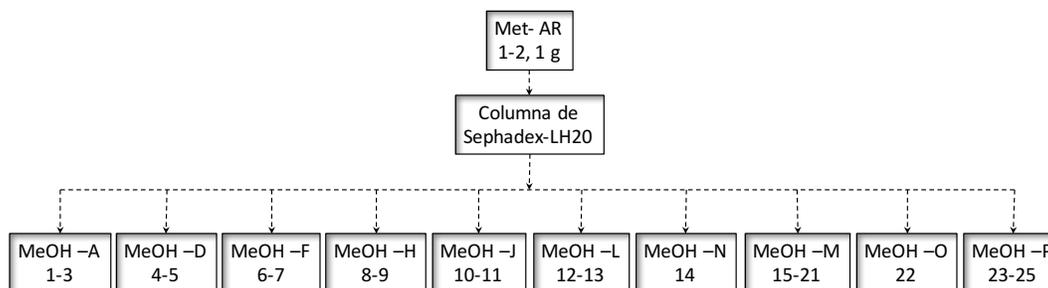


Figura 4. Esquema de la cromatografía en columna (Sephadex-LH20) de la fracción primaria Met-AR.

2.2.5.1 Cromatografía en columna (CC), de gel de sílice de la fracción MeOH – D.

Se colocó el extracto MeOH – D en una columna de vidrio (30 cm de altura por 1 cm de ancho), la cual se empaquetó con 6000 mg de gel de sílice y 300 mg de extracto, posteriormente se realizó la separación con diferentes eluyentes de polaridad ascendente y mezclas de ellos (Hexano, DCM, DCM/AcOEt y AcOEt/MeOH) obteniendo quince eluatos de 20 ml, las fracciones fueron reunidas de acuerdo al R_F observado por CCF y posteriormente se les realizó análisis por resonancia magnética nuclear protónica (RMN 1H) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas acoplada (CG – EM). Las fracciones reunidas se nombraron como (MeOH – DC, DG, DG² y DL) (Figura 5).

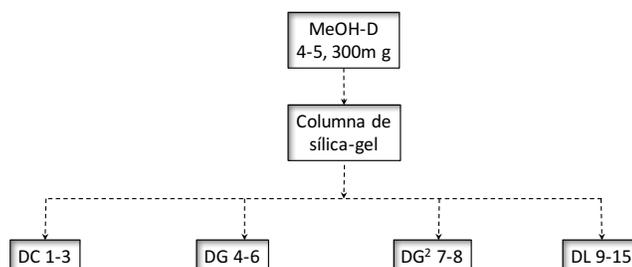


Figura 5. Esquema de la cromatografía en columna (Gel de sílice) de la fracción MeOH – D

2.2.5.2 Cromatografía en columna (CC), de Sephadex – LH20 de la fracción MeOH – H.

Se colocó 150 mg de la fracción (MeOH – H) en una columna de vidrio previamente empaquetada con Sephadex-LH 20, la cual se eluyó con metanol y se obtuvieron 18 eluatos de 5 ml, los cuales se reunieron en base a su semejanza, empleando múltiples cromatófilos de aluminio (CCF) para corroborar y reunir las fracciones con componentes semejantes, obteniendo 6 fracciones (Figura 6).

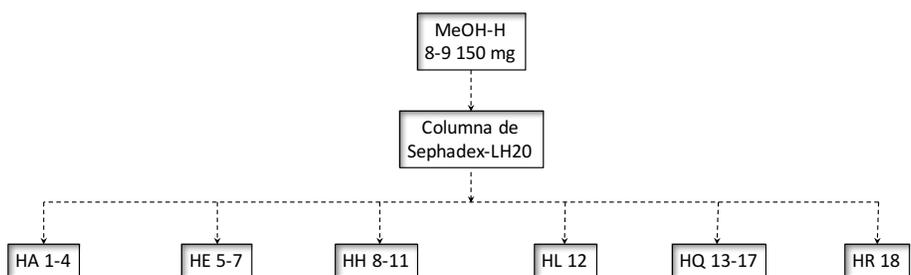


Figura 6. Esquema de la cromatografía en columna (Sephadex-LH20) de la fracción MeOH – H.

2.2.5.3 Cromatografía en columna (CC), de gel de sílice de la fracción MeOH – HA.

Se colocó la fracción MeOH – HA en una columna de vidrio (15 cm de altura por 0.5 cm de ancho), la cual se empaquetó con (45 mg) de extracto en (300 mg) de sílice, posteriormente se realizó la extracción con diferentes eluyentes de polaridad ascendente (DCM, DCM/AcOEt, DCM/MeOH y AcOEt/MeOH) obteniendo 26 eluatos de 20 ml (Figura 7), las fracciones fueron reunidas de acuerdo a su semejanza y posteriormente se les realizó análisis por resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹H) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG – EM).

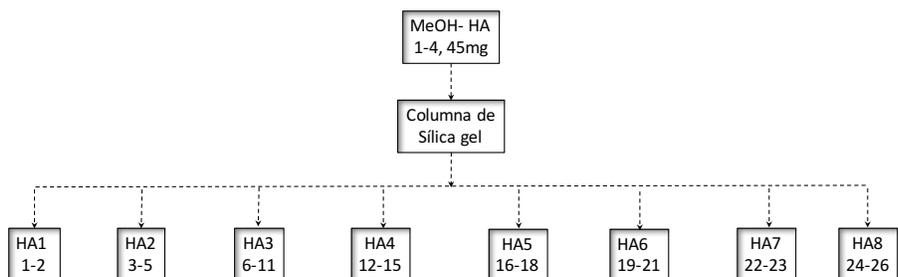


Figura 7. Esquema de la cromatografía en columna (Gel de sílice) de la fracción MeOH – HA.

2.2.5 Extracción Líquido-Líquido de la fracción CYST – M.

Se realizó la extracción líquido – líquido, mediante la utilización de 50 ml del concentrado de *M. aeruginosa*, que se le agregó 150 ml de agua destilada. Esta mezcla se congeló y se descongeló para provocar la lisis celular, permitiendo a las células liberar sus metabolitos al medio, obteniendo un extracto de color azul claro, el cual se filtró para evitar la contaminación con metabolitos anteriormente identificados provenientes de las células (Figura 8).



Figura 8. Obtención de metabolitos por lisis celular (Congelación y Descongelación) de *Microcystis aeruginosa*.

Posteriormente en un embudo de separación de 500 ml, se agregó el extracto azul (200 ml) y se realizó la extracción con AcOEt (300 ml), se agitó ligeramente para evitar la formación de una emulsión, se dejó reposar de por 3 horas, hasta que se observó la separación de 2 fases en el embudo, posteriormente se realizó la separación del agua y el AcOEt, mediante goteo lento. Lo obtenido (9.2 mg) se analizó por cromatografía de alto rendimiento acoplado a espectrometría de masas (HPLC – EM).

CAPITULO III.

RESULTADOS

3.1 Identificación de ésteres metílicos de la fracción MeOH – DC por resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG – EM).

De la fracción MeOH – DC (75mg) se obtuvo un aceite de color amarillento, el cual se analizó mediante resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H). Su espectro determinado en cloroformo deuterado (CDCl_3), mostró señales características de ésteres metílicos de ácidos grasos, consistentes en una señal múltiple a un desplazamiento químico (δ) de 5.3 ppm, debido a la presencia de protones vinílicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$), una señal simple aguda a (δ) 3.64 ppm que corresponde a los protones del metilo de un éster metílico ($\text{O}=\text{C}-\text{OCH}_3$), así como los protones de los metilenos de una cadena alifática $-(\text{CH}_2)_n-$ y el metilo terminal ($-\text{CH}_3$), lo que da lugar a una señal simple y otra señal triple en (δ) 1.25 y 0.86 ppm respectivamente (Figura 9)

La mezcla de ésteres metílicos se analizó por (CG – EM) (Figura 10), se lograron analizar e identificar 18 ésteres metílicos, de los cuales, diez corresponden a ácidos grasos saturados y sus isómeros correspondientes C14:0^a, C14:0^b, C15:0^a, C15:0^b, C16:0^a, C16:0^b, C16:0^c, C17:0^a, C17:0^b y C18:0, seis a ácidos grasos monoinsaturados C14:1, C16:1, C17:1^a, C17:1^b, C17:1^c y C18:1, así como dos ácidos grasos polinsaturados C15:3 y C18:3 (Tabla 13 y 14).

Mediante la obtención de espectros de masas, se realizó un perfil de ácidos grasos, en donde se observa la abundancia relativa de cada compuesto, correspondiendo los ésteres metílicos de ácidos grasos C16:0 (10.82 %) C16:1 (16.49 %), C18:0 (12.37 %) y C18:1 (18.04 %) con la mayor abundancia dentro de la especie *M. aeruginosa*, los compuestos C14:0 y su isómero presentaron una abundancia relativa de 3.32 % y 1.32 % respectivamente, C14:1 con una abundancia de 8.25%, mientras que la abundancia de ácidos grasos C15:0 fue de 6.12 % y su isómero correspondiente C15:0^b presentó una abundancia de 4.12 %, los ésteres metílicos

C15:3 con una abundancia de 5.15 , el ácido graso C17:0 y su isómero C17:0^b con una presentaron una abundancia de 3.83 % y 1.83% respectivamente, por otro lado los ácidos grasos monoinsaturados C17:1^a y C17:1^b presentaron una abundancia del 2.58 mientras que su isómero C17:1^c tienen la mayor abundancia con 3.61 % de los tres isómeros C17:1, por último el ácido graso poliinsaturado C18:3 tiene la menor abundancia, siendo esta de 1.55% e identificado como ácido α - linolénico (Tabla 8).

La composición relativa de ácidos grasos saturados corresponde al 41.75 % de la composición total de este tipo de compuestos y el 58.25 % se reportó como ácidos grasos insaturados, que componen el perfil de la especie *M. aeruginosa*, con lo cual se estableció que la composición mayoritaria de este tipo de compuestos corresponde a los ácidos grasos mono y poliinsaturados (Tabla 9).

Tabla 8. Composición de Ácidos grasos y ésteres metílicos (%) presentes en *M. aeruginosa* donde: A.R = Abundancia relativa.

Ácidos grasos saturados e insaturados		A.R(%)	Isómeros ácidos grasos		A.R(%)
C14:0 ^a	Tetradecanoato de metilo	3.32	C14:0 ^b	Tetradecanoato de metilo	1.32
C14:1	11-Tetradecenoato de metilo	8.25			
C15:0 ^a	Pentadecanoato de metilo	6.12			
C15:3	4E,7E,10E-Hexadecatrienóico	5.15	C15:0 ^b	Ácido 14-metilpenadecanóico	4.12
C16:0 ^a	Hexadecanoato de metilo	3.60			
C16:1	9-Hexadecanoato de metilo	16.49			
C:17:0 ^a	Heptadecanoato de metilo	3.83	C16:0 ^b	Hexadecanoato de metilo	3.60
C17 1 ^a	9-Heptadecanoato de metilo	2.58			
C17:1 ^b	Cis-10-Heptadecanóico	2.58	C16:0 ^c	Hexadecanoato de metilo	3.60
C17:1 ^c	11-Heptadecanoato de metilo	3.61			
C18:0	Octadecenoato de metilo	12.37	C17:0 ^b	Heptadecanoato de metilo	1.83
C18:1	9-Octadecenoato de metilo	18.04			
C18:3	Ácido 9,12,15-Octatridecanóico	1.55			

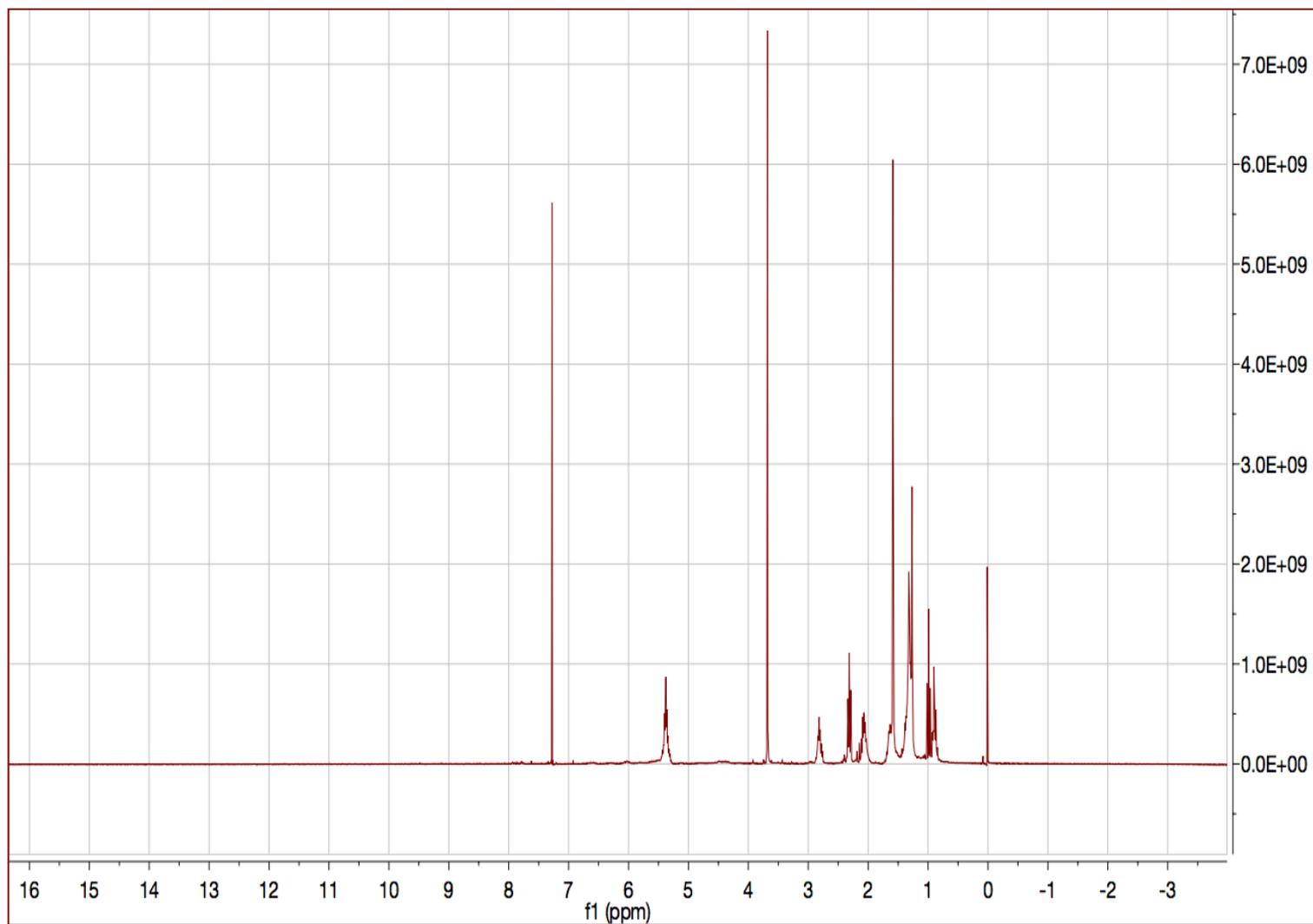


Figura 9. Espectro de Resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H), de ésteres metílicos de la fracción MeOH-DC

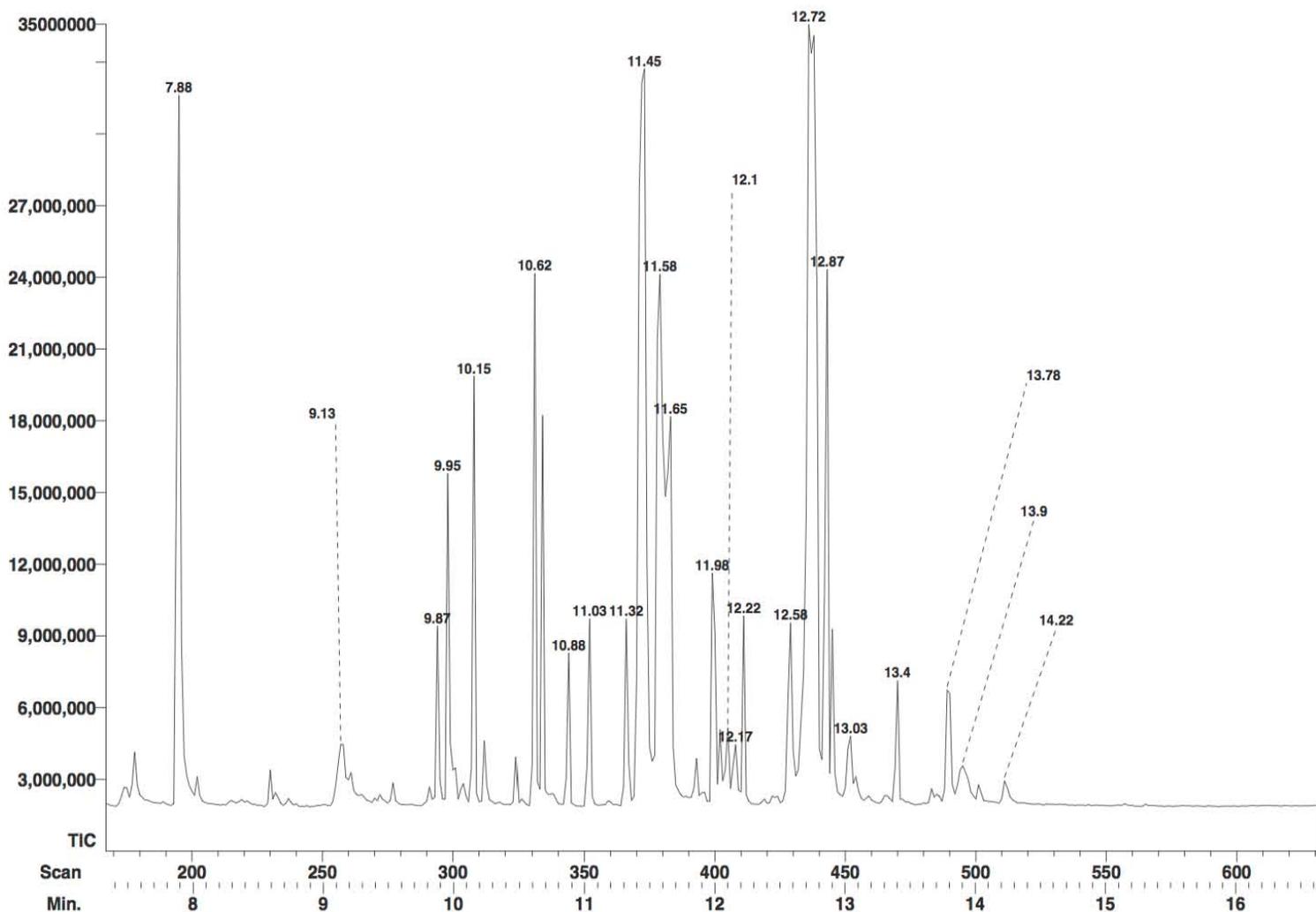
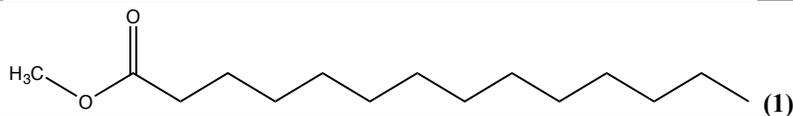


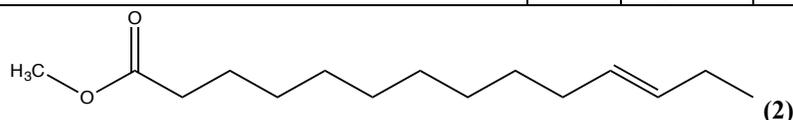
Figura 10. Cromatograma de la mezcla de ésteres metílicos de la fracción MEOH-DC analizada por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM).

Tabla 9. Ésteres metílicos y ácidos grasos, identificados CG-EM, donde PB = Pico base, FM = Fórmula Molecular, PM = Peso Molecular y TR = Tiempo de retención.

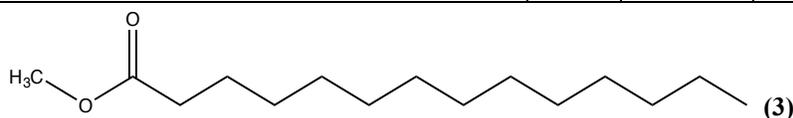
Compuesto	PB (m/z)	F M	P M	(TR) min
Tetradecanoato de metilo	74	C ₁₅ H ₃₀ O ₂ C14:0 ^a	242	9.87



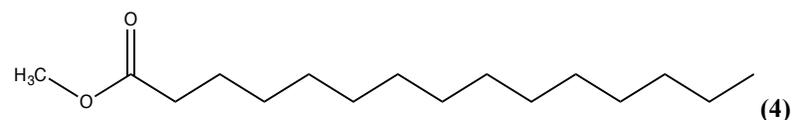
11-Tetradecanoato de metilo	85	C ₁₅ H ₂₈ O ₂ C14:1	240	9.95
-----------------------------	----	---	-----	------



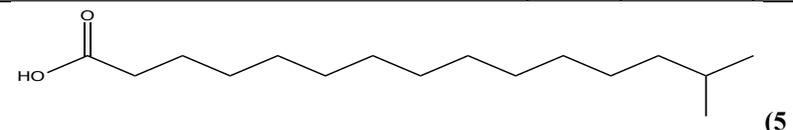
Tetradecanoato de metilo	87	C ₁₅ H ₃₀ O ₂ C14:0 ^b	242	10.15
--------------------------	----	--	-----	-------



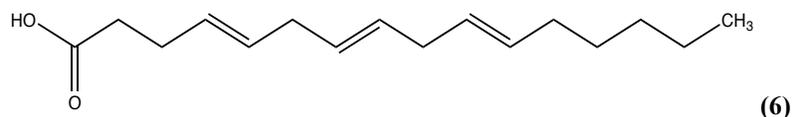
Pentadecanoato de metilo	87	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ C15:0 ^a	256	10.62
--------------------------	----	--	-----	-------



Ácido 14-metilpentadecanoico	74	C ₁₆ H ₃₂ O ₂ C15:0 ^b	256	10.88
------------------------------	----	--	-----	-------

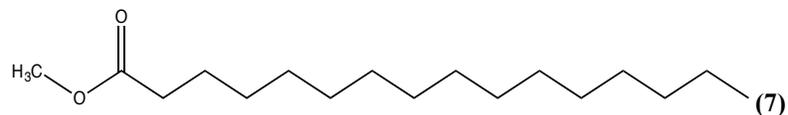


Ácido 4E,7E,10E-Hexadecatrienóico	43	C ₁₆ H ₂₈ O ₂ C15:3	250	11.03
-----------------------------------	----	---	-----	-------

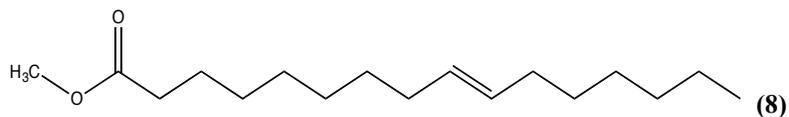


E = Configuración trans

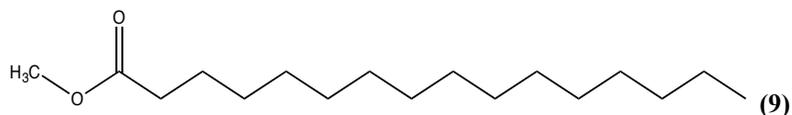
Hexadecanoato de metilo	74	$C_{17}H_{34}O_2$ $C16:0^a$	270	11.32
-------------------------	----	--------------------------------	-----	-------



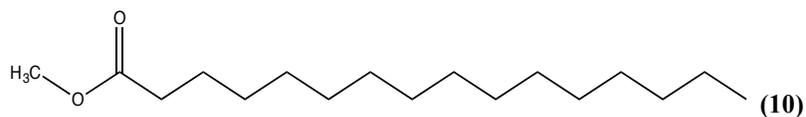
9-Hexadecenoato de metilo	83	$C_{17}H_{32}O_2$ $C16:1$	268	11.45
---------------------------	----	------------------------------	-----	-------



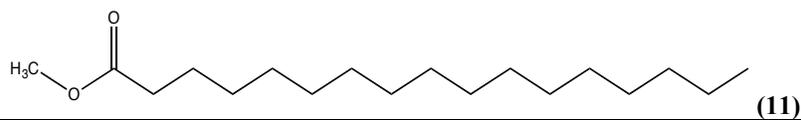
Hexadecanoato de metilo	87	$C_{17}H_{34}O_2$ $C16:0^b$	270	11.58
-------------------------	----	--------------------------------	-----	-------



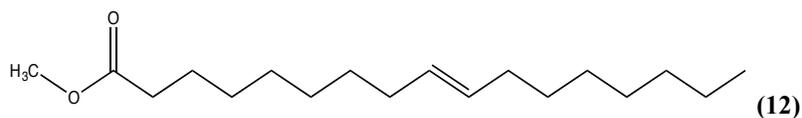
Hexadecanoato de metilo	87	$C_{17}H_{34}O_2$ $C16:0^c$	270	11.65
-------------------------	----	--------------------------------	-----	-------



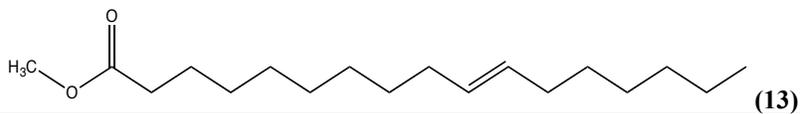
Heptadecanoato de metilo	87	$C_{18}H_{36}O_2$ $C17:0^a$	284	11.98
--------------------------	----	--------------------------------	-----	-------



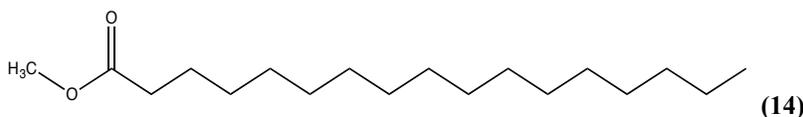
9-Heptadecenoato de metilo	55	$C_{18}H_{34}O_2$ $C17:1$	282	12.10
----------------------------	----	------------------------------	-----	-------



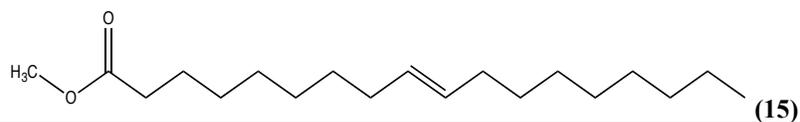
10-heptadecenoato de metilo	55	$C_{18}H_{34}O_2$ C17:1	282	12.17
-----------------------------	----	----------------------------	-----	-------



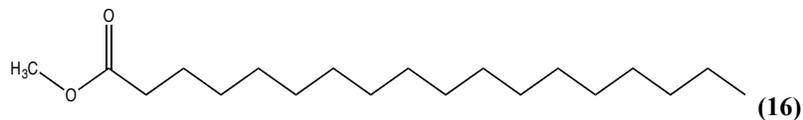
Heptadecanoato de metilo	74	$C_{18}H_{36}O_2$ C17:0 ^b	284	12.22
--------------------------	----	---	-----	-------



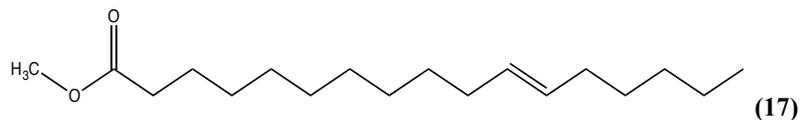
9-Octadecenoato de metilo	97	$C_{19}H_{36}O_2$ C18:1	296	12.72
---------------------------	----	----------------------------	-----	-------



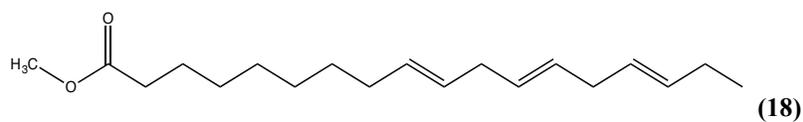
Octadecenoato de metilo	87	$C_{19}H_{38}O_2$ C18:0	298	12.87
-------------------------	----	----------------------------	-----	-------



11-heptadecenoato de metilo	55	$C_{18}H_{34}O_2$ C17:1	282	13.03
-----------------------------	----	----------------------------	-----	-------



Ácido 9,12,15-octadecatrienoato de metilo	55	$C_{19}H_{32}O_2$ C18:3	292	13.9
---	----	----------------------------	-----	------



3.2 Identificación de Fitol (**19**), isómeros del fitol y esteroides de las fracciones MeOH – DG, DG² y HA1 por resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹H) y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

De la fracción MeOH – DG (115mg) se obtuvo un compuesto, el cual fue identificado por RMN ¹H y de ¹³C como el diterpeno conocido como fitol (**19**). En su espectro de RMN ¹H se observó una señal múltiple a (δ) 5.48 ppm que corresponde a una señal triple doble de dobles, indica la presencia de un metino olifénico (=CH) acoplado con un grupo metileno oxigenado (-OCH₂), cuya señal es observada a (δ) 4.3 ppm, mientras que la señal a (δ) 1.60 ppm es debida a un grupo metilo vinílico (C=C-CH₃), las señales entre (δ) 1.9 y 2.1 ppm se atribuyen a los metinos (-CH) y metilenos (-CH₂) respectivamente, por otro lado las señales de los metilos (C-CH₃) se observan entre (δ) 0.80 ppm como señales sobrepuestas (Figura 12). Las señales anteriores están de acuerdo con las reportadas en la literatura para el fitol (**19**). El análisis de las fracciones DG, DG² y HA1 por CG-EM y la similitud observada (R_F) por CCF, permitió el aislamiento del fitol (**19**) así como la identificación de dehidrofitol (**20**) y dos isómeros del fitol como, isofitol (**21**) y *cis*-fitol (**22**) de la fracción DG (Tabla 10 y Figura 11,12 y 13) el peso molecular de los compuestos fitol, isofitol y *cis*-fitol es de 296, sin embargo, este ión molecular no se observó debido a la pérdida de una molécula de agua por la inserción de la muestra al espectrómetro de masas, mostrando un ión molecular de 278, esto mismo ocurrió con el compuesto dehidrofitol, donde el ion molecular 298 no se observa por la pérdida de una molécula de agua, observándose en su caso un pico en 280.

En la fracción DG² se identificó una mezcla de esteroides (Figura 14), identificándose tres compuestos mayoritarios de esta naturaleza: Estigmasterol (**23**) con una abundancia relativa dentro del (54.07 %), 7,22-ergostadienona (**24**) con una abundancia del (15.38 %), β-sitosterol (**25**) con la menor abundancia relativa de (5.12 %) (Tabla 11), además de la fracción HA1 (Figura 15) se identificaron esteroides, los cuales fueron identificados como: Cholesta-4,6-dien-3-ona (**26**) con una abundancia relativa del 19.23 %, finalmente el esteroide identificado como 4,22-stigmastadien-3-ona (**27**) con abundancia de 3.84 % (Tabla 11 y 12).

Tabla 10. Composición de diterpenos correspondientes a fitol (**19**), dehidrofitol (**20**) y los isómeros, isofitol (**21**) y *cis*-fitol (**22**) de la fracción DG. PM = Peso molecular, FM = Fórmula molecular y AR = Abundancia relativa (%).

Compuesto	P M y F M	AR %
Fitol (19)	296 C ₂₀ H ₄₀ O	65.62
Dehidrofitol (20)	298 C ₂₀ H ₄₂ O	6.25
Isofitol (21)	296 C ₂₀ H ₄₀ O	10.93
<i>cis</i> -fitol (22)	296 C ₂₀ H ₄₀ O	17.18
<p style="text-align: center;">OH en configuración Z (22)</p>		

Tabla 11. Composición de esteroides de *M. aeruginosa*, de la fracción DG² y HA1, AR = Abundancia Relativa (%) y *(identificados en la fracción HA1).

Esteroides		A.R (%)
Estigmasterol	C ₂₉ Δ ⁵ Δ ²²	54.07
7,22-Ergostadienona	C ₂₈ Δ ⁷ Δ ²²	15.38
β-sitosterol	C ₂₉ Δ ⁵	5.12
Cholesta-4,6-dien-3-ona*	C ₂₇ Δ ⁴ Δ ⁶	19.23
4,22-Stigmastadien-3-ona*	C ₂₉ Δ ⁴ Δ ²²	6.18

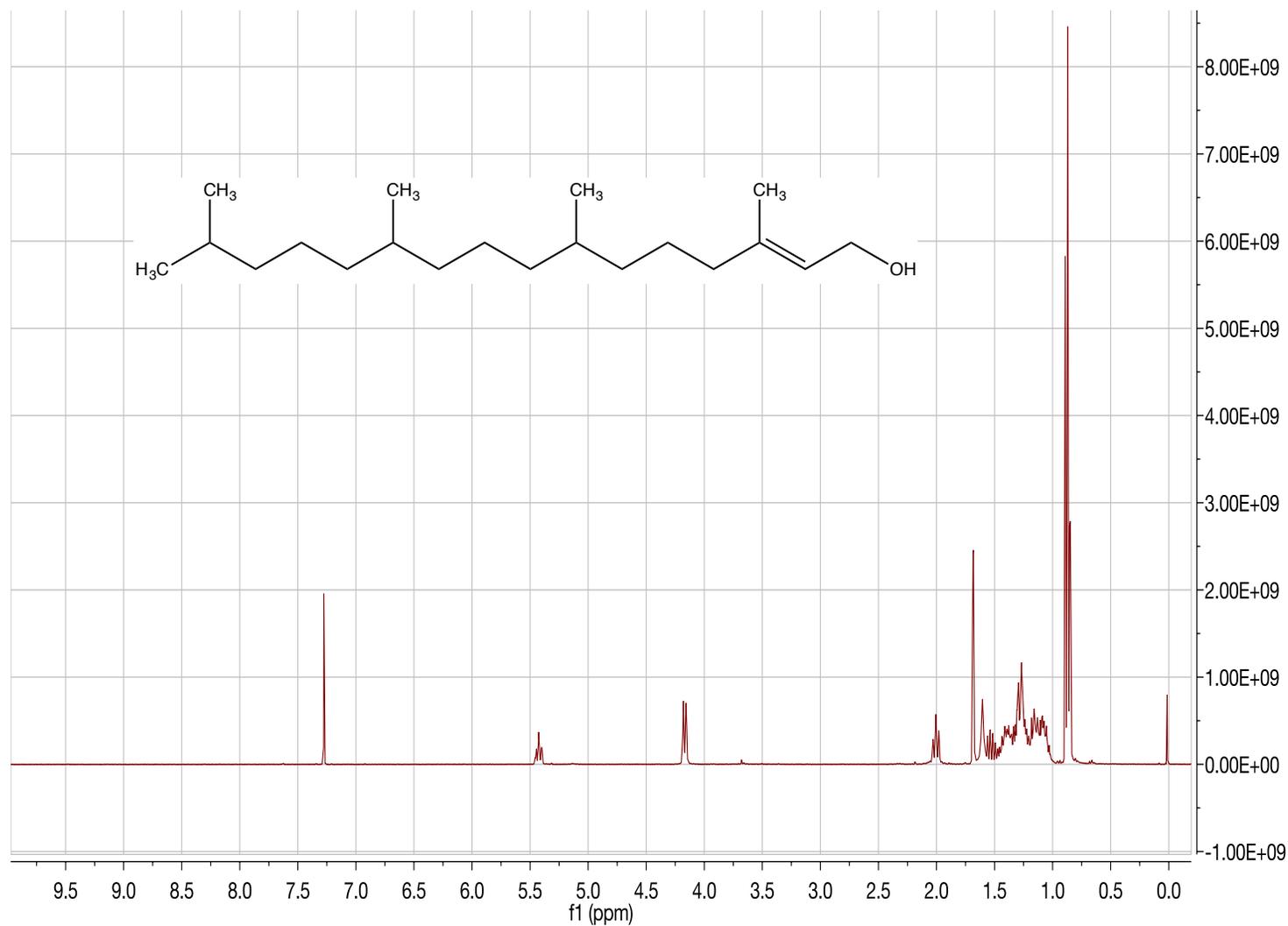


Figura 11. Espectro de Resonancia magnética nuclear protónica (RMN ¹H) del fitol (**19**), aislado de la fracción MeOH-DG.

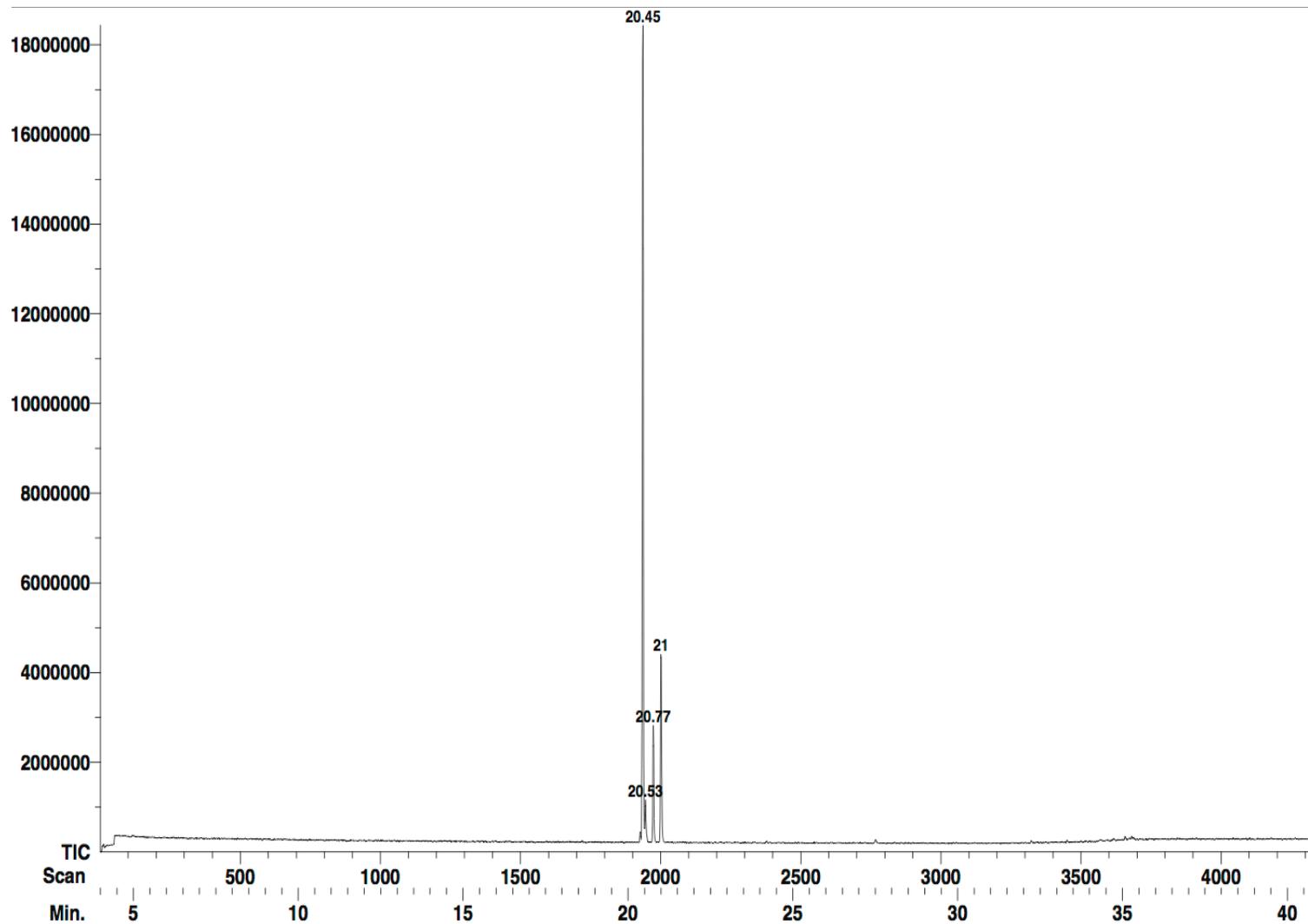


Figura 12. Cromatograma de la fracción MEOH-DG. El pico mayoritario con TR = 20.45 min corresponde al fitol (**19**), . Los picos minoritarios corresponden a isómeros del fitol, TR = 20.53 dehidrofitol (**20**), TR = 20.77 isofitol (**21**) y TR = 21.00 *cis*-fitol (**22**).

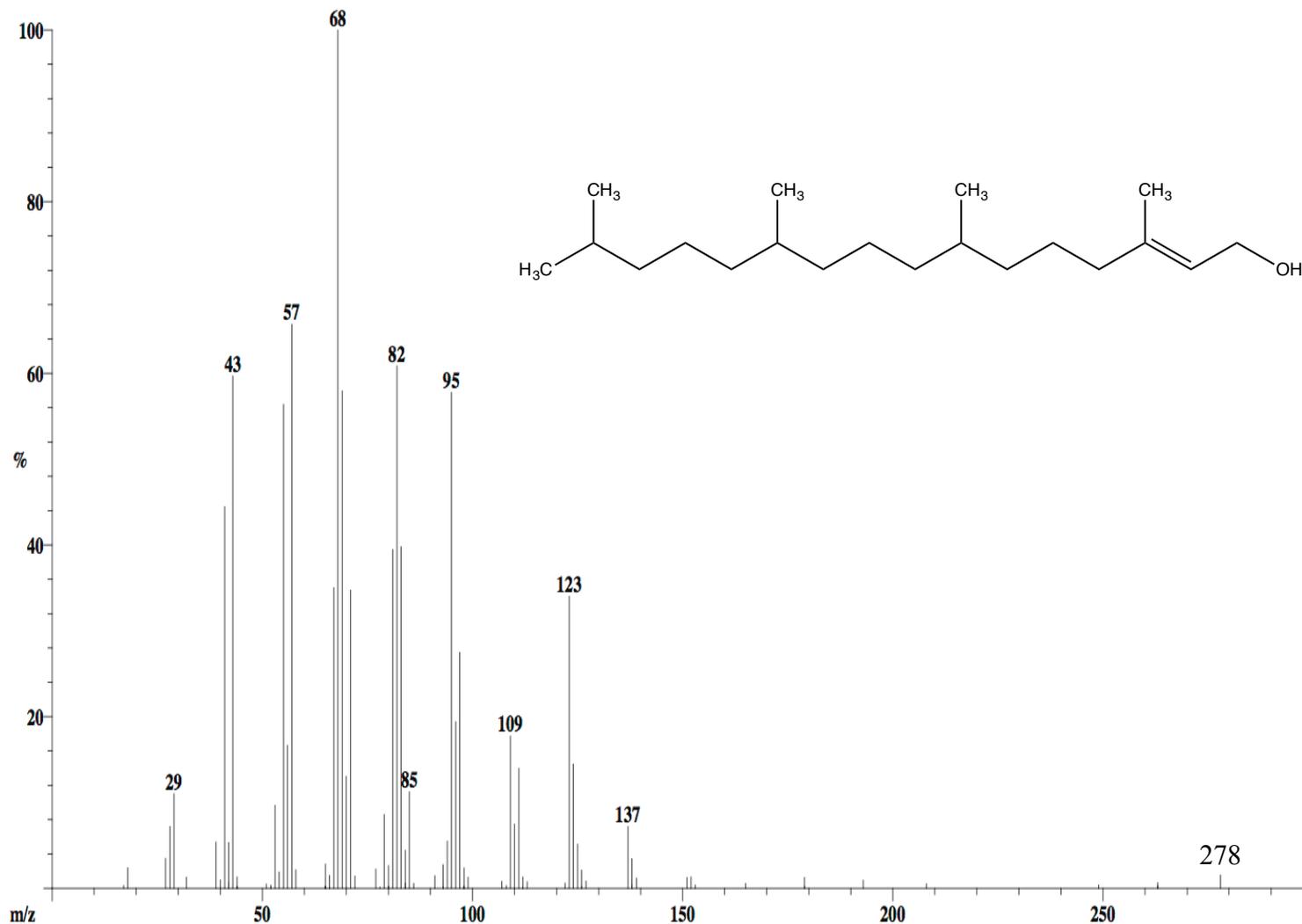


Figura 13. Ampliación del espectro obtenido por CG-EM de la fracción MEOH-DG. Pico con TR = 20.45 min correspondiente al Fitol $M^+ = 278$.

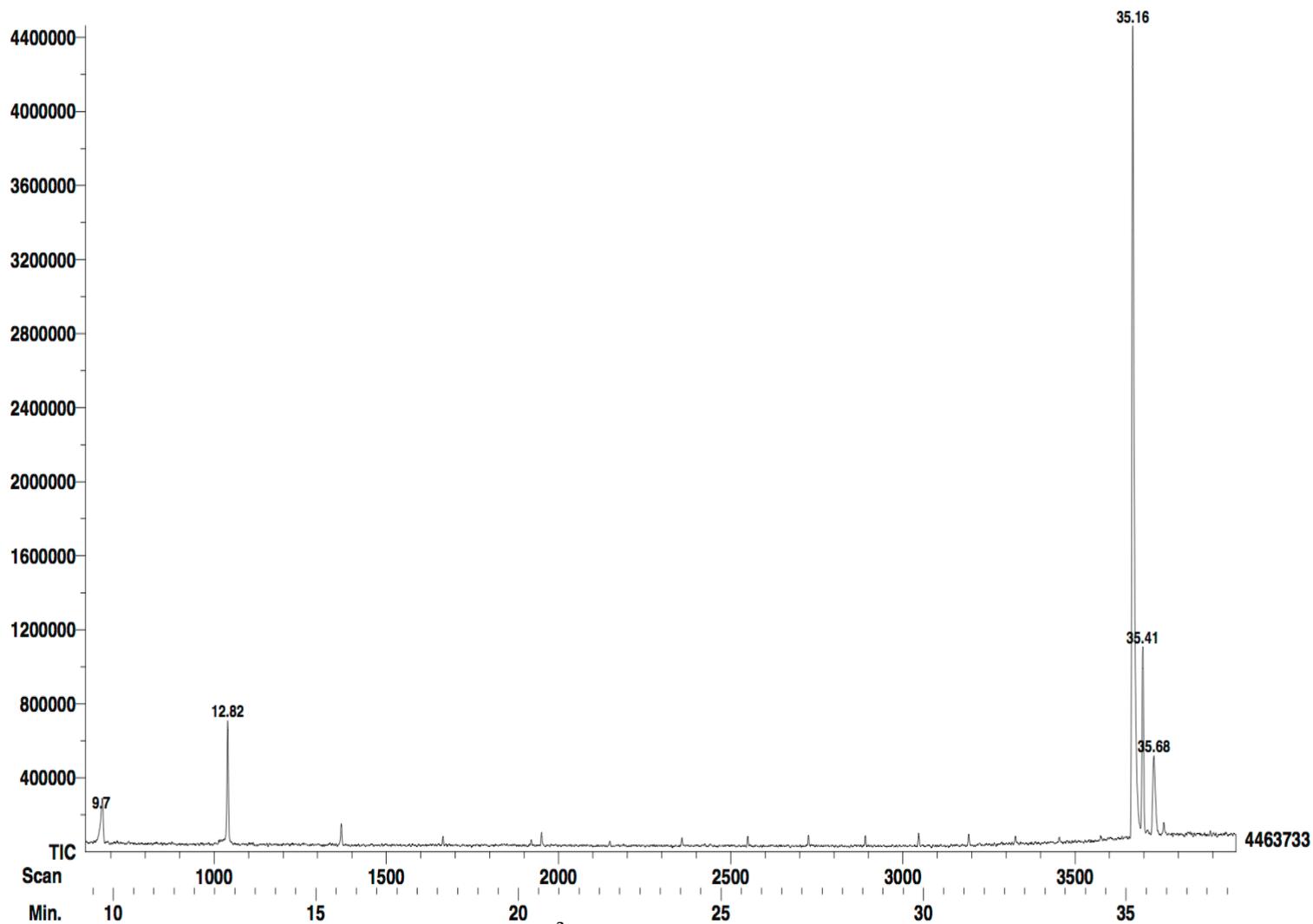
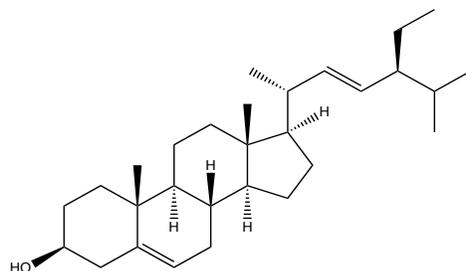


Figura 14. Cromatograma de la fracción MEOH-DG². Los picos con tiempo de retención TR = 35.16, 35.41 y 35.68, que corresponden a los compuestos Estigmasterol (**23**), 7,22-ergostadienona (**24**) y β -sitosterol (**25**).

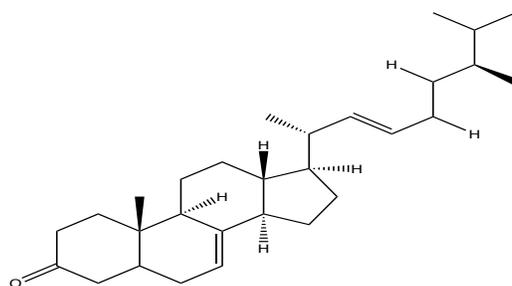
Tabla 12. Compuestos identificados por espectrometría de CG-EM correspondientes a Esteroles de la fracción DG² y HA1(*), donde: TR = Tiempo de retención.

Compuesto/Estructura	Pico Base (m/z)	Fórmula molecular	Peso molecular	(TR)
Estigmasterol	271	C ₂₉ H ₄₈ O	412	35.16



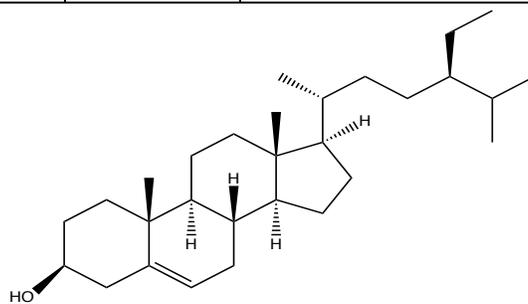
(23)

7,22-Ergostadienona	269	C ₂₈ H ₄₄ O	396	35.41
---------------------	-----	-----------------------------------	-----	-------



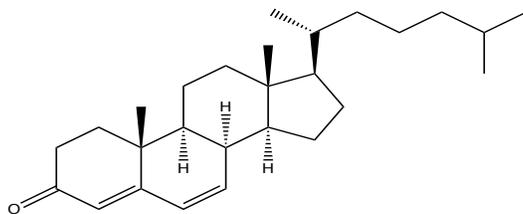
(24)

β-sitosterol	207	C ₂₉ H ₅₀ O	414	35.68
--------------	-----	-----------------------------------	-----	-------



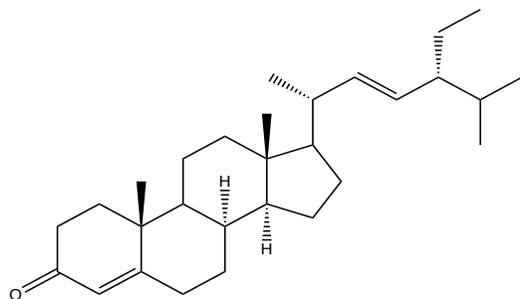
(25)

* Cholesta-4,6-dien-3-ona	43	C ₂₇ H ₄₂ O	382	34.84
---------------------------	----	-----------------------------------	-----	-------



(26)

*4,22-stigmastadiene-3-ona	69	C ₂₉ H ₄₆ O	410	35.2
----------------------------	----	-----------------------------------	-----	------



(27)

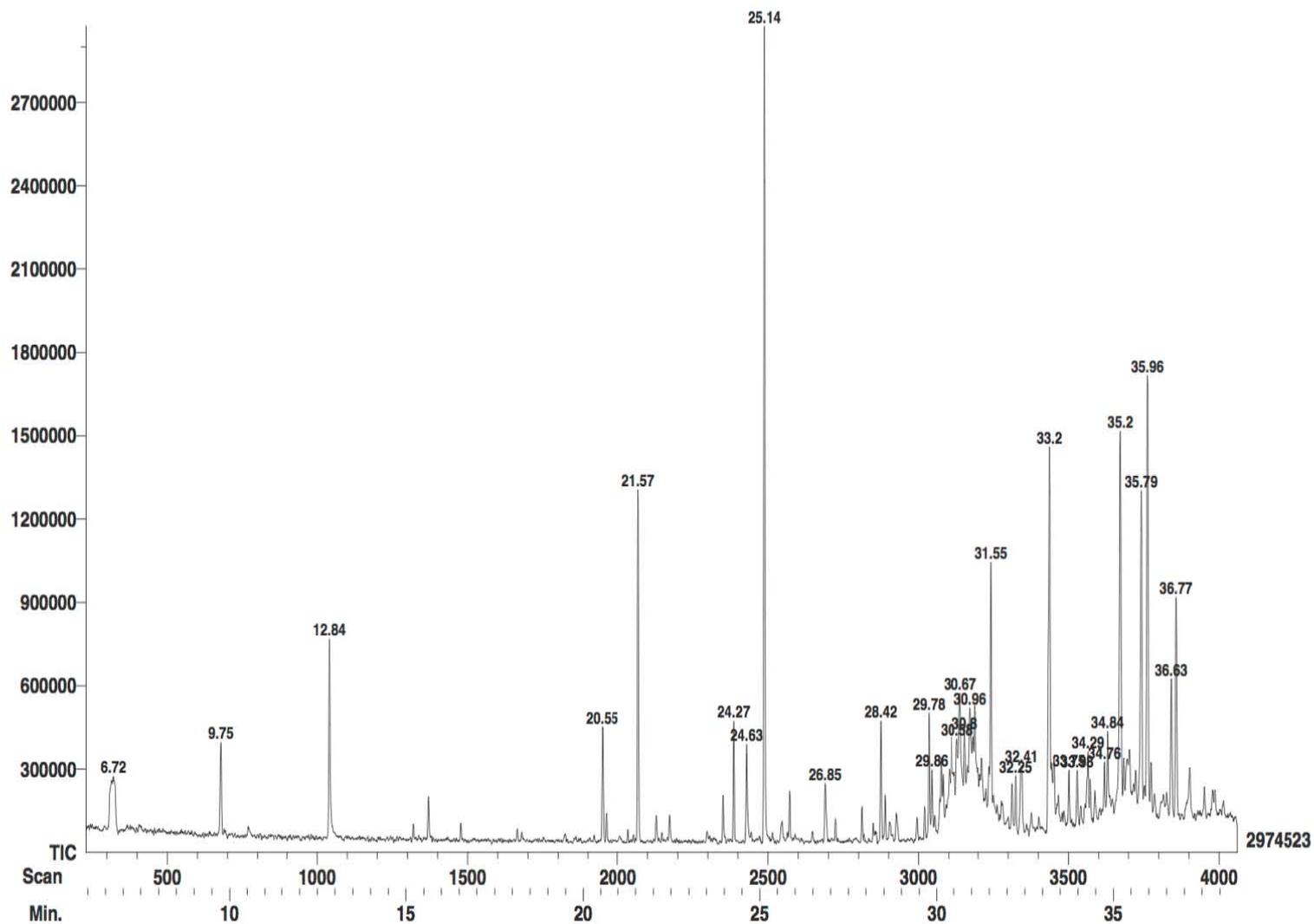


Figura 15. Cromatograma de la fracción MEOH-HA1(*). Los picos con tiempo de retención TR = 34.84 y 35.2, que corresponden a los compuestos Cholesta-4,6-dien-3-ona (**26**) y 4,22-Stigmastadiene-3-ona (**27**) respectivamente.

CAPITULO IV

4.1 Discusión.

Los metabolitos en cianobacterias y en especial la especie utilizada en este estudio *M. aeruginosa*, han sido motivo para el aislamiento y caracterización de sus diferentes componentes químicos, los cuales poseen estructuras químicas únicas e interesantes, así como un posible potencial químico, biológico, agronómico, farmacológico etc.

Una parte importante de estos metabolitos la constituyen los ésteres metílicos de ácidos grasos (Tabla 10), esto debido a que las cianobacterias poseen una cantidad significativa de lípidos, así como, el que algunas especies posean una alta cantidad de ácidos grasos esenciales, como lo son el ácido linoleico y el γ -linoleico (Sharathchandra y Rajasekhar, 2011). Además del valor nutricional de los ácidos grasos, estos han sido empleados para clarificar problemas existentes durante la identificación taxonómica (Li y Watanabe 2001).

Kenyon y colaboradores 1972, mencionan que existen cuatro tipos de ácidos grasos principales en las cianobacterias (C16:0, C16:1, C18:0 y C18:3), mismos que se encuentran ligados a características morfológicas. Por otro lado, Pérez-Gutierrez y colaboradores (2007), menciona que existen ácidos grasos específicos para cada especie de alga verde, y solo existen algunos cambios en la abundancia relativa de los ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo, el perfil de ácidos grasos de las algas verde-azules, en donde se incluyen especies como *Cyanophycean spirulina sp.* y *Microcystis aeruginosa* es el mismo perfil como en las algas verdes (Cojocarú *et. al.*, 1988), lo que concuerda con los ésteres metílicos aislados en este estudio siendo estos identificados como C16:0, C16:1, C18:0 y C18:3 (Tabla 11 y 12).

No obstante, Khalid y colaboradores 2010 identificaron y aislaron un perfil de ácidos grasos similar, conformado por siete ácidos grasos saturados (C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C15:0, C16:0 y C17:0), este tipo de compuestos conformaron el 22.22 % de la abundancia relativa de la especie y 21 ácidos grasos insaturados (C10:1 y 2, C12:1 y 2, C13:1 y 2, C14:1, 2, 3 y 4, C15:1, 2 y 3, C16:1, 2, 3 y 4, C17:3, C18:1 y C18:3) que conformaron el 77.71 % de la

abundancia relativa total de la especie. En este estudio se identificaron diez ácidos grasos saturados que corresponden a los anteriormente mencionados, con la excepción de los ácidos grasos C8:0, C10:0 y C12:0, además la abundancia relativa reportada es del 41.75%, por otro lado los ácidos grasos insaturados en este estudio se identificaron como C14:1, C16:1, C17:1^{a, b y c}, C18:1, C15:3 y C18:3 con una abundancia relativa más baja (58.25 %), lo cual es congruente debido a que en esta especie (*M. aeruginosa*) la composición mayoritaria es de ácidos grasos insaturados.

Por otro lado, un estudio realizado por Sharathchandra y Rajasekhar en 2011, en trece especies de cianobacterias donde se incluyó *M. aeruginosa*, solo se aislaron e identificaron dos tipos de ácidos grasos saturados (C16:0 con 45.2% y C18:0 con 3.98%) con una abundancia relativa total del 49.18% y cinco ácidos grasos insaturados (C16:1, C18:2, C18:3, C18:3^a y C20:1) con una abundancia del 50.82 %, la abundancia relativa es similar a la reportada en este estudio, sin embargo la composición de ácidos grasos en este estudio difiere ya que se identificaron cinco ácidos saturados C14:0, C15:0, C16:0, C17:0 y C18:0, siendo C16:0 y C18:0 los de mayor abundancia con 10.82 y 12.37 % respectivamente, lo cual difiere con la abundancia relativa, ya que el ácido graso C16:0 no es mayoritario como se menciona, siendo el ácido graso C18:0 el de mayor abundancia; sin embargo Pérez-Gutiérrez y colaboradores en 2007 reportaron que en cultivos puros de *M. aeruginosa* solo se identificó un ácido graso saturado (C16:0) y solo ácidos grasos insaturados de tipo C18:2, C18:3^{a y b} y C18:4. Lo cual muestra que este tipo de compuestos en *M. aeruginosa* pueden cambiar o en su defecto modificarse por factores físicos, químicos o biológicos, mostrando así, que bajo diferentes condiciones la especie *M. aeruginosa* puede adaptarse, sobrevivir y proliferar desplazando a otras especies.

Los esteroides son componentes estructurales esenciales en las membranas celulares de organismos eucariontes, entre sus funciones se encuentra el control de regulación de la permeabilidad y fluidez de la membrana, (Volkman, 2003; Kumari *et. al.*, 2013). Existe una diversidad de esteroides fascinante en las microalgas y cianobacterias, como es de esperarse

por la gran cantidad de clases y especies descritas (Volkman, 1986; Jones *et al.*, 1994; Volkman *et al.*, 1998; Volkman, 2003), esto permite una identificación de este tipo de compuestos, como las variaciones obtenidas en este trabajo, ya que se lograron identificar esteroides como colesterol y β -sitosterol compuestos comúnmente identificados en animales y plantas, además, de especies de microalgas y cianobacterias y por ende en la especie empleada en este trabajo *M. aeruginosa*.

En los años sesenta existió un escepticismo sobre la producción de esteroides en cianobacterias, ya que algunos autores como Levin y Bloch en 1964 reportaron la ausencia de los mismos, De Souza y Nes en 1968 quienes aislaron e identificaron efímeras cantidades en algunas especies. No obstante, Forin y colaboradores (1972) presentó evidencia convincente a través de espectros de masas de la presencia de Colesterol y 24-etilcolesta-5,22E-dien3 β -ol en cianobacterias. Algunos de estos esteroides se encuentran ampliamente distribuidos, y otros restringidos a algunas pocas especies de microalgas (Sucrow *et al.*, 1976; Volkman, 1986; Patterson, 1991; Jones *et al.*, 1994; Rzama, *et al.*, 1994). La composición de esteroides varía entre cepas de microalgas y puede ser influenciada por factores como la intensidad de luz, temperatura y etapa de crecimiento (Ballantine *et al.* 1979; Shifrin y Chisholm. 1980; Fábregas *et al.* 1997), aunque usualmente este tipo de cambio en su composición es mínimo (Hallegraeff, *et al.* 1991).

Volkman. 2003, menciona que los esteroides identificados en microalgas, incluyen la presencia o ausencia de un grupo metilo en el carbono 4 (C-4), varias posiciones de los dobles enlaces, siendo común (Δ^5 , y Δ^7 en el núcleo) y (Δ^{22} , $\Delta^{24(25)}$, $\Delta^{24(28)}$ en la cadena secundaria), así como la posición y grados de alquilación en la cadena secundaria, presencia de un grupo hidroxilo y diferencias estereoquímicas del grupo alquilo en C-24. Este tipo de compuestos están conformados en su mayoría por esteroides de $C_{27} - C_{30}$ en las microalgas. Los esteroides aislados e identificados en este estudio corresponden a compuestos con estructuras químicas de $C_{27}\Delta^4\Delta^6$, $C_{28}\Delta^7\Delta^{22}$, $C_{29}\Delta^5$, $C_{29}\Delta^4\Delta^{22}$ y $C_{29}\Delta^7\Delta^{22}$ (Tabla 11) con características similares a los identificados y aislados en microalgas y cianobacterias por investigadores como Volkman en 1986, quien identificó a los esteroides de 27 ($C_{27}\Delta^5$) y 28 átomos de carbono como los más

comunes, así como también esteroides de 29 ($C_{29}\Delta^5$) átomos de carbono, que usualmente son encontrados en plantas, pero que han sido aislados en algunas especies de microalgas, congruente a lo reportado a la especie *M. aeruginosa* en este estudio.

En este estudio se lograron aislar e identificar seis esteroides Estigmasterol (**23**), 7,22-ergostadienona (**24**), β -sitosterol (**25**), Cholesta-4,6-dien-3-ona (**26**) y 4,22-stigmastadien-3-ona (**27**), lo que puede ser comparado con los compuestos reportados por Khalid y colaboradores en 2010, quienes aislaron tres tipos de esteroides de extractos metanólicos, siendo estos, Colesterol, Estigmasterol y β -sitosterol, además de dos diterpenos *cis*-fitol (**22**) y *trans*-fitol (**19**), compuestos aislados también de extractos metanólicos en este estudio. Resultados similares fueron obtenidos por Aftab y Shameel en 2006, en especies colectadas en ambientes estuarinos, además, se lograron aislar e identificar isómeros de diterpenos como el dihidrofitol e isofitol. Siendo este último aislado por primera vez de la cianobacteria *Spirulina platensis* (Ozdemir *et. al.* 2004). Respecto al tiempo de retención reportado en la identificación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas Pinkart y colaboradores 1998, identificaron los compuestos *trans*-fitol e isofitol (**21**) entre los 18 y 20 min, que se corrobora con lo reportado por Ozdemir y colaboradores (2004), quienes también reportaron este tipo de compuestos en tiempos de retención entre los 18 y 20 min. El tiempo de retención de este tipo de compuestos puede ser comparado con los resultados obtenidos en este estudio ya que se identificaron en tiempos de retención entre los 20 y 21 minutos.

M. aeruginosa puede presentarse en diferentes ambientes, conteniendo los mismos metabolitos y productos secundarios. Sin embargo, el contenido de β -sitosterol es interesante, ya que este tipo de compuesto es un precursor capaz de inhibir el crecimiento de la colonia de *M. aeruginosa* en conjunto con el compuesto dicitohexanil arizane (Park *et. al.*, 2008), Summons y colaboradores (2001) mencionan, que, a pesar del aislamiento e identificación de esteroides en cianobacterias, existe la posibilidad de la presencia de este tipo de compuestos debido a la contaminación, por otro tipo de organismos como levaduras, hongos e incluso otras especies de microalgas.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES

1. La influencia de los factores fisicoquímicos en la producción de metabolitos tanto primarios como secundarios se encuentran fuertemente asociados, no obstante, la obtención, aislamiento, e identificación de metabolitos en condiciones de cultivo en especies de cianobacterias y por ende en *M. aeruginosa* ofrece resultados comparables con especies en vida silvestre, así como cepas en cultivo realizados en diferentes laboratorios en el mundo.
2. La especie *M. aeruginosa*, presenta características idóneas para la producción de ácidos grasos esenciales (ácido linoleico y γ -linoleico) utilizados en la nutrición, así como mejor eficiencia en la producción de lípidos empleados como biocombustible, como en la producción de ácidos grasos de ésteres metílicos de cadenas largas (C18, C19 y C:20).
3. La distribución de ácidos grasos en *M. aeruginosa* se encuentra asociada a ácidos grasos insaturados, siendo C16:1 y C18:1 los compuestos con mayor abundancia.
4. Los esteroides aislados en *M. aeruginosa* corresponden a estructuras de 27, 28 y 29 átomos de carbono, además es común encontrar compuestos como colesterol y β -sitosterol, esteroides normalmente encontrados en animales y plantas respectivamente, corroborando de esta manera que las cianobacterias son de los primeros organismos en habitar la tierra.
5. *M. aeruginosa* es una especie que puede ser empleada en la producción de agentes antibacteriales y antimicóticos ya que contienen los diterpenos identificados como *trans* y *cis*-fitol así como isofitol

PERSPECTIVAS

La importancia de este tipo de estudios en microalgas y cianobacterias, debe ser ampliado ya que este tipo de microorganismos poseen metabolitos secundarios con estructuras interesantes que podrían ser utilizados en la industria, que por otro lado se ve afectada por la baja concentración de estos metabolitos en las cianobacterias. Es por esto que el estudio en la producción de metabolitos primarios y/o secundarios debería ampliarse hacia la identificación de las posibles rutas genéticas que promuevan o no la producción de un metabolito debido al cambio físico, químico o biológico, permitiendo así que se identifique genéticamente los factores que promuevan la producción del metabolito identificado por técnicas de cromatografía y espectroscopia.

Referencias.

1. Aftab, J. y M. Shameel. 2006. Phytochemistry and bioactivity of *Microcystis aeruginosa* (Chroocophyceae Shameel) from Miani Hor, Pakistan. *International Journal of Phycochemistry*. 2: 137-148.
2. Ainsle, R. D., Moore, R. E. y G. M. L. Patterson. 1986. (S)-()-3,4-Dihydroxybutanoic acid g-lactone from Puerto Rican *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry*. 25: 2654-2655.
3. Alva, A. 1999. Memorias de Primera Reunión de Cuerpos de Agua Artificiales del Gobierno del Distrito Federal. Patronato del Parque Ecológico Xochimilco A.C., México, D. F. 9 de septiembre de 1999.
4. Alva-Martínez, A. F., Sarma, S. S. S., y S. Nandini. 2007. Effect of mixed diets (cyanobacteria and green algae) on the population growth of the cladocerans *Ceriodaphnia dubia* and *Moina macrocopa*. *Aquatic Ecology*. 41:579–585
5. Arzate, M. A. 2008. Detección de cianobacterias toxigénicas pertenecientes al género *Microcystis* mediante marcadores moleculares y ensayos biológicos. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. pp. 69.
6. Atsumi, S., Higashide, W. y J. C. Liao. 2009. Direct photosynthetic recycling of carbon dioxide to isobuteraldehyde. *Nature Biotechnology*. 27: 1177-1180.
7. Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A. y F. Thigstad. 1983. The ecological Role of Water-column microbes in the Sea. *Marine Ecology progress series*. 10: 257-263.

8. Azevedo, S. M. F. O., Carmichael, W. W., Jochimsen, E. M., Rinehart, K. L., Lau, S., Shaw, G. R., y G. L. Eaglesham. 2002. Human Intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Cararu-Brazil. *Toxicology*, 181-182. 27: 441-446.
9. Balaji-Prasath, B., Nandakumar, R., Jayalakshmi, T. y P. Santhanam. First report on the intense cyanobacteria *Microcystis aeruginosa* Kützing, 1846 bloom at Muttukkadu Backwater, Southeast coast of India. 2014. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. 43 (2): 258-262.
10. Ballantine, J. A., Lavis, A. y R. J. Morris. 1979. Sterols of the phytoplankton-effects of illumination and growth stage. *Phytochemistry* 18: 1459-1466.
11. Ballot, A., Krientz, L., Kotut, K., Wiegand, C. y S. Pflugmacher. 2005. Cyanobacteria, and cyanobacterial toxins in the alkaline crater lakes Sonachi and Simbi, Kenya. *Harmful Algae*. 4: 139-150.
12. Banker, R., Carmeli, S., Hadas, O., Teltsch, B., Porat, R. y A. Sukenik. 1997. Identification of cylindrospermopsin in *Aphanizomenon ovalisporum* (cyanophyceae) isolated from lake Kinneret, Israel. *Journal of Phycology*. 33: 613-616.
13. Banker, R., Carmeli, S., Werman, M., Teltsh, B., Porat, R. y A. Sukenik. 2001. Uracil moiety is required for toxicity of the cyanobacterial hepatotoxin cylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health*.
14. Barreno, E. y S. Pérez-Ortega. 2003. 9 Clasificación de los Géneros. Consejería de Meio ambiente, Ordenación del Territorio e Infraestructura del Principado de Asturias y KRK Ediciones. pp. 134-429.

15. Barreiro-Gümes, M. T. y M. Signoret-Poillon. 1999. Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Sección de Producción Editorial. México. pp. 7-20.
16. Bernard, C., Harvey, M., Briand, J. F., Bire, R., Krys, S. y J. J. Fontaine. 2003. Toxicological comparison of diverse *Cylindrospermopsis raciborskii* strains: evidence of liver damage caused by a French *C. raciborskii* strain. *Environmental Toxicology*. 18: 176-186.
17. Berman, F. W., Gerwick, W. H. y T. F. Murray. 1999. Antillatoxin and kalkitoxin, ichthyotoxins from the tropical cyanobacterium *Lyngbya majuscula*, induce distinct temporal patterns of NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Toxicon*. 37: 1645-1648.
18. Berry, J. P., Gantar, M., Pérez, M. H., Berry, G. y F. G. Noriega. 2008. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. *Marine Drugs*. 6: 117-146.
19. Beutler, J. A., Alvarado, A. B., Schaufelberger, D. E., Andrews, P y T. G. McCloud. 1990. Dereplication of phorbol bioactivities: *Lyngbya majuscula* and *Croton cuneatus*. *Journal of Natural Products*. 53: 867-874.
20. Burja, A. M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Burgess, J. G., y P. C. Wright. 2001. Marine cyanobacteria-a prolific source of natural products. *Tetrahedron*. 57: 9347-9377.
21. Burja, A. M., Abou-Mansour, E., Banaigs, B., Payri, C., Burgess, J. G. y P. C. Wright. 2002. Culture of marine cyanobacterium, *Lyngbya majuscula* (Oscillatoriaceae), for bioprocess intensified production of cyclic and linear lipopeptides. *Journal of Microbiological Methods*. 48: 207-219.

22. Briand, J. F., Jacquet, S., Bernand, C., y J. F. Humbert. 2003. Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems. *Veterinary Research* 34: 361-377.
23. Briggs, J. C. 1994. Species diversity: Land and Sea. *Systematic Biology*. 43: 130-135.
24. Brittain, S. M., Wang, J., Babcock-Jackson, L., Wayne, W., Carmichael, W. W., Rinehart, K. L. y D. A. Culver. 2000. Isolation and characterization of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins from Lake Erie strain of *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Great Lakes Research*. 26(6). 241.249.
25. Bryant, D.A. (ed.) 1994. The molecular biology of cyanobacteria. *Kluwer Academic Publishers. Dordrecht*. pp. 879.
26. Buchanan, M. R., Brister, S. J. y F. A. Ofofu. 1995. Thrombin: Its key role in Thromogenesis: Implications for its Inhibition Clinically. CRC Press: Boca Raton, FL.
27. Cannell, R. J. P., Kellam, S. J., Owsianka, A. M., y J. M. Walker. 1988. Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Medica*. 54: 10-14.
28. Carmichael, W. W., Mahmood., N. A. y E. G. Hyde. 1978. Pharmacology of anatoxin-a, produced by the freshwater cyanophyte *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. *Toxicon*. 17: 229-236.
29. Carmichael, W. W. 1986. Algal toxins. En: Callow, J. A. (ed). Advances in Botanical Research. *London Academic Press*. pp. 47-101.

30. Carmichael, W. W. 1988a. Freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. En: Ownby, C. L. y G. V. Odell. (eds). *Natural Toxins: Characterization, Pharmacology and Therapeutics*. London: Pergamon Press. pp. 3-16.
31. Carmichael, W. W. 1988b. Toxins of freshwater algae. En: Tu, A. T. (ed). *Handbook of Natural Toxins*. New York: Marcel Dekker. pp. 121-147.
32. Carmichael, W. W., Mahmood, N. A., y E. G. Hyde. 1990. Natural toxins from cyanobacteria (blue-green) algae. En: Hall, S., y G. Strichartz. *Marine Toxins: Origin, Structure, and Molecular Pharmacology*, Washington, DC: American Chemical Society. pp. 87-106.
33. Carmichael, W. W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*. 72: 445-459.
34. Carmichael, W.W. 1997. The cyanotoxins. En: Callow, J.A. (ed), *Advances in Botanical Research*, 27. Academic Press, London, pp. 211–256.
35. Castillo-Morales. G. 2004. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de calidad de aguas. Estandarización, Intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. IMTA. pp. 189.
36. Chang, Z., Sitachitta, N., Rossi, J. V., Roberts, M. A., Flatt, P. M., Junyong, J., Sherman, D. H. y W. H. Gerwick. 2004. Biosynthetic pathway and gene cluster analysis of Curacin A, an antitubulin Natural product from tropical marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*. 67: 1356-1367.
37. Choi, S. H. y S. G. Kim. 1998. Lipopolisaccharide inhibition of rat hepatic microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase gene expression

- irrespective of nuclear factor-kB activation. *Biochemical Pharmacology*. 56: 1427-1436.
38. Claeyssens, S., Francois, A., Chedeville, A. y A. Lavoine. 1995. Microcystin-LR induced an inhibition of protein synthesis in isolated rat hepatocytes. *Biochemical Journal*. 306: 693-696.
39. Codd, G. A., y G. K. Poon. 1988. Cyanobacteria toxins. En: Rogers, L. J. y J. G. Gallon. (eds). *Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria*. Oxford: *Oxford Science Publishers*. pp. 283-296.
40. Codd, G. A., Ward, C. J., Beattie K. A. y S. G. Bell. 1999. Widening perceptions of the occurrence and significance of cyanobacterial toxins. En: Peschek, G. A., Löfflerhardt W. y G. Schmettner (eds). *The phototrophic prokaryotes*. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*. New York. pp. 623-632.
41. Codd, G. A., Lindsay, J., Young, F. M.; Morrison, L. F. y J. S. Metcalf. 2005a. Harmful Cyanobacteria: From Mass Mortalities to Management Measures. En: Huisman, J., Matthijs, H. C. P. y P. M, Visser. (Eds). *Harmful Cyanobacteria*. Springer: Dordrecht, The Netherlands. pp. 1-24.
42. Codd, G. A.; Morrison, L. F. y J. S. Metcalf. Cyanobacterial Toxins: Risk Management for Health Protection. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005b. 203: 264-272.
43. Cojocar, M., Shlosberg, M., Dubinsky, Z. y A. Finkel. 1988. Gas chromatographic/Mass Spectrometry analysis of fatty acids found in aquatic algae. *Biomedical & Environmental Mass Spectrometry*. 16: 477-480.

44. Corbett, T. H., Valeriote, F. A., Polin, L., Panchapor, C., Pugh, S., White, K., Lowichik, N., Knight, J., Bissery, M. C., Wozniak, A., Mer, K., Esenmacher, S., Lisow, L., Mattes, K. C., Cavanaugh, P. F., Rake, J. B. y L. Baker. 1992. Discovery and development anticancer agents. En: Valeriote, F. A., Corbett, T. H. y L. H. Baker. (Eds). Cytotoxic anticancer drugs: Models and concepts for drug discovery and development. Kluwer Academic Publishers, Nonvell. pp. 35-87.
45. Costa, J. A. V. y M. G. Morais. 2011. The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource technology*. 102 (1): 2-9
46. Crispin, C. A. y C. C. Gaylarde. 2004. Cyanobacteria and biodeterioration of cultural heritage: a review. *Microbial Ecology*. 48: 1-10.
47. Da Rós, P. C. M., Silva, C. S. P., Silva-Stenico, M. E., Fiore, M. F. y H. F. de Castro. 2012. *Microcystis aeruginosa* lipids as feedstock for biodiesel synthesis by enzymatic route. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 84: 177-182.
48. Da Rós, P. C. M., Silva, C. S. P., Silva-Stenico, M. E., Fiore, M. F. y H. F. De Castro. 2013. Assessment of chemical and physico-chemical properties of cyanobacterial lipids for biodiesel production. *Marine Drugs*. 11: 2365-2381.
49. Dawson, R. M. 1998. The toxicology of microcystins. *Toxicon*. 36: 953-962
50. De León, L. 2002. Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: causas y consecuencias. En: Domínguez, A. y R. G. Prieto (eds). Perfil Ambiental del Uruguay 2002. Nordan-comunidad, Montevideo. pp. 28-37.
51. Demirbas, A. y M. F. Demirbas. 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Conversion and Management*. 52: 163-170.

52. Deng, M. D. y J. R. Coleman. 1999. Ethanol synthesis by genetic engineering cyanobacteria. *Applied Environmental Microbiology*. 65: 523-528.
53. De Souza, N. J. y W. R. Nes. 1968. Sterols: isolation from a blue-green alga. *Science*. 162: 363.
54. Demott, W. R., Zhang, Q. X., y Carmichael, W. W. 1991. Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of Daphnia. *Limnology and Oceanography*. 36: 1346-1357.
55. Dittmann, E., Neilan, B. A., Erhard, M., Von Döhren, H. y T. Börner. 1997. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for heptatoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Molecular Microbiology*. 26: 779-787.
56. Dittmann, E. y C. Wiegand. 2006. Cyanobacterial toxins- occurrence, biosynthesis and impact in human affairs. *Molecular Nutrition Food Research*. 50: 7-17.
57. Douglas, S. E. 1994. Chloroplast origin and evolution. En. Bryant, D. A. (ed) *The molecular biology of cyanobacteria*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. pp. 91-118.
58. Edwards, C., Beattie, K. A., Scrimgeour, C. M. y G. A. Codd. 1992. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon*. 30: 1165-1175.
59. Edwards, D. J., Marquez, B. L., Nogle, L. M., McPhail, K., Goeger, D. E. y M. A. Roberts. 2004. Structure and biosynthesis of the jamaicamides, new mixed

polyketide-peptide neurotoxins from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Chemical Biology*. 11: 817-833.

60. Elkobi-peer, S., Faigenbaun, R. y S. 2012. Carmeli. Bromine- and chlorine-containing aeruginosins from *Microcystis aeruginosa* Bloom Material Collected in Kibbutz Geva, Israel. *Journal of Natural Products*. 75: 2144-2151.
61. Eriksson, J. E., Meriluoto, J. A. O., Kujari, H. P., Osterlund, K., Fagerlund, K. y L. Hallbom. 1988. Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. *Toxicon*. 26: 161-166.
62. Fábregas, J., Aran, J., Morales, E. D., Lamela, T. y A. Otero. 1997. Modification of sterol concentration in marine microalgae. *Phytochemistry*. 46: 1189-1191.
63. Ferreira-Rosini, E., Sant'Anna, C. L. y A. Tucci. 2013. Cyanobacteria from fishing ponds in the Metropolitan region of São Paulo, Brasil. *Rodriguésia*. 64(2): 399-417.
64. Fiksdahl, A., Foss, P., Liaaen-Jensen, S. y H. W. Siegelman. 1983. Carotenoids of blue-green algae. 11. Carotenoids of chromatically-adaptated cyanobacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*. 76: 599-601.
65. Fristachi, A. y J. L. Sinclair. 2008. Occurrence of Cyanobacterial Harmful Algal Blooms Workgroup Report. En: Hudnell, H. K. (ed). *Cyanobacterial harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*. Springer Science + Business Media: New York. pp. 45-104.

66. Flores, E. y C. P. Wolk. 1986. Production, by filamentous, nitrogen-fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and other antibiotics that kill related strains. *Archives of Microbiology*. 145: 215-219.
67. Froscio, S. M., Humpage, A. R., Burcham, P. C. y I. R. Falconer. 2003. Cylindrospermopsin-induced protein synthesis inhibition and its dissociation from acute toxicity in mouse hepatocytes. *Environmental Toxicology*. 18: 243-251.
68. Fu, X., Do. T., Schmidt F. J., Andrushevich, V. y M. H. Engel. 1998. New cyclic peptides from the Ascidian *Lissoclimun patella*. *Journal of Natural Products*. 61: 1547-1551.
69. Fujii, K., Sivonen, K., Adachi, K., Noguchi, K., Shimizu, Y., Sano, H., Hirayama, K., Suzuki, M. y K. I. Harada. 1997a. Comparative study of toxic and non-toxic cyanobacterial products: a novel glycoside, suomilide, from non-toxic *Nodularia spumigena* HKVV. *Tetrahedron Letters*. 38: 5529-5532.
70. Fujii, K., Sivonen, K., Adachi, K., Noguchi, K., Sano, H., Hirayama, K., Suzuki, M. y K. I. Harada. 1997b. Comparative study of toxic and non-toxic cyanobacterial products: novel peptides from toxic *Nodularia spumigena* AV1. *Tetrahedron Letters*. 38: 5525-5528.
71. Fujiki, H., Suganuma, M., Nakayasu, M., Hoshino H., Moore, R. E. y T. Sugimura. 1982. The third class of new tumor promoters, polyacetates (debromoaplysiatoxin and aplysiatoxin), can differentiate biological actions relevant to tumor promoters. *GANN Japanese Journal of Cancer Research*. 73: 497-499.
72. Gademann, K., y C. Portmann. 2008. Secondary Metabolites From Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities. *Current Organic Chemistry*. 12: 326-341.

73. Garozzo, D., Impallomeni, G., Spina, E. y L. Sturiale. 1998. The Structure of the exocellular polysaccharide from the cyanobacterium *Cyanospira capsulate*. *Carbohydrates Research*. 307: 113-124.
74. Geitler, L. 1932. *Cyanophyceae*. En: L. Rabenhorst, L. (ed). *Kryotigramenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz*. 14: 130-148 Akademische Verlagsgesellschaft.
75. Gerwick, W. H., Mrozek, C., Moghaddam, M. F. y S. K. Agarwal. 1989. Novel cytotoxic peptides from the tropical marine cyanobacterium *Hormothamnion etheromorphoides*. 1. Discovery, isolation and initial chemical and biological characterization of the hormothamnins from wild and cultured material. *Experientia*. 45: 115-121.
76. Gerwick, W. H., Proteau, P. J., y D. G. Nagle. 1994. Compound Exhibiting Antiproliferative Activity Against Cells. US Patent number 5,324,739, Oregon State University, United States of America.
77. Gerwick, W. H., Tan, L. y N. Sitachitta. 2001. The alkaloids. Academic Press. San Diego. 57: 75-184.
78. Gesner-Apter, S. y S. Carmeli. 2009. Protease Inhibitors from a water Bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Natural Products*. 72: 1429-1436.
79. Gokulan, K., Khare, S., y C. Cerniglia. 2014. Production of secondary metabolites of Bacteria. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2: 561-569 National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration Jefferson, AR, USA.

80. Graham, L. y L. Wilcox. 2000. *Algae*. Prentice Hall. Press. New Jersey 16: 42-43.
81. Gugger, M., Lyra, C., Suominen, I., Tsitko, I., Humbert, J. F., Salkinija-Salonen, M. S. y K. Sivonen. 2002. Cellular fatty acids as chemotactants. *Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*. 52: 1007-1015.
82. Gulavita, N., Hori, A., Shimizu, Y., Lazlo, P. y J. Clardy. 1988. Aphanorphine, a novel tricyclic alkaloid from blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. *Tetrahedron Letters*. 29: 4381-4384.
83. Gullledge, B. M., Aggen, J. B., Huang H. B., Nairn, A. C. y A. R. Chamberlin. 2002. The microcystins and nodularins: cyclic polypeptide inhibitors of PP1 and PP2A. *Current Medicinal Chemistry*. 9:1991-2003.
84. Gunstone, F. D., Harwood, J. L. y A. J. Dijkstra. 2007. *The lipid handbook*. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton, pp 791.
85. Hallegraeff, G. M., Nichols, P. D., Volkman, J. K., Blackburn, S. I. y D. A. Everitt. 1991. Pigments, fatty acids and sterols of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Journal of Phycology*. 27: 591-599.
86. Harada, K. I., Ohtani, I., Iwamoto, K., Suzuki, M., Watanabe, M. F. y M. Watanabe. 1994., Isolation of cylindrospermopsin from a cyanobacterium *Umezakia natans* and its screening method. *Toxicon*. 32: 73-84.
87. Hayakawa, K. y K. Kohoma. 1995. Reversible effects of okadaic acid and microcystin-LR on the ATP-dependent interaction between actin and myosin. *Journal of Biochemistry*. 117: 509-514.

88. Heavens, K., James, R. T., East, T. L. y V. H. Smith. 2003. N:P ratios, light limitation, and cyanobacterial dominance in subtropical lake impacted by non-point source nutrient pollution. *Environmental Pollution*. 122, 379-390.
89. Hewett, J. A. y R. A. Roth. 1993. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharides. *Pharmacology Reviews*. 45: 381-411.
90. Honkanen, R. E., Zwiller, J., Moore, R. E., Daily, S. L., Khatra, B. S., Dukelow, M. y A. L. Boynton. 1990. Characterization of Microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *The Journal of Biological Chemistry*. 265 (32): 19401-19404.
91. Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T. y S. T. Williams. 1994. Group 11. Oxygenic phototrophic bacteria. En: Hensyl, W. R. (ed). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Novena Edición. pp. 377-425. Baltimore: Williams & Wilkins.
92. Huang, G. H., Chen, F., Wei, D., Zhang, X. W. y G. Chen. 2010. Biodiesel production by microalgal biotechnology. *Applied Energy*. 87: 38-46.
93. Humpage, A. R., Rositano, J., Breitag, A. H., Brown, R., Baler, P. D. y W. C. Nicholson 1994. Bioactivities of nostocine A produced by freshwater cyanobacterium *Nostoc spongiaforme* TISTR8169. *Journal of the Bioscience and Bioengineering*. 95: 512-517.
94. Humpage, A. R., Fenech, M., Thomas, P. y I. R. Falconer. 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human White cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutant Research/Genetic Toxicology and Enviromental Mutagenesis*. 472:155-161.

95. Ikawa, M., Sasner, J. J., Haney, J. F. y Foxall, T. L. 1995. Pterins of the cyanobacterium *Aphanizomenon flos-aquae*. *Phytochemistry*. 38: 1229-1232.
96. Isaacs, J. D. 2011. Chemical investigations of the Metabolites of two strains of toxic Cyanobacteria. Tesis de Maestria. Department of Chemistry and Biochemistry. University of North Carolina Wilmington.
97. Ito, E. y H. Nagai. 2000. Bleeding from the small intestine caused by aplysiatoxin, the causative agent of the red alga *Gracilaria cronopifolia* poisoning. *Toxicon*. 38: 123-132.
98. Jones, G. J., Nichols, P. D. y P. M. Shaw. 1994. Analysis of microbial sterols and hopanoids. En: Goodfellow M. O'Donnell A G. (eds) Chemical methods in prokaryotic systematics. Wiley, Chichester. pp 163-195.
99. Jung, J. H., Moor, R. E. y G. M. L. Patterson. 1991. Scytophycins from a blue-green alga belonging to the *Nostocaceae*. *Phytochemistry*. 30: 3615-3616.
100. Juttner, F. y H. P. Wessel. 2003. Isolation of di(hydroxymethyl)dihydroxypyrroline from the cyanobacterial genus *Cylindrospermum* that effectively inhibits digestive glucosidases of aquatic insects and crustacean grazers. *Journal of Phycology*. 39: 26-32.
101. Kaebnick, M. y B. A. Neilan. 2001. Ecological and molecular investigations of cyanotoxin production. *FEMS Microbiology, Ecology*. 35: 1-9.
102. Karatay, S. E. y G. Dönmez. 2011. Microbial oil production from thermophile cyanobacteria for biodiesel production. *Applied Energy*. 88 (11): 3632-3635.

103. Kardinaal, W. E. A. y P. M. Visser. 2005. Dynamics of the cyanobacterial toxins. Sources of variability in microdystin concentrations. En: Huisman, I., Matthijs, H. C. P. y P. M. Visser (eds). Harmful Cyanobacteria. Dordrecht, The Netherlands: Springer. pp. 41-63.
104. Kashiwagi, M., Mynderse, J. S., Moore, R. E. y T. R. Norton. 1980. Antineoplastic evaluation of Pacific basin marine algae. *Journal of Pharmacological Science*. 69: 735-738.
105. Kenyon, C. N., Rippka, R. y R. Y. Stanier. 1972. Fatty acid composition and physiological properties of some filamentous blue-green algae. *Archives of Microbiology*. 83: 216-236.
106. Khalid, M. N., Shameel, M., Ahmad, V. U., Shahzad, S. y S. M. Leghari. 2010. Studies on the bioactivity and phycochemistry of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophycota) from Sindh. *Pakistan Journal of Botany*. 42(4): 2635-2646.
107. Koehn, F. E. y G. T. Carter. 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 4: 206-220.
108. Komárek, J. 1991. A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. *Archives of Hydrobiology Supplement Algological Studies*. 64: 115-127.
109. Komárek, J. y K. Anagnostidis. 1998. Band 19-Cyanoprokaryota. 1. Teil Chroococcales. En: Ettl, H., Gärtner, G., Heynig, H., y D. Mollenhauer (eds). Chroococcales. In *Süßwasserflora von Mittel-europa*. pp. 225-236. Jena: Gustav Fischer Verlag.

110. Kuiper-Goodman, T., I. Falconer. y J. Fitzgerald, 1999. Human Health Aspects. Chapter 4, pp. 112-153. En: Chorus, I. y Bartram, J. (eds). Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to Their Public Health Consequences, Monitoring, and Management London and New York. E&FN Spon, 416 pp.
111. Kruger, G. H. J., Wet, H. D., Kock, J. L. F. y A. J. H. Pieterse. 1995. Fatty acid composition as taxonomic characteristic for *Microcystis* and other coccoid cyanobacteria (blue-green alga) isolates. *Hydrobiologia*. 308: 145-151.
112. Kumari. P., Kumar. M., Reddy. C. R. K. y B. Jha. 2013 Algal Lipids, fatty acids and sterols. Capitulo 3. En: Dominguez H. Woodhead (Ed) Functional from algae for foods and nutraceuticals. Primera edición. Publishing Ltd. pp. 87-137.
113. Jurczak, T., Tarcynska, M., Karlsson, K. y J. Meriluoto. 2004. Characterization and diversity of cyanobacterial hepatotoxins (microcystins) in blooms from polish freshwaters indentified by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *Chromatographia*. 59: 571-578.
114. Lanaras, T. y C. M. Cook. 1994. Toxin extraction from an *Anabaenopsis milleri* – dominated Bloom. *Science of Total Environment*. 142: 163-169.
115. Lan, E. I. y J. C. Liao. 2012. ATP drives direct photosynthetic production of 1-butanol in cyanobacteria *Proceedings of the National Academy of Science*. 109: 6018-6023.
116. Lankoff, A., Krzowski, L., Glab, J. y A. Banasik. 2004. DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. *Mutation Research*. 559: 132-142.

117. Llewellyn, L. E. 1997. Haemolymph protein in xanthid carbs: its selective binding of saxitoxin and possible role in toxin bioaccumulation. *Marine Biology*. 128: 599-606.
118. Levin, E. Y. y K. Bloch. 1964. Absence of sterols in blue-green algae. *Nature*. 22: 90-91.
119. Li, R. H y M. M. Watanabe. 2001. Fatty acid profiles and their chemotaxonomy in planktonic species of *Anabaena* (cyanobacteria) with straight trichomes. *Photochemistry*. 57: 727-731.
120. Li, R. H., Carmichael, W. W., Brittain, S., Eaglexham, G. K., Shaw, G. R., Liu, Y. D. y M. M. Watanabe. 2001. First report of the cyanotoxins cylindrospermopsin and deoxycylindrospermopsin from *Raphidiopsis curvata* (cyanobacteria). *Journal of Phycology*. 37: 1121-1126.
121. Li, X. Y., Wang, J., Liang, J. B. y Y. D. Liu. 2007. Toxicity od microcystins in the isolated hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 67:447-451.
122. Lifshits, M. y S. Carmeli. 2012. Metabolites of *Microcystis aeruginosa* Bloom Material from Lake Kinneret, Israel. *Journal of Natural Products*. 75: 209-219.
123. Lindberg, P., Park, S. y A. Melis. 2010. Engineering a platform for photosynthetic isoprene production in cyanobacteria, using *Synechocystis* as the model organism. *Metabolic Engineering*. 12: 70-79.

124. Liu, X., Sheng, J. y R. Curtiss III. 2011. Fatty acid production in genetically modified cyanobacteria. *Proceeding of the National Academy of Science*. 108: 6899-6904.
125. Lobner, D., Piana, P. M. T., Salous, A. K. y R. W. Peoples. 2007. β -N-methylamino-L-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanism. *Neurobiology of Disease*. 25: 360-366.
126. Lodin-Friedman, A. y S. Carmeli. 2013. Metabolites from *Microcystis aeruginosa* Bloom Material Collected at a Water Reservoir near Kibbutz Hafetz Haim, Israel. *Journal of Natural Products*. 76: 1196-1200.
127. LoRusso, P., Wozniak, A. J., Polin, L., Capps, D. E., Leopold, W.R., Werbel, L. M., Biernat, L., Dan, M. E. y T. H. Corbet. 1990. Antitumor efficacy of interleukin-2 alone and in combination with Adriamycin and Dacarbazine in murine solid tumor systems. *Cancer Research*. 50: 5876-5882.
128. Machado, I. y S. Atsumi. 2012. Cyanobacterial biofuel production. *Journal of Biothechnology*. 162: 50-56.
129. Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V. y Clark. D. P. 2009. BROCK Biología de los microorganismos. Editorial Pearson Education, S. A. pp. 812-839.
130. Mansell, H. L. 1996. Synthetic approaches to anatoxin-a. *Tetrahedron*. 52:6025-6061.
131. MarinLit. 2001. Natural Product Bibliography Software (update January 2001); University of Canterbury: Christ-church, New Zeland.

132. Marquez, B., Verdier-pinard, P., Hamel, E. y W. H. Gerwick. 1998. Curacin D, an antimitotic agent from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry*. 49 (8): 2387 – 2389.
133. Margulis, L. y K. V. Schwartz. 1999. Five Kingdoms. W. H. Freeman and Company. New York.
134. Mason, C. P., Edwards, K. R., Carlson, R. E., Pignatello, J., Gleason, F. K. y J. M. Wood. 1982. Isolation of chlorine containing antibiotic from the freshwater cyanobacterium *Scytinema hofmanni*. *Science*. 215: 400-402.
135. Martin, C., Codd, G. A., Siegelman, H. W. y J. Weckesser. 1989. Lipopolysaccharides and polysaccharides of the cell envelope of toxic *Microcystis aeruginosa* strains. *Archives of Microbiology*. 152; 90-94.
136. Matsunaga, S., Moore, R. E., Niemczura, W. P. y W. W. Carmichael. 1989. Anatoxin-a(s), a potent anticholinesterase from *Anabaena flosaquae*. *Journal of the American Chemistry Society*. 111: 8021-8023.
137. Moore, B. S., Chen, J. L., Patterson, G. M. L. y R. E. Moore. 1992. Structures of cylindrocyclophanes A-F. *Tetrahedron*. 48: 3001-3006.
138. Moore, R. E. y G. Bartolini. 1981. Structure of Palytoxin. *Journal of the American Chemical Society*. 103: 2491-2494.
139. Moore, R. E., Patterson, G. M. L. y W. W. Carmichael. 1988. New Pharmaceuticals from Cultured Blue-Green Algae. Biomedical Importance of Marine Organisms - Memories of the Californian Academy of Science; Fautin, D. G. (Ed). Californian Academy of Science: San Francisco, CA. 13: 143-150.

140. Moore, R. E. 1996. Cyclic peptides and depsipeptides from cyanobacteria: a review. *Journal of Industrial Microbiology*. 16: 134-143.
141. Msagati, T. A. M., Siame, B. A. y D. D. Shushu. 2006. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquatic Toxicology*. 78: 382-397.
142. Mundt, S., Kreitlow, S., Nowotny, A. y U. Effmert. 2001. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 203: 327-334.
143. Mur, L. R., Skulbert, O. M. y H. Utkilen. 1999. Cyanobacteria in the environment. En: Chorus I. y Bartram J. (eds) *Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public Health consequences, monitoring and management*. London, E y F. N. Spon. pp. 15-40.
144. Murphy, J., Crompton, C. M., Haney, S., Codd, G. A. y C. J. Hutchison. 1995. The role of protein phosphorylation in the assembly of replication competent nucleus: investigation in *Xenopus* egg extracts using the cyanobacterial toxin microcystin-LR. *Journal of Cell Science*. 108: 235-244.
145. Mynderse, J. S., Moore, R. E., Kashiwagi, M. y T. R., Norton. 1977. Antileukemia activity in the *Osillatoriaceae*: isolation of debromoaplysiatoxin from *Lyngbya*. *Science*. 196: 538-540.
146. Nagle, D. G., Park, P. U. Y V. J. Paul. 1996. Ypaoamide, a new broadly acting feeding deterrent from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Tetrahedron*. 37: 6263-6266.

147. Namikoshi, M., Carmichael, W. W. Sakai, R., Jares-Erijman, E. A., Kaup, A. M. y K. L. Rinehart. 1993 .9-Deazaadenosine and its 5V-a-Dglucopyranoside isolated from the cyanobacterium *Anabaena affinis* strain VS-1. *Journal of the American Chemistry Society*. 115: 2504-2505.
148. Namikoshi, M. y K. L. Rinehart. 1996. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. *Journal of Industrial Microbiology*. 17: 373-384.
149. Norris, R. L., Eaglesham, G. K., Pierens, G., Shaw, G. R., Smith, M. J., Chiswell, R. K., Seawright, A. A. y M. R. Moore. 1999. Deoxycylindrospermopsin, an analog of cylindrospermopsin from *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Environmental toxicology*. 14: 163-165.
150. Nozzi, N. E., Oliver, J. W. K. y S. Atsumi. 2013. Cyanobacteria as a platform for biofuel production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 1: 1-7.
151. Neumann, C., Bain, P., y G. Shaw. 2007. Studies of the comparative *in vitro* toxicology of the cyanobacterial metabolite deoxycylindrospermopsin. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 70:1679-1686.
152. O'Neil, J. M., Shaw, G. R. y W. C. Dennison. 2000. Blooms of the toxic Cyanobacterium *Lyngbya Majuscula* in coastal Queensland Waters. Ninth International Conference on Harmful Algal Blooms, Tasmansia Australia.
153. Ohta, T., Nishiwaki, R., Yatsunami, J., Komori, A., Suganuma, M. y H. Fujiki. 1992. Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis*. 13: 2443-2447.

154. Orjala, J y W. H. Gerwick. 1996. Barbamide, a chlorinated metabolite with molluscicidal activity from the Caribbean cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*. 59: 427-430.
155. Oudra, B., Loudiki, M., Sbiyaa, B., Martins, R., Vasconcelos, V. y N. Namikoshi. 2001. Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominated Bloom of Lalla Takerkoust lake – reservoir (Morocco). *Toxicon*. 39: 1375-1381.
156. Ozdemir, G., Karabay, N. U., Dalay, M. C. y B. Pazarbasi. 2004. Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. *Phytotherapy Research*. 18: 754.
157. Packer, L. y A. M. Glazer. 1988. Methods in Enzymology. Cyanobacteria. 67. San Diego: *Academic Press*.
158. Park, H. D., Watanabe, M. F., Harada, K. I., Nagai, H., Suzuki, M. y M. Watanabe. 1993. Hepatotoxin (microcystin) and neurotoxin (anatoxin-a) contained in natural blooms and strains of cyanobacteria from Japanese waters. *Natural Toxins*. 1: 353-360.
159. Park, M. H., Chung, I. H., Ahmad, A., Kim, B. H. y S. J. Hwang. 2008. Growth inhibition of unicellular and colonial *Microcystis* strains (Cyanophyceae) by compounds isolated from rice (*Oryza sativa*) hulls. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 83: 97-101.
160. Pate, R., Klise, G., y B. Wu. 2011. Resource demand implications for US algae biofuels production sacleup. *Applied Energy*. 88: 3377-3388.

161. Patterson, G. M. L., Norton, T. R., Furusawa, E., Furusawa, S., Kasiwagi, M. y R. E. Moore. 1984. Antineoplastic evaluation of marine algal extracts. *Botanica Marina*. 27:485-488.
162. Patterson, G. M. L., Baldwin, C. L., Bolis, C. M., Karuso, H., Larsen, L. K., Levine, I. A., Moore, R. E., Nelson, C. S., Tschappat, K. D., Tuang, G. D., Furusawa, E., Furusawa, S., Norton, T. R., y R. B. Raybourne. 1991. Antineoplastic activity of cultured Blue-green algae (Cyanophyta). *Journal of Phycology* 27: 530-536.
163. Patterson, G. M. L., Baker, K. K., Baldwin, C. L., Bolis, C. M., Caplan, F. R., Larsen, L. K., Levine, I. A., Moore, R. E., Nelson, C. S., Tschappat, K. D., Tuang, G. D., Boyd, M. R., Cardellina, J. H., Collins, R. P., Gustafson, K. R., Snader, K. M., Weislow, O. S., y R. A. Lewin. 1993. Antiviral activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). *Journal of Phycology*. 29: 125-130.
164. Patterson, G. W. 1991. Sterols of algae. En: Physiology and biochemistry of sterols. (Eds) Patterson G. W. y W. D. Nes. American Oil Chemist Society, Champaign III. Pp 118 – 157.
165. Pereira, P., Onodera, H., Andrinolo, D., Franca, S., Arajo, F., Lagos, N., y Y. Oshima. 2000. Paralytic shellfish toxins in the freshwater cyanobacterium *Aphanizomeno flos-aquae*, isolated from Montargil reservoir, Portugal. *Toxicon*. 38: 1689-1702.
166. Pérez-Guitierrez, R. M., Figueroa-Torres, G., Martínez Flores, A. y J. M. Mota-Flores. 2007. *Microcystis aeruginosa*: Pharmacology and Phytochemistry. *Pharmacologyonline*. 1: 57-116.
167. Pietra, F. A. 1990. Secret world: Natural Products of Marine Life; 1st ed; Birkhäuser: Basel Switzerland.

168. Pineda, R. M. 2009. Determinación de bacterias toxigénicas productoras de microcistinas por métodos moleculares y bioensayos. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. pp. 101.
169. Pinkart, H. C., Devereux, R. y P. J. Chapman. 1998. Rapid separation of microbial lipids using solid phase extraction columns. *Journal of Microbiological Methods*. 34 (1): 9.
170. Prinsep, M. R., Moore, R. E., Levine, I. A. y G. M. L. Patterson. 1992. Westiellamide, a bistratamide-related cyclic peptide from the blue-green alga *Westiellopsis prolifica*. *Journal of Natural Products*. 55 (1): 140-142.
171. Rabauille, C., Misteli, T., Watson, R., y G. Warren. 1995. Reseassembly of Golgi stacks from mitotic Golgi fragments in a cell-free system. *Journal of Cell Biology*. 129: 605-618.
172. Rapala, J., Robertson, A., Negri, A. P., Berg, K. A., Tuomi, P., Lyra, C., Erkomaa, K., Lahti, K., Hopuu, K. y L. Lepisto. 2005. First report of saxitoxin in finnish lakes and posible associated effects on human health. *Enviromental Toxicology*. 20: 331-340.
173. Rastogi, R. P. y R. P. Sinha. 2009. Biothecnological and industrial significance of cyanobacterial secondary metabolites. *Biotechnology Advances*. 27: 521-539.
174. Reynolds, C. S. 1997. Vegetation Processes in the Pelagic: A Model for Ecosystem Theory. Excellence in Ecology Books, Ecology Institute. Olderdorf/Luhe. pp. 371.

175. Reynolds, C. S., Huszar, V., Kruk, C., Nasalli-Flores, L. y S. Melo. 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *Journal of Plankton Research*. 24: 417-428.
176. Rezanka, T., Dor, I., Prell, A. y Dembitsky, V. M. 2003. Fatty acid composition of six freshwater wild cyanobacterial species. *Folia Microbiológica*. 48: 71-75.
177. Rezanka, T. y V. M. Dembitsky. 2006. Metabolites Produced by Cyanobacteria Belonging to Several Species of the Family *Nostocaceae*. *Folia Microbiológica*. 51 (3): 159-182.
178. Rietschel, E. T., Brade, I., Schade, F. U., Seydes, U., Zahringer, U. y U. Mamat. 1993. Bacterial endotoxins-relations between chemical constitution and biological effects. *Inmmun Infekt Journal Articles*. 21: 26-35.
179. Rinehart, K. L., Shaw, P. D., Shield, L.S., Gloer, J. B., Schwartz, R. E., Tymial, A. A., Weller, D. L., Carter, G. T., Munro, M. H. G., Hughes, R. G., Renia, H. E., Swynenberg, E. B., Stringfellow, D. A., Vava, J. J., Coats, J. H., Zurenki, G. E., Kuentzel, S. L., Li, L. H., Bakus, G. J., Brunasca, R. C., Craft, L. L., Young, D. N. y J. L. Conner. 1981. Marine natural products as sources of antiviral, antimicrobial and antineoplastic agents. *Pure Applied Chemistry*. 53: 795-817.
180. Rinehart, K. L., Harada, K. I., Namikoshi, M., Chen, C., Harvis, C. A., Munro, M. H. G., Blunt, J. W., Mulligan, P. E., Beasley, V. R., Dahlem, A. M. y W. W. Carmichael. 1988. Nodularin, microcystin, and the configuration of Adda. *Journal of American Chemistry Society*. 110: 8557-8558.

181. Rinehart, K. L., Namikoshi, M. y B. W. Choi. 1994. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *Journal of Applied Phycology*. 6: 159-176.
182. Rittmann, B. E. 2008. Opportunities for renewable bioenergy using microorganisms. *Biotechnology and Bioenergy*. 2: 203-212.
183. Rorrer, G. L., Modrell, J., Zhi, C., Yoo, H. D., Nagle, D. y W. H. Burja. 1995. Bioreactor seaweed cell culture for production of bioactive oxylipins. *Journal of Applied Phycology*. 7: 187-198.
184. Rossi, J. V., Roberts, M. A., Yoo, H. D. y W. H. Gerwick. 1997. Pilot scale culture of the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula* for its pharmaceutically-useful natural metabolite curacin A. *Journal of Applied Phycology*. 9: 195-204.
185. Rouhiainen, L., Paulin, L., Soumalainen, S., Hyytiäinen, H., Buikema, W., Haselkorn, R. y K. Sivonen. 2000. Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Molecular Microbiology*. 37. (1): 156-167.
186. Rzama, A., Dufourc, E. J. y B. Arreguy. 1994. Sterols from green and blue-green algae grown on reused waste water. *Phytochemistry* 37 (6): 1625-1628.
187. Saito, K., Konno, A., Ishii, H., Saito, H., Nishida, F. y T. Abe. 2001. Nodulain-Har: a new nodularin from *Nodularia*. *Journal of Natural Products*. 64: 139-141.
188. Schmidt, E. W., Nelson, J. T., Rasko, D. A., Sudek, S., Eisen, J. A., Haygood, M. G. y J. Ravel. 2005. Patellamide A and C biosynthesis by a microcin-like pathway in *Prochloron didemni*, the cyanobacterial symbiont of *Lissoclinum patella*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 7315-7320.

189. Schwartz, R. E., Hirsch, C. F., Sesin, D. F., Flor, J. E., Chartrain, M., Frontling, R. E., Harris, G. H., Salvatore, M. J., Liesch, J. M. y K. J. Yudin. 1990. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 5: 113-124.
190. Scott, W. E. 1991. Occurrence and Significance of Toxic Cyanobacteria in Southern Africa. *Water Science and Technology*. 23: 175-180.
191. Sharathchandra, K y M. Rajasekhar. 2011. Total lipid and fatty acid composition in some freshwater cyanobacteria. *Journal of Algal Biomass Utilization*. 2 (2): 83-97.
192. Shen, C. R. y J. C. Liao. 2012. Photosynthetic production of 2-methyl-1-butanol from CO₂ in cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC7942 and characterization of the native acetohydroxyacid synthase. *Energy Environmental Science*. 5: 9574-9583.
193. Shen, X. Y., Lam, P. K. S., Shaw, G. R. y W. Wickramasinghe. 2002. Genotoxicity investigation of a cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Toxicol.* 40: 1499-1501.
194. Sherwood, H., Struchartz, G., Moczydlowski, E., Ravindran, A. y P. B. Reichardt. 1990. Chapter 3: The Saxitoxins, Sources, Chemistry and Pharmacology. En: Sherwood, H. y G. Strichartz (eds). *Marine toxins Origin structure and molecular pharmacology*. ACS Symposium Series. pp 29-65.
195. Schlegel, I., Doan, N. T., de Chazal, N. y G. D. Smith. 1998. Antibiotic activity of cyanobacterial isolates from Australia and Asia against green algae and cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*. 10: 471-479.

196. Silakowski, B., Kunze, B. y R. Muller. 2001. Multiple hybrid polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Gene*. 275: 233-240.
197. Silva, C. J., Wuensche, L y C. Djerassi. 1991. Biosynthetic studies of marine lipids 35. The demonstration of novo sterol biosynthesis in sponges using radiolabeled isoprenoid precursors. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry and Molecular Biology of Comparative Biochemistry and Physiology*. 99 (4): 763-773.
198. Singh, I. P., Milligan, K. E. y W. H. Gerwick. 1999. Tanikolide, a toxic and antifungal lactone from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*. 62: 1333-1335.
199. Sinha, R. P., Ambasht, N. K., Sinha, J. P., Klisch, M. y D. P. Hader. 2003. UV-B-induced synthesis of mycosporine-like amino acids in three strains of *Nodularia* (cyanobacteria). *Journal of Photochemistry and Photobiology Biology*. 71: 51-58.
200. Sitachitta, N., Rossi, J., Roberts, M. A., Gerwick, W. H., Fletcher, M. D. y C. L. Willis. 1998. Biosynthesis of the marine cyanobacterial metabolite barbamide. 1. Origin of the trichloromethyl group. *Journal of the American Chemical Society*.
201. Sitte, P., Weiler, E. R., Kadereit, J. W., Bresinsky, A., y C. Korner. 2004. Strasburger. *Tratado de Botánica*. 35ª edición.
202. Sivonen, K., Namikoshi, M., Evans, W. R., Gromov, B. V., Carmichael, W. W. y K. L. Rinehart. 1992. Isolation and structures of five microcystins from a Russian *Microcystis aeruginosa* strain CALU 972. *Toxicon*. 30 (11) 1481-1485.

203. Sivonen, K. 1996. Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*. 35: 12-24.
204. Sivonen, K., y G. Jones. 1999. En: Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. I. Chorus y J. Bartram (eds). London, E. y F. N. Spon, pp. 41-112.
205. Sivonen, K. y T. Börner. 2008. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. En: Herrero A. y E. Flores (eds). The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution. Caister Academic, Norfolk, pp 159-197.
206. Sivonen, K., Leikoski, N. y D. P. Fewer. 2010. Cyanobactins-ribosomal cyclic peptides produced by cyanobacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 86: 1213-1225.
207. Shifrin, N. S. y S. W. Chisholm. 1980. Phytoplankton lipids: environmental influences on production and possible commercial applications. En: Algae biomass. (Eds) Shelef, G. y C. J. Soeder. Elsevier, Amsterdam. pp 623-645.
208. Shigetani, O., Suda S., Shibata, S., Oyaizu, H., Matsumoto, S., y M. M. Watanabe. 2001. A proposal for the unification of five species of cyanobacterial genus *Microcystis* Kützing ex Lemmermann 1907 under the rules of the Bacteriological Code. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51: 873-879.
209. Skulberg, O. M., Carmichael, W. W., Anderson, R. A., Matsunaga, S., Moore, R. E. y R. Skulberg. 1992. Investigations of a neurotoxic oscillatorioid strain (Cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanotoxin-a. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 11: 312-329.

210. Smith, J. L., Boyer, G. I. y P. V. Zimba. 2008. A review of cyanobacterial odorous and bioactive metabolites: impacts and management alternatives in aquaculture. *Aquaculture*. 280: 5-20.
211. Soriente, A., Sodano, G., Cambacorta, A. y A. Trincone. 1992. Structure of the "heterocyst glycolipids" of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. *Tetrahedron*. 48: 5375-5384.
212. Soriente, A., Gambacorta, A., Trincone, A., Sili, C., Vincenzini, M. y G. Soldano. 1993. Heterocysts glucolipids of the cyanobacterium *Cyanospira rippkae*, *Phytochemistry*. 33: 393-396.
213. Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. y G. Cohen-Baziere. 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Review*. 35: 171-205.
214. Stewart, I., Schuller, P. J., y G. R. Shaw. 2006. Cyanobacterial lipopolysaccharides and human health- a review. *Environmental Health: A Global Access Science Source*. 5: 7.
215. Stratmann, K., Belli, J., Jensen, C. M., Moore, R. E. y G. M. L. Patterson. 1994. A aulosirazole, a novel solid tumor selective cytotoxin from the blue-green alga *Aulosira fertilissima*. *Journal of Organic Chemistry*. 59: 6279-6281.
216. Strichartz, G., Rando, T., Hall, S., Gitschier, J., Hall, I. y B. Magnani. 1986. On the mechanism by which saxitoxin binds to and blocks sodium channels. *Ann, N. Y. Acedemy of Science*. 479: 96-112.
217. Su, Z., Sheets, M., Ishida, H., Li, F., y W. H. Barry. 2004. Saxitoxin blocks L-type/Ca. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 308: 324-329.

218. Sueoka, E., Sueoka, N., Okabe, S., Koza, T., Ohta, T. y M. Suganuma. 1997. Expression of the tumor necrosis factor alpha gene and early response gene by nodularin, a liver tumor promoter in primary cultured rat hepatocytes. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 123: 413-419.
219. Sucrow, W., Slopianka, M. y H. W. Kircher. 1976. *Phytochemistry*. En: Patterson G. W. (ed). *Physiology and Biology of Sterols*. American Oil Chemist Society. 15: 1533.
220. Summons, R. E., Jahnke, L. L., Cullings, K. w. y G. A. Logan. 2001. Cyanobacterial biomarkers: triterpenoids plus steroids? Abstract B22D-0184. *Eos Trans AGU 82(47) Fall Meeting*. [Supplement].
221. Sukenik, A., Reisner, M., Carmeli, S. y Werman, M. 2006. Oral toxicity of the cyanobacterial toxin cylindrospermopsin in mice: long term exposure to low doses. *Environmental Toxicology*. 21: 575-582.
222. Taher, H., Al-Zuhair, S., Al-Marzouqi, A. H., Haik, Y. y M. M. Farid. 2011. A review of enzymatic transesterification of microalgal oil-based biodiesel using supercritical technology. *Enzyme Research*. pp 25.
223. Takahama, K., Matsuoka, M., Nagahama, K. y T. Ogawa. 2003. Construction and analysis of a recombinant cyanobacterium expressing a chromosomally insertegene for an ethylene forming enzyme at the *psbAI* locus. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 95: 302-305.
224. Tan, L. T., Chang, Y. Y. y T. Ashootosh. 2008. Besarhanamides A and B from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry*. 69: 2067-2069.

225. Tischer, J. 1938. Carotenoides of the freshwater algae. IV. The polyene pigments of the blue-green algae *Aphanizomenon flos-aquae*. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. 251: 109-128.
226. Tischer, J. 1939. Carotenoids of freshwater algae. *Zeitschrift für Physikalische Chemie*. 252: 257-269.
227. Tillet, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T. y B. A. Neilan. 2000. Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chemistry & Biology*. 7: 753-764.
228. Trost, M. B., Toshiyuki, K., Andersen, N. G., Tappertzhofen, C. y B. Fahr. 2012. Total synthesis of Aeruginosin 98B. *Journal of American Chemical Society*. 134 (46): 18944 – 18947.
229. Todd, J. S y W. H. Gerwick. 1995. Isolation of cyclic carbonate, a γ -butyrolactone, and a new indole derivate from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*. 58: 586-589
230. Turner, J. y., Doucette, G. J., Powell, C. L., Kullis, D. M., Keafer, B. A. y D. M. Anderson. 2000. Accumulation of red tide toxins in larger size fractions of zooplankton assemblages from Massachusetts Bay, USA. *Marine Ecology Progress Series*. 203: 95-107.
231. Vacca, J. 1998. Annual reports in medication chemistry. Bristol, J. A., (ed). Academic Press. San Diego. 33: pp 81 – 90.
232. van Apeldoorn, M. E., van Egmond, H. P., Speijers, G. J. A. y G. J. I. Bakker. 2007. Toxins of cyanobacteria. *Molecular Nutrition and Food Research*. 51: 7-60.

233. Vanderploeg, M., Tucker, C. S. y C. E. Boyd. 1992. Geosmin and 2-methylisoborneol production by cyanobacteria in fish ponds in the south Eastern United States. *Water Science Technology*. 25: 283-290.
234. Vargas, M. A., Rodríguez, H., Moreno, J., Olivares, H., Delcampo, J. A., Rivas, J., y G. M. Guerrero. 1998. Biochemical composition and fatty acid content of filamentous nitrogen-fixing cyanobacteria. *Journal of Phycology*. 34: 812-817.
235. Volkman, J.K. 1986. A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Organic Geochemistry*. 9: 83-99.
236. Volkman, J. K., Jeffrey, S. W., Nochils, P. D., Rogers, G. I. y C. D. Garland. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 128: 219-240.
237. Volkman, J. K., Barret, S. M., Blackburn, S. I., Mansour, M. P., Sikes, E. L. y F. Gelin. 1998. Microalgal biomarkers: a review of recent research developments. *Organic Geochemistry*. 29: 1163 – 1179.
238. Volkman, J. K. 2003. Sterols in Microorganism. *Applied Microbiol Biotechnology*. 60: 495-506.
239. Watanabe, M. 1996. Isolation, cultivation and, classification of Bloom-forming *Mixrocystis* in Japan. En: Watanabe, M. F., Harada, J., Carmichael, W. W. y H. Fujiki. (eds). *Toxic Microcystis*. Boca Raton: *CRC Press*. 13-34.
240. Walsby, A. E. 1987. Mechanisms of buoyancy regulation by planctonik cyanobacteria with gas vesicles. En: Fay, P. y Van Baalen, C. (Eds) *The Cyanobacteria*. Elsevier. Amsterdam, pp. 377-414.

241. Weckesser, J., Martin, C. y C. Jakobi. Cyanopeptolins, depsipeptides from cyanobacteria. 1996. *Systematic and Applied Microbiology*. 19: 133-138.
242. Welker, M. y H. von Döhren. 2006. Cyanobacterial peptides-nature's own combinational biosynthesis. *FEMS Microbiological Reviews*. 30: 530-563.
243. Whitton, B. A. 1992. Diversity, ecology and taxonomy of the cyanobacteria, En: Mann, N. H. y N. G. Carr (eds). *Photosynthetic Prokaryotes Botechnology Handbooks 6. Plenum Press*, London pp. 1-51.
244. Whitton, A. R., y M. Potts. 2000. Introduction to cyanobacteria. En: Whitton, B. A. y Potts, M. (eds). *The Ecology of Cyanobacteria. Kluwer Academic Publishers*. pp. 1-11.
245. Wiegand, C. y S. Pflugmacher. 2005. Ecotoxicological effects of selected cyanobacterial secondary metabolites: a short review. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 203: 201-218.
246. Williams, A. B. y R. S. Jacobs. 1993. A marine natural product, patellamide D, reverses multidrug resistance in human leukemic cell line. *Cancer Letters*. 71 (1-3): 97-102.
247. Wipf, P. y J. L. Methot. 2000. Total synthesis and stereochemical revision of (+)-Aeruginosin 298-A. *Organic Letters*. 2 (26): 4213-4216.
248. Witcover, J., Yeh, S. y D. Sperling. 2013. Policy options to address global land use change from biofuels. *Energy policy*. 56: 63-74.
249. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiology Review*. 51: 221-271.

250. Wonnacott S., Swanson, K. L., Albuquerque, E. X., Huby, N. J., Thompson, P. y T. Gallagher. 1992. Homoanatoxin: a potent analogue of anatoxin-A. *Biochemical Pharmacology*. 43: 419-423.
251. Wu, M., Okino, T., Nogle, L. M., Marquez, B. L., Williamson, R. T. y N. Sitachitta. 2000. Structure synthesis, and biological properties of kalkitoxin, a novel neurotoxin from the marine cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of the American Chemistry Society*. 122: 12041-12042.
252. Zhou, J., Zhang, H., Zhang, Y., Li, Y. y Y. Ma. 2012. Design and creating a modularized synthetic pathway in cyanobacterium *Synechocystis* enables production of acetone from carbon dioxide. *Metabolic Engineering*. 14: 394-400.
253. Zurawell, R. W., Chen, H., Burke, J. M., y E. E. Prepas. 2005. Hepatotoxic cyanobacteria: a review of the biological importance of microcystins in freshwater environments. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part B: Critical Reviews*. 86: 240-245.

ANEXO
Ácidos Grasos y ésteres Metílicos

TR.: 9.87

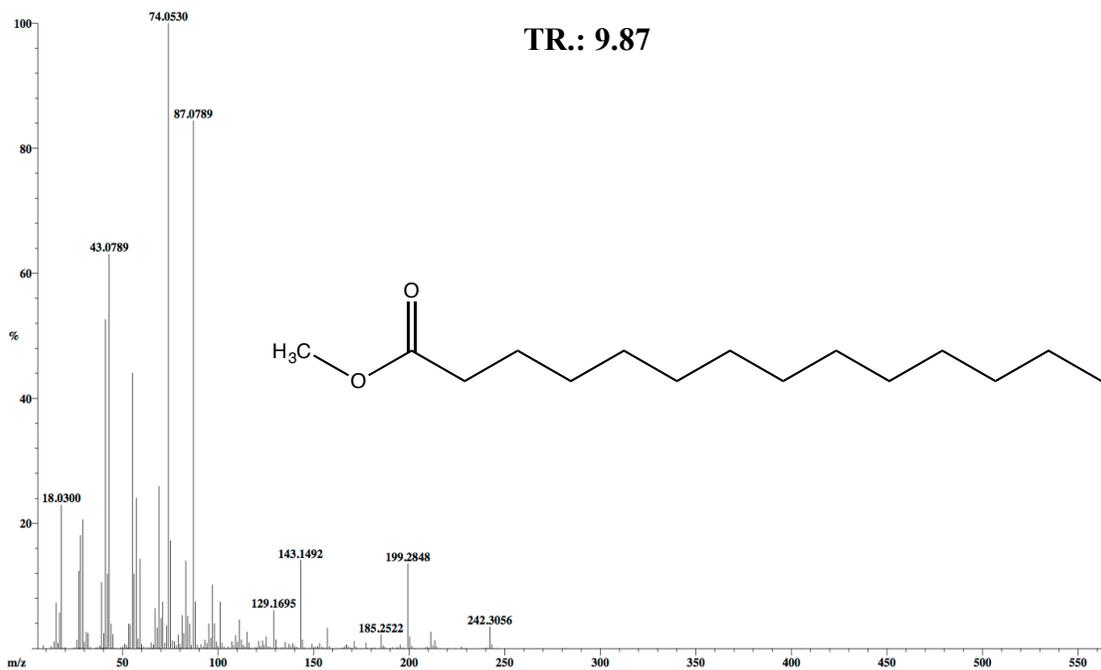


Figura 16. Espectro de masas correspondiente al Tetradecanoato de metilo, Pico base PB= 74, Tiempo de Retención TR =9.87 y peso molecular PM = 242 de la fracción MeOH-DC.

TR.: 9.95

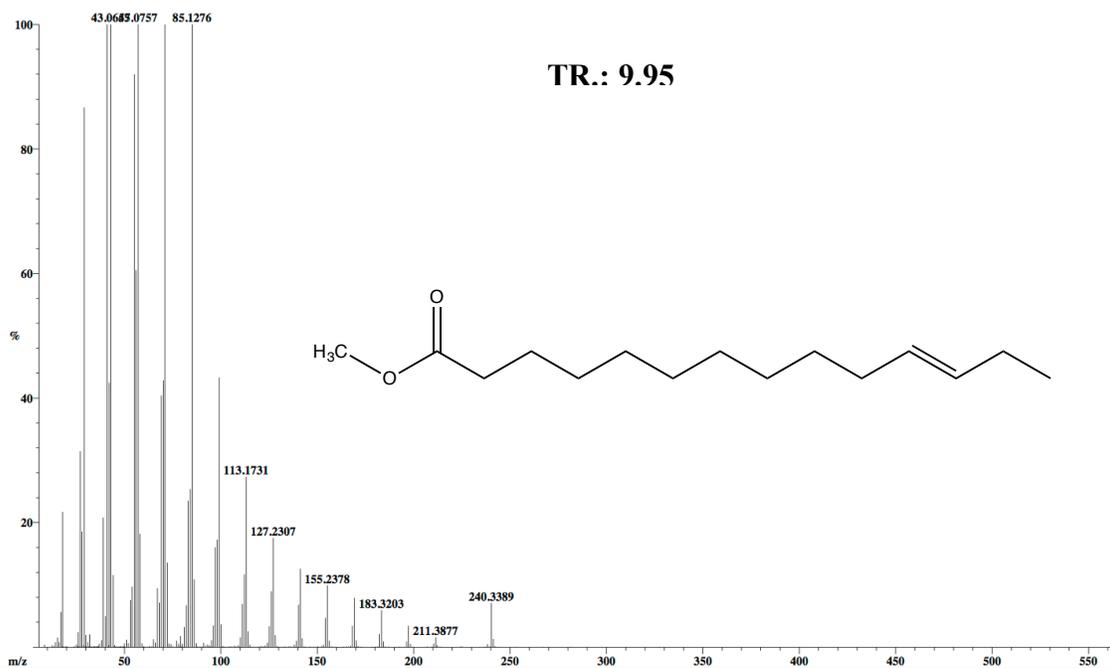


Figura 17. Espectro de masas correspondiente al 11-Tetradecenoato de metilo, Pico base PB= 85, Tiempo de Retención TR =9.95 y peso molecular PM = 240 de la fracción MeOH-DC.

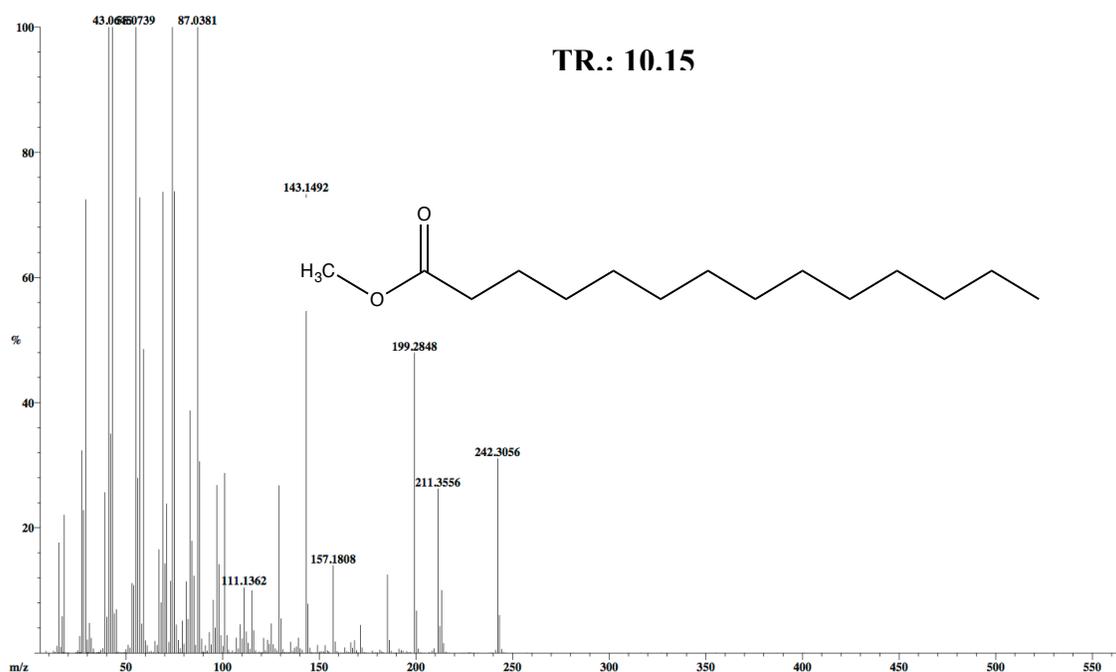


Figura 18. Espectro de masas correspondiente al Tetradecanoato de metilo, Pico base PB = 87, Tiempo de Retención TR = 10.15 y peso molecular PM = 242 de la fracción MeOH-DC.

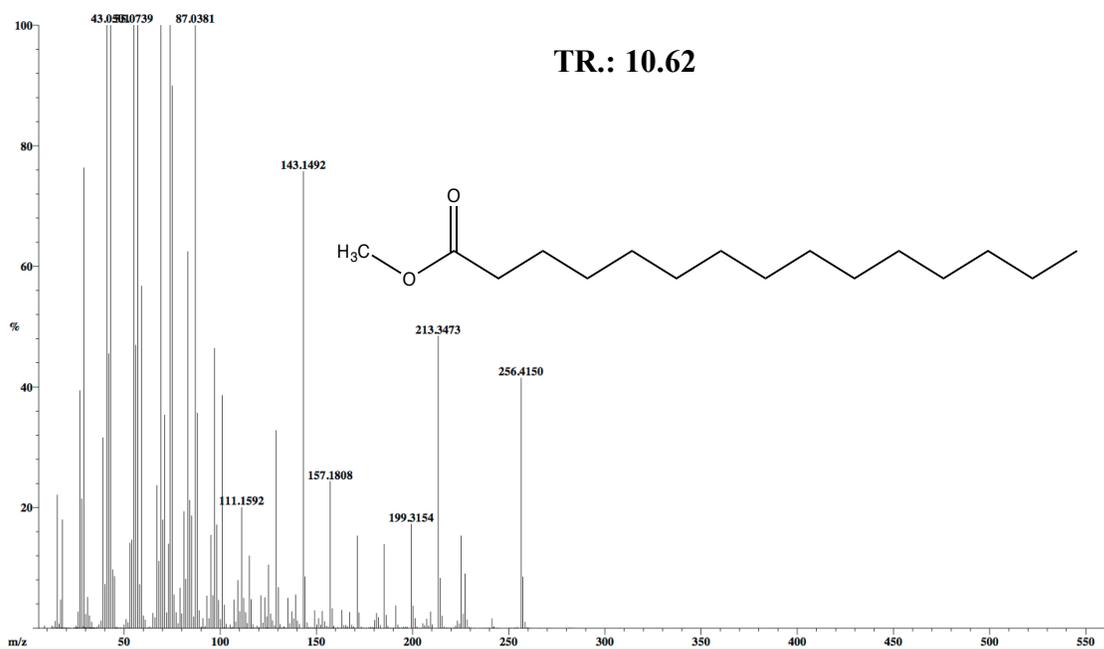


Figura 19. Espectro de masas correspondiente al Pentadecanoato de metilo, Pico base PB = 74, Tiempo de Retención TR = 10.62 y peso molecular PM = 256 de la fracción MeOH-DC.

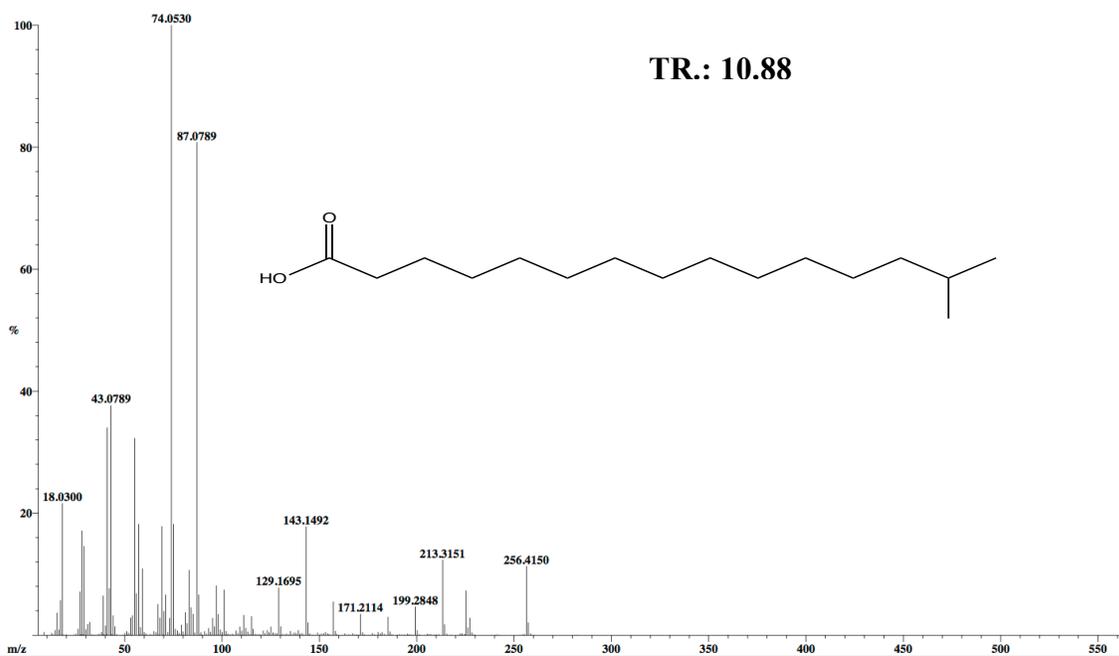


Figura 20. Espectro de masas correspondiente al Ácido 14-metilpentadecanóico, Pico base PB= 74, Tiempo de Retención TR =10.88 y peso molecular PM = 256 de la fracción MEOH-DC.

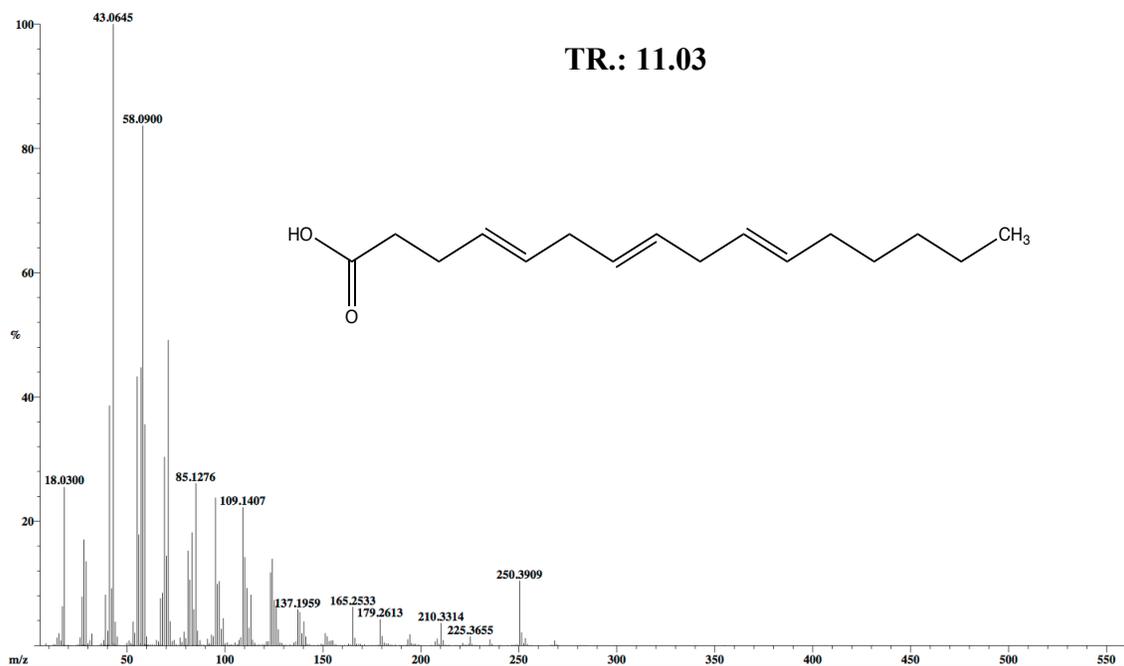


Figura 21. Espectro de masas correspondiente al Ácido 4E, 7E, 10E-Hexadecatrienóico, Pico base PB= 43, Tiempo de Retención TR =11.03 y peso molecular PM = 250 de la fracción MEOH-DC.

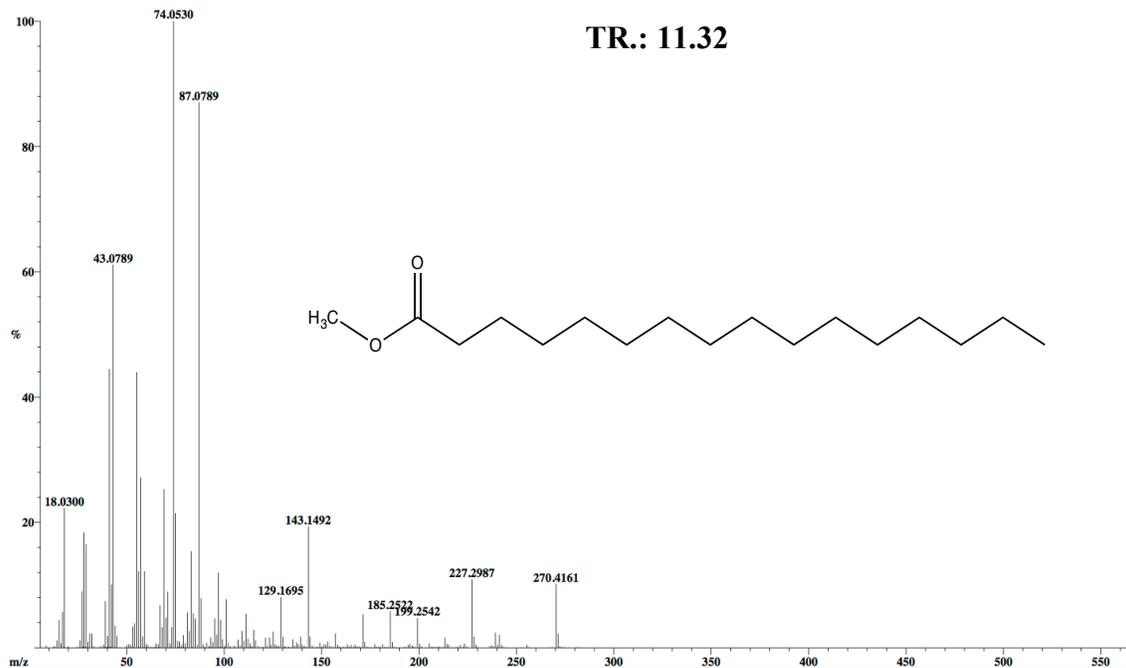


Figura 22. Espectro de masas correspondiente al Hexadecanoato de metilo, Pico base PB= 74, Tiempo de Retención TR = 11.32 y peso molecular PM = 270 de la fracción MEOH-DC.

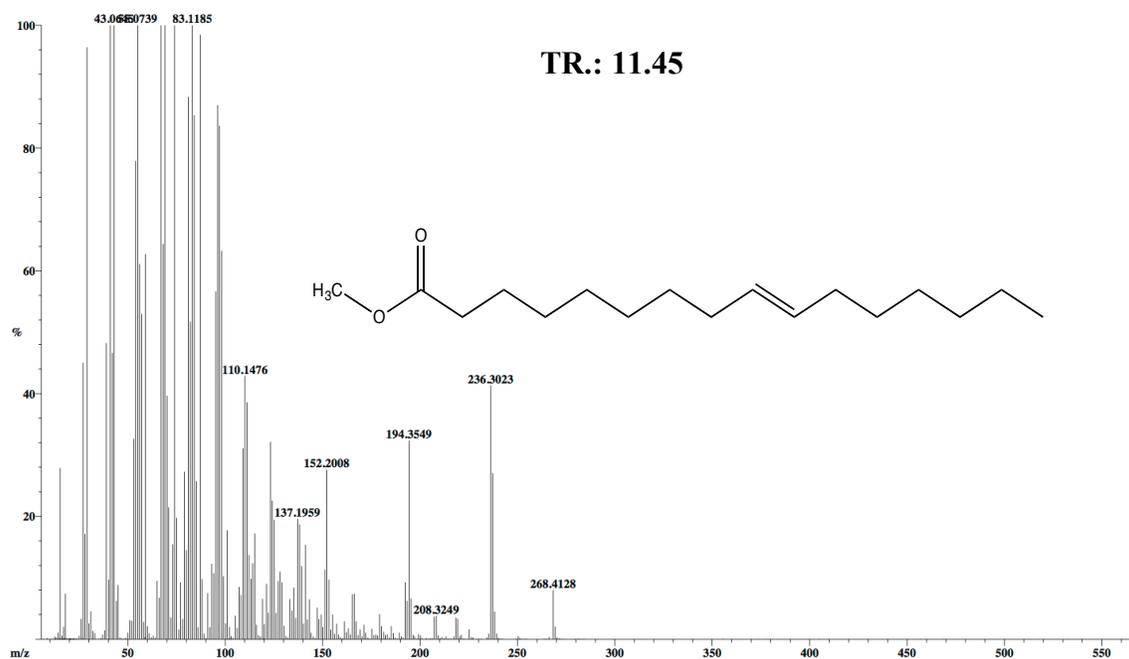


Figura 23. Espectro de masas correspondiente al 9-Hexadecenoato de metilo, Pico base PB= 83, Tiempo de Retención TR = 11.45 y peso molecular PM = 268 de la fracción MEOH-DC.

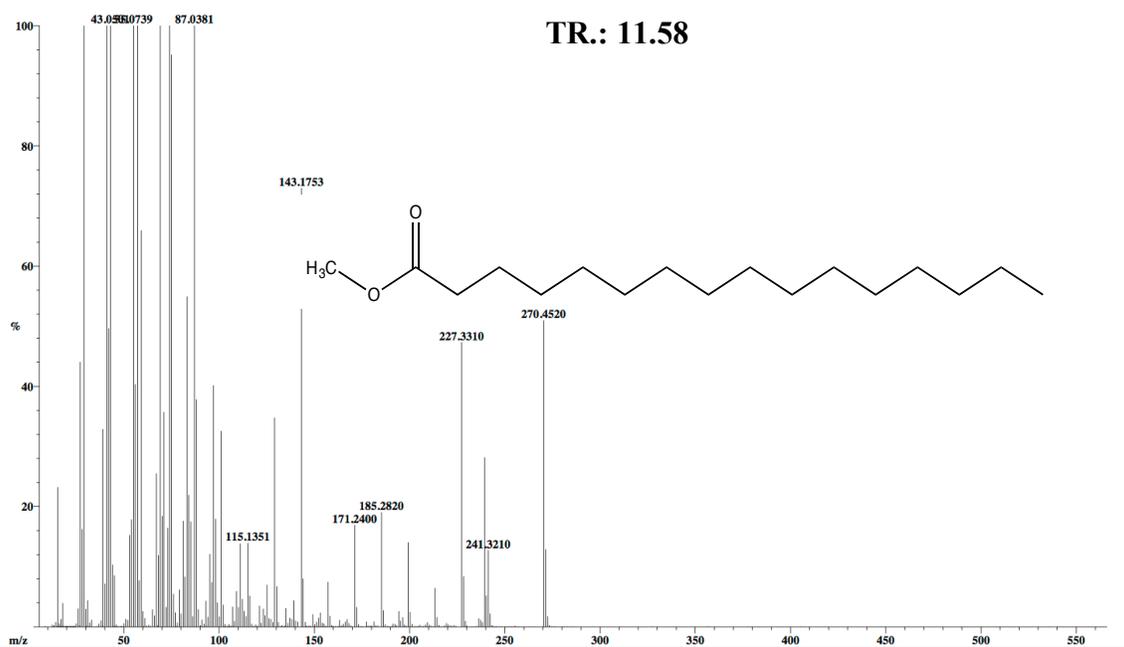


Figura 24. Espectro de masas correspondiente al Hexadecanoato de metilo, Pico base PB = 87, Tiempo de Retención TR = 11.58 y peso molecular PM = 270 de la fracción MEOH-DC.

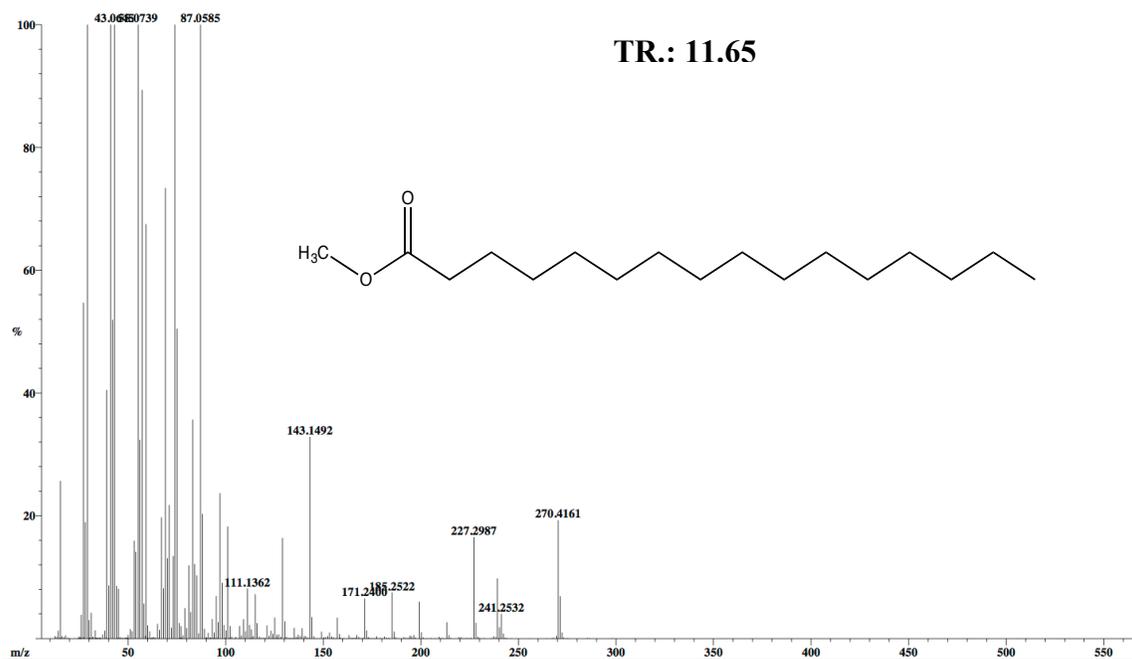


Figura 25. Espectro de masas correspondiente al Hexadecanoato de metilo, Pico base PB = 87, Tiempo de Retención TR = 11.65 y peso molecular PM = 270 de la fracción MEOH-DC.

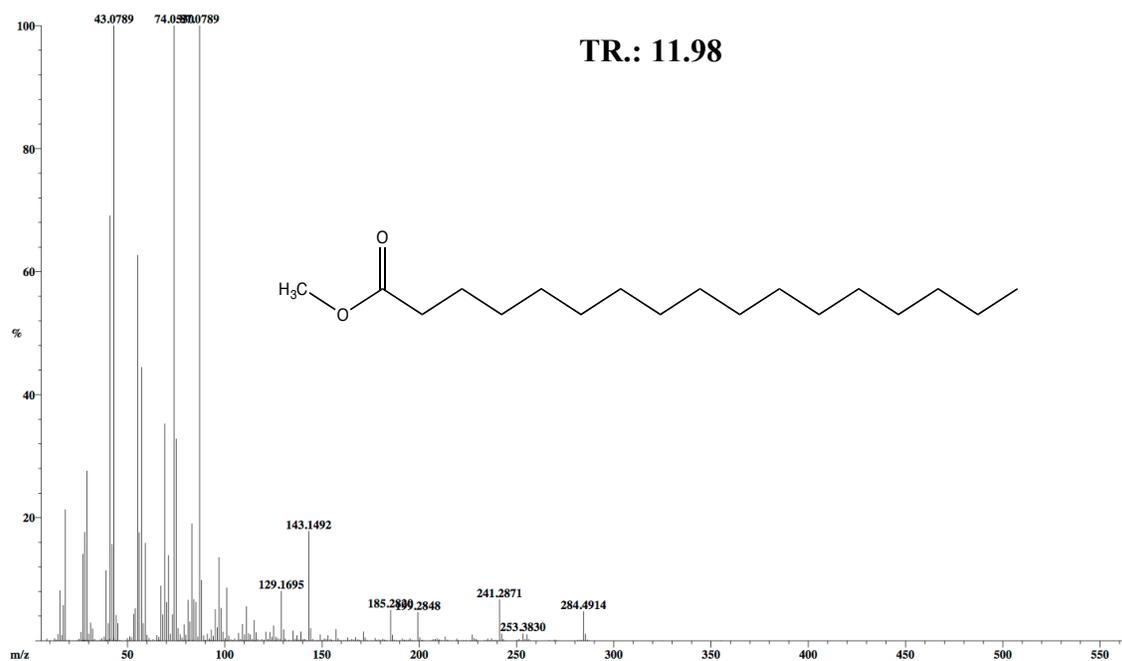


Figura 26. Espectro de masas correspondiente al Heptadecanoato de metilo, Pico base PB = 87, Tiempo de Retención TR = 11.98 y peso molecular PM = 284 de la fracción MEOH-DC.

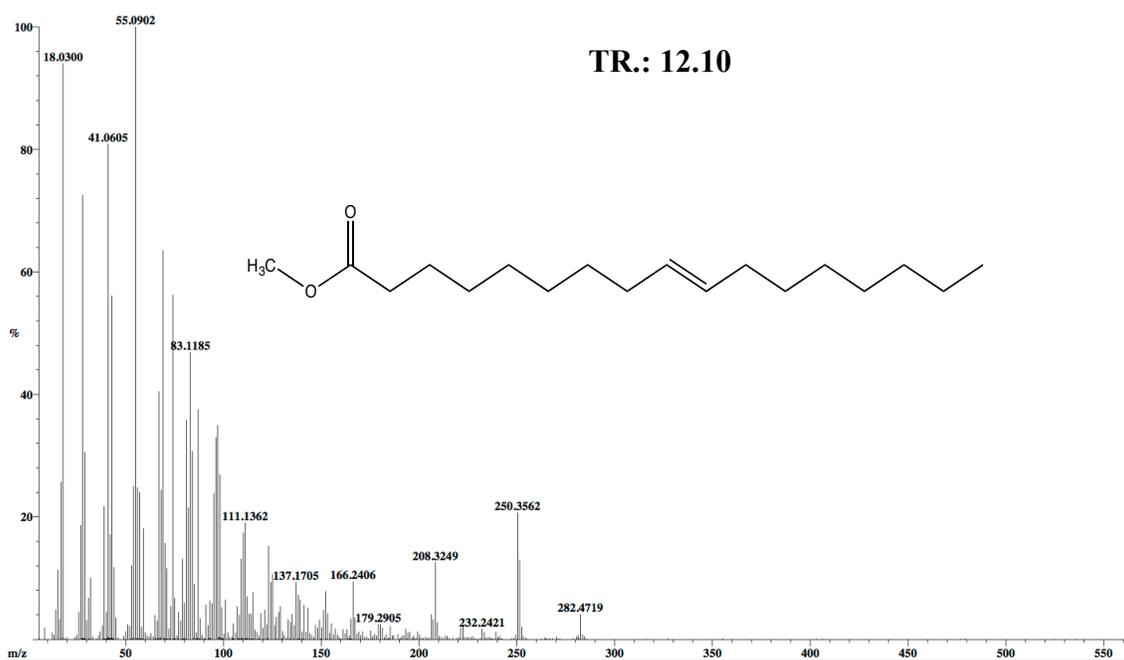


Figura 27. Espectro de masas correspondiente al 9-Heptadecenoato de metilo, Pico base PB = 55, Tiempo de Retención TR = 12.10 y peso molecular PM = 282 de la fracción MEOH-DC.

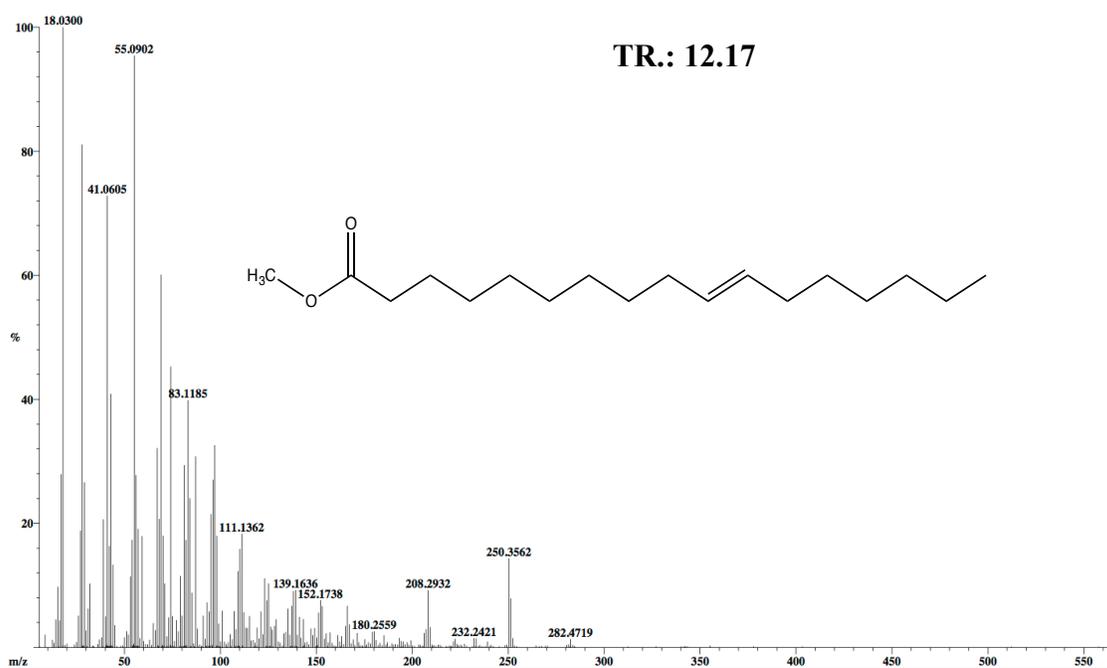


Figura 28. Espectro de masas correspondiente al 10-Heptadecenoato de metilo, Pico base PB = 55, Tiempo de Retención TR = 12.17 y peso molecular PM = 282 de la fracción MEOH-DC.

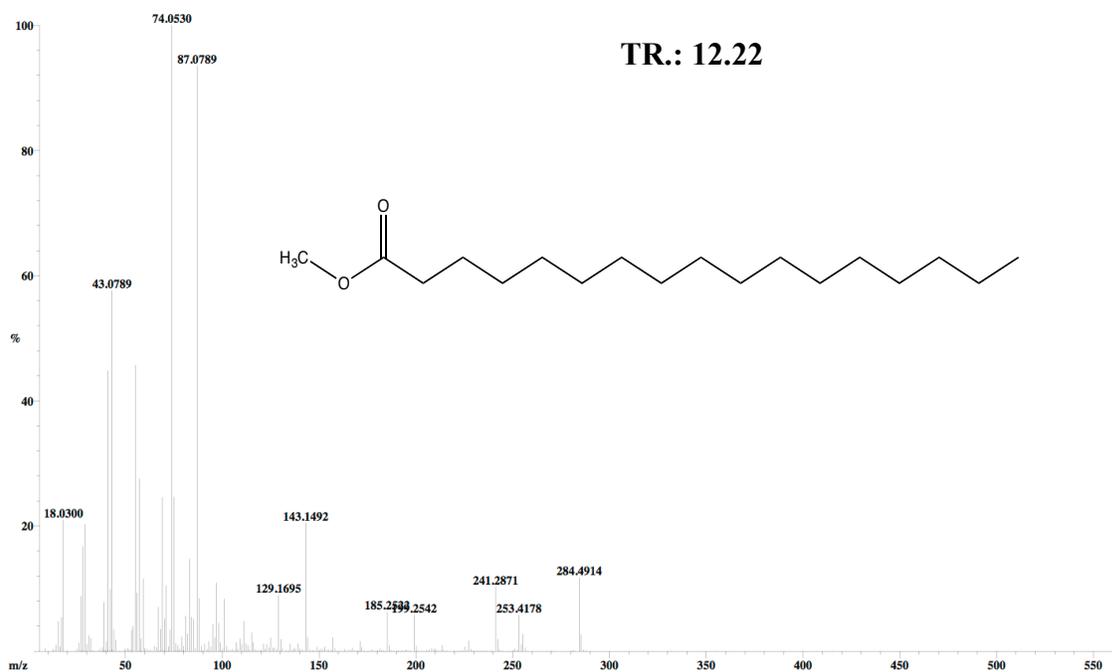


Figura 29. Espectro de masas correspondiente al Heptadecenoato de metilo, Pico base PB = 74, Tiempo de Retención TR = 12.22 y peso molecular PM = 284 de la fracción MEOH-DC.

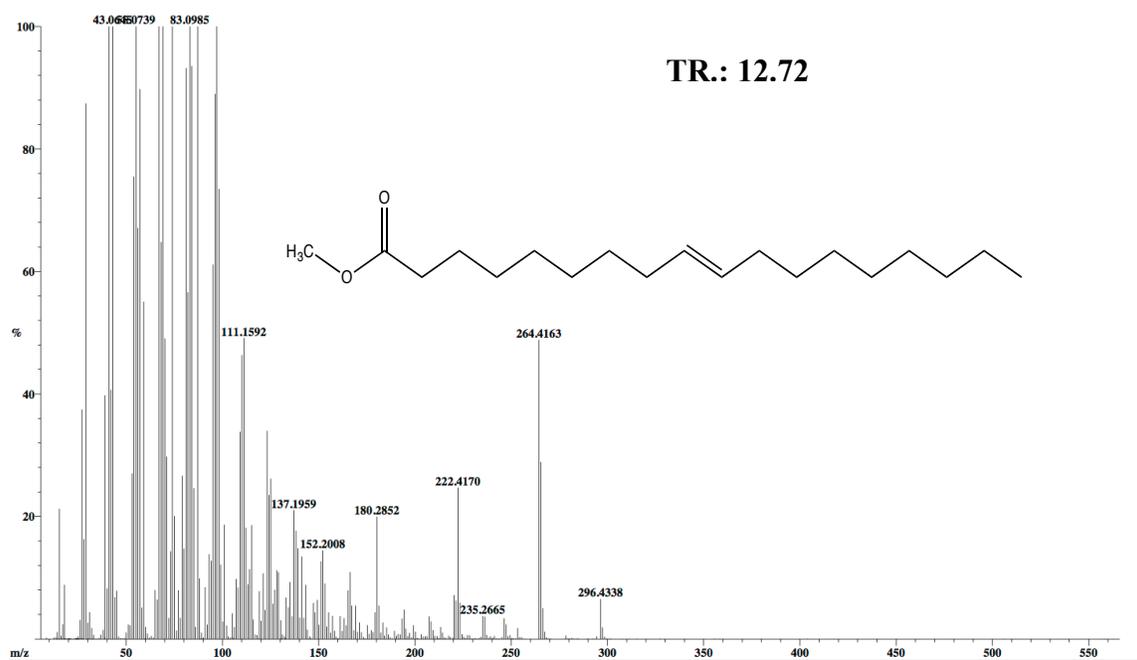


Figura 30. Espectro de masas correspondiente al 9-octadecenoato de metilo, Pico base PB = 97, Tiempo de Retención TR = 12.72 y peso molecular PM = 296 de la fracción MEOH-DC.

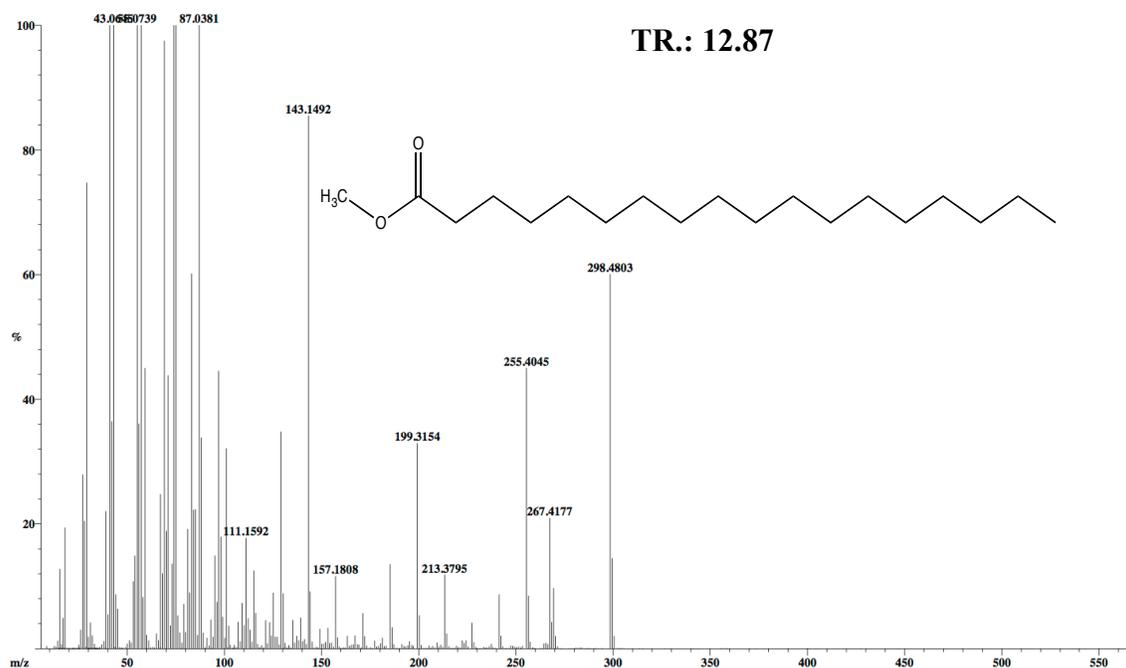


Figura 31. Espectro de masas correspondiente al Octadecenoato de metilo, Pico base PB = 87, Tiempo de Retención TR = 12.87 y peso molecular PM = 298 de la fracción MEOH-DC.

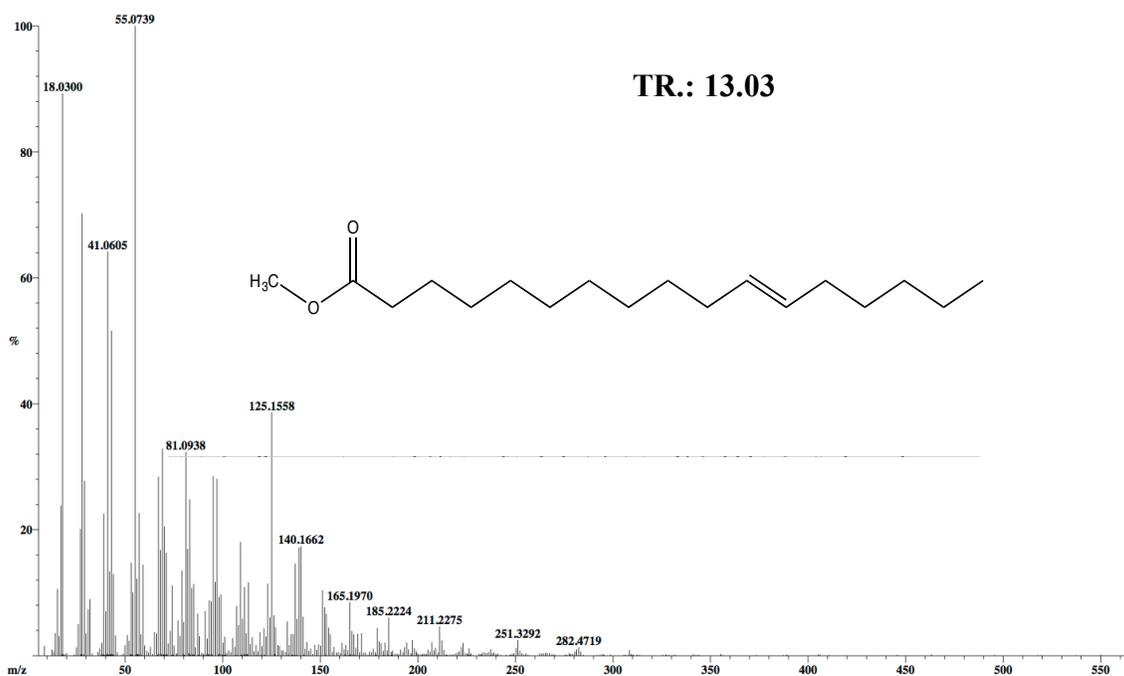


Figura 32. Espectro de masas correspondiente al 11-Heptadecenoato de metilo, Pico base PB = 55, Tiempo de Retención TR = 13.03 y peso molecular PM = 282 de la fracción MEOH-DC.

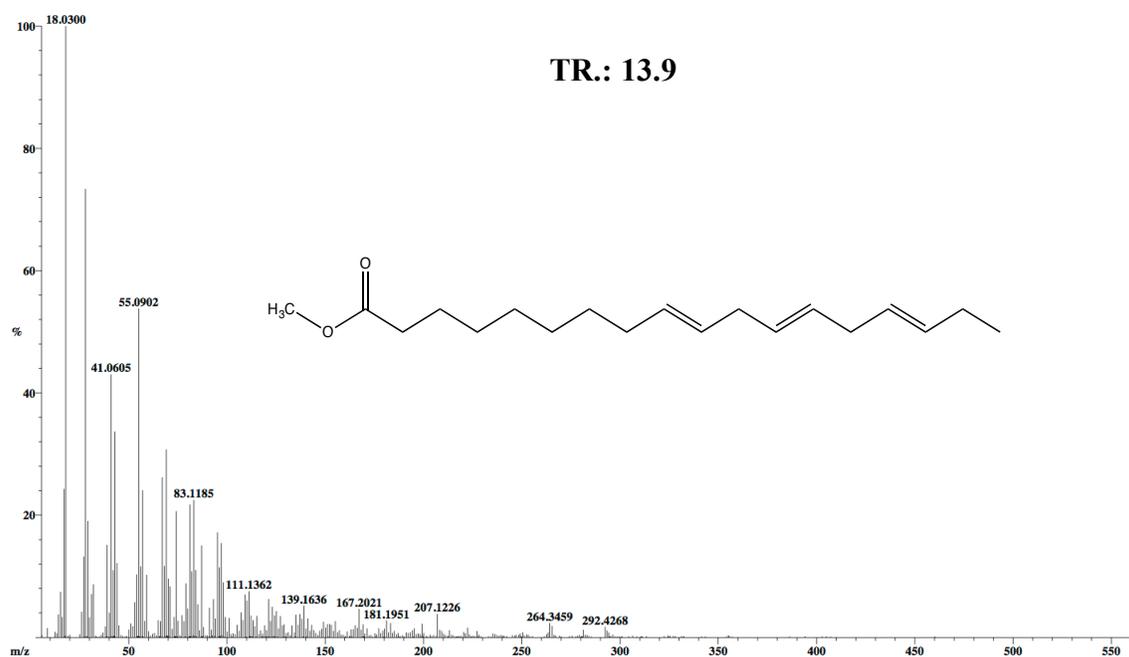


Figura 33. Espectro de masas correspondiente al Ácido 9,12,15-octadecatrienoato de metilo, Pico base PB = 55, Tiempo de Retención TR = 13.9 y peso molecular PM = 292 de la fracción MEOH-DC

Esteroles

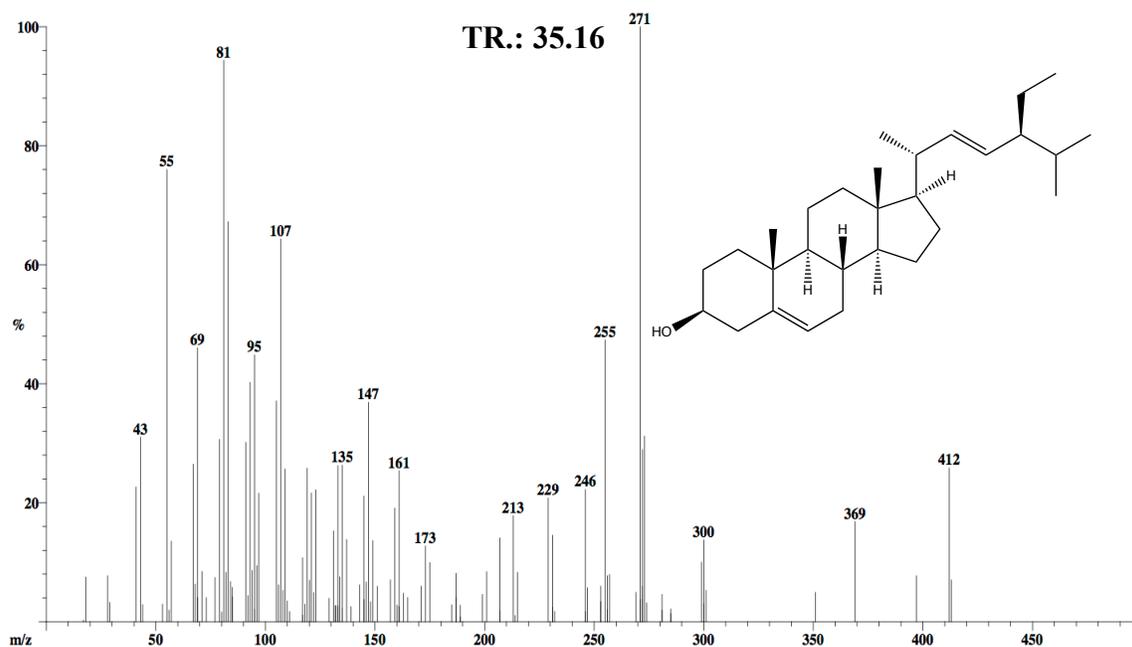


Figura 34. Espectro de masas correspondiente al esteroles Estigmasterol ($C_{29}\Delta^5\Delta^{22}$), Pico base PB = 271, Tiempo de Retención TR = 35.16 y peso molecular PM = 412 de la fracción MEOH-DG².

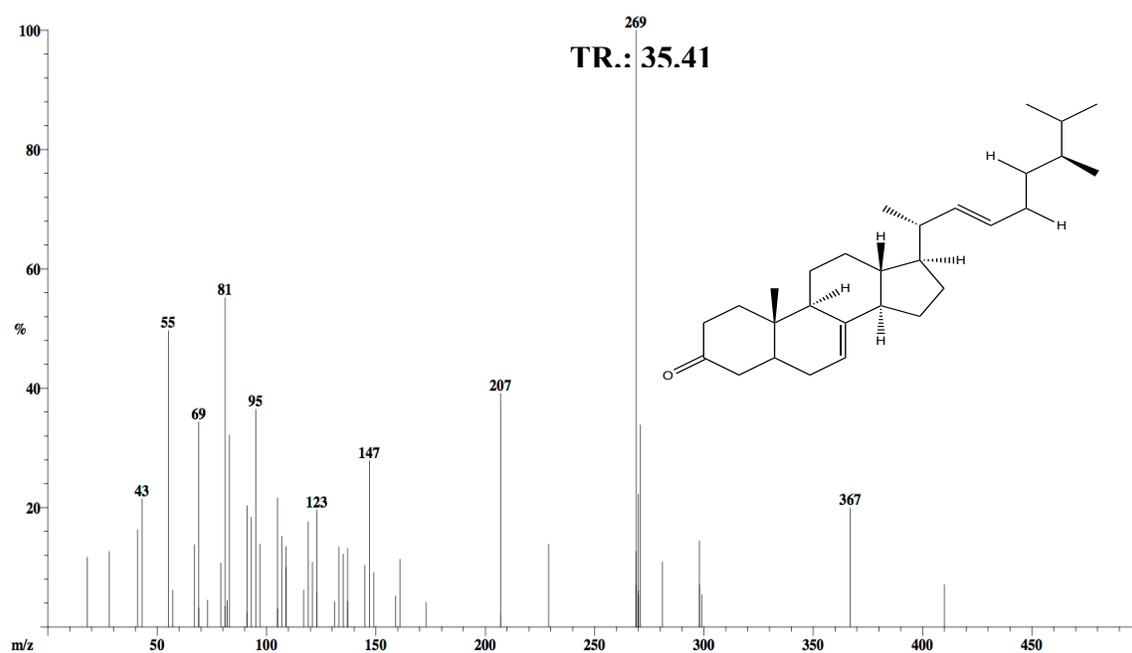


Figura 35. Espectro de masas correspondiente al esteroles 7,22-Ergostadienona ($C_{28}\Delta^7\Delta^{22}$), Pico base PB = 269, Tiempo de Retención TR = 35.41 y peso molecular PM = 396 de la fracción MEOH-DG².

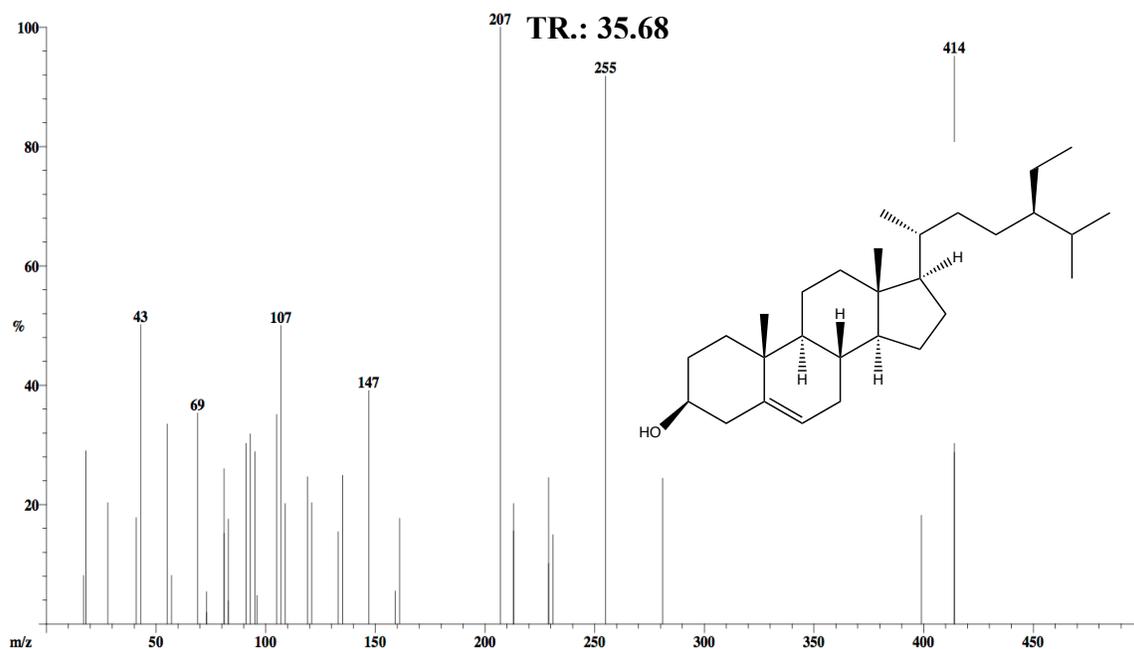


Figura 36. Espectro de masas correspondiente al esteroil β -sitosterol ($C_{29}\Delta^5$), Pico base PB = 207, Tiempo de Retención TR = 35.68 y peso molecular PM = 414 de la fracción MEOH-DG²

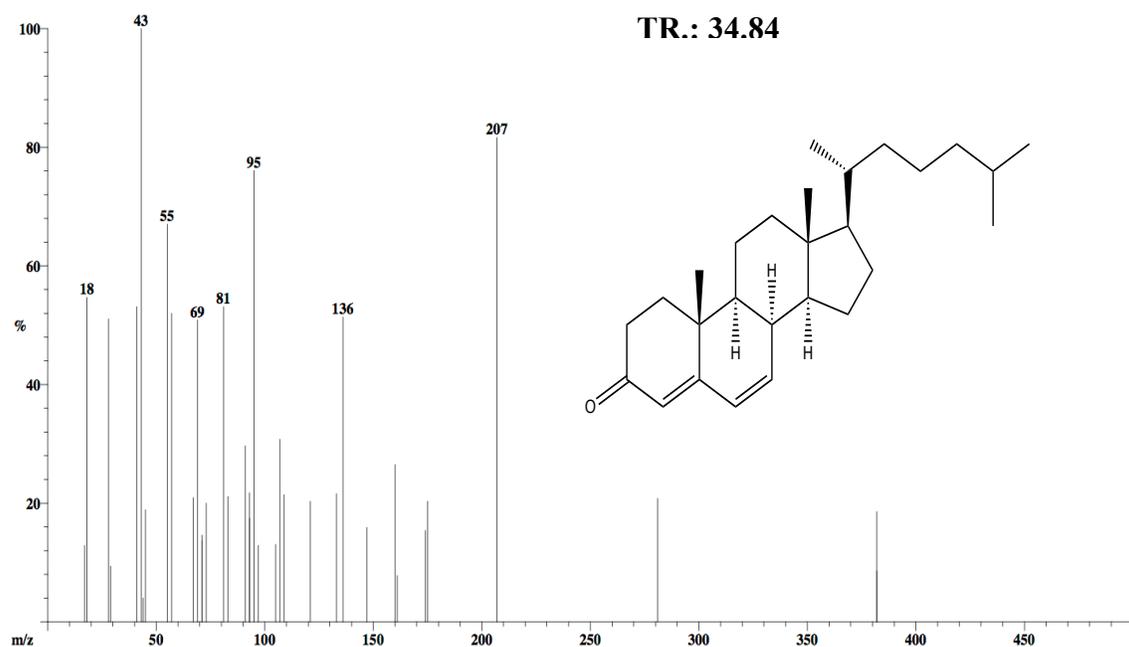


Figura 37. Espectro de masas correspondiente al esteroil Cholesta-4,6-dien-3-ona ($C_{27}\Delta^4\Delta^6$), Pico base PB = 43, Tiempo de Retención TR = 34.84 y peso molecular PM = 382 de la fracción MEOH-HA1.

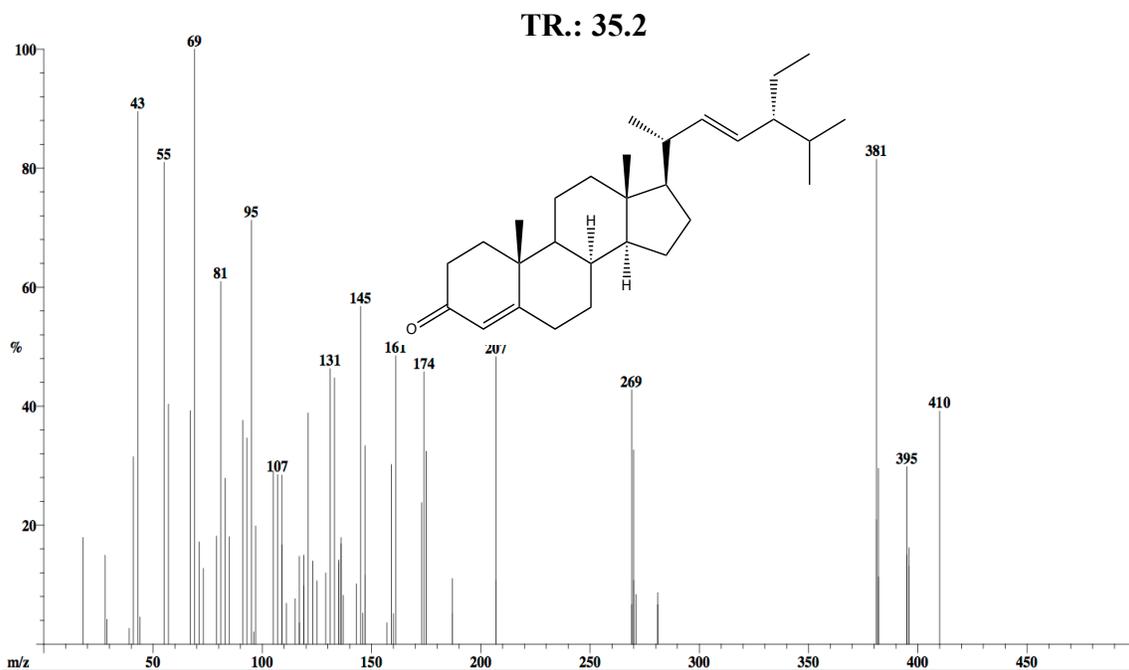


Figura 38. Espectro de masas correspondiente al esteroide 4,22-Stigmastadien-3-ona ($C_{29}\Delta^4\Delta^{22}$), Pico base PB = 69, Tiempo de Retención TR = 35.2 y peso molecular PM = 410 de la fracción MEOH-HA1

Isómeros del Fitol

TR.: 20.53

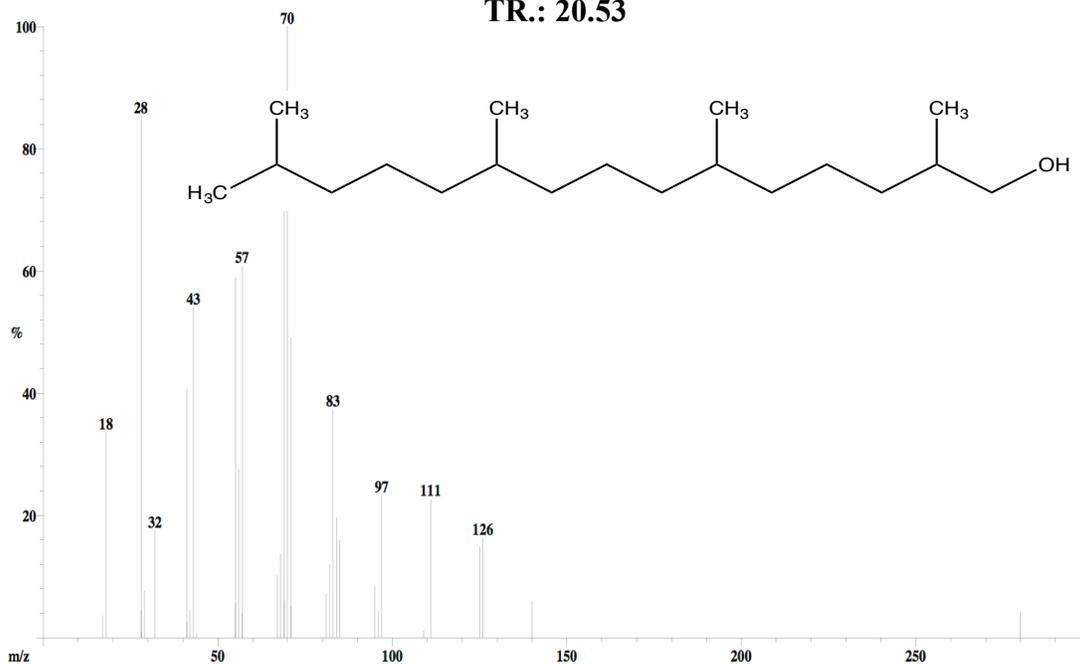


Figura 39. Espectro de masas correspondiente al isómero del fitol, identificado como el compuesto dehidrofitol, pico base PB = 70, Tiempo de retención TR = 20.77 min, peso molecular PM = 296, ion molecular IM = 280.

TR.: 20.77

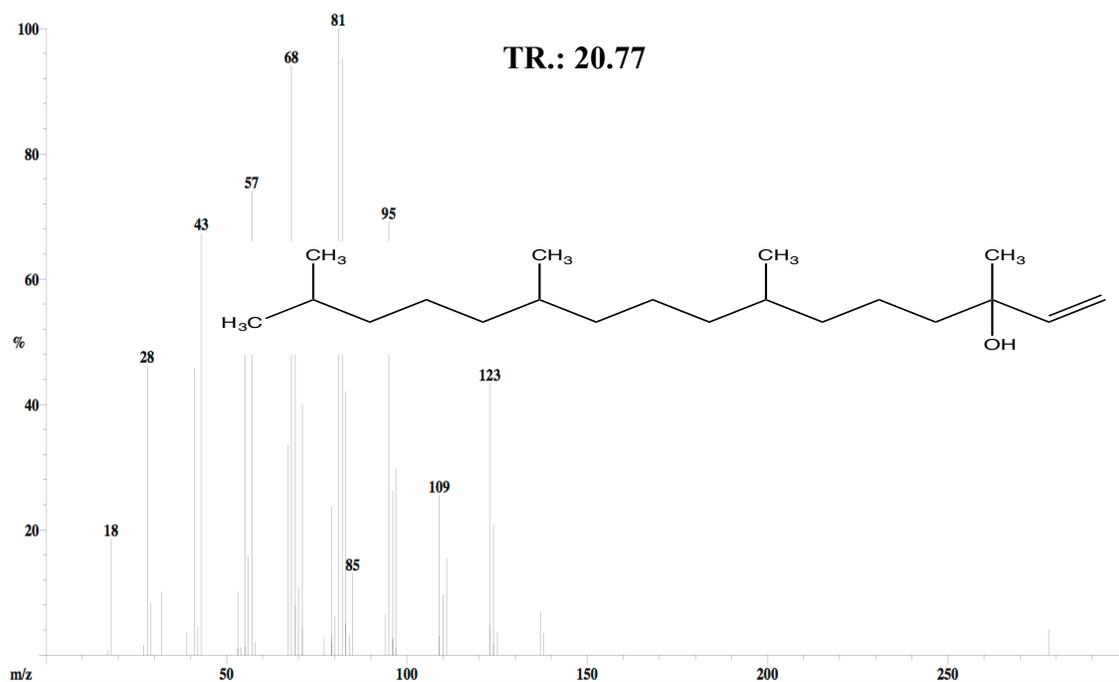


Figura 40. Espectro de masas correspondiente al compuesto isofitol, pico base PB = 81, Tiempo de retención TR = 20.45 min, peso molecular PM = 296, ion molecular IM = 278.

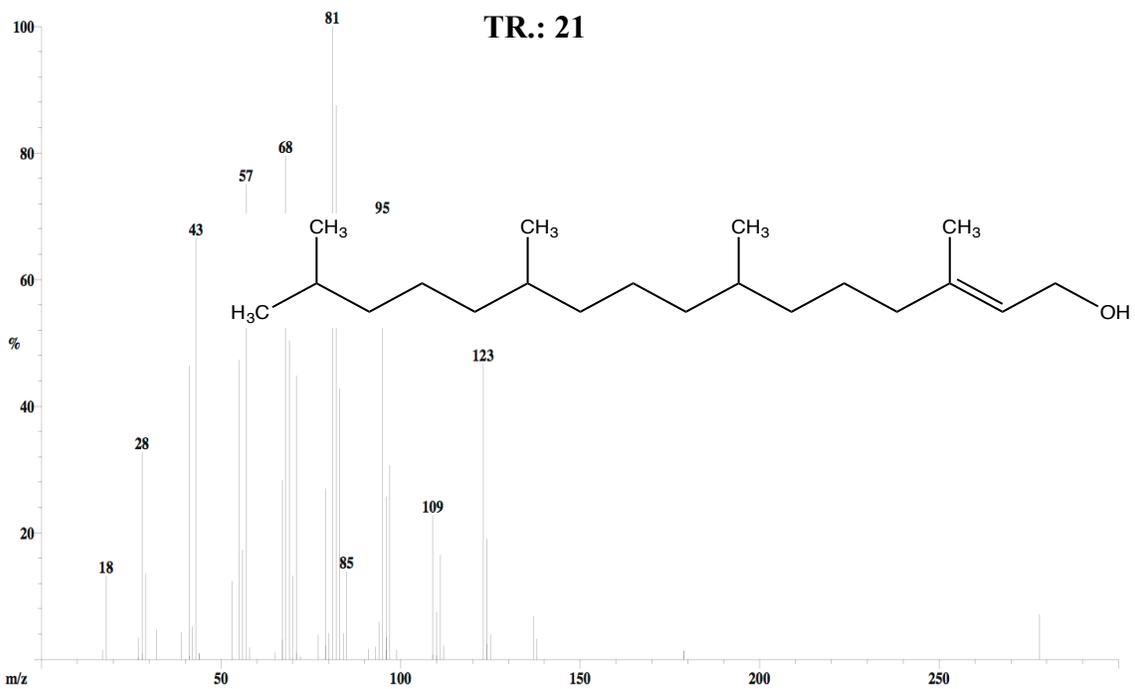


Figura 41. Espectro de masas correspondiente al compuesto *cis*-fitol, pico base PB = 81, Tiempo de retención TR = 20.45 min, peso molecular PM = 296, ion molecular IM = 278.

Se realizaron análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (EM) de la fracción MeOH – A, mostró la presencia de ocho picos en el cromatograma de los cuales pueden ser asociados a compuestos como: Anabaenopeptina F pico uno, Aeruginosina GH553 pico cuatro y pico seis Aeruginosina KT608A o KT608B de acuerdo al peso molecular (PM) mostrado en el espectrograma. (Tabla. 18, Figura. 50), la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (EM) de la fracción CYST-M, mostró la presencia de doce picos en el cromatograma de los cuales solo puede ser asociado el pico diez al compuesto Aeruginosina KT608A o KT608B y pico siete Aeruginosina GE642 , sin embargo esta ultima no se considera como una posible identificación correcta de este compues ya que el espectro de masas muestra una señal simple cuando compuestos con halógenos (Cl y/o Br) se puede apreciar una señal en forma de triple (1:2:1) (Tabla. 20, Figura. 51).

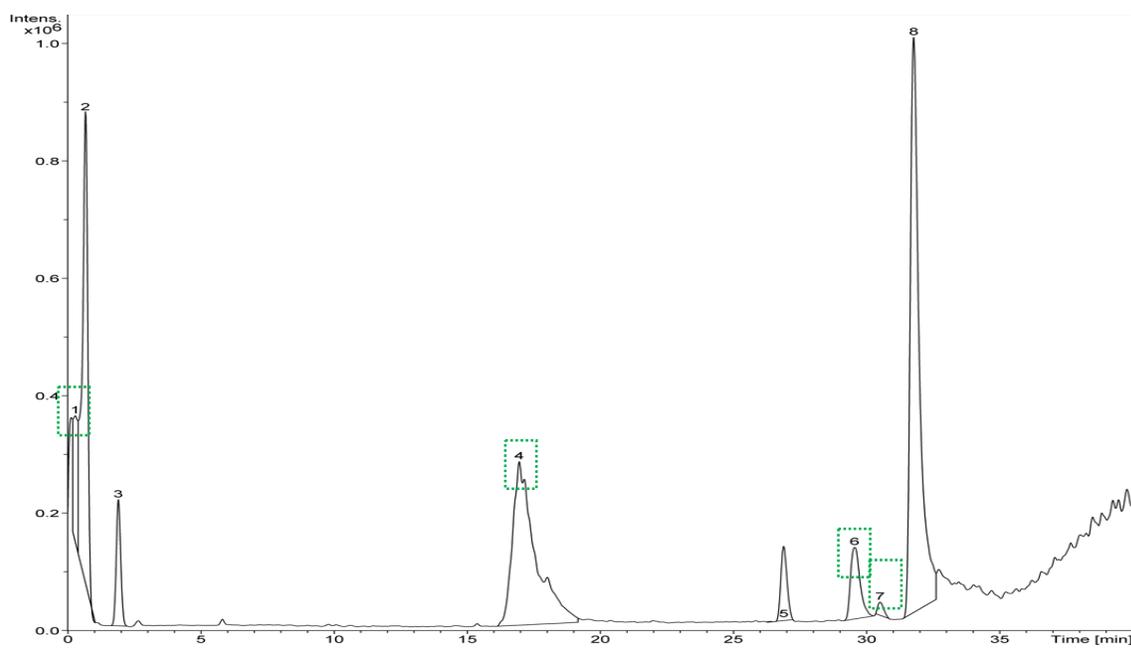
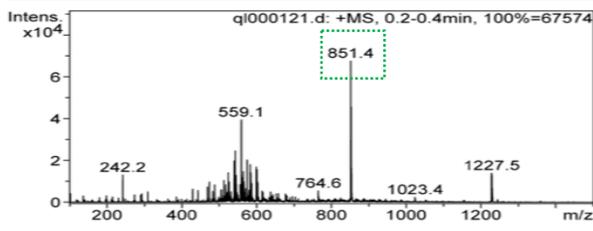
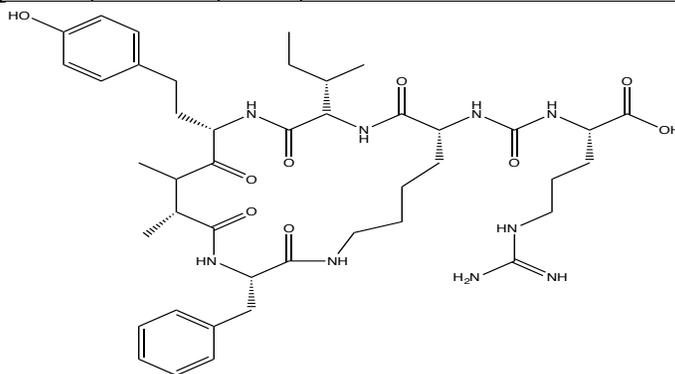
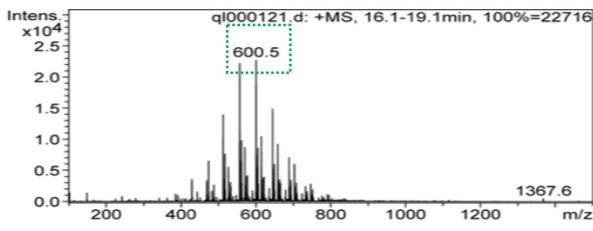


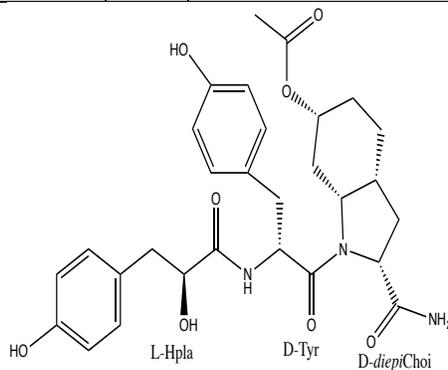
Figura 42. Cromatograma de HPLC de la fracción MeOH-A en la que se observa la presencia de ocho picos de los cuales el pico uno corresponde al compuesto Anabaenopeptina F, Aeruginosina GH553 o Pseudoaeruginosina KT554 pico cuatro, pico seis Aeruginosina KT608A o KT608B y pico siete Aeruginosina (GE642 Tabla. 19).

Tabla 13. Posible identificación de compuestos de acuerdo a su peso molecular, mostrado en el espectro correspondiente a la fracción MeOH-A, TR = Tiempo de retención (min), $M+M^+$ = Peso molecular mas el aducto (H, Na, K, etc.) y M = Peso molecular.

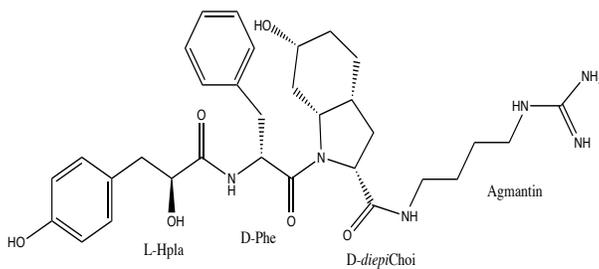
Compuesto	TR (min)	$M+M^+$	M	Espectro/Estructura química
Anabaenopeptina F	0.3	(M+H)		Cmpd 1, 0.3 min 
		851	850	



Aeruginosina GH553	17.0	(M+H+2Na)		Cmpd 4, 17.0 min 
		600	553	

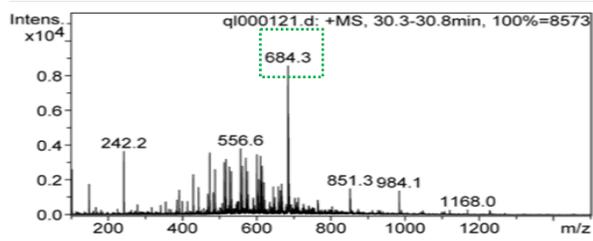
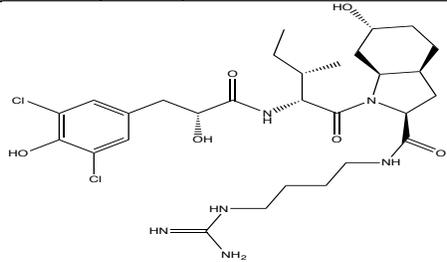


Pseudoaeruginosina KT554	(M+2Na)		
	600	554	
Aeruginosina KT608A	29.5	(M+2H)	
		610	



Aeruginosina KT608B	(M+2H)		
	610	608	

Tabla 14. Posible identificación del compuesto Aeruginosina KT642 de acuerdo a su peso molecular, mostrado en el espectro correspondiente a la fracción CYST-M. TR = Tiempo de retención (min), $M+M^+$ = Peso molecular mas el aducto (H, Na, K, etc.) y M = Peso molecular.

Compuesto	TR (min)	$M+M^+$	M	Espectro/Estructura química
Aeruginosina GE642	30.5	$(M+CH_3CN+H)$		<p>Cmpd 7, 30.5 min</p> 
		684	642	
				

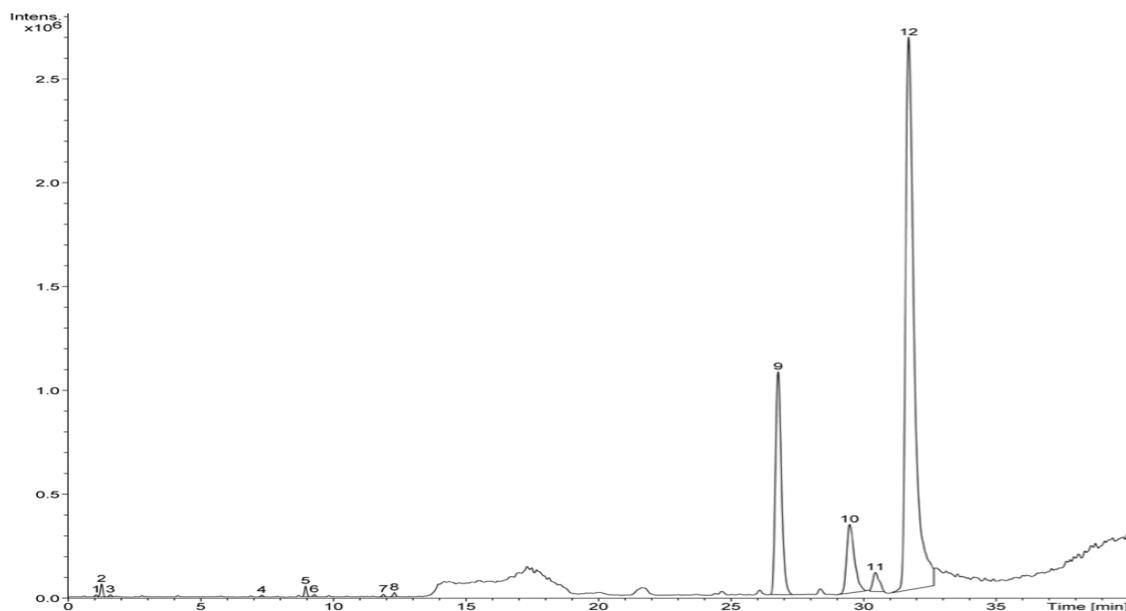


Figura 43. Cromatograma de HPLC de la fracción CYST-M en la que se observa la presencia de doce picos de los cuales el pico nueve corresponde a la Aeruginosina KT608A o KT608B.

Tabla 15. Posible identificación de compuestos de acuerdo a su peso molecular, mostrado en el espectro correspondiente a la fracción CYST-M. TR = Tiempo de retención (min), $M+M^+$ = Peso molecular mas el aducto (H, Na, K, etc.) y M = Peso molecular.

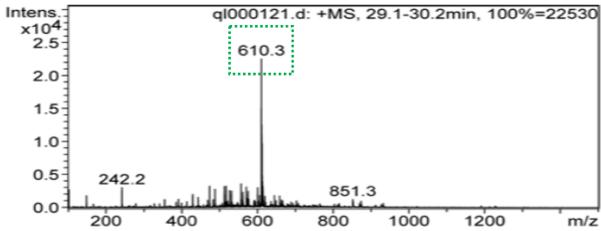
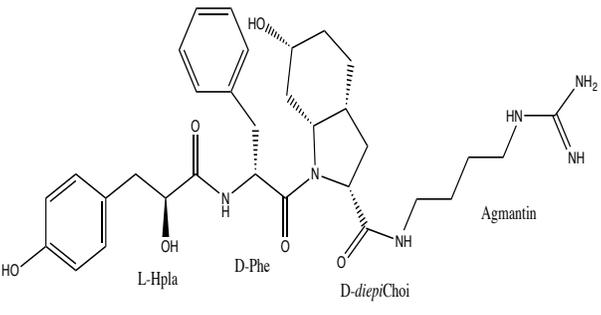
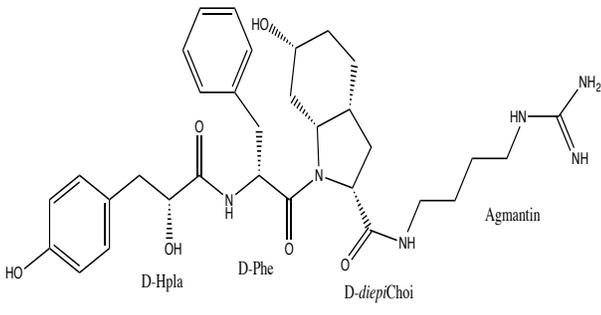
Compuesto	TR (min)	$M+M^+$	M	Espectro/Estructura química
Aeruginosina KT608A	29.5	(M+2H)		Cmpd 6, 29.5 min 
		610	608	
				
Aeruginosina KT608B		(M+2H)		
	610	608		

Tabla 16. Metabolitos secundarios identificados en *Microcystis aeruginosa*, en los que se comprende la identificación del compuesto por espectrometría de masas identificando el ión aducto.

Nombre del metabolito/ Autor	Masa molecular (M)/M ⁺ (Aducto)	Masa molecular (M)
	M + M ⁺ = (M + Na)	
Micropeptina KT1042 (Lifshits y Carmeli, 2012)	1065	1042
Micropeptina SF909 (Lifshits y Carmeli, 2012)	932	909
Micropeptina HM978 (Lifshits y Carmeli, 2012)	1001	978
Micropeptina HU909 (Gesner-Apter y Carmeli 2009)	932	909
Micropeptina HU989 (Gesner-Apter y Carmeli 2009)	1012	989
Micropeptina HU975 (Gesner-Apter y Carmeli 2009)	998	975
Aeruginosina KT650 (Lifshits y Carmeli, 2012)	673	650
Aeruginosina GH553 (Lifshits y Carmeli, 2012)	576	553
Aeruginosina GE810 (Elkobi-Peer <i>et. al.</i> , 2012)	833	810
Aeruginosina GE766 (Elkobi-Peer <i>et. al.</i> , 2012)	789	766
Planktociclina-S-Oxido (Lifshits y Carmeli, 2012)	839	816
Planktociclina-iso-S-Oxido (Lifshits y Carmeli, 2012)	839	816
Microcistina-AR (Brittain <i>et. al.</i> , 2000)	975	952
M + M⁺ = (M + K)		
Micropeptina HU895 (Gesner-Apter y Carmeli 2009)	934	895
M+ M⁺ = (M+H-2SO₃)		
Micropeptina HU1069 (Gesner-Apter y Carmeli 2009)	910	1069
M+ M⁺ = (M+Na-SO₃)		
Micropeptina HU1041 (Gesner-Apter y Carmeli 2009)	984	1041
Micropeptina HU1021 (Gesner-Apter y Carmeli 2009)	964	1021
M + M⁺ = (M + H)		
Micropeptina HU895B (Gesner-Apter y Carmeli 2009)	896	895
Anabaenopeptina HU892 (Gesner-Apter y Carmeli 2009)	893	892
Aeruginosina GE686 (Elkobi-Peer <i>et. al.</i> , 2012)	687	686
Aeruginosina GE730 (Elkobi-Peer <i>et. al.</i> , 2012)	731	730
Aeruginosina GE642 (Elkobi-Peer <i>et. al.</i> , 2012)	643	642
Aeruginosina KT608A (Lifshits y Carmeli, 2012)	609	608
Aeruginosina KT 608B (Lifshits y Carmeli, 2012)	609	608
Pseudoseruginosina KT554 (Lifshits y Carmeli, 2012)	555	554
Anabaenopeptina F (Lifshits y Carmeli, 2012)	851	850
Microcistina-LR [D-Asp ³] (Brittain <i>et. al.</i> , 2000)	981	980
Microcistina-LR (Brittain <i>et. al.</i> , 2000)	995	994
Microcistina D-Ala, L-Tyr, D-MeAsp, L-Arg, D-Glu (Sivonen <i>et. al.</i> , 1992)	1031	1030
Microcistina D-Ala, L-Leu, D-Asp, L-Arg, D-Glu (Sivonen <i>et. al.</i> , 1992)	967	966
Microcistina D-Ala, L-Arg, D-MeAsp, L-Arg, D-Glu (Sivonen <i>et. al.</i> , 1992)	1024	1023
Microcistina D-Ala, L-Arg, D-Asp, L-Arg, D-Glu (Sivonen <i>et. al.</i> , 1992)	1010	1009
Microcistina-RR (Oudra <i>et. al.</i> , 2001)	1038	1037
Microcistina-YR (Oudra <i>et. al.</i> , 2001)	1045	1044