



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO METABOLÓMICO DE ESPECIES DE
*NOSTOC***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

JÁCOME REBOLLO MARIANO

TUTOR DE TESIS:

DR. MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDÍVAR

MÉXICO, CDMX, NOVIEMBRE 2023





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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Dra. Fragoso Serrano Mabel Clara
VOCAL: Dr. Figueroa Saldívar Mario Alberto
SECRETARIO: Dr. Hernández Pérez Hugo Antonio
1er SUPLENTE: Dra. Pérez Vásquez Araceli
2do SUPLENTE: Dra. Flores Bocanegra Laura Cecilia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 125, Edificio de Bioquímica y Farmacia, Conjunto E, Facultad de
Química, UNAM

SUSTENTANTE:



Mariano Jácome Rebollo

SUPERVISOR TÉCNICO:



M. en C. Carlos Daniel Hernández Granillo

TUTOR:



Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química (FQ) por contribuir a mi desarrollo profesional durante todos estos años.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA PAPIIT IN203923) y al Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado (PAIP 5000-9145) de la FQ, por los financiamientos otorgados para la realización de este proyecto.

Al Departamento de Superación Académica (DSA) por el apoyo otorgado a través del Subprograma 127 “Formación Básica en la Investigación” (1 de septiembre de 2022 al 31 de agosto de 2023).

Al Dr. Nicholas H. Oberlies de la Universidad de Carolina del Norte en Greensboro, Carolina del Norte, EE. UU., por el registro de los espectros de masas de alta resolución; al Dr. Scott A. Jarmusch de la Technical University of Denmark, por su apoyo con los análisis GNPS; al QFB Alejandro Camacho Cruz del Cepario de la FQ, UNAM, y al Dr. Rodolfo García Contreras de la Facultad de Medicina, UNAM, por proporcionar las cepas bacterianas para la realización de los ensayos biológicos. Al M. en C. Albert Danilo Patiño Restrepo por su apoyo con los ensayos de actividad fitotóxica; y al Dr. Eberto Novelo Maldonado de la Facultad de Ciencias, UNAM, por proporcionar los organismos objeto de estudio.

A mí asesor, el Dr. Mario A. Figueroa Saldívar, que tiene mi completa admiración como investigador por su enseñanza, apoyo y orientación durante el desarrollo de este proyecto. Así como por, permitirme ser parte de su grandioso grupo de trabajo, tenerme la paciencia y la confianza como su alumno.

Adicionalmente, agradezco a mis sinodales y supervisor técnico, por su tiempo y valiosos comentarios que enriquecieron este manuscrito.

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Metabolómica	2
2.1.1 Técnicas analíticas en estudios metabolómicos	2
2.1.2 Niveles confianza en identificación de metabolitos	4
2.2 Herramientas computacionales como apoyo en los estudios de metabolómica	4
2.2.1 Pretratamiento de datos con MZmine	5
2.2.2 Visualización de datos a través de redes moleculares	5
2.2.3 Análisis de datos con MetaboAnalyst.....	6
2.3 La metabolómica global y los productos naturales	6
2.4 Cianobacterias como fuente de obtención de metabolitos especializados	8
2.4.1 Metabolitos especializados de cianobacterias con actividades biológicas de interés para el ser humano.	9
2.4.2 Cianotoxinas.....	10
2.4.3 Cianobacterias del género <i>Nostoc</i>	11
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 Objetivo general.....	14
3.2 Objetivos particulares	14
4. HIPÓTESIS.....	16
5. SECCIÓN EXPERIMENTAL	17
5.1 Acondicionamiento y preparación de los extractos orgánicos a partir de cultivos en medio sólido de <i>Nostoc</i> sp. y <i>Nostoc sphaericum</i>	17
5.2 Cultivo y preparación de extractos orgánicos a partir de cultivos en medio líquido de <i>Nostoc</i> sp. y <i>N. sphaericum</i>	18

5.3 Estudio metabolómico preliminar	18
5.3.1 Pretratamiento de datos con MZmine	19
5.3.2 Análisis por redes moleculares clásicas.....	19
5.3.3 Análisis por <i>Feature-Based Molecular Networking</i> (FBMN)	20
5.3.4 Tratamiento de datos con MetaboAnalyst	20
5.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las <i>Nostoc</i> contra bacterias del grupo <i>ESKAPE</i>	21
5.5 Evaluación de la actividad fitotóxica.....	22
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
6.1 Acondicionamiento de las dos especies de <i>Nostoc</i> y obtención de extractos orgánicos	23
6.2 Evaluación de actividad antibacteriana de los extractos orgánicos	28
6.3 Evaluación de actividad fitotóxica de los extractos orgánicos	29
6.4 Análisis quimiométricos de extractos orgánicos de las <i>Nostoc</i>	32
6.4.1. Análisis de componentes principales de los extractos orgánicos	32
6.4.2. Mapas de calor de los extractos orgánicos de las <i>Nostoc</i>	34
6.5 Análisis por redes moleculares.	36
6.5.1 Red molecular global de las <i>Nostoc</i> estudiadas.....	36
6.5.2. <i>Feature Based Molecular Networking</i> de <i>Nostoc</i> sp.....	39
6.5.3. <i>Feature Based Molecular Networking</i> de <i>Nostoc sphaericum</i>	42
6.5.4. Derreplicación manual de las <i>Nostoc</i> estudiadas.....	47
7. CONCLUSIONES	49
8. REFERENCIAS.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principales actividades biológicas de metabolitos especializados producidos por cianobacterias.....	9
Figura 2. Cultivos en medio sólido y líquido BG ₁₁ de <i>Nostoc</i> sp. (A) y <i>Nostoc sphaericum</i> (B).	23
Figura 3. Rendimientos de los EBMSs de las <i>Nostoc</i>	25
Figura 4. Rendimientos de los EMLs y EBMLs de las <i>Nostoc</i>	25
Figura 5. Comparación de los perfiles cromatográficos de la corriente total de iones (TIC, por sus siglas en inglés) en modo positivo de los EMLs respecto al medio BG ₁₁	26
Figura 6. Comparación de perfiles cromatográficos de la TIC en modo positivo entre EBMLs y EMLs de <i>N. sphaericum</i> de apariencia amarilla y verde	27
Figura 7. Comparación de perfiles cromatográficos en modo positivo entre EBMSs de <i>N. sphaericum</i>	28
Figura 8. Promedio de longitud radicular de las semillas tratadas con los EMLs a 200 y 20 ug/mL, y con el blanco de medio BG ₁₁ a 157.1 ug/mL (* denota diferencia significativa respecto al control negativo)	30
Figura 9. Promedio de longitud radicular de las semillas tratadas con los EBMSs a 200 y 20 ug/mL (* denota diferencia significativa respecto al control negativo)	30
Figura 10. Promedio de longitud radicular de las semillas tratadas con los EBMLs a 200 y 20 ug/mL; EBML8 se evaluó únicamente a 185.7 ug/mL (* denota diferencia significativa respecto al control negativo)	31
Figura 11. Inhibición del crecimiento radicular en semillas de <i>A. thaliana</i> por efecto de los extractos EBML3 y EBMS3 a 200 y 20 ug/mL.....	32
Figura 12. Comparación de las naturalezas de los extractos orgánicos de las <i>Nostoc</i> determinado por PCA.	33
Figura 13. Mapa de correlación de los extractos orgánicos de las <i>Nostoc</i> , en cuadros amarillos se resaltan las correlaciones más elevadas.	34
Figura 14. Mapa de calor comparando la presencia (basada en la intensidad del ion) de los 25 iones más diferentes en el total de extractos (A) y en extractos provenientes exclusivamente de biomasa (B).	35

Figura 15. RM global de las <i>Nostoc</i> estudiadas. Se muestran las agrupaciones de al menos 3 nodos y la clasificación química asignada a cada clúster	37
Figura 16. Clasificación en familias químicas de clústeres de la RM dada por <i>MolNetEnhancer</i>	37
Figura 17. Distribución de los nodos de la RM global en función del sistema de elución empleado (izquierda) y de la especie de cianobacteria (derecha).....	38
Figura 18. Estructuras químicas de la 17(21)-hopen-6-ona (A), el ácido N-acetil murámico (B) y el ácido xanturénico (C).....	39
Figura 19. FBMN de <i>Nostoc</i> sp. con método A (A) y método B (B); con anotaciones seleccionadas	40
Figura 20. Patrón de fragmentación del 3,25-Dihidroxihexacosil alfa-D-glucopiranosido, ion pseudomolecular en azul y fragmentos en rojo; ^a Valor tomado del GNPS	42
Figura 21. FBMN de <i>N. sphaericum</i> con método A, con anotaciones seleccionadas.	43
Figura 22. FBMN de <i>N. sphaericum</i> con método B, con anotaciones seleccionadas.	43
Figura 23. Patrón de fragmentación de la Feofitina A, ion pseudomolecular en azul y fragmentos en rojo; ^a Valor tomado del GNPS	45
Figura 24. Patrón de fragmentación de la Kalkipirona A; ^a Valor tomado del GNPS.....	47
Figura 25. Estructura química de la Criptoficina 24 (A) y Nodularina-Har (B)	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Ventajas y limitaciones de la LC-MS/MS como técnica analítica en estudios metabolómicos.....	3
Tabla 2. Niveles de confianza con sus respectivos criterios en la identificación de metabolitos.	4
Tabla 3. Ejemplos de metabolitos especializados de cianobacterias.....	10
Tabla 4. Ejemplos de cianotoxinas.....	11
Tabla 5. Ejemplos de metabolitos de interés de cianobacterias del género <i>Nostoc</i>	12
Tabla 6. Resumen de los extractos orgánicos de las <i>Nostoc</i> preparados a partir de los medios sólidos BG ₀ y BG ₁₁	24
Tabla 7. Resumen de los extractos orgánicos de las <i>Nostoc</i> preparados a partir de los cultivos en medios líquido BG ₁₁	24
Tabla 8. Resumen de los resultados de la evaluación de extractos orgánicos contra bacterias del grupo <i>ESKAPE</i>	29
Tabla 9. Resumen de los resultados de los extractos más activos en la evaluación fitotóxica.....	31
Tabla 10. Anotaciones automáticas por el GNPS de la RM global.....	38
Tabla 11. Características principales de la FBMN de <i>Nostoc</i> sp. con método A y método B	41
Tabla 12. Anotación química de metabolitos en <i>Nostoc</i> sp.....	41
Tabla 13. Características principales de la FBMN de <i>N. sphaericum</i> con método A y método B.....	44
Tabla 14. Anotación química de metabolitos en <i>Nostoc sphaericum</i>	44
Tabla 15. Derreplicación manual de metabolitos de las <i>Nostoc</i> estudiadas	47

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Å	Armstrong	g	Gramo
°C	Grados Celsius	GNPS	<i>Global Natural Products Social Molecular Networking</i>
µg	Microgramo	h	Hora
µL	Microlitro	H ₂ O	Agua
µM	Micromolar	HRESIMS	Espectrometría de masas de alta resolución por ionización con electrospray
µm	Micrómetro	Ile	Isoleucina
AcOEt	Acetato de etilo	kDa	Kilodalton
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	kV	Kilovolt
AMP	Adenosín monofosfato	L	Litro
BG _{11/0}	<i>Blue green medium</i>	LB	Caldo Luria-Bertani
BGC	<i>Biosynthetic gene cluster</i>	LC	Cromatografía de líquidos
CFM-ID	<i>Competitive fragmentation modeling for metabolite identificación</i>	LC-MS/MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem
CHCl ₃	Cloroformo	LED	<i>Light emitting diode</i>
CMH	Caldo Müeller-Hinton	lx	Lux
CMI	Concentración mínima inhibitoria	<i>m/z</i>	Relación masa-carga
IDH	Índice de deficiencia de hidrógeno	MeCN	Acetonitrilo
DMSO	Dimetil sulfóxido	MeOH	Metanol
DNP	<i>Dictionary of Natural Products</i>	mg	Miligramo
EBML	Extracto de la biomasa de medio líquido	min	Minuto
EBMS	Extracto de la biomasa de medio sólido	mL	Mililitro
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético	mm	Milímetro
EML	Extracto del medio líquido	MoNA	<i>MassBank of North America</i>
ESI	Electrospray	MS	Espectrometría de masas
eV	Energía de colisión	MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
FBMN	<i>Feature-Based Molecular Networking</i>	MS²	
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
FTP	Protocolo de transferencia de datos	NIH	<i>National Institutes of Health</i>
		NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i>

nm	Nanómetro	rpm	Revoluciones por minuto
NPA	<i>Natural Products Atlas</i>	s	Segundo
OATP	<i>Organic anion transporter polypeptide</i>	SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
PCA	Análisis de componentes principales	sp.	Especie
PDA	Detector de arreglo de fotodiodos	spp.	Especies
pH	Potencial de hidrógeno	t_R	Tiempo de retención
ppm	Partes por millón	UMP	Uridina monofosfato
PN	Producto natural	UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia
Pro	Prolina	UPLC-HRMS-MS/MS	Cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem de alta resolución
RM	Red molecular	V	Volumen
RMN	Resonancia nuclear magnética	VHS	Virus del herpes simple

1. INTRODUCCIÓN

En este trabajo se realizó el estudio metabolómico, químico y biológico preliminar de dos especies de cianobacterias del género *Nostoc*, una aislada de humedales en Yalahau, Quintana Roo, y la otra de las orillas del río Magdalena en los Dinamos de Contreras. El interés por estas cianobacterias presentes en nichos ecológicos nacionales poco explorados reside en que su diversidad química no ha sido previamente estudiada, por lo tanto, representan una potencial fuente de metabolitos especializados novedosos.

El desarrollo de este trabajo inició con el acondicionamiento de las *Nostoc* en medios de cultivo sólidos y líquidos, para la posterior preparación de extractos orgánicos a partir de su biomasa y sobrenadante del medio líquido. Los extractos orgánicos fueron evaluados contra una serie de bacterias del grupo *ESKAPE* y en un ensayo biológico de actividad fitotóxica sobre semillas de *Arabidopsis thaliana*.

De forma paralela, se realizaron estudios de metabolómica no dirigida sobre los extractos orgánicos mediante la comparación de sus perfiles cromatográficos y el empleo de herramientas computacionales enfocadas al análisis de datos espectrométricos, siendo las redes moleculares el principal recurso de estudio. Cabe señalar que estas últimas permiten visualizar la diversidad química de las especies estudiadas, además de favorecer la anotación de metabolitos secundarios, que, por su baja abundancia en los extractos, se limita su aislamiento por métodos cromatográficos convencionales.

Así, mediante los análisis metabolómicos y los ensayos de actividad biológicas se lograron identificar de forma presuntiva algunos metabolitos especializados producidos por las *Nostoc* objeto de estudio, siendo este trabajo pionero sobre este tipo de cianobacterias de México.

2. ANTECEDENTES

2.1 Metabolómica

La metabolómica es una de las principales ciencias “ómicas” cuyo objetivo radica en estudiar metabolitos de bajo peso molecular (menor a 2 kDa) en un determinado organismo, a partir de muestras biológicas como extractos orgánicos obtenidos de la biomasa, o incluso del medio de cultivo para aquellos metabolitos de naturaleza exógena¹.

Esta ciencia destaca debido a que ha permitido la anotación de metabolitos desconocidos o que no fueron reconocidos previamente en un organismo de estudio. Adicionalmente, concede la visualización de un espacio químico como consecuencia de condiciones ambientales sobre el metabolismo².

Existen dos formas principales de conducir un estudio de metabolómica: dirigida y no dirigida. En la primera, se identifica y/o cuantifica una serie limitada de metabolitos previamente conocidos en una muestra biológica. Este enfoque, tiene como objetivo emplear estándares de referencia para validar la relación entre metabolitos específicos y el contexto fisiológico o genético de un organismo dado³.

Por otro lado, la metabolómica no dirigida tiene como objetivo explorar la diversidad de metabolitos presentes en una muestra sin conocimiento previo de la misma, por lo que no existe una hipótesis *a priori* acerca del perfil metabolómico. En este caso, se realiza una identificación presuntiva de compuestos con base en la comparación contra bibliotecas de espectros de masas¹.

2.1.1 Técnicas analíticas en estudios metabolómicos

La resonancia magnética nuclear (RMN) y la cromatografía de líquidos acoplada espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) son técnicas analíticas de las que hace uso la metabolómica para cumplir sus objetivos, siendo la última la primera opción en estos estudios debido su alta sensibilidad y versatilidad en la detección de diversos metabolitos en muestras biológicas complejas⁴. No obstante, existen limitaciones asociadas a esta técnica instrumental (**Tabla 1**).

Tabla 1. Ventajas y limitaciones de la LC-MS/MS como técnica analítica en estudios metabolómicos⁵.

Ventajas	Limitaciones
<ul style="list-style-type: none"> • Alta sensibilidad a componentes minoritarios en la muestra. • Tiempo corto de adquisición de datos. • Requiere cantidad mínima de muestra. • Versatilidad en la capacidad de detección de metabolitos. • La preparación de muestra es sencilla. 	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia de iones isobáricos o co-eluyentes complican el análisis de espectros de fragmentación. • Variaciones de acuerdo con el tipo de espectrómetro de masas. • Depende en la ionización eficiente de metabolitos. • Dificultad en la determinación de falsos positivos. • Las anotaciones realizadas dependen de la disposición y accesibilidad a bibliotecas espectrales. • Limitada capacidad de diferenciación entre isómeros.

Cabe mencionar que la extensión de metabolitos a detectar esta influenciada por la naturaleza de la muestra.⁴ Por ejemplo, en el estudio de un microorganismo, los compuestos presentes en una muestra de biomasa pueden estar en trazas o incluso ausentes en el sobrenadante del medio de cultivo, o viceversa. Por lo que, la diversidad química a observar será dependiente de la muestra.

De forma breve, la LC promueve la separación de metabolitos en función de su grado de interacción con la fase móvil y la fase estacionaria. En segundo lugar, la MS detecta la relación masa-carga (m/z) de los metabolitos que se convierten en especies cargadas al pasar por una fuente de ionización. Los iones generados tienden a fragmentarse o formar aductos por la propia energía adquirida en el paso de ionización.

En el caso de la MS en tándem, MS/MS o MSⁿ, se emplean técnicas de fragmentación *in situ* (en la fuente de ionización) o trampas que seleccionan iones provenientes de la ionización inicial de la muestra, con la finalidad de que experimenten “n” número de fragmentaciones. Los iones producto brindan información estructural de los metabolitos. Cabe destacar que el grado y tipo de fragmentación de una molécula depende de varios factores, entre ellos, el método de ionización, el gas de colisión, la energía de colisión (eV), entre otros⁶.

La incorporación de analizadores de masa de sector magnético, como el Orbitrap, o de Tiempo de Vuelo (TOF), le confiere a la técnica una alta sensibilidad en la medición de la relación m/z . Estas técnicas se denominan de alta resolución (HR), ya que permite distinguir dos picos con valores de m/z muy cercanos, con ligeras diferencias en la tercera o cuarta cifra del orden de magnitud. Por consiguiente, se facilita la determinación de la composición elemental inequívoca de un compuesto, para su posterior identificación o anotación.⁷

2.1.2 Niveles confianza en identificación de metabolitos

Como se mencionó anteriormente, algunos de los problemas de emplear la LC-MS/MS en la anotación de metabolitos es la identificación de falsos positivos, la capacidad limitada de diferenciar isómeros y la existencia de especies co-eluyentes. Como respuesta, se han propuesto una serie de criterios para evaluar la confianza con la que se realiza la identificación de un compuesto (**Tabla 2**)^{1,8}.

Tabla 2. Niveles de confianza con sus respectivos criterios en la identificación de metabolitos.

Nivel de confianza	Criterio
5	Valor experimental de m/z con error aceptable (± 5 ppm)
4	Determinación de fórmula molecular con error aceptable (± 5 ppm)
3	Estructura tentativa: coincidencia al comparar m/z (en MS ¹) con error aceptable (± 5 ppm)
2	Identificación presuntiva: Coincidencia con espectro de fragmentación (MS/MS) con error aceptable (± 5 ppm)
1	Identificación validada: Confirmación al comparar con un estándar de referencia bajo condiciones analíticas idénticas

2.2 Herramientas computacionales como apoyo en los estudios de metabolómica

La LC-MS/MS genera volúmenes masivos de datos espectrométricos, lo que dificulta su manejo de forma manual. Como solución, han surgido numerosas herramientas computacionales que facilitan la visualización, organización, análisis, interpretación y anotación de metabolitos a partir de datos de MS/MS. Estas herramientas brindan resultados que son complementarios entre sí y permiten desarrollar el análisis integrativo de datos. A continuación, se describirá brevemente las herramientas empleadas en este proyecto.

2.2.1 Pretratamiento de datos con MZmine

MZmine es un recurso de libre acceso que fue desarrollado en 2005 para el procesamiento de datos provenientes de LC-MS⁹. Con el paso de los años, este programa fue rediseñado para manejar datos de HRMS y MS/MS. Su función primordial consiste en detectar los iones (picos) y su resolución, para luego alinearlos en conjuntos de miles de muestras. Cabe mencionar que el programa tiene módulos para visualización de cromatogramas, enfrentamientos entre muestras, búsquedas en bases de datos y análisis de componentes principales, entre otras funcionalidades⁹. Además, la plataforma propicia los análisis integrativos al permitir la exportación de resultados a otras plataformas especializadas para anotación de metabolitos, como SIRIUS, MetaboAnalyst y *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS), entre otras¹⁰.

2.2.2 Visualización de datos a través de redes moleculares

Las redes moleculares (RM) son una herramienta desarrollada desde el 2012 para la organización y visualización de datos MS¹ y MS². Tras el procesamiento de los datos, se logran generar esquemas conformados por nodos unidos a través de vértices. En una red, cada nodo representa el espectro de fragmentación de un ion precursor y aquellos nodos con características afines se entrelazan para formar clústeres.

Las RM parten de la hipótesis de que moléculas estructuralmente similares van a exhibir patrones de fragmentación similares en un análisis de MS/MS. Bajo tal aserción, las RM emplean el algoritmo *MSCluster* para ejecutar una comparación masiva de espectros MS² que culmina en el agrupamiento de espectros que guardan similitud y la combinación de espectros idénticos en un espectro consenso. El coeficiente cosenoidal es el parámetro empleado para definir la similitud de los espectros y toma en consideración los siguientes aspectos: ion precursor, fragmentos del ion e intensidad de los fragmentos¹¹.

El GNPS es una plataforma en línea que ofrece recursos para realizar RM. Una de sus ventajas clave es que funciona como un repositorio de múltiples bibliotecas espectrales, lo que permite comparar datos espectrométricos experimentales con

bases de datos públicas, facilitando así la identificación de metabolitos aislados con anterioridad. Algunas de las bases de datos incluidas en el GNPS son MassBank, Metlin, mzCloud, ReSpect, NIH y las bibliotecas de la FDA, de Sigma y del NIST¹².

Adicionalmente, la plataforma proporciona una serie de herramientas cuyos resultados enriquecen la elaboración de RM. En primera instancia, *Dereplicator+*, propaga la anotación de metabolitos especializados como péptidos, policétidos, terpenos, alcaloides y otras clases de productos naturales (PNs) o metabolitos especializados¹³. En segundo lugar, *MS2LDA*, cuya función es determinar subestructuras o motivos de metabolitos en función de fragmentos y pérdidas neutrales¹⁴. Por último, *MolNetEnhancer*, permite la integrar los resultados de las herramientas anteriores para clasificar los nodos en familias químicas a través del algoritmo *ClassyFire*¹¹.

2.2.3 Análisis de datos con MetaboAnalyst

MetaboAnalyst es un servidor en línea implementado desde 2009, destinado al procesamiento, análisis, visualización y anotación de datos espectrométricos. Este programa tiene módulos de análisis de variable única, quimiométricos, de clustering jerárquico y de clasificación supervisada, por lo que lo convierte en una plataforma muy versátil capaz de realizar análisis discriminatorios e identificar atributos distintivos entre varios grupos¹⁵.

A lo largo de los años, MetaboAnalyst ha pasado por varias actualizaciones; en la más reciente (MetaboAnalyst 5.0) se ha implementado flujos de trabajo enfocados a metabolómica dirigida y no dirigida, la posibilidad de incorporar datos de otras ciencias como la transcriptómica¹⁶ e incluso definir las potenciales rutas metabólicas involucradas en la biosíntesis de un metabolito¹⁵.

2.3 La metabolómica global y los productos naturales

En los últimos años, la búsqueda de PNs a partir de plantas y microorganismos ha enfrentado el problema del reaislamiento de compuestos previamente caracterizados al costo de pérdida de recursos y tiempo¹⁷. Como solución, los enfoques de metabolómica en conjunto con estrategias computacionales han

posibilitado la inspección de los espacios químicos complejos propios de extractos orgánicos sin la necesidad de realizar fraccionamientos y purificaciones¹⁸.

Entonces, mediante la temprana derreplicación de compuestos en extractos, se crea un criterio para centrar los esfuerzos en aquellos extractos que potencialmente presentan compuestos de interés y detener el estudio de extractos poco prometedores. Este enfoque se complementa con la realización de ensayos de actividad biológica¹⁷, lo que brinda otro criterio para seleccionar las muestras cuyo estudio se debe continuar.

Otras alternativas para combatir el reislamento de PNs son la exploración de ecosistemas o ambientes poco estudiados para el aislamiento de organismos novedosos, o la activación de clústeres de genes biosintéticos (BGCs) silenciados con el propósito de aumentar la diversidad estructural de metabolitos especializados¹⁹. En el primer caso, la inclusión de la metabolómica facilita la exploración pronta de la diversidad química de los microorganismos aislados a partir de estos ecosistemas, y por ende la búsqueda de PNs novedosos.

En el segundo caso, se incorporan enfoques genómicos que mediante el uso de bibliotecas detectan clústeres de genes previamente reconocidos que participan en la biosíntesis de PNs. En conjunto, los microorganismos estudiados se someten a condiciones de cultivo variadas y a través de técnicas de metabolómica se escanean y definen qué parámetros favorecen la producción de PNs con diversidad química inusual²⁰.

Cabe mencionar que el enfoque anterior es una alternativa para explorar de forma exhaustiva a microorganismos cuyo potencial biosintético ya es reconocido, porque mediante la activación de BGCs silenciados es posible incrementar el número de compuestos producidos, así como la variabilidad estructural²⁰. En resumen, la metabolómica apoya al descubrimiento de nuevos PNs al ser una herramienta para enfrentar la limitación del reislamento de PNs previamente caracterizados.

2.4 Cianobacterias como fuente de obtención de metabolitos especializados

A lo largo de su historia, el ser humano ha aprovechado el uso de fuentes naturales disponibles a su alcance, tales como animales, hongos, plantas y microorganismos, para conseguir su propio desarrollo y bienestar. Esto, debido a que son capaces de biosintetizar moléculas de complejidad estructural diversa (PNs o metabolitos especializados) y que poseen numerosas actividades biológicas, por ejemplo, con la capacidad de combatir el cáncer y enfermedades infecciosas, entre otras²¹.

Los microorganismos, en particular las bacterias, son consideradas una fuente primordial de PNs desde el surgimiento de los antibióticos en la década de 1940. Algunas de las moléculas bioactivas descritas incluyen a la nistatina, la vancomicina, la polimixina E, entre otras. Como se mencionó en el apartado anterior, el estudio de colecciones de bacterias conocidas ha conllevado a redescubrir metabolitos especializados, como consecuencia, la búsqueda de moléculas novedosas ha impulsado el estudio de microorganismos provenientes de nichos ecológicos poco explorados, como ambientes marinos o lacustres²².

Como resultado, otros filos de bacterias adquirieron relevancia como potenciales fuentes de PNs, entre ellos las cianobacterias. Estas bacterias Gram negativo son productores primarios ya que realizan fotosíntesis oxigénica, contribuyen con la liberación de oxígeno a la atmósfera y tiene una gran capacidad para fijar nitrógeno, por lo que son eslabones clave en ciclos biogeoquímicos de nuestro planeta²³.

Desde un punto de vista biotecnológico, el interés por las cianobacterias incursiona en varios ámbitos. Por ejemplo, hay cianobacterias empleadas en el tratamiento de aguas residuales; también son una potencial fuente de biocombustibles; se ha descrito que en simbiosis con plantas acuáticas generan biofertilizantes de interés para el cultivo de arroz; e incluso se ha explorado la utilidad de sus compuestos bioactivos en el área cosmetológica y en la talasoterapia²⁴.

2.4.1 Metabolitos especializados de cianobacterias con actividades biológicas de interés para el ser humano.

En el área biomédica, las cianobacterias destacan como una fuente de moléculas bioactivas provenientes de biogénesis diversas, tales como péptidos, alcaloides, terpenoides, polisacáridos, lípidos, policétidos, entre otras²⁴. Esta diversidad química ha conllevado a encontrar moléculas que poseen actividades biológicas variadas.

En una revisión bibliográfica realizada en 2019, se encontraron más de 90 géneros de cianobacterias que producen compuestos con una gran variedad de potenciales aplicaciones benéficas para el ser humano (**Figura 1**). La mayoría de estos géneros proceden de los órdenes *Oscillatoriales*, *Chroococcales*, *Synechococcales* y *Nostocales*. La actividad citotóxica destaca como el principal atributo de los PNs obtenidos de cianobacterias, seguido por la actividad antimicrobiana²⁴⁻²⁶.

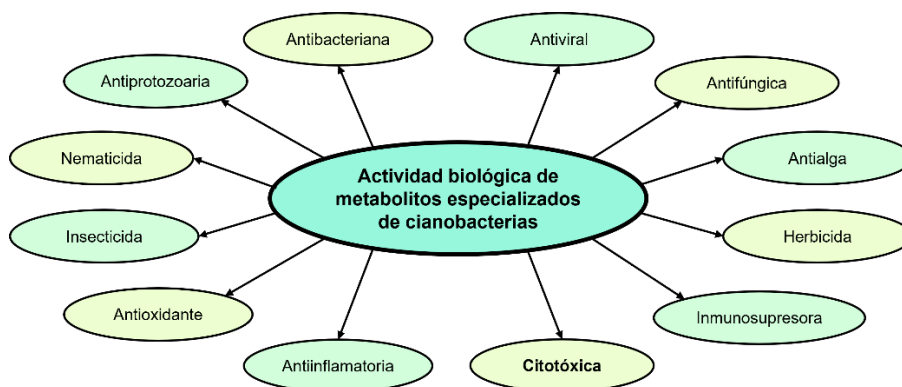
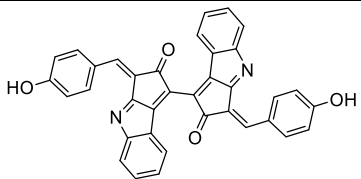
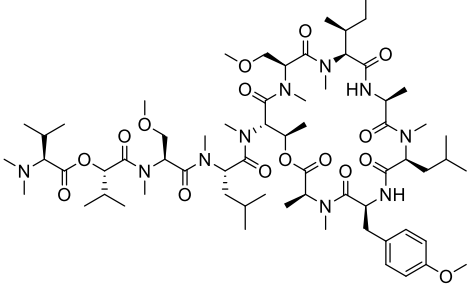
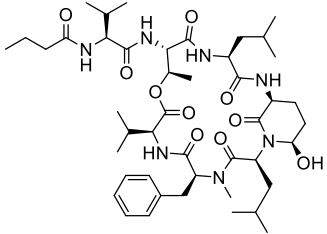
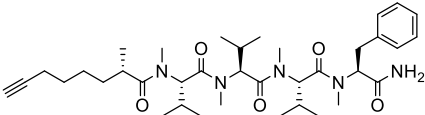
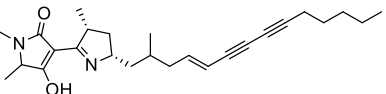
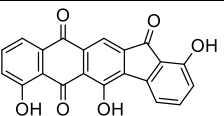
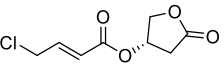


Figura 1. Principales actividades biológicas de metabolitos especializados producidos por cianobacterias.

En algunos casos, los PNs de cianobacterias fueron evaluados en estudios clínicos y contribuyeron al desarrollo de agentes terapéuticos²⁴. Por ejemplo, la dolastatina 10, producida por la cianobacteria *Symploca* sp., impulsó la síntesis de un análogo que se usa en el tratamiento del linfoma de Hodgkin²⁷. Adicionalmente, hay metabolitos que se usan como suplementos alimenticios, como es el caso del complejo proteico de ficocianinas provenientes de *Spirulina* sp, que tiene propiedades hipoglucemiantes y coadyuvan el tratamiento del síndrome metabólico²⁸; o las bacteriocinas producidas por diversas especies de cianobacterias que se emplean como probióticos²⁴. En resumen, existe una amplia

gama de PNs de distinta naturaleza química producidos por cianobacterias de numerosas especies con potencial uso biotecnológico (**Tabla 3**).

Tabla 3. Ejemplos de metabolitos especializados de cianobacterias.

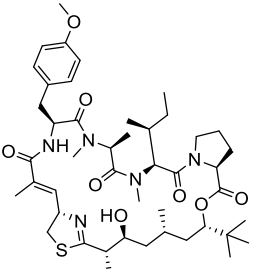
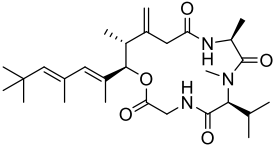
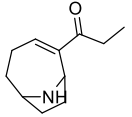
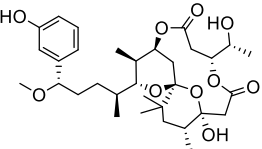
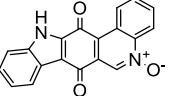
Compuesto	Clase química	Estructura	Actividad biológica	Cianobacteria
Scitonemina	Alcaloide		Antioxidante Antiinflamatoria	<i>Lyngbya</i> sp. <i>Scytonema</i> sp. <i>Nostoc</i> sp. <i>Calothrix</i> sp. <i>Rivularia</i> sp.
Coibamida A	Depsipéptido cíclico		Citotóxica	<i>Leptolyngbya</i> sp.
Tasipeptina A	Depsipéptido cíclico		Citotóxica	<i>Symploca</i> sp.
Dragonamida A	Lipopéptido alquinoico		Antiparasitaria	<i>Lyngbya majuscula</i>
Fischerelina A	Policétido		Herbicida Antifúngica	<i>Fischerella</i> sp.
Eucapsitriona	Derivado de antraquinona		Antibacteriana Citotóxica	<i>Eucapsis</i> sp.
Honaucina A	Éster		Antiinflamatoria Inhibidor de quorum-sensing	<i>Leptolyngbya crossbyana</i>

2.4.2 Cianotoxinas

Numerosas especies de cianobacterias son productoras de cianotoxinas que poseen actividad hepatotóxica, neurotóxica, cardiotóxica, entre otras²⁶. La producción de cianotoxinas es elevada en ambientes que propician el crecimiento

exponencial de las cianobacterias, y la acumulación de estos metabolitos tóxicos es perjudicial para otros organismos presentes en el ecosistema, e incluso para el ser humano²⁹. A pesar de lo anterior, estos metabolitos son de interés debido a su potencial acción como alguicidas, larvicidas, antivirales o agentes antineoplásicos³⁰ (Tabla 4).

Tabla 4. Ejemplos de cianotoxinas.

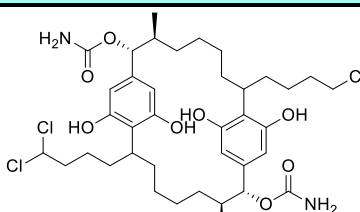
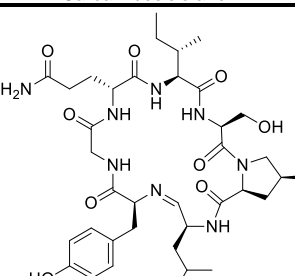
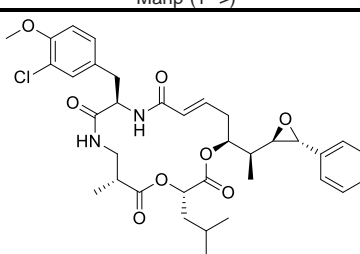
Cianotoxina	Clase química	Estructura	Actividad biológica	Cianobacteria
Apratoxina A	Depsipéptido cíclico		Citotóxica	<i>Lyngbya majuscula</i>
Antilatoxina	Lipodepsipéptido cíclico		Citotóxica	<i>Lyngbya majuscula</i>
Homoanatoxina A	Alcaloide		Citotóxica	<i>Oscillatoria formosa</i> <i>Anabaena circinalis</i> <i>Raphidiopsis mediterranea</i>
Debromoaplysiatoxina	Policétido		Antiviral	<i>Trichodesmium erythaeum</i> <i>Lyngbya majuscula</i>
Calothrixina A	Indolofenantridina		Citotóxica	<i>Calothrix</i> sp.

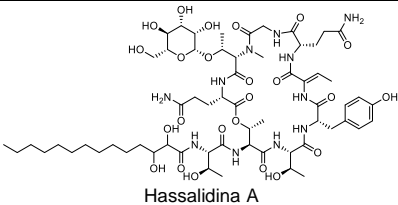
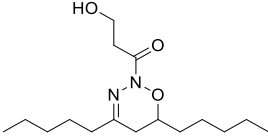
2.4.3 Cianobacterias del género *Nostoc*

El género de cianobacterias *Nostoc* perteneciente a la familia *Nostocaceae* alberga alrededor de 200 especies conocidas. Su distribución geográfica es amplia y se encuentran en ambientes marinos, terrestres y de agua dulce, incluso en asociación con esponjas o formando líquenes³¹.

El interés del ser humano hacia este género de cianobacterias data de hace aproximadamente dos mil años, en donde civilizaciones orientales como China consumían *Nostoc flagelliforme* por sus propiedades nutricionales y valor simbólico³². Actualmente, en China, India, Indonesia, Perú y Bolivia existen alimentos que contienen *Nostoc*, y destacan por su alto contenido en fibra, proteínas, aminoácidos y carbohidratos. Adicionalmente, algunas especies de *Nostoc* son relevantes por producir moléculas bioactivas con potenciales aplicaciones en varias áreas de interés para el ser humano³¹ (**Tabla 5**).

Tabla 5. Ejemplos de metabolitos de interés de cianobacterias del género *Nostoc*.

Compuesto o grupo de compuestos	Clase química	Estructura	Actividad biológica	Especie
Carbamidociclofanos	Paraciclofanos	 <p>Carbamidociclofano B</p>	Citotóxica.	<i>Nostoc</i> sp. CAVN 10
Nostociclopéptidos (A1, A2 y M1)	Heptapéptido no ribosomal	 <p>Nostociclopéptido A1</p>	Citotóxica (A1 y A2). Inhibidor de transportadores de aniones orgánicos OATP1B3 y OATP1B1 (M1).	<i>Nostoc</i> sp. ATCC 53789 (A1 y A2) <i>Nostoc</i> sp. XSPORK (M1)
Nostoflan	Polisacárido	Compuesto principalmente por secuencias de: (->4)-D-Glcp-(1->,->6,4)-D-Glcp-(1->,->4)-D-Galp-(1->,->4)-D-Xilp-(1->,-D-GlcAp-(1->,-D-Manp-(1->)	Antiviral, contra virus del herpes simple (VHS-1, VHS-2) y virus de la influenza A ³³ .	<i>Nostoc flagelliforme</i>
Criptoficinas	Depsipéptidos macrocíclicos	 <p>Criptoficina 1</p>	Citotóxica, por unión a la tubulina. Antifúngica en contra de levaduras del género <i>Cryptococcus</i> ³³ .	<i>Nostoc</i> sp. ATCC 53789 <i>Nostoc</i> sp. GSV-224

Hassalidinas	Glicolipopéptidos cíclicos	 <p>Hassalidina A</p>	Antifúngica contra <i>A. fumigatus</i> y <i>C. albicans</i> ³³ .	<i>Nostoc</i> spp.
Nocuolina A	Oxadiazina		Citotóxica ³⁴ .	<i>Nostoc</i> sp.

En México, el estudio químico de cianobacterias *Nostoc* aisladas de nichos ecológicos nacionales es incipiente. En tal contexto y con los antecedentes planteados, este proyecto busca estudiar especies de cianobacterias del género *Nostoc* cuya diversidad metabólica no ha sido explorada, con el objetivo de identificar moléculas con potencial biológico para el ser humano.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Explorar la diversidad química de los metabolitos producidos por las cianobacterias *Nostoc sphaericum*, aislada de humedales en Yalahau, Quintana Roo, y *Nostoc* sp., aislada de las orillas del río Magdalena en los Dinamos de Contreras, CDMX; mediante el uso de datos de HRMS-MS/MS y herramientas computacionales para análisis de los datos espectrométricos.

3.2 Objetivos particulares

Para el cumplimiento del objetivo general se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- Realizar una revisión bibliográfica en bases de datos especializadas (SCOPUS, SciFnder, DNP, etc.) sobre los estudios metabolómicos, químicos y biológicos de especies de *Nostoc*.
- Acondicionar y cultivar en dos medios de crecimiento (sólido y líquido) las cianobacterias objeto de estudio.
- Obtener los extractos orgánicos de las cianobacterias de estudio mediante técnicas de maceración y reparto.
- Analizar los extractos orgánicos por cromatografía de líquidos de ultra eficiencia acoplada a espectrometría de masas alta resolución (UPLC-HRMS-MS/MS).
- Realizar el análisis metabolómico de los extractos mediante derreplicación manual, tratamiento de datos espectrométricos con MZmine, elaboración de RM con la plataforma GNPS y el uso de la plataforma MetaboAnalyst.
- Evaluar el potencial antimicrobiano de los extractos obtenidos contra bacterias del grupo *ESKAPE* (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter* spp.) mediante un ensayo de microdilución en placa usando MTT como agente revelador.

- Evaluar la potencial actividad fitotóxica de los extractos obtenidos en *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 por medio de un bioensayo de inhibición de la germinación de las semillas y/o crecimiento radicular.

4. HIPÓTESIS

El uso conjunto de ensayos de actividad biológica y herramientas computacionales de metabolómica para el estudio de los extractos orgánicos de dos cianobacterias del género *Nostoc* aisladas en nuestro país, cuya diversidad metabolómica no ha sido previamente explorada permitirá la identificación presuntiva de metabolitos especializados bioactivos con fines de bioprospección.

5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

5.1 Acondicionamiento y preparación de los extractos orgánicos a partir de cultivos en medio sólido de *Nostoc* sp. y *Nostoc sphaericum*

El grupo de trabajo del Dr. Eberto Novelo Maldonado del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias de la UNAM, llevó a cabo el aislamiento de ambas cianobacterias. En el caso de *Nostoc sphaericum*, se aisló en la Reserva Ecológica El Edén, en los humedales de Yalahau, Quintana Roo. Por otro lado, *Nostoc* sp. es un ejemplar aislado del tejido foliar de un musgo de género desconocido de las orillas del río Magdalena en los Dinamos de Contreras, CDMX.

La *Nostoc* sp. fue inoculada en medio sólido BG₀ y *N. sphaericum* fue inoculada en los medios sólidos BG₁₁ 1X (nitrato de sodio, 15.00 mg/L; fosfato dipotásico, 0.31 mg/L; sulfato de magnesio, 0.36 mg/L; cloruro de calcio dihidratado, 0.37 mg/L; carbonato de sodio, 0.02 mg/L, EDTA disódico de magnesio, 0.01 mg/L; ácido cítrico, 0.05 mg/L; y citrato de amonio férrico, 0.06 mg/L) y BG₀1X (la composición es similar a la del medio BG₁₁, la diferencia reside en la falta de nitrato de sodio). Las placas se mantuvieron a una exposición de 3000 lx provista por una lámpara LED durante 5 semanas para *Nostoc* sp. y 8 semanas para *N. sphaericum*³⁵.

Posteriormente, la biomasa de cada organismo se separó del medio de cultivo mediante el raspado de la biomasa con una espátula previamente esterilizada y se liofilizó en tres ciclos con una duración aproximada de 4 h cada uno. A partir de las biomásas liofilizadas se prepararon los extractos orgánicos. Para ellos, se realizó una maceración empleando 50 mL de una mezcla CHCl₃-MeOH (1:1) por 24 h con agitación constante a 100 rpm en un agitador orbital. Una vez transcurrido el periodo de maceración, el extracto se filtró para separar la biomasa y el filtrado resultante se concentró al vacío. Posteriormente se realizaron dos maceraciones consecutivas de la biomasa separada con 50 mL de una mezcla MeOH-H₂O (7:3) para la primera y 50 mL de MeOH en la segunda, y se siguió el procedimiento anteriormente descrito hasta obtener extractos secos^{36,37}.

5.2 Cultivo y preparación de extractos orgánicos a partir de cultivos en medio líquido de *Nostoc* sp. y *Nostoc sphaericum*

A partir de cajas frescas en medio sólido de las cianobacterias, se inocularon matraces Erlenmeyer con 100 mL de medio líquido BG₁₁ al 1.0 %. Los matraces permanecieron a una exposición de 2000-3000 lx y con agitación de 50 rpm durante 10 semanas para *N. sphaericum* y 14 semanas para *Nostoc* sp. En ambos casos, el medio de cultivo se separó de la biomasa mediante filtración al vacío, y el filtrado obtenido se llevó a un pH de 2-3 empleando ácido fórmico. Luego, se realizó la extracción exhaustiva (5 veces) del medio de cultivo mediante un reparto con AcOEt. Posteriormente, se realizaron tres lavados a la fase orgánica con una disolución al 0.1 % de ácido fórmico y la fase acuosa fue desechada. Finalmente, la fase orgánica fue secada con sulfato de sodio anhidro y se concentró al vacío³⁸.

La biomasa obtenida a partir de los cultivos de medio líquido fue tratada como se describió previamente en la sección 5.1.

5.3 Estudio metabolómico preliminar

Todos los extractos obtenidos se analizaron en un sistema de cromatografía de líquidos de ultra eficiencia Acquity UPLC (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución. El sistema cromatográfico estaba equipado con una columna BEH C₁₈ (1.7 μm, 130 Å, 50 × 2.1 mm) y un detector de arreglo de fotodiodos (PDA, λ 190-500 nm). La fase móvil se compuso de mezclas entre (A) MeCN-ácido fórmico acuoso al 0.1 % o (B) MeOH-ácido fórmico acuoso al 0.1 %. En el caso del sistema (A), el método consistió en un gradiente de elución lineal con una composición inicial de 15 % de MeCN hasta 100 % de MeCN en 8 min; luego se mantuvo isocrático por 1.5 min; y finalmente se efectuó un lavado de 0.5 min con fase 100% orgánica y se regresó a las condiciones iniciales del método. El método (B) fue similar al (A), con la diferencia que la fase móvil empleada tenía una composición de 90 % de MeOH y 10 % de ácido fórmico al 0.1 %. En ambos métodos el flujo fue de 0.3 mL/min y el volumen de inyección fue de 3 μL de una solución de la muestra a 1.0 mg/mL.

Los datos de HRESIMS-MS/MS se colectaron en un espectrómetro Q-Exactive Plus (Thermo) por la técnica de ionización de electrospray en los modos positivo [ESI (+)] y negativo [ESI (-)], y se registraron scans durante todo el análisis en un intervalo de m/z de 150 a 2000, seguido de la fragmentación a nivel MS^2 de los cinco iones principales del scan de MS^1 , con cambios aleatorios de éstos últimos durante toda la corrida cromatográfica. Los parámetros de análisis de equipo de masas fueron los siguientes: voltaje del capilar, ± 5 V; temperatura del capilar, 300 °C; voltaje del espray, ± 3.8 kV; y flujo del gas auxiliar, 30 unidades arbitrarias.

5.3.1 Pretratamiento de datos con MZmine

Los datos espectrométricos de cada extracto en formato .RAW fueron convertidos al formato .mzXML con la herramienta *MSConvert* (ProteoWizard) y pretratados con el programa MZmine 3 versión 3.3.0¹⁰ empleando el siguiente flujo de trabajo: detección de masa en niveles MS^1 y MS^2 , construcción de cromatogramas con el algoritmo ADAP^{9,39}, resolución de cromatogramas, *deisotoping*, alineación, filtrado de filas, *gap-filling* y filtrado de duplicados. Los picos que tuvieran una diferencia menor al triple de la señal con respecto al blanco fueron eliminados. Los parámetros de *group intensity threshold*, *min highest intensity* y *minimum absolute height* se ajustaron en función del nivel de ruido seleccionado en el nivel MS^1 . Adicionalmente, otros parámetros ajustados fueron: *minimum group size of scans*, *m/z tolerance*, *min ratio of peak*, *peak duration ranges*, *isotopes peaks grouper*, *m/z tolerance for peak alignment*, *weight for m/z* y *peak-list rows filter*.

A partir de la base de datos del *Natural Products Atlas* (NPA), se creó una base de datos con compuestos identificados únicamente en bacterias [6], para comparar con los datos espectrométricos de las *Nostoc*. También se realizó un proceso de derreplicación manual usando el *Dictionary of Natural Products* (DNP)⁴⁰. La lista de picos en nivel MS^1 se exportó a Excel como un archivo.csv y los datos de MS^2 se exportaron como un archivo .mgf para su análisis en el GNPS.

5.3.2 Análisis por redes moleculares clásicas

Los datos espectrométricos de cada extracto en formato .RAW fueron convertidos al formato .mzML con la herramienta *Conversion Drag and Drop* implementada en

la plataforma del GNPS (gnps.ucsd.edu). Los archivos generados se transfirieron al servidor web del GNPS mediante el uso de un programa de Protocolo de Transferencia de Archivos (FTP) WinSCP versión 5.21.3. Para la generación de las RM se empleó el protocolo de trabajo establecido por Aron y colaboradores¹¹. Brevemente, los parámetros empleados para la tolerancia de masa de los iones precursores y tolerancia de los iones fragmentados MS/MS fueron 0.01 y 0.02 Da, respectivamente; para la obtención de los *edges* de la red se ajustó el valor de coseno a un puntaje superior a 0.7 y con un mínimo de 5 picos alineados; la correlación entre dos nodos se conservó si cada uno de ellos concordaba entre los 10 nodos más similares entre sí. De igual manera, los espectros integrados en la red fueron comparados respecto a bibliotecas de espectros del GNPS, se fijó el valor de 5 picos en común para determinar que existe coincidencia entre dos espectros.

Como resultado del procesamiento anterior, se obtuvieron archivos con la extensión *.cys (cytoscape sesión file)* que fueron visualizados y estudiados con programa Cytoscape v.3.9.1. Adicionalmente, el archivo resultante se analizó con las herramientas *Derreplicator*¹³ y *MS2LDA*¹⁴. Finalmente, los archivos de salida generados de los tres análisis realizados se integraron con la herramienta *MolNetEnhancer*. Los procesamientos adicionales también se ejecutaron en la plataforma del GNPS.

5.3.3 Análisis por *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN)

Con los datos previamente tratados con MZmine, se exportaron los archivos *.csv* y *.mgf* para realizar una red de tipo *Feature-Based Molecular Networking* (FBMN) en la plataforma del GNPS⁴¹. En la red se establecieron los mismos parámetros, descritos en la sección 5.3.2. De igual forma, se hizo uso de las herramientas *MS2LDA* y *MolNetEnhancer*.

5.3.4 Tratamiento de datos con MetaboAnalyst

Los datos espectrométricos de nivel MS¹, pretratados con el software MzMine, en formato *.csv* se exportaron a la plataforma del MetaboAnalyst 5.0¹⁶ para realizar análisis estadístico de un factor. Se ejecutó un análisis de componentes principales

(PCA) y se elaboró un mapa de calor seleccionando los 25 picos que sean más diferentes en el conjunto de datos analizados. Para ellos, los datos de las muestras fueron ordenadas en columnas, se seleccionó la normalización por suma y el escalado de datos tipo Pareto. Cabe destacar, que en este caso sólo se hizo uso de los datos espectrométricos obtenidos con el método (A).

5.4 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de las *Nostoc* contra bacterias del grupo *ESKAPE*

Los extractos obtenidos se evaluaron empleando el método de microdilución en placas de 96 pozos con MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] como agente revelador, contra una serie de bacterias Gram positivo [*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *S. aureus* (ATCC 25923) y *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) (ATCC 43300)] y Gram negativo [*Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978), *A. baumannii* cepa 564 (resistente a antibióticos), *Klebsiella aerogenes* (ATCC 13048), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)]. Para realizar la evaluación, las bacterias se cultivaron en caldo Müeller-Hinton (CMH), con excepción de las cepas de *A. baumannii* que fueron cultivadas en caldo Luria-Bertani (LB). Enseguida los cultivos se incubaron a 37 °C durante 24 h previas a realizar el ensayo. Al término de este periodo, se prepararon suspensiones de las bacterias en 10 mL de H₂O hasta ajustar la turbidez visualmente con la ayuda de una solución referencia de BaCl₂ al 1 % equivalente a 0.5 en la escala de McFarland. Como controles positivos se realizaron curvas de diluciones seriadas por duplicado de los siguientes antibióticos: ampicilina (*S. aureus*), gentamicina (bacterias Gram negativo) y vancomicina (*E. faecalis* y SARM)⁴². Para cada control, se prepararon disoluciones a una concentración tal que la CMI se encontrara en los pozos intermedios de la curva. Adicionalmente, se incluyeron pozos de control de crecimiento (únicamente contenían medio de cultivo y la cepa bacteriana a evaluar), control de DMSO al 2 % y control de esterilidad. En el caso de los extractos, se prepararon disoluciones stock a 10 mg/mL de DMSO, a partir de estas se obtuvieron dos disoluciones (1 mg/mL y 0.1 mg/mL) que se evaluaron por duplicado. Así, cada

pozo de prueba contenía 50 μL de extracto, 100 μL del medio de cultivo correspondiente y 100 μL de suspensión de microorganismos.

Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h para su posterior revelado con una disolución de MTT (5 mg/mL en MeOH): se agregaron 10 μL a cada pozo y las placas nuevamente se incubaron a 37 °C por 30 min. Finalmente, se determinó visualmente a las dos concentraciones de prueba si el extracto orgánico mostraba inhibición de la viabilidad celular o no, esto mediante el cambio de coloración en el pozo (amarillo a morado) debido a la reducción del MTT a formazán.

5.5 Evaluación de la actividad fitotóxica

Se realizó un ensayo de inhibición de la germinación de la semilla y/o el crecimiento de la raíz de *A. thaliana* por parte de los extractos, en cajas de Petri de 5 cm de diámetro con medio sólido Gamborg estéril (7 mL). Los extractos se disolvieron en DMSO y se probaron a dos concentraciones: 200 y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La dilución de los extractos en las placas se realizó previo a la solidificación del medio Gamborg. Como control positivo se empleó el PN tricolorina A a 9.8 μM .

En el ensayo se emplearon semillas de *A. thaliana* desinfectadas con 1 mL de hipoclorito de sodio al 20 % (v/v) y tratadas con 1 μL de Tween 20 estéril (0.1 %, v/v), con agitación de 20 min provista por un agitador eléctrico. Luego se realizaron 5 lavados sucesivos con agua estéril con periodos de agitación de 30 s y un periodo de centrifugación de 2 s entre cada lavado. Al término de este proceso de desinfección, las semillas se dejaron suspendidas en agua estéril.

Posteriormente, con una micropipeta de 1 mL, se colocaron 5 semillas en línea en la parte superior de cada placa, con una separación de al menos 0.5 cm entre ellas. En cada caja se dejó secar el exceso de agua y se sellaron con cinta Micropore. Las placas se transfirieron a una cámara con temperatura de 22 °C y se incubaron verticalmente con fotoperiodos luz/oscuridad de 16/8 h por 7 días. Finalmente, al término de la incubación, se tomaron fotografías de las placas y con ayuda del software ImageJ se hicieron las mediciones correspondientes para establecer la actividad fitotóxica.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera sección se abordará acerca del acondicionamiento en medios de cultivo de las dos especies de *Nostoc* estudiadas, así como de la preparación de los extractos orgánicos. Luego, se mostrarán los resultados de la evaluaciones antimicrobiana y fitotóxica. Finalmente, se detallarán los resultados derivados del tratamiento de los datos espectrométricos con herramientas computacionales dirigidas a estudios de metabolómica.

6.1 Acondicionamiento de las especies de *Nostoc* y obtención de extractos orgánicos

El aislamiento y acondicionamiento de las *Nostoc* spp. en placas con medio sólido BG₁₁ y BG₀ (**Figura 2**) fue realizada en el grupo de trabajo del Dr. Eberto Novelo Maldonado de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Los extractos orgánicos se prepararon a partir de la biomasa recolectada de los medios sólidos y las cantidades obtenidas se muestran en la **Tabla 6**. También a partir de estas cajas se prepararon cultivos en medio líquido BG₁₁ (**Figura 2**), y se obtuvieron sus correspondientes extractos a partir del sobrenadante y de la biomasa, cuyos rendimientos se muestran en la **Tabla 7**.

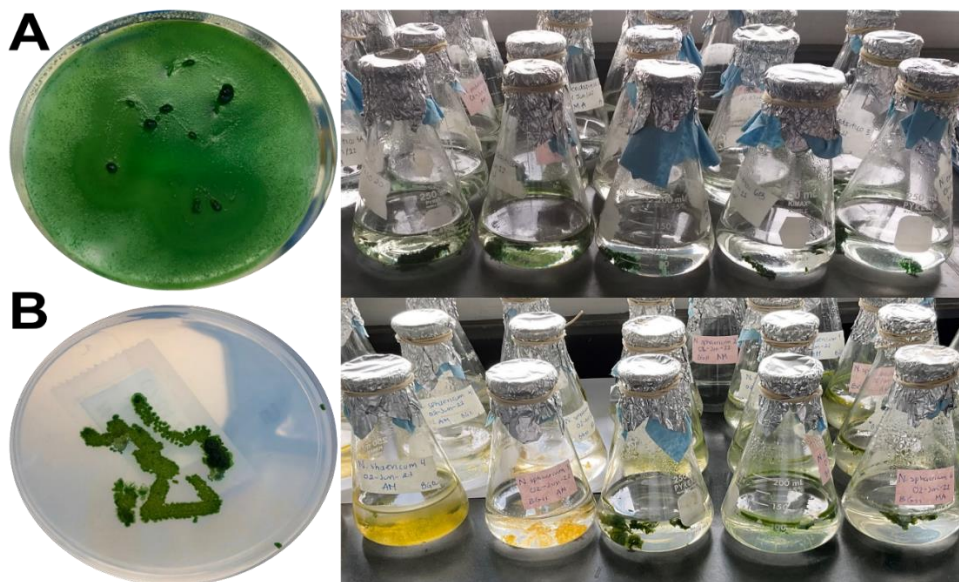


Figura 2. Cultivos en medio sólido y líquido BG₁₁ de *Nostoc* sp. (A) y *N. sphaericum* (B).

En los cultivos de *N. sphaericum* en medio líquido se observó que algunas cianobacterias adquirieron una tonalidad amarillenta a partir de la quinta semana de crecimiento, (**Figura 2B**), mientras que la mayoría de los cultivos permanecieron con el color verde similar al observado en el cultivo en medio sólido. Este cambio de apariencia se puede atribuir a un agotamiento de nutrientes, como la disminución de nitrógeno o bien, a una sobreexposición a la luz⁴³.

Tabla 6. Resumen de los extractos orgánicos de las *Nostoc* preparados a partir de los medios sólidos BG₀ y BG₁₁

Extracto	Especie	Clave del extracto	Biomasa liofilizada (mg)	Cantidad (mg)
CHCl ₃ -MeOH (1:1)	<i>Nostoc</i> sp. *	EBMS1	298.4	26.8
	<i>N. sphaericum</i> *	EBMS2	78.1	4.1
	<i>N. sphaericum</i> **	EBMS3	105.3	3.7
MeOH-H ₂ O (7:3)	<i>Nostoc</i> sp. *	EBMS4	298.4	15.4
	<i>N. sphaericum</i> *	EBMS5	78.1	6.9
	<i>N. sphaericum</i> **	EBMS6	105.3	12.0
MeOH	<i>Nostoc</i> sp. *	EBMS7	298.4	3.1
	<i>N. sphaericum</i> *	EBMS8	78.1	0.5
	<i>N. sphaericum</i> **	EBMS9	105.3	1.4

NOTA: * Medio BG₀; ** Medio BG₁₁; EBMS = Extracto de biomasa de medio sólido

Tabla 7. Resumen de los extractos orgánicos de las *Nostoc* preparados a partir de los cultivos en medios líquido BG₁₁

Extracto	Especie	Clave del extracto	Biomasa liofilizada (mg) o volumen de medio	Cantidad (mg)
AcOEt	Medio BG ₁₁	Blanco	0.1 L	4.8
	<i>Nostoc</i> sp.	EML1	2.1 L	62.7
	<i>N. sphaericum</i> *	EML2	0.9 L	25.8
	<i>N. sphaericum</i> **	EML3	1.5 L	40.6
CHCl ₃ -MeOH (1:1)	<i>Nostoc</i> sp.	EBML1	338.2	24.6
	<i>N. sphaericum</i> *	EBML2	110.4	14.7
	<i>N. sphaericum</i> **	EBML3	327.3	39.2
MeOH-H ₂ O (7:3)	<i>Nostoc</i> sp.	EBML4	338.2	12.5
	<i>N. sphaericum</i> *	EBML5	110.4	14.3
	<i>N. sphaericum</i> **	EBML6	327.3	44.0
MeOH	<i>Nostoc</i> sp.	EBML7	338.2	4.5
	<i>N. sphaericum</i> *	EBML8	110.4	5.6
	<i>N. sphaericum</i> **	EBML9	327.3	8.2

NOTA: * Color amarillo; ** Color verde; EML: Extracto del medio líquido; EBML: Extracto de la biomasa del medio líquido

De forma general, al comparar los rendimientos de los extractos de biomasa de medio sólido (EBMSs) (**Figura 3**) se aprecia que los rendimientos de *Nostoc* sp.

fueron superiores en los extractos de CHCl₃-MeOH (1:1) y MeOH, mientras que el rendimiento de *N. sphaericum* sobresalió en los extractos de MeOH:H₂O (7:3).

En el caso particular de *N. sphaericum*, se observaron mayores rendimientos en extractos cuya biomasa provenían de cultivos en medio BG₁₁, a excepción de los extractos preparados con CHCl₃-MeOH (1:1). Esto se debe a la diferencia entre BG₁₁ y BG₀ que radica en la concentración de nitrógeno, siendo el medio BG₀ reducido en dicho macronutriente. Previamente se ha descrito en especies como *Nostoc linckia*, que de 1.5 g/L a 3.0 g/L de nitrógeno se obtienen mayores cantidades de biomasa y se favorece la producción de pigmentos necesarios para el desarrollo de las cianobacterias, a diferencia de medios con menores concentraciones de nitrógeno⁴⁴.

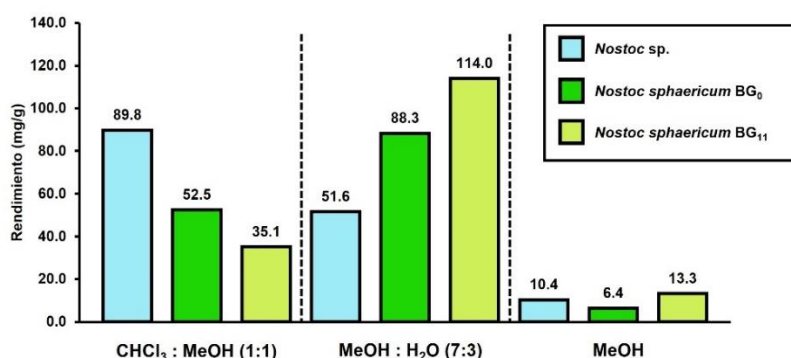


Figura 3. Rendimientos de los EBMSs de las *Nostoc*

Por otro lado, en la comparación de los rendimientos de los extractos del medio líquido (EMLs) y de la biomasa del medio líquido (EBMLs) (**Figura 4**) se determinó que los EBMLs de *N. sphaericum* tuvieron mayores rendimientos respecto a los de *Nostoc sp.* En cambio, ésta última destacó por tener un rendimiento superior en su EML. Los rendimientos más elevados se presentaron con el uso de las mezclas de CHCl₃-MeOH (1:1) y MeOH-H₂O (7:3).

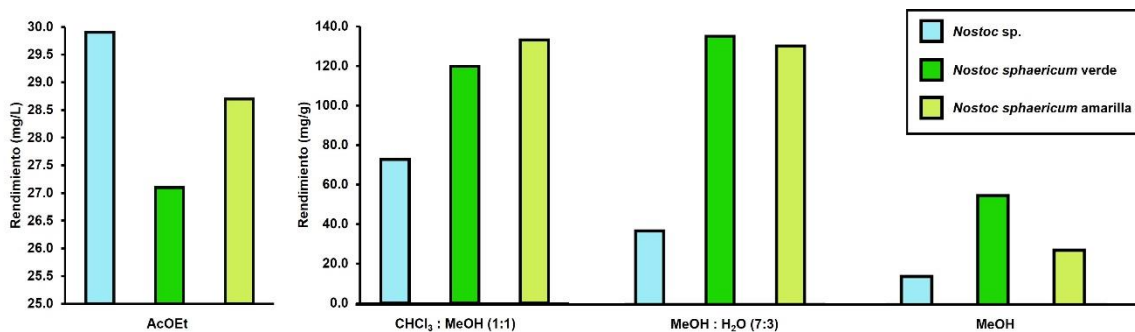


Figura 4. Rendimientos de los EMLs y EBMLs de las *Nostoc*

Adicionalmente, en ambas especies de *Nostoc*, los extractos obtenidos a partir de la biomasa tienen mayores rendimientos respecto a los EMLs, por lo que se puede inferir que la mayor parte de metabolitos producidos se concentran en la biomasa y no son expulsados al medio.

Lo anterior, se confirma mediante la comparación de los perfiles cromatográficos de los EMLs con el perfil de medio BG₁₁ (**Figura 5**). Como se observa, las muestras comparten varios picos en común con el control de medio de cultivo, por lo que, para este caso, la búsqueda de metabolitos especializados a partir del medio de cultivo resultó una estrategia poco eficaz.

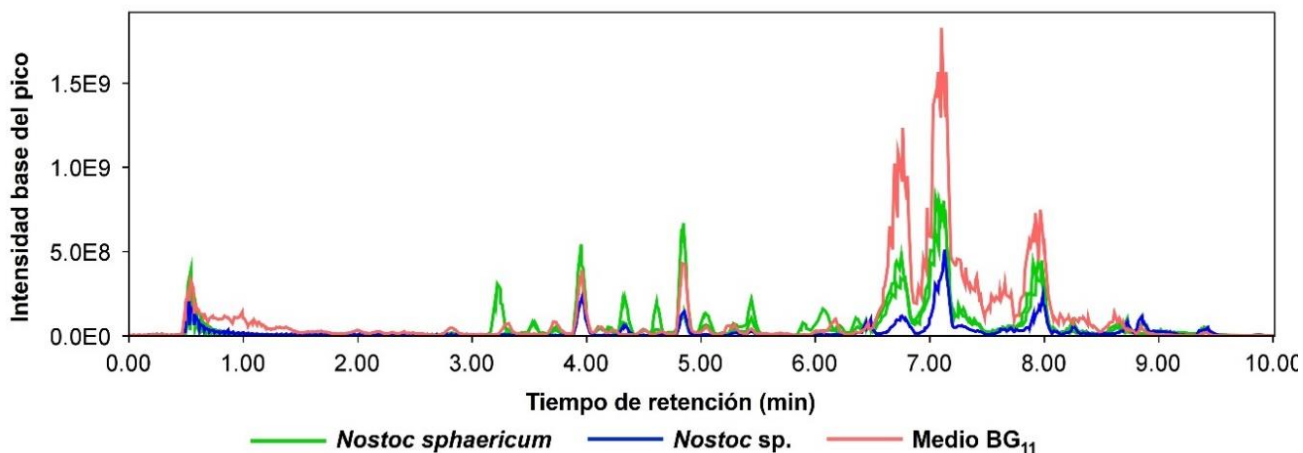


Figura 5. Comparación de los perfiles cromatográficos de la corriente total de iones (TIC) en modo positivo de los EMLs respecto al medio BG₁₁

En la comparación de perfiles cromatográficos de las *N. sphaericum* de apariencia amarilla y verde (**Figura 6**), *a priori* se observa que los EBMLs y los EMLs

presentan comportamientos similares con diferencias en la intensidad de algunos iones. No obstante, en cada par de extractos existe una menor proporción de iones que no se comparten entre EBMLs de una misma naturaleza, esto se discutirá en secciones posteriores.

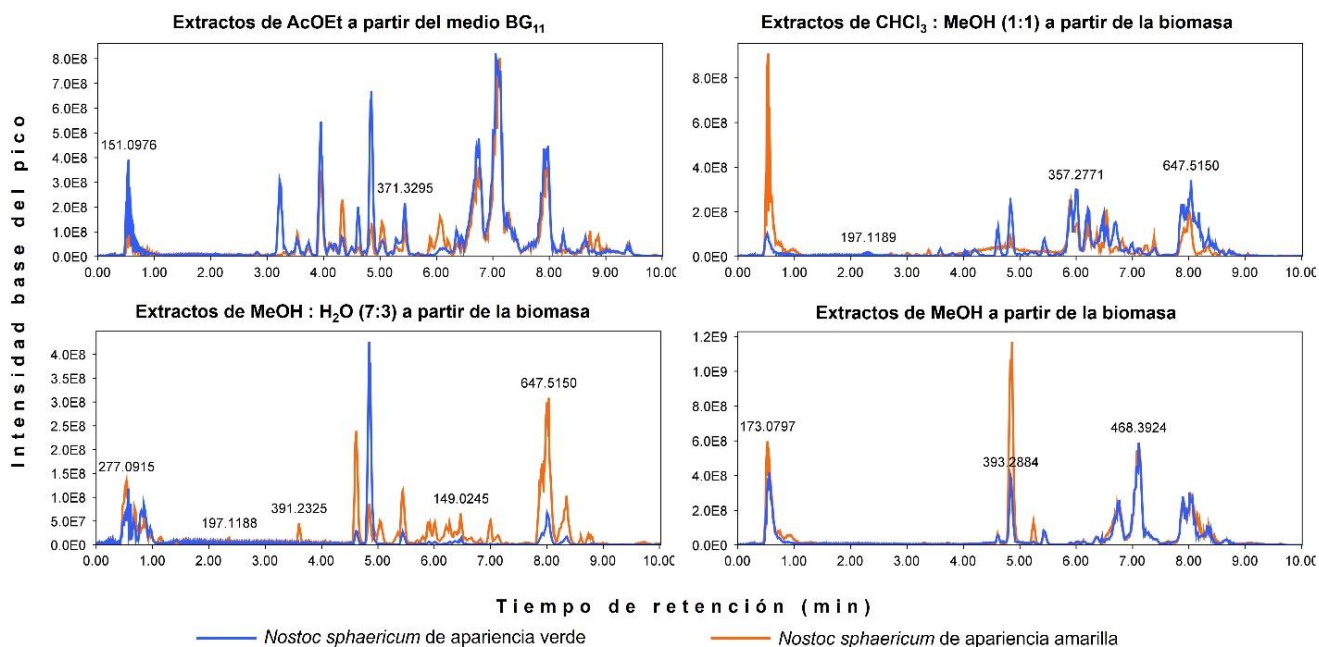


Figura 6. Comparación de perfiles cromatográficos de la TIC en modo positivo entre EBMLs y EMLs de *N. sphaericum* de apariencia amarilla y verde

De forma análoga, se realizó una comparación de los perfiles de *N. sphaericum* en los medios BG₀ y BG₁₁ (**Figura 7**), en donde se muestra que varios de los picos mayoritarios coinciden entre los tratamientos comparados, con diferencias en la intensidad base del pico. Sin embargo, en los extractos de medio BG₀ se observan picos que no están presentes en los extractos de medio BG₁₁ o cuya intensidad es muy baja respecto a su contraparte.

Lo anterior, se atribuye a la falta del nitrógeno en el medio BG₀, lo que representa un factor de estrés para la cianobacteria, cuya consecuencia es una alteración en las vías metabólicas. Para algunas cianobacterias se ha observado que en menores concentraciones de nitrógeno ocurre un aumento en la producción de fenoles, flavonoides y taninos⁴⁴.

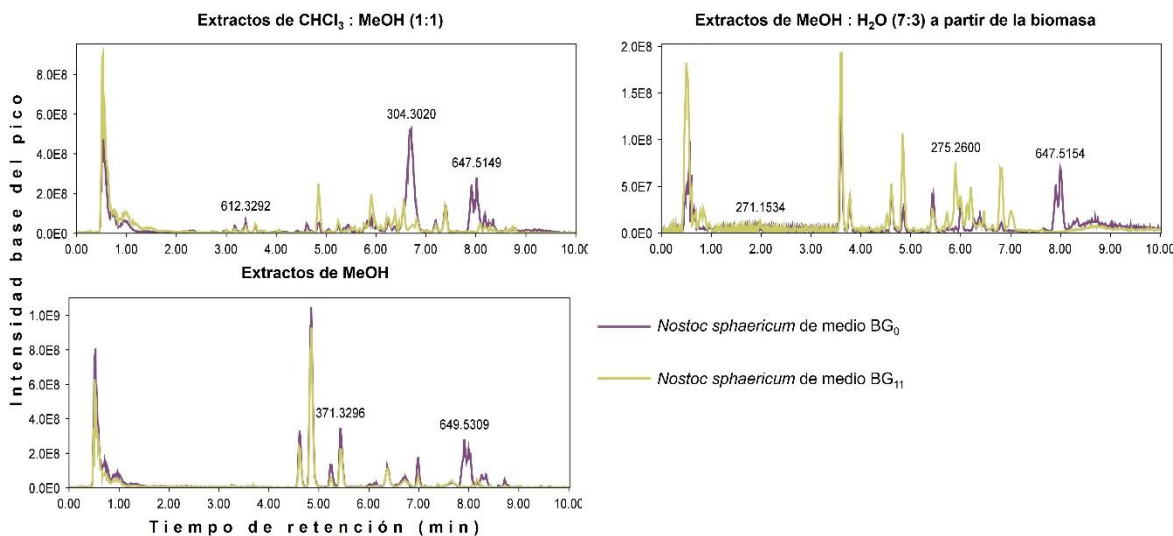


Figura 7. Comparación de perfiles cromatográficos en modo positivo entre EBMSs de *N. sphaericum*

6.2 Evaluación de actividad antibacteriana de los extractos orgánicos

Se evaluaron 20 del total de extractos orgánicos preparados sobre una batería de bacterias del grupo *ESKAPE*, de los cuales cuatro presentaron actividad parcial contra *S. aureus* (ATCC 6538) y *E. faecalis* (ATCC 29212) (**Tabla 8**). Los extractos EBMS1 y EBMS4 (*Nostoc* sp.) y EBMS3 y EBMS5 (*N. sphaericum*) mostraron actividad, siendo EBMS4 parcialmente activo contra ambas bacterias. Cabe mencionar, que dichos extractos comparten la característica de ser extractos de biomasa de medio sólido (EBMSs), pero de naturalezas distintas; CHCl₃-MeOH (1:1) (EBMS1 y EBMS3) y MeOH-H₂O (7:3) (EBMS4 y EBMS5).

Adicionalmente, la mayoría de los extractos activos provienen de cultivos en medio BG₀, lo que sugiere que la baja concentración de nitrógeno podría ser un factor relacionado con la presencia de metabolitos con actividad antibacteriana⁴⁴, a su vez esto podría explicar la ausencia de actividad en los EBMLs y EMLs ya que provienen de medio BG₁₁.

Los extractos orgánicos evaluados no mostraron actividad antibacteriana sobre SARM ni contra el grupo de bacterias Gram negativo (*K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. baumannii*).

Tabla 8. Resumen de los resultados de la evaluación de extractos orgánicos contra bacterias del grupo *ESKAPE*.

Extracto	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)
EBMS1		
EBMS3		
EBMS4		
EBMS5		
CMI (μM)^a	8.94	1.31
Control positivo	Ampicilina	Vancomicina
	Inhibición total a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	Inhibición parcial a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y total a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	Inhibición total únicamente a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	Inhibición parcial a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	Inhibición parcial únicamente a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
	Sin actividad	
^a Valor determinado experimentalmente		

6.3 Evaluación de actividad fitotóxica de los extractos orgánicos

La determinación de la actividad fitotóxica sobre *A. thaliana* se realizó con 18 del total de extractos orgánicos preparados a las concentraciones de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de las mediciones de la longitud radicular se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en conjunto con una prueba Dunnett para generar un intervalo de confianza y así comparar las medias de los tratamientos respecto a la del control negativo (DMSO 0.4 %).

En el caso EMLs (**Figura 8**) se observa que los extractos de *N. sphaericum* (EML2 y 3) disminuyeron significativamente el crecimiento radicular de las semillas a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sin embargo, en el control de medio también ocurrió una disminución significativa de la longitud radicular, por lo que, se puede atribuir que hay componentes del medio BG₁₁ involucrados en la inhibición del crecimiento de la raíz.

Este medio se constituye principalmente de sales, tales como nitrato de sodio, carbonato de sodio, cloruro de calcio, entre otras; las cuales posiblemente aumenten el nivel de salinidad tal que se induce un estrés osmótico en las semillas de *A. thaliana* y como consecuencia ocurre una alteración en el desarrollo de la planta⁴⁵.

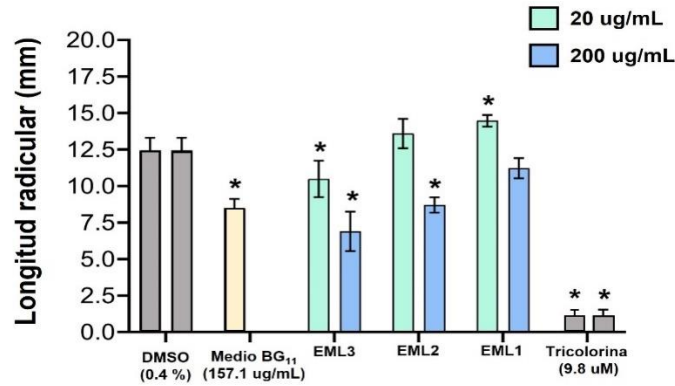


Figura 8. Promedio de longitud radicular de las semillas tratadas con los EMLs a 200 µg/mL y 20 µg/mL, y con el blanco de medio BG₁₁ a 157.1 µg/mL (* denota diferencia significativa respecto al control negativo)

En el caso de los EBMS (**Figura 9**), nuevamente los extractos provenientes de *N. sphaericum* mostraron una inhibición significativa del crecimiento. Tanto los extractos originados de cultivos en medio BG₀ (EBMS2 y EBMS5) como los provenientes de medio BG₁₁ (EBMS3 y EBMS6) fueron activos a 200 µg/mL, siendo EBMS3 el único cuya inhibición también se observó a 20 µg/mL.

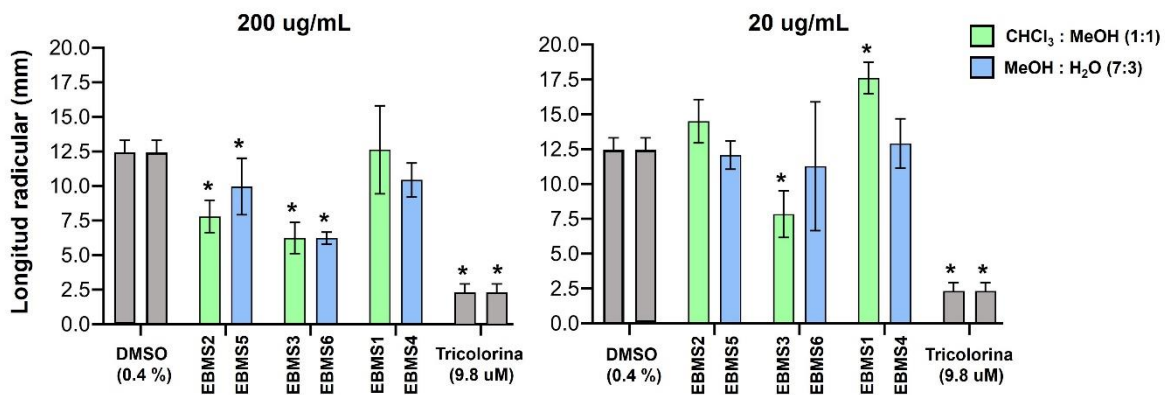


Figura 9. Promedio de longitud radicular de las semillas tratadas con los EBMSs a 200 µg/mL y 20 µg/mL (* denota diferencia significativa respecto al control negativo)

Finalmente, en los EBMLs (**Figura 10**) se repitió el hecho de que no hubo inhibición por parte de extractos de *Nostoc* sp; Los EBMLs de CHCl₃-MeOH (1:1) fueron los más activos, como es el caso de EBML2 y 3, siendo ambos activos a las dos concentraciones de prueba. Se observó que para cada par de EBMLs de una misma naturaleza hubo inhibición significativa, a excepción del par de EBMLs preparados con MeOH-H₂O (7:3), en donde EBML5 no mostró inhibición. Como se mencionó anteriormente, los EBMLs de una misma naturaleza, que difieren en su origen ya

sea de *N. sphaericum* amarilla o verde, poseen perfiles cromatográficos similares lo que explica que compartan la actividad fitotóxica observada.

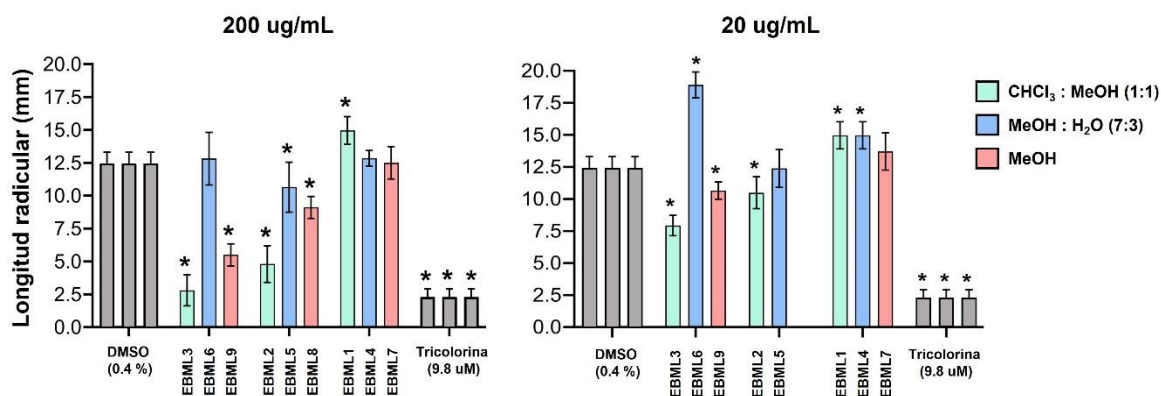


Figura 10. Promedio de longitud radicular de las semillas tratadas con los EBMLs a 200 µg/mL y 20 µg/mL; EBML8 se evaluó únicamente a 185.7 µg/mL (* denota diferencia significativa respecto al control negativo)

Los extractos que mostraron la mayor inhibición de crecimiento a ambas concentraciones evaluadas se resumen en la **Tabla 9**. Cabe resaltar que estos extractos provienen exclusivamente de *N. sphaericum*. Adicionalmente, en la **Figura 11** se muestra una comparación de EBML3 y EBMS3 respecto al control negativo.

Tabla 9. Resumen de los resultados de los extractos más activos en la evaluación fitotóxica

Extracto	200 µg/mL		20 µg/mL	
	($\bar{x} \pm DE$) mm	% de inhibición de crecimiento radicular	($\bar{x} \pm DE$) mm	% de inhibición de crecimiento radicular
EBMS3	(6.23 ± 1.13)	49.91	(7.84 ± 2.20)	36.93
EBMS6	(6.22 ± 0.43)	49.97	(11.27 ± 4.94)	9.38
EBML2	(4.80 ± 1.39)	61.45	(10.48 ± 1.24)	15.70
EBML3	(2.81 ± 1.18)	77.45	(7.93 ± 0.80)	36.25
EBML9	(5.49 ± 0.84)	55.84	(10.66 ± 0.68)	14.30

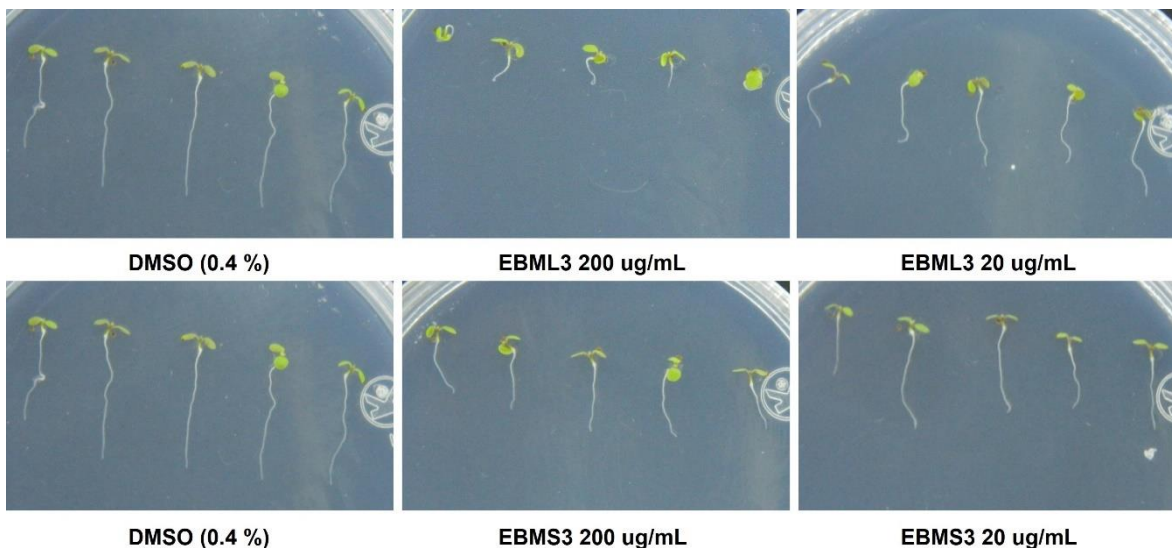


Figura 11. Inhibición del crecimiento radicular en semillas de *A. thaliana* por efecto de los extractos EBML3 y EBMS3 a 200 y 20 $\mu\text{g/mL}$

6.4 Análisis quimiométricos de extractos orgánicos de las *Nostoc*

6.4.1. Análisis de componentes principales de los extractos orgánicos

Para el estudio de la similitud de metabolitos presentes entre los extractos, se decidió realizar un análisis de componentes principales (PCA) donde la naturaleza de los extractos fue la principal variable (**Figura 12**). El PCA se ejecutó en la plataforma MetaboAnalyst 5.0 con un listado de 4410 iones presentes en los extractos tras realizar la eliminación de iones pertenecientes a blancos de disolvente y medio BG₁₁. Se seleccionaron los componentes PC2 (14.3 %) y PC3 (11.5 %), por lo que, la naturaleza de los extractos abarca el 25.8 % de la variabilidad presente entre los extractos, además estos componentes facilitaron la visualización y comparación de los extractos orgánicos.

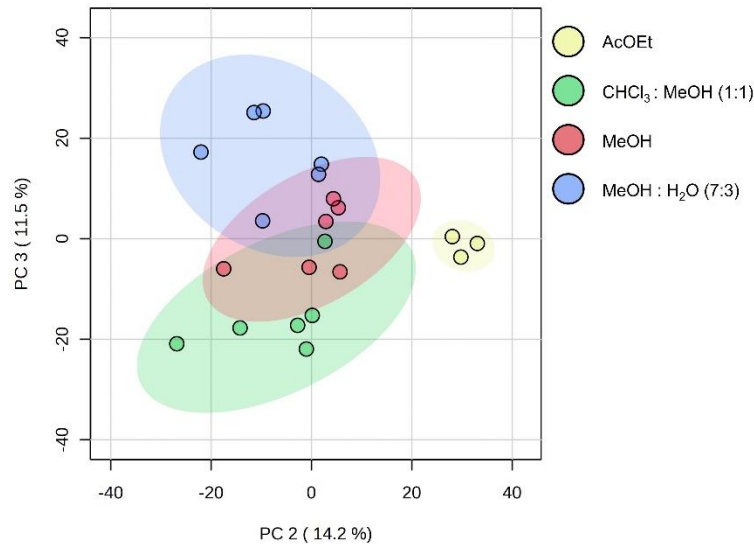


Figura 12. Comparación de las naturalezas de los extractos orgánicos de las *Nostoc* determinado por PCA.

De manera general, se observan tres agrupaciones de puntos cercanas entre sí y existe una cuarta agrupación separada de las demás. La entidad ajena corresponde a los EMLs (puntos amarillos), cuya diferencia frente a los otros grupos se atribuye a que estos extractos no provienen de la biomasa, sino del medio de cultivo, y por lo tanto correspondan a una mínima cantidad de metabolitos excretados que no se encuentran en la biomasa.

Por otro lado, las tres entidades en cercanía comparten las características de ser extractos originados de la biomasa y el empleo de MeOH en su preparación. Debido a esto, se observa que la intersección entre los extractos de CHCl₃-MeOH (1:1) (puntos verdes) y los de MeOH-H₂O (7:3) (puntos azules) corresponde a extractos preparados únicamente con MeOH (puntos rojos). Entonces, se infiere que en los extractos de biomasa hay metabolitos en común, posiblemente de polaridades similares por su afinidad hacia el MeOH. Aunado a lo anterior, la cercanía entre los grupos también se explica por el hecho de que los extractos se prepararon de forma sucesiva.

Por último, en los grupos de CHCl₃-MeOH (1:1) y H₂O-MeOH (7:3) hay extractos más alejados de la intersección y esto se asocia, en el primer grupo, a extractos que presentan mayor cantidad de metabolitos de menor polaridad respecto a los

extractos de la intersección. Por el contrario, el segundo grupo lo conforman extractos donde predominan metabolitos de mayor polaridad en comparación de aquellos presentes en la intersección.

6.4.2. Mapas de calor de los extractos orgánicos de las *Nostoc*

A partir de la matriz de 4410 iones también se elaboró un mapa de correlación entre todos los extractos preparados (**Figura 13**), lo que permite definir la similitud entre extractos que comparten características. Para empezar, se confirma la similitud de los EBMLs de *N. sphaericum* color amarillo (EBML2, 5 y 8) con sus equivalentes de *N. sphaericum* color verde (EBML3, 6 y 9, respectivamente).

De la misma forma, se observa una elevada correlación entre los EBMSs de *N. sphaericum* en medio BG₀ (EBMS 2, 5 y 8) con sus equivalentes de *N. sphaericum* en medio BG₁₁ (EBMS 3, 6 y 9, respectivamente), por lo que hay numerosos iones en común entre cada dupla de extractos correlacionadas. En el caso de los EMLs, se aprecia que los 3 EMLs comparten iones entre ellos, siendo la mayor correlación entre los EMLs de *N. sphaericum* color amarillo y verde (EML2 y 3, respectivamente).

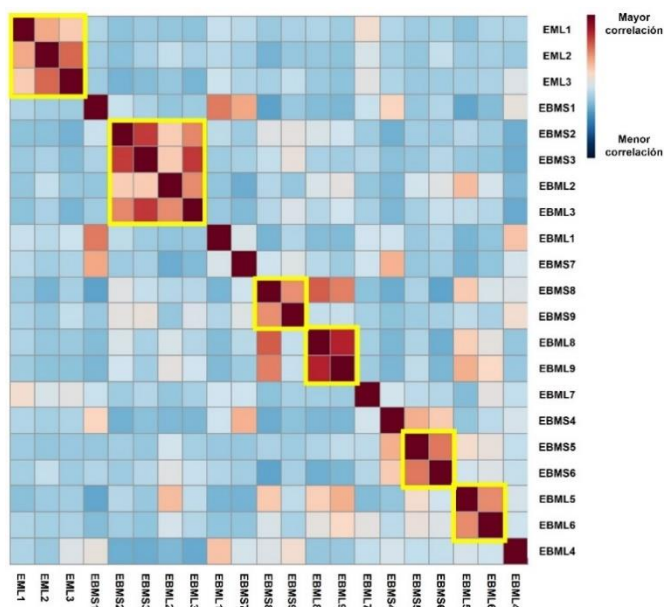


Figura 13. Mapa de correlación de los extractos orgánicos de las *Nostoc*, en cuadros amarillos se resaltan las correlaciones más elevadas.

De manera similar se realizó un mapa de calor que resalta los 25 iones más diferentes entre el conjunto de muestras que conforman la matriz. Se aprecia que la mayoría de estos iones se encuentran en EMLs (**Figura 14A**), y corrobora lo mostrado anteriormente en el PCA: los EMLs presentaban características ajenas respecto a los EBMSs y EBMLs. Luego, se realizó un segundo mapa de calor únicamente con extractos provenientes de biomasa (**Figura 14B**). En este caso, se observó que los iones más diferentes precedían de extractos de MeOH, con la excepción de dos iones (249.1505 y 223.1348), cuya presencia mayoritaria fue en los extractos de CHCl₃-MeOH (1:1).

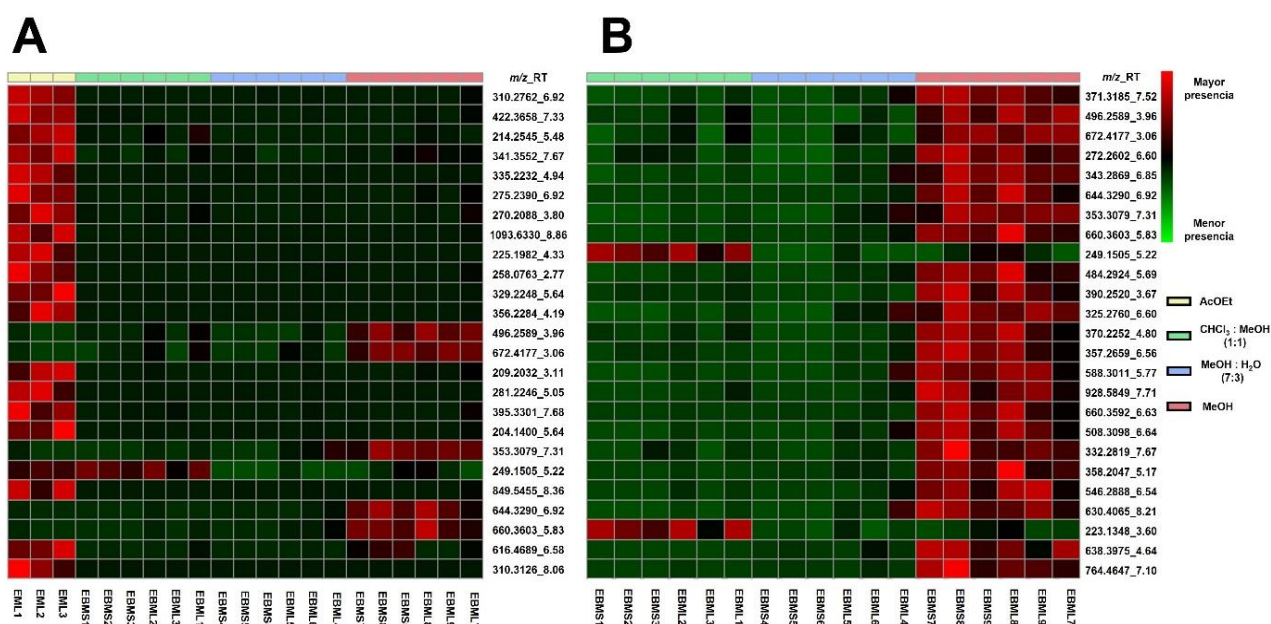


Figura 14. Mapa de calor comparando la presencia (basada en la intensidad del ion) de los 25 iones más diferentes en el total de extractos (A) y en extractos provenientes exclusivamente de biomasa (B).

Cabe destacar que al realizar una búsqueda en la base de datos del *Dictionary of Natural Products* (DNP) algunos de los iones mostrados tuvieron coincidencias con metabolitos de bacterias. No obstante, no se dispone de la evidencia suficiente para efectuar una identidad presuntiva de dichos iones.

6.5 Análisis por redes moleculares.

6.5.1 Red molecular global de las *Nostoc* estudiadas

Con el propósito de explorar la diversidad en los metabolitos producidos por las *Nostoc*, se elaboró una RM global que incluyó todos los extractos agrupados de acuerdo con la especie (**Figura 15**). Como resultado, se obtuvo una RM conformada por 4,572 nodos, de los cuales, 2,286 (50.0 %) están distribuidos en 401 agrupaciones de al menos dos nodos y el otro 50.0 % se presenta de forma aislada debido a que no muestran correlación más que con ellos mismos.

El uso de la herramienta *MolNetEnhancer* permitió identificar diversas clasificaciones químicas presentes en la RM, siendo la más abundante los lípidos y moléculas similares a lípidos (34.52 %), seguido de compuestos orgánicos oxigenados (27.19 %) y de fenilpropanoides y policétidos (16.43 %) (**Figura 16**). Las agrupaciones con mayor número de nodos presentan la clasificación de diterpenoides, glicerofosfolípidos, aminas y carbohidratos y conjugados de carbohidratos. Sin embargo, hay 3671 nodos (80.29 %) que no fueron englobados dentro de una familia química.

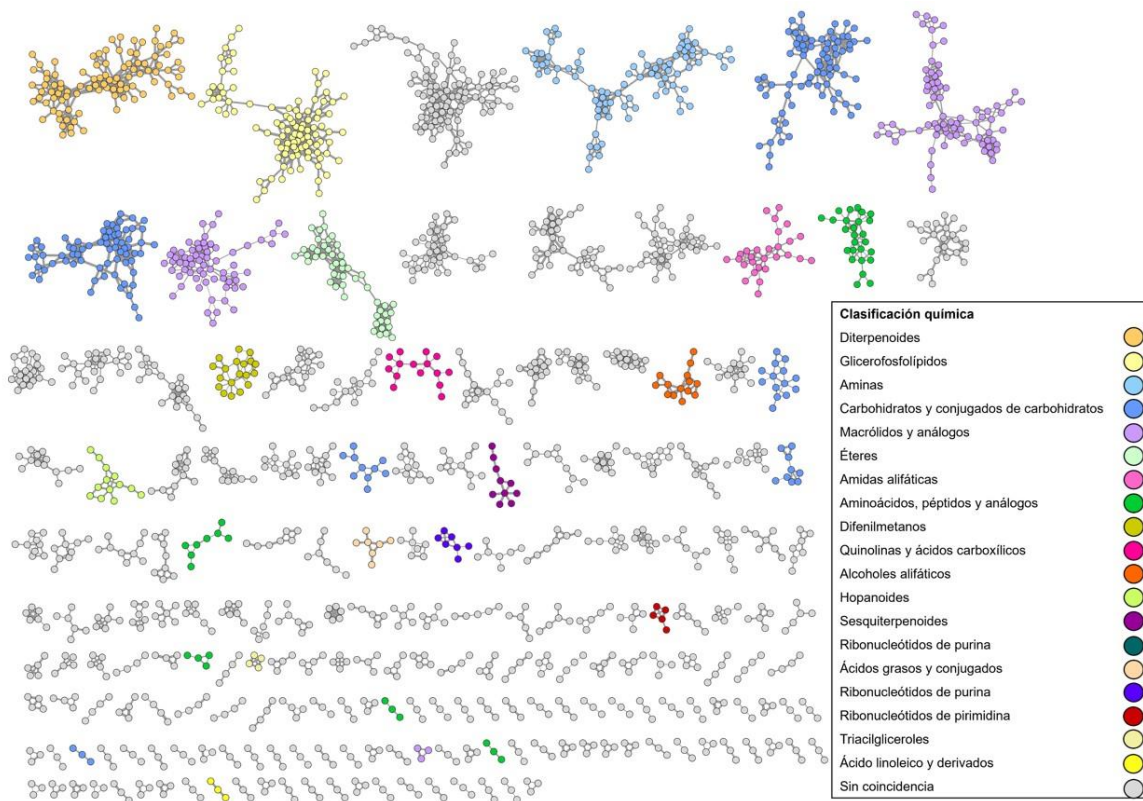


Figura 15. RM global de las *Nostoc* estudiadas. Se muestran las agrupaciones de al menos 3 nodos y la clasificación química asignada a cada clúster

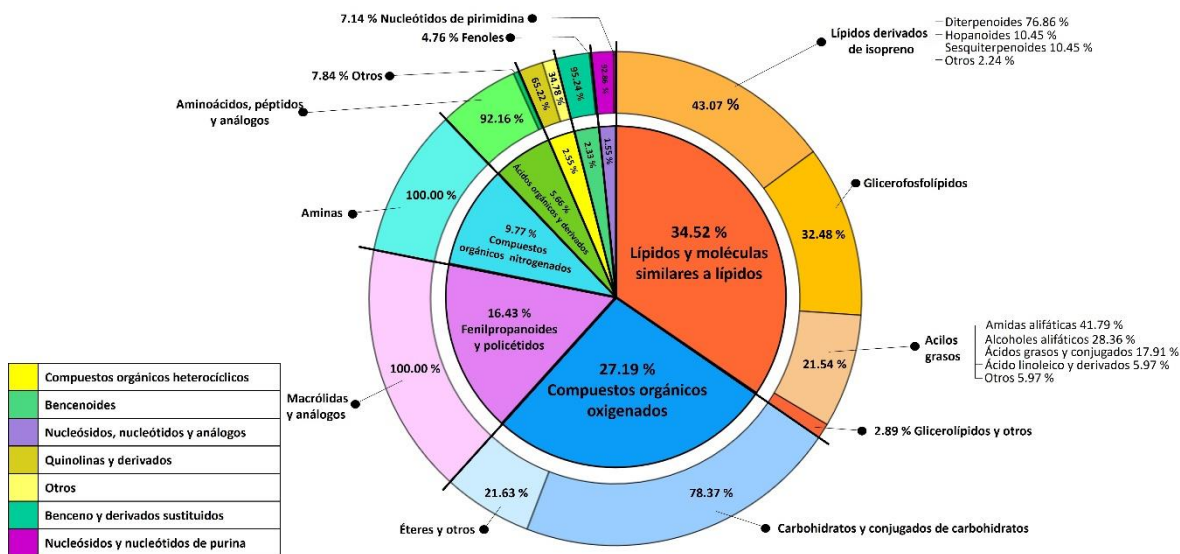


Figura 16. Clasificación en familias químicas de clústeres de la RM dada por MoInetEnhancer

Adicionalmente, esta RM permitió identificar que 1971 nodos (43.11 %) provienen exclusivamente de extractos de *N. sphaericum* y 626 nodos (13.69 %) se

encuentran únicamente en extractos de *Nostoc* sp; mientras que 1975 nodos (43.20 %) están presentes en extractos provenientes de ambas especies. El valor elevado de esta intersección se atribuye a que ambas cianobacterias pertenecen al mismo género (**Figura 17**). Por otra parte, se observa que el empleo de dos sistemas de elución diferentes en los análisis cromatográficos amplió la visualización de la diversidad química de los extractos, ya que en con el método B se observan nodos que no están presentes en el método A (**Figura 17**).

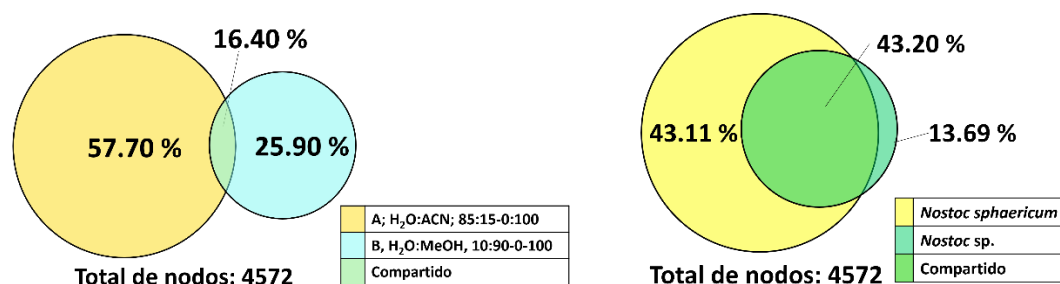


Figura 17. Distribución de los nodos de la RM global en función del sistema de elución empleado (izquierda) y de la especie de cianobacteria (derecha).

Por otra parte, la plataforma del GNPS realizó anotaciones en la RM global (**Tabla 10**), destacándose sacáridos como glucosa-6-fosfato, manosa-6-fosfato y sacarosa; ácidos grasos como los ácidos oleico y eláidico; un dipéptido constituido por residuos isoleucina y prolina; nucleótidos como 5'-AMP y 5'-UMP; y el nucleósido adenosina.

Tabla 10. Anotaciones automáticas por el GNPS de la RM global

Compuesto	Masa del precursor	Aducto	Fórmula molecular	Masa exacta calc.	Error (ppm)	Especie	Método
Ácido xanturénico	204.029	[M-H] ⁻	C ₁₀ H ₆ NO ₄	204.0291	-0.7	<i>N. sphaericum</i>	Ambos
Ile-Pro	229.155	[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₂₁ N ₂ O ₃	228.1474	+1.4	<i>N. sphaericum</i>	Ambos
Glucosa-6-fosfato	259.022	[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₂ O ₉ P	260.0297	-1.7	<i>N. sphaericum</i>	B
Manosa-6-fosfato	259.023	[M-H] ⁻	C ₆ H ₁₂ O ₉ P	260.0297	+2.2	Ambas	Ambos
Ácido oleico	265.254	[M+H-H ₂ O] ⁺	C ₁₈ H ₃₃ O	282.2559	+5.3	Ambas	Ambos
Adenosina	268.105	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₄	267.0968	+3.6	Ambas	Ambos
Ácido eláidico	283.264	[M+H] ⁺	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	282.2559	+3.0	Ambas	Ambos
Ácido N-acetil murámico	316.100	[M+Na] ⁺	C ₁₁ H ₁₉ NO ₈ Na	293.1111	-0.9	<i>N. sphaericum</i>	Ambos
5'-UMP	323.030	[M-H] ⁻	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₉ P	324.0359	+4.4	Ambas	Ambos
5'-AMP	348.070	[M+H] ⁺	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₇ P	347.0631	-1.0	Ambas	Ambos
Sacarosa	365.104	[M+Na] ⁺	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ Na	342.1162	-3.9	Ambas	Ambos
17(21)-Hopen-6-ona	425.377	[M+H] ⁺	C ₃₀ H ₄₉ O	424.3705	-1.9	<i>N. sphaericum</i>	B
Dipalmitoilfosfatidilglicerol	721.502	[M-H] ⁻	C ₃₈ H ₇₄ O ₁₀ P	722.5098	-0.7	Ambas	B

Entre las anotaciones destaca la 17(21)-hopen-6-ona (**Figura 18A**), un triterpenoide perteneciente al grupo de los hopanoides, los cuales brindan rigidez a membranas de bacterias Gram positivas y negativas⁴⁶. Este metabolito se visualizó únicamente con el empleo del método B y en EBMS de *N. sphaericum* de naturaleza CHCl₃-MeOH (1:1) (EBMS2 y EBMS3). También se anotó el ácido *N*-acetil murámico (**Figura 18B**) que es un residuo del peptidoglicano que compone la pared celular bacteriana⁴⁷.

El ácido xanturénico (**Figura 18C**), metabolito encontrado en EMLs (EML2 y 3) y que se compone por un ácido carboxílico con núcleo de quinolina, es un metabolito presente en una amplia gama de seres vivos, desde bacterias hasta el ser humano⁴⁸.

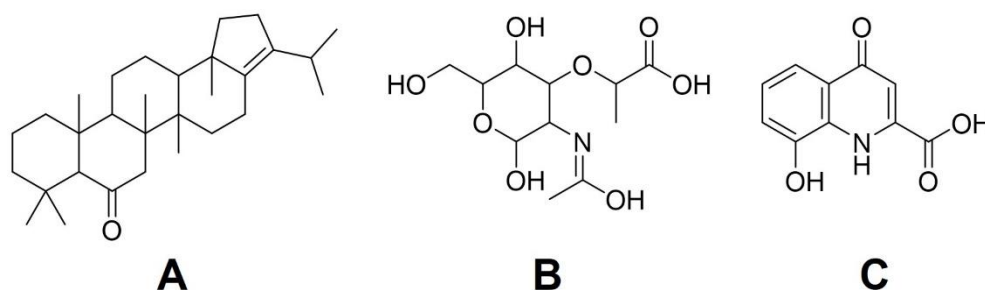


Figura 18. Estructuras químicas de la 17(21)-hopen-6-ona (A), el ácido *N*-acetil murámico (B) y el ácido xanturénico (C).

6.5.2. Feature Based Molecular Networking de *Nostoc* sp.

El procesamiento de datos en MZmine en conjunto con la plataforma del GNPS permitió la realización de *Feature Based Molecular Networking* (FBMN), en donde, los datos espectrométricos procesados se alinearon en función del tiempo de retención y la similitud entre espectros. Para cada *Nostoc* estudiada se realizó una red empleando cada método (A y B, métodos explicados en la sección 5.3), con la finalidad de explorar la diversidad química presente en los extractos de cada cianobacteria.

En el FBMN de *Nostoc* sp. (**Figura 19**) se observa que la RM con datos espectrométricos del método A (**Figura 19A**) posee un mayor número de nodos

respecto a la RM del método B (**Figura 19B**). Esto confirma que la mayor parte de la diversidad en las RM lo aporta el método A, aunque el método B funge como un complemento.

En ambas redes la principal familia química es la de ácidos grasos y conjugados, siendo el caso de la RM del método B la única familia química asignada. Mientras que en la RM del método A existen clústeres que se clasificaron como aminas y benzotiazoles (**Figura 19A**). Cabe mencionar que el interés biotecnológico por las cianobacterias como fuente de biocombustibles reside en su capacidad de producción de ácidos grasos y derivados⁴⁹.

En cuanto al clúster clasificado como benzotiazoles (**Figura 19A**), se determinó que los nodos que lo conforman provienen del EML1. Previamente se ha cuantificado benzotiazol a partir de destilados provenientes de la cianobacteria *Oscillatoria perornata*⁵⁰. Este núcleo es interesante debido a que se considera una estructura asociada con múltiples propiedades farmacológicas⁵¹. Desafortunadamente no se logró identificar presuntivamente algún compuesto englobado en el clúster.

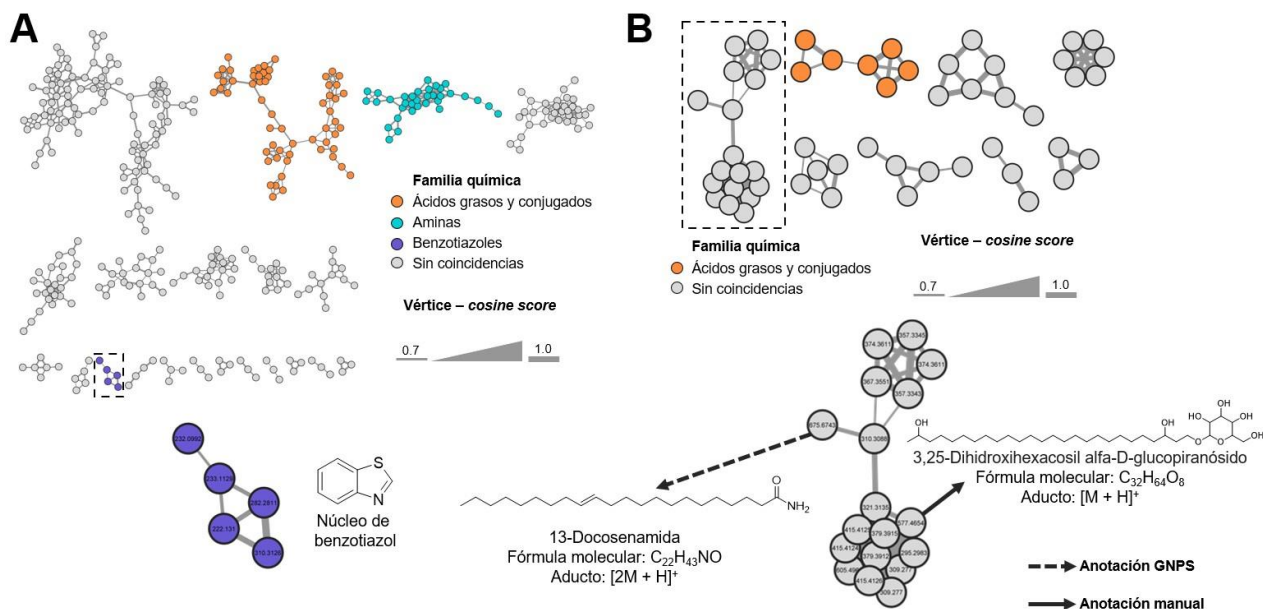


Figura 19. FBMN de *Nostoc* sp. con método A (A) y método B (B); con anotaciones seleccionadas

Adicionalmente, en las dos redes se observa que la mayoría de los nodos no se encuentran clasificados dentro de alguna familia química (**Tabla 11**) y en el caso de la RM del método B, existe una mayor cantidad de nodos aislados que nodos englobados en un clúster. En la **Tabla 11** se resumen las principales características de cada red.

Tabla 11. Características principales de la FBMN de *Nostoc* sp. con método A y método B

RM de <i>Nostoc</i> sp.	Método A	%	Método B	%
Número total de nodos	680	100.0	131	100.0
Número de clústeres con ≥ 3 nodos	21	-	8	-
Número de clústeres con 2 nodos	33	-	2	-
Número de nodos agrupados en un clúster	418	61.5	58	44.3
Número total de nodos no agrupados (<i>singletons</i>)	262	38.5	73	55.7
Número de nodos con clasificación química	108	15.9	7	5.3
Número de nodos sin clasificación química	572	84.1	124	94.7

Las anotaciones químicas realizadas (**Tabla 12**) se obtuvieron principalmente de la RM elaborada con el método B entre ellas se encuentra el ácido 14-metilpentadecanoico y la 13-docosenamida, metabolitos presentes en una amplia gama de bacterias, detectados principalmente en los extractos de MeOH (EBMS7 y EBML4) y en el EML1, respectivamente.

Tabla 12. Anotación química de metabolitos en *Nostoc* sp.

Compuesto	Masa del precursor ^a	Aducto	Fórmula del aducto	Masa exacta calc.	Error (ppm)
Método B					
Ácido 14-metilpentadecanoico ^b	257.2464	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₃₃ O ₂	257.2475	-4.3
3,25-Dihidroxihexacosil alfa-D-glucopiranosido ^c	577.4654	[M+H] ⁺	C ₃₂ H ₆₅ O ₈	577.4674	-3.5
13-Docosenamida ^b	675.6743	[2M+H] ⁺	C ₄₄ H ₈₇ N ₂ O ₂	675.6762	-2.8

^a Valores tomados del análisis del GNPS; ^b Anotado por el GNPS; ^c Anotado manualmente

La anotación del 3,25-dihidroxihexacosil alfa-D-glucopiranosido se realizó de manera manual mediante la comparación espectral empleando como referencia un espectro de MS² proveniente del *MassBank of North America* (MoNA)⁵². En el espectro experimental se observaron 5 fragmentos principales descritos en la literatura (**Figura 20**). Este metabolito se detectó principalmente en extractos de biomasa preparados con CHCl₃-MeOH (1:1) (EBML1), es un glicolípido presente en células especializadas en fijar nitrógeno denominados heterocistos aislado por primera vez en la cianobacteria *Nodularia harveyana*. Los glicolípidos del

heterocisto también están presentes en cianobacterias del género *Nostoc* debido a que son capaces de fijar nitrógeno atmosférico⁵³.

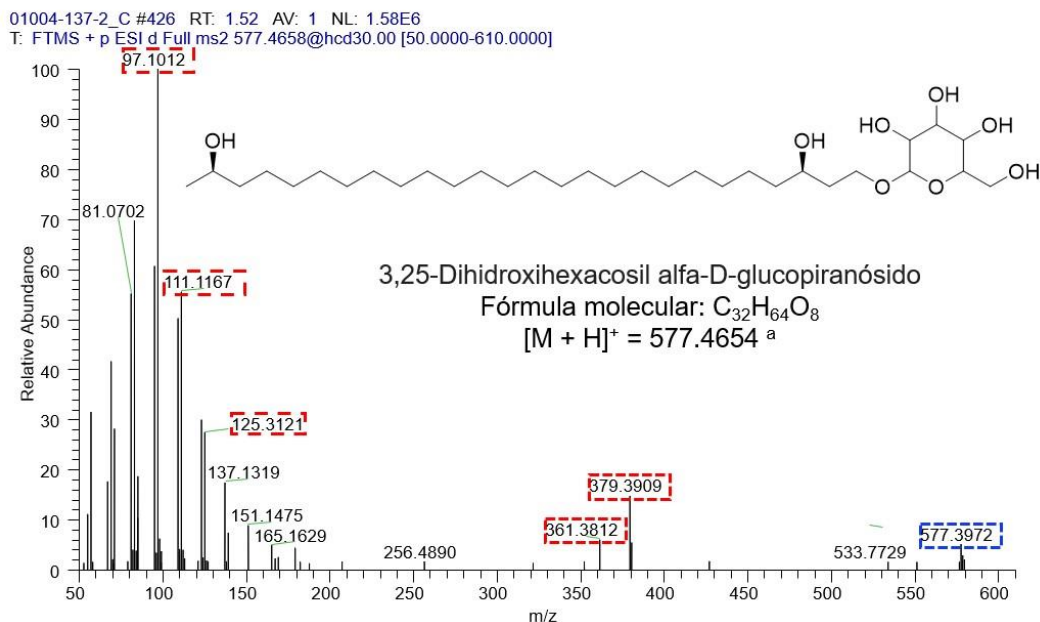


Figura 20. Patrón de fragmentación del 3,25-dihydroxihexacosil alfa-D-glucopiranósido, ion pseudomolecular en azul y fragmentos en rojo; ^a Valor tomado del GNPS

6.5.3. Feature Based Molecular Networking de *N. sphaericum*

En el FBMN de *N. sphaericum* se aprecia, como en el caso anterior, que la RM elaborada con el método A (**Figura 21**) posee un mayor número de nodos y diversidad química que la realizada a partir del método B (**Figura 22**).

En ambas redes la principal familia química es la de amidas alifáticas. En el caso particular de la RM del método A (**Figura 21**) hay otras clasificaciones químicas presentes como difenilmetanos, aminas, glicerolípidos y nuevamente se presenta un clúster de benzotiazoles, el cual también está conformado por nodos provenientes principalmente del EML2 y 3. Adicionalmente, destaca la presencia del clúster de difenilmetanos, cuyos nodos provienen principalmente de extractos de biomasa de naturaleza metanólica (EBMS8, 9, EBML8 y 9). Los difenilmetanos se consideran un núcleo con potencial terapéutico y se ha detectado la presencia del difenilmetano levometadil acetato en estudios metabólicos de *Nostoc flagelliforme*⁵⁴.

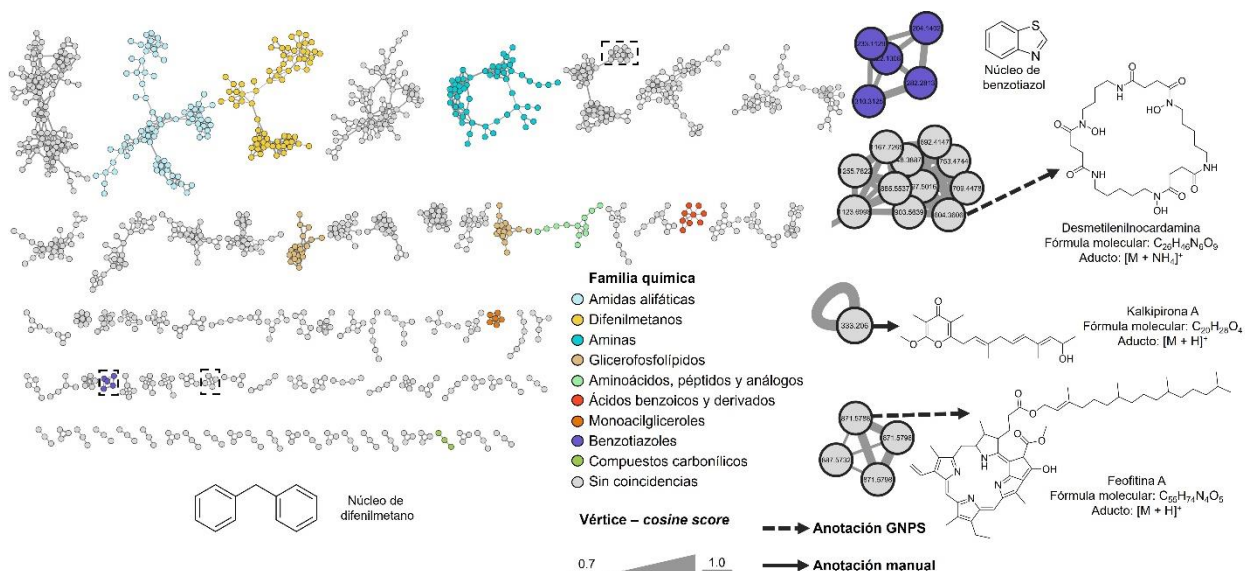


Figura 21. FBMN de *N. sphaericum* con método A, con anotaciones seleccionadas.

Por otro lado, en la RM del método B (**Figura 22**) abundan familias químicas de moléculas de naturaleza lipídica o afines, como es el caso de glicerofosfolípidos, ácidos grasos y conjugados; y ésteres de ácidos grasos.

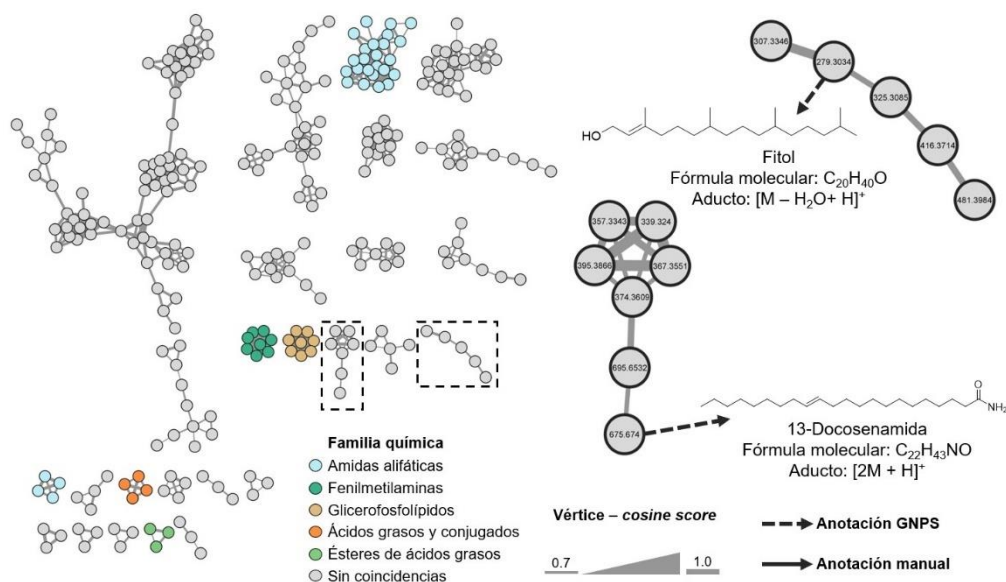


Figura 22. FBMN de *N. sphaericum* con método B, con anotaciones seleccionadas.

En las dos RM se observa que la mayoría de los nodos no se encuentran clasificados dentro de alguna familia química y que los nodos aislados están en menor proporción respecto a los nodos englobados en una agrupación (**Tabla 13**).

Tabla 13. Características principales de la FBMN de *N. sphaericum* con método A y método B

RM de <i>N. sphaericum</i>	Método A	%	Método B	%
Número total de nodos	1845	100.0	416	100.0
Número de clústeres con ≥ 3 nodos	89	-	25	-
Número de clústeres con 2 nodos	66	-	10	-
Número de nodos agrupados en un clúster	1192	64.6	295	70.9
Número total de nodos no agrupados (<i>singletons</i>)	653	35.4	121	29.1
Número de nodos con clasificación química	298	16.2	51	12.3
Número de nodos sin clasificación química	1547	83.8	365	87.7

Para *N. sphaericum* las anotaciones químicas realizadas (**Tabla 14**) se obtuvieron de las dos RM. Al igual que en *Nostoc* sp., en la RM del método B se encontró el ácido 14-metilpentadecanoico y la 13-docosenamida en los extractos metanólicos (EBMS8, EBML8 y 9) y en el EML2 y 3, respectivamente.

Tabla 14. Anotación química de metabolitos en *Nostoc sphaericum*

Compuesto	Masa del precursor ^a	Aducto	Fórmula del aducto	Masa exacta calc.	Error (ppm)
Método A					
Kalkipirona A ^c	333.2060	[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₉ O ₄	333.2060	-0.1
Desmetilnilnocardamina ^b	604.3606	[M+NH ₄] ⁺	C ₂₆ H ₅₀ N ₇ O ₉	604.3664	-9.7
Feofitina A ^b	871.5788	[M+H] ⁺	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₅	871.5732	+6.4
Método B					
Ácido 14-metilpentadecanoico ^b	257.2465	[M+H] ⁺	C ₁₆ H ₃₃ O ₂	257.2475	-3.9
Fitol ^b	279.3034	[M-H ₂ O+H] ⁺	C ₂₀ H ₃₉	279.3046	-4.4
13-Docosenamida ^b	675.6740	[2M+H] ⁺	C ₄₄ H ₈₇ N ₂ O ₂	675.6743	-3.3
^a Valores tomados del análisis del GNPS; ^b Anotado por el GNPS; ^c Anotado manualmente					

En la RM del método A, el GNPS realizó la anotación de la feofitina A, el nodo proviene de los EBMS5 y 6 cuya naturaleza es MeOH-H₂O (7:3). La feofitina es un pigmento fotosintético que sirve como transportador de electrones en el proceso de fotosíntesis y está presente en bacterias fotoautótrofas, como es el caso de las cianobacterias. Cabe mencionar que, aunque esta anotación presenta un error superior a 5 ppm, en su espectro de fragmentación (**Figura 23**) se observó la presencia de los picos característicos de la fragmentación de la feofitina descritos en la literatura⁵⁵, lo que aumenta el nivel de confianza de esta anotación.

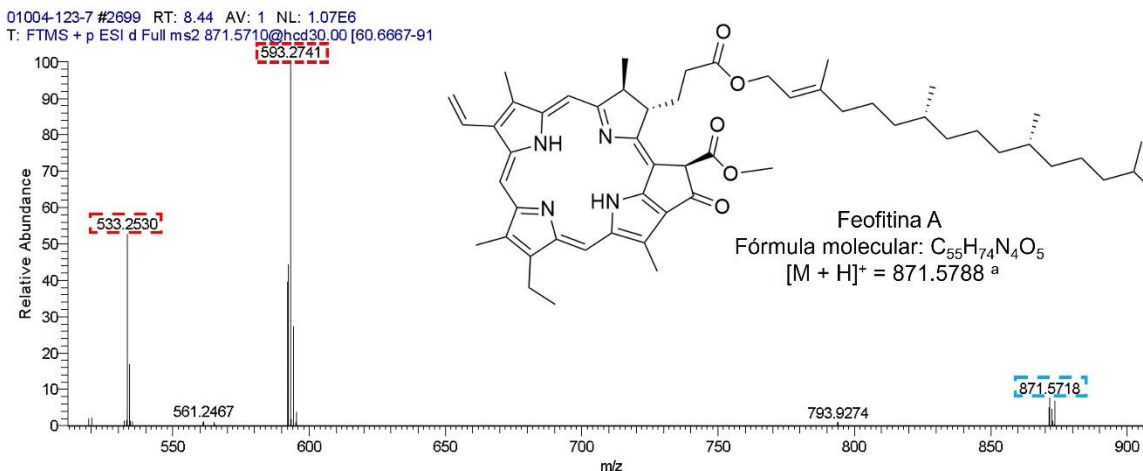


Figura 23. Patrón de fragmentación de la Feofitina A, ion pseudomolecular en azul y fragmentos en rojo; ^a Valor tomado del GNPS

De forma similar, en los EMLs 2 y 3 se evidenció la anotación automática del fitol, diterpenoide acíclico presente principalmente en organismos fotoautótrofos y es un componente de la feofitina. En los últimos años ha ocurrido un aumento en estudios centrados en el fitol, así como en la exploración de sus potenciales actividades biológicas, entre ellas antioxidante, antiinflamatoria y citotóxica⁵⁶.

En relación con la desmetilnilnocardamina, este compuesto se detectó en extractos MeOH-H₂O (7:3) (EBMS5 y EBML5) y también presentó un error superior a 5 ppm como la feofitina. Sin embargo, al realizar la comparación con su espectro de fragmentación depositado en el MoNA⁵⁷ se observó la coincidencia de cinco fragmentos, no obstante, estos no son determinantes. Aun así, la anotación permaneció debido a que fue realizada por el GNPS y cumplió con el criterio de similitud espectral al tener un coeficiente cosenoidal mayor o igual a 7 respecto al espectro de la biblioteca del GNPS.

La desmetilnilnocardamina, una macrolactama aislada en actinobacterias del género *Streptomyces*⁵⁸, es un sideróforo cuya función radica en captar y transportar iones de hierro provenientes del ambiente extracelular. Los sideróforos están presentes en una amplia gama de bacterias, incluyendo a las cianobacterias por lo que la anotación de este metabolito abre la posibilidad de la presencia de sideróforos de estructura similar en los extractos orgánicos estudiados. Cabe destacar que algunas de estas macrolactamas poseen actividad antibiótica⁵⁹.

La anotación de la kalkipirona A se realizó manualmente mediante el análisis de su espectro de fragmentación (**Figura 24**). En primer lugar, se observó la presencia del principal fragmento descrito en la literatura con m/z 221.1165⁶⁰. En segundo lugar, el análisis de los fragmentos presentes en el espectro permitió asociar los iones m/z 221.1165 y m/z 207.1008 como productos de la escisión en posiciones alilíacas y al ion m/z 287.1680 como producto de una escisión alfa al alcohol⁶¹. Se cree la posibilidad de que el ion 315.1963 sea producto de la pérdida del alcohol y la molécula sufra una serie de rearrreglos que establezcan el fragmento, esto con base en la predicción del espectro de fragmentación de la kalkipirona A con el uso de la herramienta CFM-ID (*Competitive fragmentation modeling for metabolite identification*)⁶².

Cabe señalar que este metabolito se detectó únicamente en el EBMS6, de naturaleza MeOH-H₂O (7:3), γ -pirona aislada por primera vez en una asociación de cianobacterias conformada por *Lyngbya majuscula* y *Tolypothrix* sp.⁶⁰, y posteriormente fue reaislada en *Leptolyngbya* sp. Este PN ha mostrado actividad citotóxica frente a la línea celular H-460 de cáncer de pulmón humano⁶³, adicionalmente cabe destacar que el núcleo γ -pirona es una estructura asociada a múltiples actividades biológicas⁶⁴, por lo que este metabolito es de potencial interés para el ser humano.

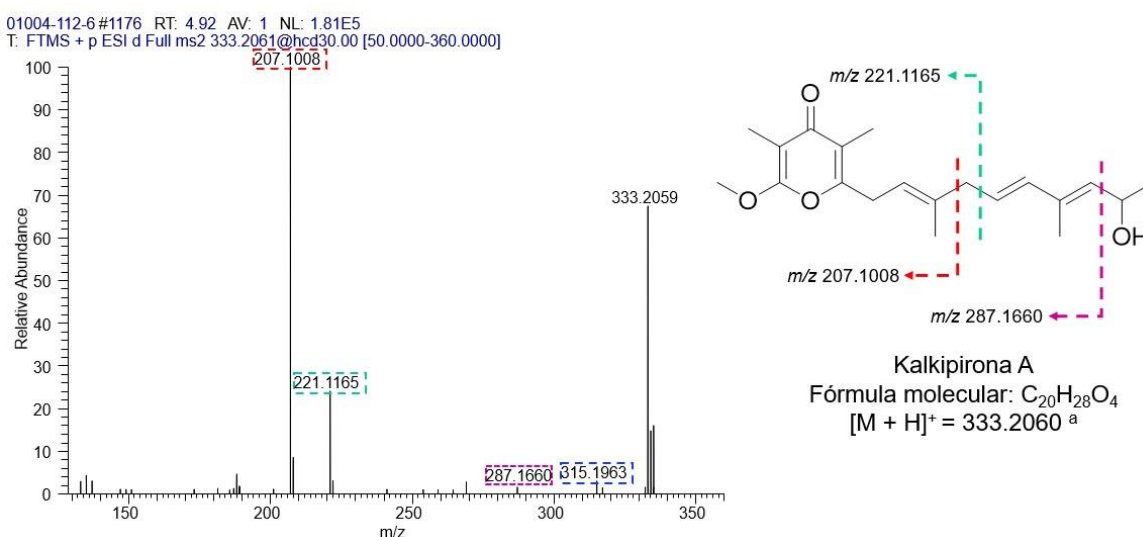


Figura 24. Patrón de fragmentación de la kalkipirona A; ^a Valor tomado del GNPS

6.5.4. Derreplicación manual de las *Nostoc*

A partir de los datos espectrométricos crudos obtenidos con el método A se realizó derreplicación manual, encontrándose dos metabolitos de interés que fueron aislados previamente en otras especies pertenecientes al género *Nostoc* (Tabla 15).

Tabla 15. Derreplicación manual de metabolitos de las *Nostoc*

Compuesto	Masa del precursor	Aducto	Fórmula del aducto	Masa exacta calc.	Error (ppm)	<i>Nostoc</i>
Criptoficina 24	607.3023	[M+H] ⁺	C ₃₄ H ₄₃ N ₂ O ₈	607.3014	+1.5	<i>sphaericum</i>
	605.2871	[M-H] ⁻	C ₃₄ H ₄₁ N ₂ O ₈	605.2868	+0.4	
Nodularina-Har	856.4910	[M+NH ₄] ⁺	C ₄₂ H ₆₆ N ₉ O ₁₀	856.4927	-2.0	sp.
	837.4549	[M-H] ⁻	C ₄₂ H ₆₁ N ₈ O ₁₀	837.4516	+3.9	

El primero de ellos se encontró en el EBMS3. Se observó la presencia de los iones m/z 607.3023 [M+H]⁺ en el tiempo de retención (t_R) de 3.55 min y 605.2871 [M-H]⁻ con $t_R = 3.60$ min, permitiendo establecer la fórmula molecular como C₃₄H₄₂N₂O₈ (IDH = 15) y que corresponde con la criptoficina 24 (Figura 25A). Este metabolito es un ciclodepsipéptido aislado de *Nostoc* sp. GSV-224 que posee actividad citotóxica y antifúngica sobre hongos patógenos para el ser humano del género *Cryptococcus*⁶⁵.

El segundo se halló en los EBMS1 y EBML1, a través de los iones m/z 856.4910 [M+NH₄]⁺ con $t_R = 4.80$ min y 837.4549 [M-H]⁻ con $t_R = 4.81$ min, permitiendo establecer la fórmula molecular como C₄₂H₆₂N₈O₁₀ (IDH = 16, [M-H]⁻) que corresponde con la nodularina-har (Figura 25B). Este metabolito es una cianotoxina hepatotóxica que inhibe fuertemente las protein fosfatasas de tipo 1 y 2A en organismos eucariontes⁶⁶. La nodularina-har fue aislada a partir de la una cianobacteria del género *Nodularia*⁶⁷, no obstante, se ha descrito que existen especies de *Nostoc* capaces de producir nodularinas⁶⁸.

Finalmente, no fue posible confirmar la anotación química de estos metabolitos ya que no se dispone de la información necesaria en las bases de datos revisadas para

realizar su identificación presuntiva, por lo que se presentan como estructuras tentativas de metabolitos producidos por las *Nostoc* estudiadas.

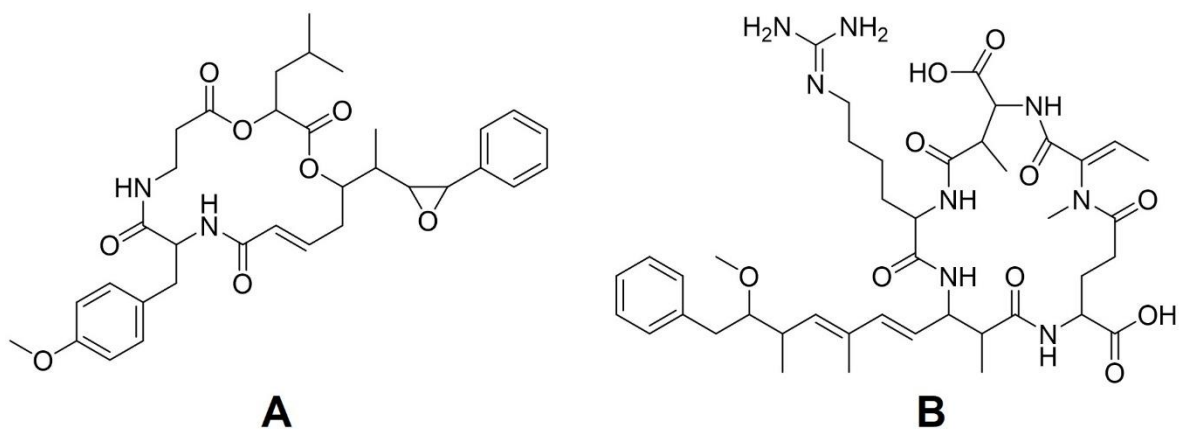


Figura 25. Estructura química de la Criptoficina 24 (A) y Nodularina-Har (B)

7. CONCLUSIONES

1. Las especies de *Nostoc* estudiadas procedentes de humedales de Yalahau, Quintana Roo y de las orillas del río Magdalena, CDMX, mostraron ser candidatos de interés biotecnológico para el ser humano. Mediante los ensayos de actividad antibacteriana se encontraron extractos provenientes ambas *Nostoc* activos contra SARM y *E. faecalis*; y extractos de *N. sphaericum* con actividad fitotóxica.
2. El estudio de los extractos orgánicos a través de herramientas computacionales de metabolómica no dirigida permitió identificar la presencia tentativa de metabolitos con potencial biotecnológico como la kalkipirona A, en el EBMS6 preparado a partir de la biomasa de *N. sphaericum*.
3. Se logró explorar la diversidad química presente en los extractos orgánicos preparados de las *Nostoc* estudiadas, determinando que la principal clasificación de los metabolitos es lípidos y moléculas similares a lípidos. Adicionalmente, en este trabajo se concluyó que la mayor parte de metabolitos producidos por las *Nostoc* se concentran en la biomasa y no son excretados al medio.
4. Finalmente se determinó que los extractos orgánicos preparados a partir de *N. sphaericum* verde y amarilla presentan una alta similitud en su composición, así como los EBMSs de medio BG₀ y BG₁₁. Esto por la comparación de sus perfiles cromatográficos y análisis de datos espectrométricos.

8. REFERENCIAS

1. Schrimpe-Rutledge AC, Codreanu SG, Sherrod SD, McLean JA. Untargeted metabolomics strategies-challenges and emerging directions. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2016;27(12):1897-1905. doi:10.1007/S13361-016-1469-Y
2. Chen L, Lu W, Wang L, et al. Metabolite discovery through global annotation of untargeted metabolomics data. *Nat Methods.* 2021;18(11):1377-1385. doi:10.1038/S41592-021-01303-3
3. Roberts LD, Souza AL, Gerszten RE, Clish CB. Targeted metabolomics. *Curr Protoc Mol Biol.* 2012;Chapter 30(SUPPL.98). doi:10.1002/0471142727.MB3002S98
4. Gertsman I, Barshop BA. Promises and pitfalls of untargeted metabolomics. *J Inherit Metab Dis.* 2018;41(3):355-366. doi:10.1007/S10545-017-0130-7
5. Flores-Bocanegra L, Al Subeh ZY, Egan JM, et al. Dereplication of fungal metabolites by NMR-based compound networking using MADByTE. *J Nat Prod.* 2022;85(3):614-624. doi:10.1021/acs.jnatprod.1c00841
6. Demarque DP, Crotti AEM, Vessecchi R, Lopes JLC, Lopes NP. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Nat Prod Rep.* 2016;33(3):432-455. doi:10.1039/C5NP00073D
7. Kuchař L, Asfaw B, Rybová J, Ledvinová J. Tandem mass spectrometry of sphingolipids: applications for diagnosis of sphingolipidoses. *Adv Clin Chem.* 2016;77:177-219. doi:10.1016/BS.ACC.2016.06.004
8. Sumner LW, Amberg A, Barrett D, et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics.* 2007;3(3):211-221. doi:10.1007/S11306-007-0082-2/METRICS
9. Pluskal T, Castillo S, Villar-Briones A, Orešič M. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. *BMC Bioinformatics.* 2010;11(1):1-11. doi:10.1186/1471-2105-11-395/TABLES/3
10. Schmid R, Heuckeroth S, Korf A, et al. Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nature Biotechnology* 2023 41:4. 2023;41(4):447-449. doi:10.1038/s41587-023-01690-2
11. Aron AT, Gentry EC, McPhail KL, et al. Reproducible molecular networking of untargeted mass spectrometry data using GNPS. *Nature Protocols* 2020 15:6. 2020;15(6):1954-1991. doi:10.1038/s41596-020-0317-5
12. Wang M, Carver JJ, Phelan V V., et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology* 2016 34:8. 2016;34(8):828-837. doi:10.1038/nbt.3597
13. Mohimani H, Gurevich A, Shlemov A, et al. Dereplication of microbial metabolites through database search of mass spectra. *Nature Communications* 2018 9:1. 2018;9(1):1-12. doi:10.1038/s41467-018-06082-8
14. Van Der Hoof JJJ, Wandy J, Barrett MP, Burgess KEV, Rogers S. Topic modeling for untargeted substructure exploration in metabolomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(48):13738-13743. doi:10.1073/pnas.160804111
15. Xia J, Psychogios N, Young N, Wishart DS. *MetaboAnalyst: A web server for metabolomic data analysis and interpretation.* *Nucleic Acids Res.* 2009;37(Web Server issue):652-660. doi:10.1093/NAR/GKP356

16. Pang Z, Chong J, Zhou G, et al. *MetaboAnalyst 5.0: Narrowing the gap between raw spectra and functional insights*. *Nucleic Acids Res.* 2021;49(W1):W388-W396. doi:10.1093/NAR/GKAB382
17. Olivon F, Allard PM, Koval A, et al. *Bioactive natural products prioritization using massive multi-informational molecular networks*. *ACS Chem Biol.* 2017;12(10):2644-2651. doi:10.1021/ACSCHEMBIO.7B00413/ASSET/IMAGES/LARGE/CB-2017-00413U_0002.JPEG
18. Ramabulana AT, Petras D, Madala NE, Tugizimana F. *Metabolomics and molecular networking to characterize the chemical space of four momordica plant species*. *Metabolites.* 2021;11(11):763. doi:10.3390/METABO11110763/S1
19. Oppong-Danquah E, Parrot D, Blümel M, Labes A, Tasdemir D. *Molecular networking-based metabolome and bioactivity analyses of marine-adapted fungi co-cultivated with phytopathogens*. *Front Microbiol.* 2018;9(SEP):2072. doi:10.3389/FMICB.2018.02072
20. Singh SB, Pelaez F. *Biodiversity, chemical diversity and drug discovery*. *Progress in Drug Research.* 2008;65:142-174. doi:10.1007/978-3-7643-8117-2_4/COVER
21. Atanasov AG, Zotchev SB, Dirsch VM, et al. *Natural products in drug discovery: Advances and opportunities*. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:3. 2021;20(3):200-216. doi:10.1038/s41573-020-00114-z
22. Sekurova ON, Schneider O, Zotchev SB. *Novel bioactive natural products from bacteria via bioprospecting, genome mining and metabolic engineering*. *Microb Biotechnol.* 2019;12(5):844. doi:10.1111/1751-7915.13398
23. Chen MY, Teng WK, Zhao L, Han BP, Song LR, Shu WS. *Phylogenomics uncovers evolutionary trajectory of nitrogen fixation in cyanobacteria*. *Mol Biol Evol.* 2022;39(9):msac171. doi:10.1093/MOLBEV/MSAC171
24. Khalifa SAM, Shedid ES, Saied EM, et al. *Cyanobacteria-From the oceans to the potential biotechnological and biomedical applications*. *Marine Drugs* 2021, Vol 19, Page 241. 2021;19(5):241. doi:10.3390/MD19050241
25. Asimakis E, Shehata AA, Eisenreich W, et al. *Algae and their metabolites as potential bio-pesticides*. *Microorganisms* 2022, Vol 10, Page 307. 2022;10(2):307. doi:10.3390/MICROORGANISMS10020307
26. Li Y, Naman CB, Alexander KL, Guan H, Gerwick WH. *The chemistry, biochemistry and pharmacology of marine natural products from Leptolyngbya, a chemically endowed genus of Cyanobacteria*. *Marine Drugs* 2020, Vol 18, Page 508. 2020;18(10):508. doi:10.3390/MD18100508
27. Luesch H, Moore RE, Paul VJ, Mooberry SL, Corbett TH. *Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium Symploca species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symprostatin 1*. *J Nat Prod.* 2001;64(7):907-910. doi:10.1021/NP010049Y
28. Prabakaran G, Sampathkumar P, Kavisri M, Moovendhan M. *Extraction and characterization of phycocyanin from Spirulina platensis and evaluation of its anticancer, antidiabetic and antiinflammatory effect*. *Int J Biol Macromol.* 2020;153:256-263. doi:10.1016/J.IJBIOMAC.2020.03.009
29. Metcalf JS, Tischbein M, Cox PA, Stommel EW. *Cyanotoxins and the nervous system*. *Toxins* 2021, Vol 13, Page 660. 2021;13(9):660. doi:10.3390/TOXINS13090660

30. Haque F, Banayan S, Yee J, Chiang YW. Extraction and applications of cyanotoxins and other cyanobacterial secondary metabolites. *Chemosphere*. 2017;183:164-175. doi:10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.05.106
31. Fidor A, Konkel R, Mazur-Marzec H. Bioactive Peptides produced by cyanobacteria of the genus *Nostoc*: A review. *Marine Drugs* 2019, Vol 17, Page 561. 2019;17(10):561. doi:10.3390/MD17100561
32. Gao K. Chinese studies on the edible blue-green alga, *Nostoc flagelliforme*: A review. *J Appl Phycol*. 1998;10(1):37-49. doi:10.1023/A:1008014424247/METRICS
33. Thuan NH, An TT, Shrestha A, Canh NX, Sohng JK, Dhakal D. Recent advances in exploration and biotechnological production of bioactive compounds in three Cyanobacterial genera: *Nostoc*, *Lyngbya*, and *Microcystis*. *Front Chem*. 2019;7:604. doi:10.3389/FCHEM.2019.00604
34. Voráčková K, Hájek J, Mareš J, et al. The cyanobacterial metabolite nocuolin A is a natural oxadiazine that triggers apoptosis in human cancer cells. *PLoS One*. 2017;12(3):e0172850. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0172850
35. Kossack R, Breinlinger S, Nguyen T, et al. Nostotrebin 6 related cyclopentenediones and δ -lactones with broad activity spectrum isolated from the cultivation medium of the cyanobacterium *Nostoc* sp. CBT1153. *J Nat Prod*. 2020;83(2):392-400. doi:10.1021/acs.jnatprod.9b00885.
36. Crnkovic CM, May DS, Orjala J. The impact of culture conditions on growth and metabolomic profiles of freshwater cyanobacteria. *J Appl Phycol*. 2018;30(1):375-384. doi:10.1007/s10811-017-1275-3.
37. Nowruzzi B, Haghghat S, Fahimi H, Mohammadi E. *Nostoc* cyanobacteria species: A new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Pharmaceutical Health Services Research*. 2018;9(1):5-12. doi:10.1111/JPHS.12202
38. Davis LJ, Maldonado AC, Khin M, Krunić A, Burdette JE, Orjala J. Aulosirazole B and C from the cyanobacterium *Nostoc* sp. UIC 10771: Analogues of an isothiazolonaphthoquinone scaffold that activate nuclear transcription factor FOXO3a in ovarian cancer cells. *J Nat Prod*. 2022;85(3):540-546. doi:10.1021/acs.jnatprod.1c01030.
39. Myers OD, Sumner SJ, Li S, Barnes S, Du X. One step forward for reducing false positive and false negative compound identifications from mass spectrometry metabolomics data: New algorithms for constructing extracted ion chromatograms and detecting chromatographic peaks. *Anal Chem*. 2017;89(17):8696-8703. doi:10.1021/acs.analchem.7b00947.
40. Van Santen JA, Poynton EF, Iskakova D, et al. The Natural Products Atlas 2.0: A database of microbially-derived natural products. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D1317-D1323. doi:10.1093/NAR/GKAB941
41. Nothias LF, Petras D, Schmid R, et al. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods* 2020 17:9. 2020;17(9):905-908. doi:10.1038/s41592-020-0933-6
42. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 31st ed. CLSI guideline M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
43. Troschl C, Meixner K, Fritz I, et al. Pilot-scale production of poly- β -hydroxybutyrate with the cyanobacterium *Synechocystis* sp. CCALA192 in a non-sterile tubular photobioreactor. *Algal Res*. 2018;34:116-125. doi:10.1016/J.ALGAL.2018.07.011
44. El-fayoumy EA, Shanab SM, Hassan OMA, Shalaby EA. Enhancement of active ingredients and biological activities of *Nostoc linckia* biomass cultivated under modified BG-110 medium

- composition. *Biomass Convers Biorefinery*. 2023;13(7):6049-6066. doi: 10.1007/s13399-021-01509-7
45. Fernando VCD, Al Khateeb W, Belmonte MF, Schroeder DF. Role of *Arabidopsis* ABF1/3/4 during *det1* germination in salt and osmotic stress conditions. *Plant Mol Biol*. 2018;97(1-2):149-163. doi:10.1007/S11103-018-0729-6
 46. Rezanka T, Siristova L, Melzoch K, Sigler K. Hopanoids in bacteria and cyanobacteria-Their role in cellular biochemistry and physiology, analysis and occurrence. *Mini Rev Org Chem*. 2010;7(4):300-313. doi:10.2174/157019310792246436
 47. Vollmer W. Peptidoglycan. In: Tang Yi-Wei, Sussman Max, Liu Dongyou, Poxton Ian, Schwartzman Joseph, eds. *Molecular Medical Microbiology*. Second Edition. Academic Press; 2015:105-124. doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00006-8
 48. Showing Compound Xanthurenic acid (FDB022297) - FoodDB. Accessed September 16, 2023. <https://foodb.ca/compounds/FDB022297>
 49. Kahn A, Oliveira P, Cuau M, Leão PN. Incorporation, fate, and turnover of free fatty acids in cyanobacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2023;47(2):1-19. doi:10.1093/FEMSRE/FUAD015
 50. Tellez MR, Schrader KK, Kobaisy M. Volatile components of the cyanobacterium *Oscillatoria perornata* (Skuja). *J Agric Food Chem*. 2001;49(12):5989-5992. doi:10.1021/JF010722P
 51. Elgemeie GH, Mohamed-Ezzat RA. Synthetic strategies for antimetabolite analogs in our laboratory. In: *New Strategies Targeting Cancer Metabolism*. Elsevier; 2022:547-611. doi:10.1016/B978-0-12-821783-2.00008-X
 52. MassBank of North America. Accessed September 16, 2023. <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/CCMSLIB00005435841>
 53. Soriente A, Sodano G, Cambacorta A, Trincone A. Structure of the "heterocyst glycolipids" of the marine cyanobacterium *Nodularia harveyana*. *Tetrahedron*. 1992;48(25):5375-5384. doi:10.1016/S0040-4020(01)89033-5
 54. Gao X, Liu B, Ji B. Profiling of small molecular metabolites in *Nostoc flagelliforme* during PERIODIC DESICCATION. *Marine Drugs* 2019, Vol 17, Page 298. 2019;17(5):298. doi:10.3390/MD17050298
 55. Pop RM, Weesepeol Y, Socaciu C, Pinteana A, Vincken JP, Gruppen H. Carotenoid composition of berries and leaves from six Romanian sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) varieties. *Food Chem*. 2014;147:1-9. doi:10.1016/J.FOODCHEM.2013.09.083
 56. Eksi G, Kurbanoglu S, Erdem SA. Analysis of diterpenes and diterpenoids. In: Sanches Silva Ana, Fazel Nabavi Seyed, Saeedi Mina, Mohammad Nabavi Seyed, eds. *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier; 2020:313-345. doi:10.1016/B978-0-12-816455-6.00009-3
 57. MassBank of North America. Accessed September 16, 2023. <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/spectra/display/VF-NPL-QEHF007325>
 58. Lee HS, Hee JS, Kyoung HJ, Tae SK, Oh KB, Shin J. Cyclic peptides of the nocardamine class from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. *J Nat Prod*. 2005;68(4):623-625. doi:10.1021/NP040220G/ASSET/IMAGES/MEDIUM/NP040220GN00001.GIF
 59. S. Pooja SP, Niveshika N. Insight into the potential cyanobacterial metabolites and their screening strategies. *Biosci Biotechnol Res Asia*. 2022;19(1):255-279. doi:10.13005/BBRA/2983

60. Graber MA, Gerwick WH. Kalkipyronone, a toxic γ -pyrone from an assemblage of the marine cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Tolypothrix* sp. *J Nat Prod.* 1998;61(5):677-680. doi:10.1021/NP970539J
61. De Vijlder T, Valkenburg D, Lemièrre F, Romijn EP, Laukens K, Cuyckens F. A tutorial in small molecule identification via electrospray ionization-mass spectrometry: The practical art of structural elucidation. *Mass Spectrom Rev.* 2018;37(5):607-629. doi:10.1002/MAS.21551
62. Wang F, Liigand J, Tian S, Arndt D, Greiner R, Wishart DS. CFM-ID 4.0: More accurate ESI-MS/MS spectral prediction and compound identification. *Anal Chem.* 2021;93(34):11692-11700. doi:10.1021/ACS.ANALCHEM.1C01465
63. Bertin MJ, Demirkiran O, Navarro G, et al. Kalkipyronone B, a marine cyanobacterial γ -pyrone possessing cytotoxic and anti-fungal activities. *Phytochemistry.* 2016;122:113-118. doi:10.1016/J.PHYTOCHEM.2015.11.011
64. Wilk W, Waldmann H, Kaiser M. γ -Pyrone natural products-A privileged compound class provided by nature. *Bioorg Med Chem.* 2009;17(6):2304-2309. doi:10.1016/J.BMC.2008.11.001
65. Golakoti T, Ogino J, Heltzel CE, et al. Structure determination, conformational analysis, chemical stability studies, and antitumor evaluation of the Cryptophycins. Isolation of 18 new analogs from *Nostoc* sp. strain GSV 224. *J Am Chem Soc.* 1995;117(49):12030-12049. doi:10.1021/JA00154A002.
66. Nowruzi B, Haghghat S, Fahimi H, Mohammadi E. *Nostoc* cyanobacteria species: A new and rich source of novel bioactive compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Pharmaceutical Health Services Research.* 2018;9(1):5-12. doi:10.1111/JPHS.12202
67. Beattie KA, Kaya K, Codd GA. The cyanobacterium *Nodularia* PCC 7804, of freshwater origin, produces [L-Har2]nodularin. *Phytochemistry.* 2000;54(1):57-61. doi:10.1016/S0031-9422(00)00045-5
68. Jokela J, Heinilä LMP, Shishido TK, et al. Production of high amounts of hepatotoxin nodularin and new protease inhibitors pseudospumigins by the brazilian benthic *Nostoc* sp. CENA543. *Front Microbiol.* 2017;8(OCT):286203. doi:10.3389/FMICB.2017.01963/BIBTEX