



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Estudio químico y evaluación de la actividad
citotóxica de metabolitos secundarios
provenientes de cianobacterias bentónicas
arrecifales del Caribe colombiano**

Lina María Bayona M

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Química
Bogotá, Colombia
2014

Estudio químico y evaluación de la actividad citotóxica de metabolitos secundarios provenientes de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano

Lina María Bayona M

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Química

Director:

Ph. D. Freddy Alejandro Ramos R

Línea de Investigación:

Productos Naturales

Grupo de Investigación:

Estudio y Aprovechamiento de Productos Naturales Marinos y Frutas de Colombia

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento Química

Bogotá, Colombia

2014

A mi papá, mi mamá y Lauris

Agradecimientos

A Dios por darme la fuerza para continuar

A mi familia, por ser mi constante apoyo y mí soporte. A mi mamá y mi papá por hacerme la persona que soy ahora, siempre respaldar todas mis decisiones y mostrarme el camino y a mi hermana por ser mi gran amiga.

A Nicolás por estar junto a mí todo este tiempo, aguantarme, consentirme, enseñarme y hacerme sonreír cada día, incluso en los días que no quería sonreír.

A mis profesores Freddy y Leonardo por haber confiado en mí y guiarme en este camino, por todas sus enseñanzas que no solo fueron académicas y por brindarme su amistad.

A todos los marineros, los presentes y los que ya se fueron, Diani, Fabio, Sandra, Alonso, Geison, Adriana, Fabian, Clara, Luz Adriana, Sandra, Angela, Edisson..... En fin. A todos por hacer que el laboratorio se sintiera realmente como un segundo hogar y por todos los buenos momentos que pasamos mientras trabajábamos.

A mis amigos de pregrado (El equipo) Jonathan, Félix, Carlos, Brian, Laura, Yina, Luis, Jorge, Nicolás y Diana por los buenos momentos que pudimos extender por dos años más. Muy especialmente a los “mismos de siempre” por todos los viernes culturales.

Al Dr. Marcelino Gutiérrez y a todos los compañeros del INDICASAT, Librada, Joel, Ricardo, Cristopher, Ana.... A todos por hacer de la pasantía experiencia muy enriquecedora.

A la universidad Nacional por ser mí segundo hogar los últimos 7 años y darme la formación académica y personal excelente.

A la convocatoria 566 de 2012 de Colciencias “Convocatoria Nacional para Jóvenes Investigadores e Innovadores Año 2012 Conformación de un Banco de Elegibles”, a la convocatoria 452 de 2008 de Colciencias por el apoyo al proyecto “cianobacterias bentónicas arrecifales: dinamica de los afloramientos y potencial aprovechable de sus toxinas” y al DIB por el apoyo al proyecto “Cianobacterias Bentónicas Arrecifales Fase II: Estudio del potencial bioactivo de los afloramientos presentes en el Caribe colombiano como fuente de compuestos con actividad citotóxica y antiparasitaria por el apoyo económico que permitió el desarrollo de este trabajo.

Resumen

Las cianobacterias bentónicas arrecifales son una de las fuentes marinas más prolíficas de compuestos con actividad biológica, dentro de los que destacan: actividad citotóxica contra líneas celulares tumorales, antiparasitaria, neurotóxica, entre otras. En el Caribe colombiano se han observado, cada vez con mayor frecuencia, la presencia de afloramientos de estos microorganismos. Sin embargo, los estudios acerca de su composición química hasta el momento son relativamente pocos.

Teniendo en cuenta lo anterior y con el fin de obtener un panorama general acerca de la producción metabólica de las cianobacterias presentes en los afloramientos que se vienen presentando desde el año 2009 en diferentes locaciones del Caribe colombiano, en este trabajo se realizó un estudio metabólico de 49 extractos de muestras de cianobacterias recolectadas en Islas de rosario, San Andrés y Providencia entre los años 2009 y 2012.

Con este estudio se estableció cuáles de las muestras tenían una composición química similar y de esta manera saber cuáles de los extractos podían ser reunidos con el fin de disponer de mayor cantidad de material de partida para un posterior estudio químico. Además fue posible analizar la relación que existe entre las especies presentes en la muestra, año y lugar de recolección con la producción metabólica, dicha información podría contribuir a trabajos de clasificación futuros.

Finalmente a partir de este estudio metabólico junto con algunos ensayos de actividad biológica (Citotoxicidad y antiparasitarios) fue posible generar criterios de selección con los cuales se escogieron dos extractos para continuar con el estudio químico.

A partir del extracto de una muestra clasificada como un consorcio de *Lyngbya majuscula* y *Oscillatoria margaritifera* se aislaron tres compuestos nuevos de los cuales, uno es 9E, 11Z-1,12-dibromo-4metildodeca-9,11-dien-2-ona (**1**), un policétido dibromado, que resultó inactivo en todos los ensayos de actividad biológica y dos péptidos denominados la catalinamida A (**2**) y catalinamida B (**3**), compuestos por cinco residuos, cuatro de los

Resumen y abstract

cuales corresponden a aminoácidos no proteinogénicos, dentro de los que se encuentra la NMe α -aminoglicina aislada por primera vez de fuentes naturales. Una fracción enriquecida en estos compuestos mostró actividad en los ensayos de citotoxicidad contra la línea celular MFC-7 y contra el parásito *Plasmodium falciparum*. De un segundo extracto obtenido de una muestra clasificada como *Lyngbya sp* se identificaron el caylobolido A (4) y el caylobolido B (5) los cuales, en reportes previos habían presentado actividad citotóxica contra varias líneas celulares tumorales. Estos resultados muestran el enorme potencial de las cianobacterias bentónicas arrecifales recolectadas en el Caribe colombiano para producir compuestos con actividad biológica y con estructuras químicamente interesantes, generando información valiosa que permitirá continuar con la exploración de los metabolitos producidos por estos microorganismos con miras a un aprovechamiento sostenible de este recurso.

Palabras clave: Cianobacterias bentónicas arrecifales, citotoxicidad, actividad antiparasitaria, metabolómica, péptido no ribosomal, policétido.

Abstract

Marine benthic cyanobacteria have been one of the most prolific sources of bioactive compounds, among which cytotoxicity against cancer cell lines, antiphrastic activity and neurotoxicity. Blooms of this microorganism had been observed in Colombian Caribbean Sea more often. However there are only a few studies about their chemical composition.

As a result of the mention above and in order to get a panoramic view of the metabolic production of cyanobacteria present in blooms that have been presented since 2009 in different locations in the Colombian Caribbean Sea, in this work, a metabolomic study of 46 cyanobacteria extracts was made, the samples were collected in Islas del Rosario, San Andrés and Providencia between 2009 and 2012.

With this study, it was possible to identify which of the samples have similar metabolic production and in this way know if it was possible to mix different extracts from different samples in order to get more starting material for subsequent chemical studies. In addition, the relation between the species present in each sample, the year and the place of recollection with the metabolic production was analyzed and the information here presented could be useful for further studies of classification.

Finally with the results obtained in the metabolic study and the biologic activity assays (cytotoxicity and antiphrastic) it was possible to generate criteria for the selection of the extracts to continue with the chemical studies.

From extract of the sample classified as *Lyngbya spp.* caylobolide A and caylobolide B were identified, these two compounds have previous reports of being active against cancer cell lines. Moreover from an extract of a sample classified as *Lyngbya majuscula* and *Oscillatoria margaritifera*, three new compounds were identified, the first named XXX is a polyketide dibrominated which show no activity against none the assays and two peptides named catalinamide A and catalinamide B. A fraction that contains this compounds was tested in the assays showing activity against MFC-7 cell line and the parasite *Plasmodium*

Resumen y abstract

falciparum. With this result it was possible to probe the capacity of marine benthic cyanobacteria to produce bioactive compounds that also have intriguing structures.

Key Words: Marine benthic cyanobacteria, cytotoxicity, antiphrastic activity, metabolomic, no ribosomal peptide, polyketide.

Contenido

Resumen	I
Lista de figuras	VII
Lista de tablas	IX
Lista de símbolos y abreviaturas	X
1. Estado del arte	1
1.1 Cianobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica	3
1.1.1 Compuestos con actividad antiparasitaria	6
1.1.2 Agentes neurofarmacológicos	8
1.1.3 Cianobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad citotóxica.	10
1.2 El cáncer	14
1.2.1 ¿Por qué continuar con la búsqueda de compuestos anticancerígenos?	15
1.3 ¿Por qué estudiar Cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano?	16
1.4 BIBLIOGRAFÍA	17
2. Estudio metabolómico de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano	22
2.1 Introducción	22
2.1.1 Las tecnologías “ómicas”	22
2.1.2 ¿Qué es la metabolómica?	23
2.1.3 Aplicaciones de la metabolómica	24
2.1.4 Técnicas analíticas utilizadas en estudios metabolómico	26
2.1.5 Análisis estadístico	27
2.1.6 Pertinencia del análisis metabolómico de cianobacterias	28
2.2 Metodología	29
2.2.1 Instrumentación y reactivos	29
2.2.2 Recolección y clasificación del material biológico	29
2.2.3 Preparación de las muestras	31

Contenido

2.2.4 Condiciones cromatográficas	31
2.2.5 Análisis de datos	31
2.2.5 Ensayos de actividad Biológica	32
2.3 Resultados y discusión	33
2.3.1 Análisis de componentes principales	35
2.3.2 Análisis de conglomerados o “cluster” jerárquicos	36
2.3.3 Composición de los grupos obtenidos	38
2.3.4 Análisis de la variación temporal y espacial	41
2.3.5 Agrupación de cianobacterias del género <i>Lyngbya</i>	42
2.3.6 Selección de las muestras para estudios químicos	47
2.4 Conclusiones	49
2.5 BIBLIOGRAFÍA	50
3. Aislamiento y Elucidación de compuestos a partir de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales del género <i>Lyngbya</i> con actividad citotóxica, recolectadas en el Caribe Colombiano.	54
3.1 Introducción	54
3.2 Metodología	57
3.2.1 General	57
3.2.2 Extracción y Purificación	58
3.2.3 Ensayos de actividad biológica	59
3.3 Resultados y discusión	60
3.3.1 Estudio químico del extracto de la muestra número 45 clasificada como un consorcio de <i>Lyngbya majuscula</i> y <i>Oscillatoria margaritifera</i>	59
3.3.2 Estudio químico del extracto de la muestra número 10 (<i>Lyngbya spp.</i>)	76
3.4 Conclusiones	83
3.5 BIBLIOGRAFÍA	84
4. Conclusiones Generales y Recomendaciones	
4.1 Conclusiones	86
4.2 Recomendaciones	87
Anexos	89

Lista de Figuras

Capítulo 1	Pág.
Figura 1.1: Ejemplos de afloramientos de cianobacterias marinas	2
Figura 1.2: Porcentaje de metabolitos secundarios aislados de organismos marinos	4
Figura 1.3: Metabolitos secundarios reportados para diferentes órdenes de cianobacterias marinas.	4
Figura 1.4: Metabolitos aislados de cianobacterias <i>Oscillatoriales</i> separadas por el género	5
Figura 1.5: Metabolitos provenientes de cianobacterias con actividad antiparasitaria	8
Figura 1.6: Estructura de compuestos con actividad neurofarmacologica	9
Figura 1.7: Estructuras de compuestos con actividad citotóxica	11
Figura 1.8: Estructura de la Curacina A y uno de los análogos estructurales más promisorios	12
Figura 1.9: Estructuras de las Dolastatinas 10 y 15 junto con sus análogos sintéticos más exitosos	13
Figura 1.10: Estructura de Bretuximabvetodin®	13
Capítulo 2	
Figura 2.1: Fotografías de los tapetes de cianobacterias recolectados, con morfologías filamentosas (a) y (b) y morfologías algodonosas (c) y (d).	34
Figura 2.2: Cromatograma de la fracción 3 del extracto número 1 que fue utilizado como modelo para la obtención de condiciones cromatográficas.	35
Figura 2.3: Gráfica de las dos primeras componente obtenidas por ACP	36
Figura 2.4: Dendrograma obtenido para el análisis de conglomerados de los datos sin tratamiento	37
Figura 2.5: Filograma para las cianobacterias de los géneros <i>Lyngbya</i> y <i>Moorea</i> basado en el estudio de la subunidad ribosomal del gen 16S.	43
Figura 2.6: Filograma resaltado la relación de <i>Okeania</i> con otros géneros, en gris se resaltan todos los géneros relacionados con <i>Lyngbya</i> .	44
Figura 2.7: Cromatograma de la Fracción 3 del extracto de la muestra 45	48
Figura 2.6: Cromatograma de la Fracción 3 del extracto numero 10	49
Capítulo 3	
Figura 3.1: Modificaciones de los aminoácidos en metabolitos secundarios aislados de cianobacterias marinas.	55
Figura 3.2: Ejemplos de compuestos estructuralmente interesantes aislados de cianobacterias marinas.	56
Figura 3.3: Esquema de fraccionamiento del extracto 45	60
Figura 3.4: Espectro ¹ H RMN (CDCl ₃ , 400 MHz) de la fracción F45.4.	61

Figura 3.5: Espectro de masas obtenido para el compuesto 3 (ESI, inyección directa)	61
Figura 3.6: Espectro de ^1H RMN (CDCl_3 , 400MHz) del compuesto 1	62
Figura 3.7: espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100MHz) del compuesto 1	63
Figura 3.8: a) subestructuras obtenidas por análisis del COSY y HMBC tomados en CDCl_3 , b) unión de las dos subestructuras por las correlaciones observadas HMBC tomados en MeOD	65
Figura 3.9: Estructura del compuesto 1	66
Figura 3.10: Espectro de masas del compuesto 2	66
Figura 3.11: Espectro RMN- ^1H (CDCl_3 , 400MHz) del compuesto 2	67
Figura 3.12: Espectro RMN- ^{13}C (CDCl_3 , 100MHz) del compuesto 2	68
Figura 3.13: Unidades de los aminoácidos presentes en el compuesto 2	70
Figura 3.14: Subestructuras para el compuesto 2	71
Figura 3.15: Espectro de EM/EM del compuesto 2	71
Figura 3.16: Estructura del compuesto 2	72
Figura 3.17: Espectro HMBC del compuesto 2 y cálculo de la constante de acoplamiento C-H a un enlace para el carbono en δ_c 94,9	73
Figura 3.18: Espectros de masa y EM/EM del compuesto 3	74
Figura 3.19: Estructura del compuesto 3	75
Figura 3.20: Esquema de separación del extracto 10	76
Figura 3.21: Análisis por CLAE-EM de la fracción F10.4.9.2 a) Cromatograma con detección a 210 nm, b) TIC, c)Espectro de masas del compuesto 4, d) Espectro de masas del compuesto 5	78
Figura 3.22: Espectro de RMN- ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz) de la fracción F10.4.9.2	79
Figura 3.23: Espectro de RMN- ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 100 MHz)de la fracción F10.4.9.2	80
Figura 3.24: Estructura del caylobolido A	80
Figura 3.25: Estructura del caylobólido B	82

Lista de tablas

Capítulo 1	Pág.
Tabla 1.1: Compuestos aislados de cianobacterias marinas con actividad antiparasitaria	7
Tabla 1.2: Agentes neurofarmacológicos aislados de cianobacterias marinas	9
Tabla 1.3: Algunos ejemplos de compuestos aislados de cianobacterias que han presentado actividad citotóxica.	10
Capítulo 2	
Tabla 2.1: Clasificación morfológica e información de recolección de los “ <i>mats</i> ” de cianobacterias	29
Tabla 2.2: Grupos formados a partir del análisis de conglomerados junto con la descripción de cada una de las muestras	39
Tabla 2.3: Resultados de los ensayos de actividad biológica para los 19 extractos evaluados	46
Capítulo 3	
Tabla 3.1: Datos de RMN ¹ H y ¹³ C para el compuesto 1 (RMN- ¹ H CDCl ₃ , 400MHz, RMN- ¹³ C, CDCl ₃ , 100MHz)	63
Tabla 3.2: Resultados de ensayos de actividad biológica para el compuesto 1	66
Tabla 3.3: Datos de RMN ¹ H y ¹³ C para el compuesto 2 (RMN ¹ H CDCl ₃ , 400MHz, RMN ¹³ C CDCl ₃ , 100MHz)	69
Tabla 3.4: Resultados de ensayos de actividad biológica de la fracción F45.4.9	75
Tabla 3.5: Resultados de actividad biológica de las fracciones obtenidas del extracto 10	77
Tabla 3.6: Comparación de las señales de RMN obtenidas para la fracción F10.4.9.2 con los desplazamientos reportados para el caylobolido A	81

Lista de símbolos y abreviaturas

Símbolo	Término
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de Etilo
ADN	Ácido desoxiribonucleico
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
bs	Singlete ancho
CCD	Cromatografía en capa delgada
CG	Cromatografía de Gases
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
δ	Desplazamiento químico (RMN)
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DCM	Diclorometano
dd	Doble doblete
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DESI	<i>Desorption ElectroSpray Ionization</i>
DMSO	Dimetil sulfoxido
EC	Electroforesis Capilar
EESI	<i>Extractive ElectroSpray Ionization</i>
EM	Espectrometría de Masas
HMBC	<i>Heteronuclear correlation through multiple bond coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear multiple quantum correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear single quantum correlation</i>
Hz	Hertz
IR	Espectroscopía Infraroja
J	Constante de acoplamiento
m	multiplete
m/z	Relación masa/carga
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption ionization</i>
MeOH	Metanol
mRNA	RNA mensajero
NRP	<i>No Ribosomal Peptides</i> (Peptidos no ribosomales)
OFRs	<i>Open Reading Frames</i> (Marcos de lectura abierta)
PK	<i>Polyketides</i> (Policetidos)
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
s	Singlete
t	Triplete

1. Estado del Arte

Las cianobacterias comprenden un amplio grupo de organismos que evolucionaron en el periodo Precámbrico hace 3,5 billones de años. Su aparición fue de suma importancia, porque a través de su metabolismo acumularon grandes cantidades de oxígeno, modificando la atmósfera reductora que existía [1]. Por mucho tiempo las cianobacterias fueron denominadas "algas verde-azules" y fueron estudiadas por los botánicos como un tipo de algas "primitivas"; Sin embargo, estos organismos no son algas sino eubacterias [2]. Las cianobacterias son organismos procariontes por lo que carecen de diferenciación celular y membrana nuclear. Además del proceso de la fotosíntesis, muchas de las cianobacterias tienen la capacidad de fijar nitrógeno, lo cual las convierte en una fuente biodisponible de este elemento [3].

Las cianobacterias son capaces de soportar una gran variedad de condiciones extremas de: Temperatura, presión, salinidad y pH; Además, tienen la capacidad de habitar prácticamente cualquier ecosistema, entre los cuales se encuentran: Endosimbiontes de plantas y animales, rocas, ambientes marinos y dulceacuícolas e inclusive en el hielo. Su morfología incluye formas unicelulares (planctónicas o bentónicas) o filamentosas que también pueden formar agregados de grosor variable. Algunas especies de cianobacterias pueden formar células especializadas llamadas heterocistos que poseen la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico [4, 5].

Los afloramientos de cianobacterias bentónicas marinas se presentan en aguas poco profundas y protegidas y suelen aparecer en la playa por acción del oleaje [6]. Existen varios factores que pueden favorecer la aparición de este tipo de fenómenos, dentro de estos factores se encuentran: La disponibilidad de nutrientes en el medio (niveles de fosfato y biodisponibilidad de hierro), alteraciones en el pH, variaciones en la temperatura y en la cantidad de luz. Adicionalmente, se ha observado que efectos antropogénicos como el calentamiento global y consecuencias directas de este, como el aumento de CO₂ en la atmósfera y el aumento en la salinidad de las aguas son algunos de los factores más importantes en el aumento de la frecuencia con que se presentan estos afloramientos [7,

8]. Sin embargo, cabe resaltar que cada cepa de cianobacterias posee diferentes dinámicas de afloramiento, que en muchos casos parecen estar controlados, más por cambios físicos que por la disponibilidad de nutrientes o por la competencia con macroalgas [9].

Los afloramientos de cianobacterias marinas se reportan cada vez más, en regiones tropicales y subtropicales (Figura 1.1). Las cianobacterias causantes de estos afloramientos se incluyen en las clases *Chroococcales* y *Oscillatoriales*, siendo los órdenes más frecuentemente asociados a estos eventos: *Synechocystis*, *Schizothrix*, *Hormothamnion*, y *Nostocales* [6, 10]. En el orden filamentoso *Nostocales*, los géneros de los que hay un mayor número de reportes de afloramientos, son principalmente: *Lyngbya*, *Oscillatoria* y *Symploca*, cuya composición química y ecología están mejor documentadas [11, 12].

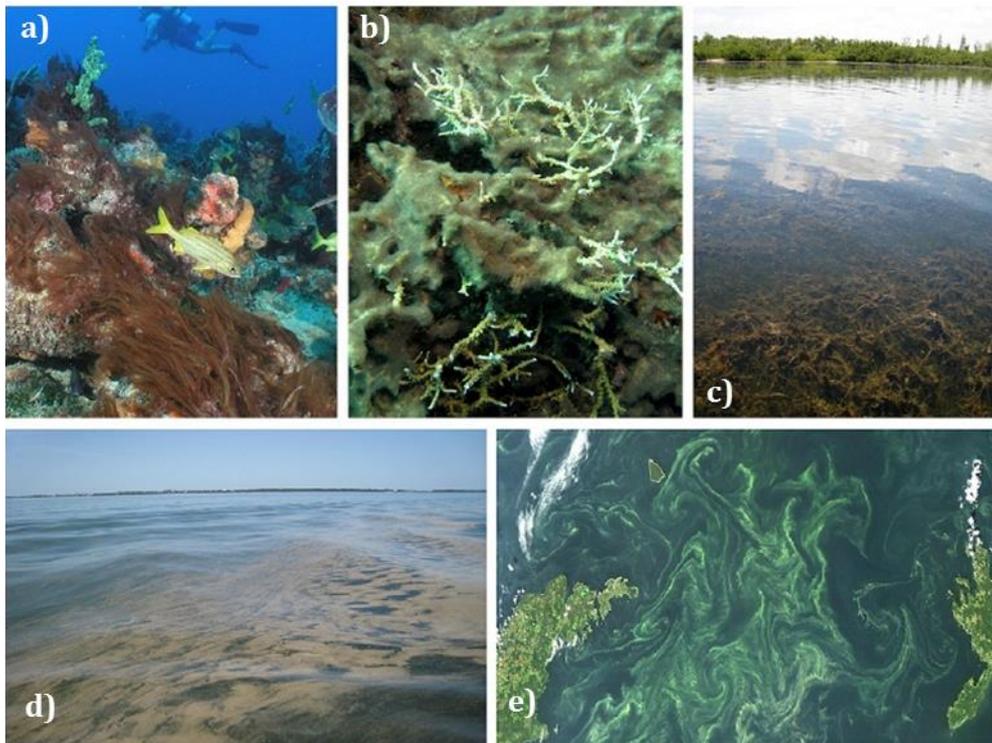


Figura 1.1: Ejemplos de afloramientos de cianobacterias marinas. A) *Lyngbya confervoides* en Florida. b) Cianobacterias sobre coral en Nueva Guinea. c) *Lyngbya sp* en el golfo de México. d) *Trichodesmiumthiebautii* en el golfo de México. e) *Nodularia*, *Anabaena*, *Microcystis* en el mar Baltico [7].

Las cianobacterias bentónicas que causan afloramientos o “blooms” crecen sobre el sustrato formando una nata (*mat*) de color oscuro, generalmente: Verde, violeta-rojizo o marrón. El fenómeno se presenta estacionalmente y ha sido reportado en la Florida [13],

en Bahamas, Belice, St. Johnen, Islas Vírgenes Americanas [14], Guam [15, 16] y Australia. Los afloramientos en Guam y Australia, por su extensión, persistencia y toxicidad, han ocasionado mortandad de peces, así como cuantiosas pérdidas económicas y problemas de salud en los habitantes o visitantes de las zonas costeras. Además, hay que destacar que las cianobacterias bentónicas son con frecuencia los organismos dominantes que colonizan el esqueleto coralino posterior al fenómeno de blanqueamiento, afectando así la salud del arrecife de coral [17]. Aunque varias especies de cianobacterias se han encontrado en *mats* microbianos, éstos suelen ser dominados por una especie [18].

La toxicidad de estos afloramientos radica en la capacidad de estos organismos de producir compuestos que han sido llamados cianotoxinas. Éstas se dividen principalmente en tres grandes grupos según su actividad, citotoxinas, neurotoxinas y hepatotoxinas. De acuerdo a su estructura química también pueden dividirse en cuatro clases, péptidos, policétidos, alcaloides y lipopolisacáridos [19]. La mayoría de las toxinas son producidas por cianobacterias planctónicas y bentónicas de los géneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Lyngbya*, *Scytonema* y *Tolypothrix*, de los cuales, géneros como *Lyngbya*, *Schizothrix* y *Symploca* son más comunes en los afloramientos en ambientes marinos [6].

1.1 Cianobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad biológica

Durante los últimos 40 años los organismos marinos se han mostrado como una de las fuentes más interesantes de productos naturales, dando paso al descubrimiento de una gran cantidad de compuestos con estructuras nuevas y novedosas. Con el paso del tiempo la atención de los investigadores se ha vuelto hacia organismos cada vez más pequeños como lo son las cianobacterias marinas, hongos marinos, y otros grupos de eubacterias marinas. Esto se debe a que estos microorganismos representan una fuente rica de nuevos productos naturales, además de descubrir que muchos de los compuestos que previamente habían sido aislados de organismos como esponjas, tunicados y octocorales eran realmente producidos por sus microorganismos asociados como se muestra en la Figura 1.2 [20]. Dentro de los microorganismos, las actinobacterias y las cianobacterias se han destacado por producir una gran cantidad de compuestos con actividad biológica [21].

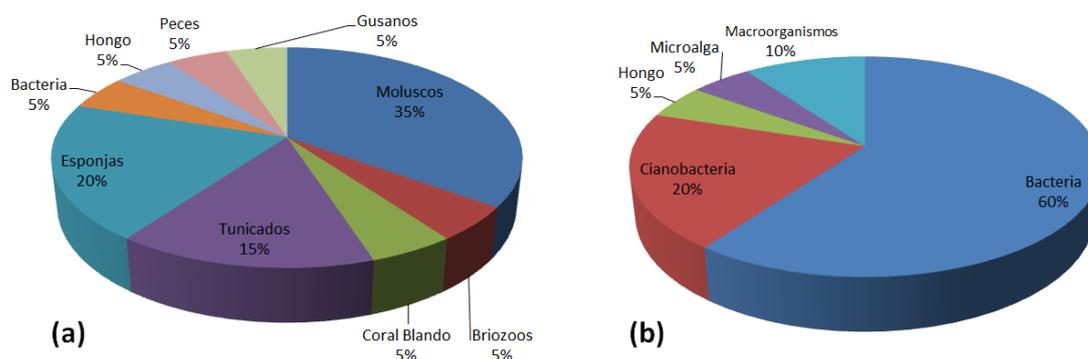


Figura 1.2: Porcentaje de metabolitos secundarios aislados de organismos marinos(a) Porcentaje de compuestos aislados de organismos marinos. (b) Porcentaje de compuestos según su verdadero productor [20]

Las cianobacterias bentónicas arrecifales se han constituido en una de las fuentes más prolíficas de compuestos con actividad biológica. Prueba de esto es el hecho que alrededor del 24% de los productos naturales marinos disponibles comercialmente para investigación biomédica son producidos por cianobacterias. Adicionalmente, como se muestra en la figura 1.2b al predecir el origen biosintético de 20 compuestos que se encuentran aprobados como medicamentos o en ensayos clínicos, 20% tienen como origen las cianobacterias [20].

Estos microorganismos han sido estudiados desde los años 70 y hasta el 2010 habían sido aislados más de 700 compuestos con una gran variedad estructural entre los que se encuentran alcaloides, terpenoides, péptidos no ribosomales y policétidos [22].

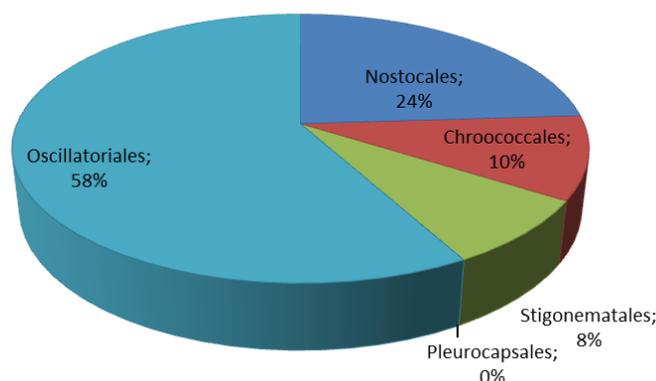


Figura 1.3: Metabolitos secundarios reportados para diferentes órdenes de cianobacterias marinas. [23]

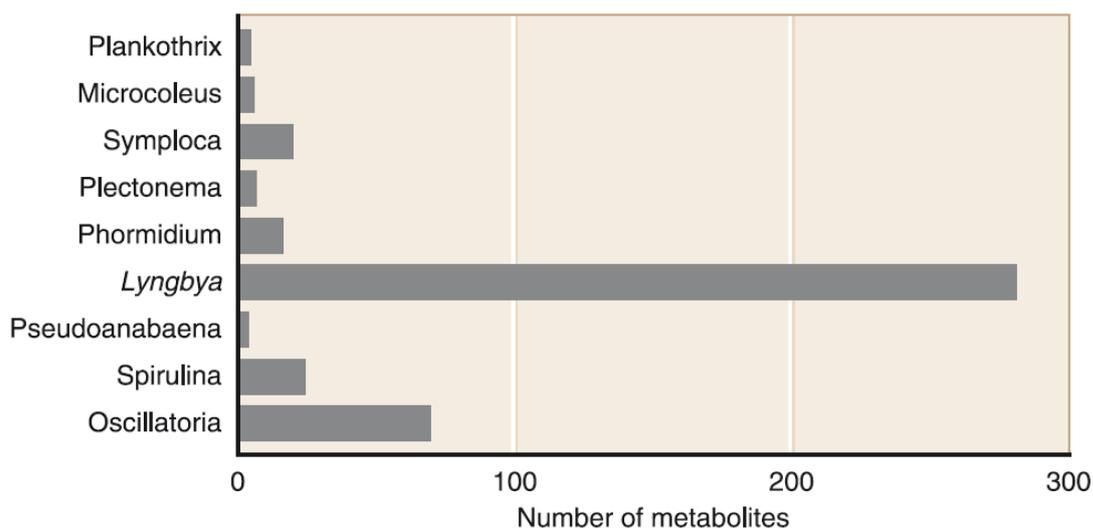


Figura 1.4: Metabolitos aislados de cianobacterias *Oscillatoriales* separadas por el género [24].

Dentro de los diferentes órdenes de cianobacterias marinas, del orden de las *Oscillatoriales* han sido aislados cerca del 58 % de los metabolitos secundarios reportados en literatura (Figura 1.3). De los géneros pertenecientes a este orden, el género *Lyngbya* es por mucho el que ha mostrado una mayor capacidad metabólica, seguido de *Oscillatoria*, *Symploca* y *Spirulina* (Figura 1.4)[23].

Llama la atención el hecho, de que solo del género *Lyngbya* han sido aislados 260 compuestos, la mayoría de ellos han sido reportados para la especie *Lyngbya majuscula*, de la cual se habían reportados 185 compuestos hasta el 2009 [25]. Sin embargo, trabajos recientes han demostrado que lo que hasta el momento había sido clasificado como *Lyngbya* es un grupo polifilético, esto se debe a que los caracteres morfológicos y morfométricos utilizados tradicionalmente para la clasificación de cianobacterias (en su mayoría de cianobacterias dulceacuícola) se hacen insuficientes para la clasificación de cianobacterias marinas [26].

Los compuestos aislados de cianobacterias en su mayoría son: Péptidos no ribosomales, policétidos o productos mixtos de policétidos-péptidos no ribosomales. La variedad estructural de los péptidos no ribosomales es inmensa ya que poseen características propias que los hacen distinguibles de los péptidos ribosomales. La más importante es quizás la presencia, no sólo de los 20 aminoácidos proteínogénicos, sino también, la de aminoácidos poco comunes y la de otros tipos de moléculas no presentes en los péptidos

ribosomales, como son, cadenas de ácidos grasos y derivados de la ruta de los policétidos [11].

Dentro de los compuestos aislados de cianobacterias marinas se han reportado diferentes tipos de actividades biológicas y además de su posible papel ecológico, como se presenta a continuación.

1.1.1 Compuestos con actividad antiparasitaria

La búsqueda de compuestos que puedan ser utilizados como medicamentos contra enfermedades tropicales es de suma importancia para países ubicados en zonas del trópico y el subtropico como el nuestro, ya que este tipo de enfermedades suelen ser endémicas de estas regiones y por esta razón la investigación que se realiza en países desarrollados suele ser muy escasa [27].

Se ha observado una nueva tendencia hacia la búsqueda de compuestos antiparasitarios a partir de compuestos aislados de cianobacterias [28]. La mayoría de las moléculas que presentan este tipo de actividad poseen estructuras de lipopéptidos o péptidos cíclicos (Tabla 1.1), dentro de los compuestos que han presentado esta actividad se destacan las almiramidas, un grupo de lipopéptidos lineales que presentan una potente actividad contra el parásito *Leishmaniadonovani* (Responsable de la leishmaniasis visceral) y que han sido utilizadas como cabezas de serie para la semisíntesis de análogos estructurales que han presentado un IC₅₀ similar al de las moléculas de origen natural, disminuyendo la toxicidad para células humanas [29].

Tabla 1.1: Compuestos aislados de cianobacterias marinas con actividad antiparasitaria

Compuesto	Fuente, Origen de la muestra	Actividad Biológica	Ref
Gallinamida A	<i>Schizothrix</i> sp. Panamá	<i>Plasmodium falciparum</i> IC ₅₀ 8,4 µM <i>Leishmania donovani</i> IC ₅₀ 9,3 µM	[30]
Dragonamida A	<i>Lyngbya majuscula</i> Panamá	<i>Plasmodium falciparum</i> IC ₅₀ 4,3 µM	[31]
Dragomabina	<i>Lyngbya majuscula</i> Panamá	<i>Plasmodium falciparum</i> IC ₅₀ 6,0 µM	[31]
Carmabina A	<i>Lyngbya majuscula</i> Panamá	<i>Plasmodium falciparum</i> IC ₅₀ 7,7 µM	[31]
Almiramida B	<i>Lyngbya majuscula</i> Panamá	<i>Leishmania donovani</i> IC ₅₀ 2,4 µM	[29]
Almiramida C	<i>Lyngbya majuscula</i> Panamá	<i>Leishmania donovani</i> IC ₅₀ 1,9 µM	[29]
Viridamida A	<i>Oscillatoria nigro-viridis</i> Curazao	<i>Trypanosoma cruzi</i> IC ₅₀ 1,1 µM <i>Leishmania mexicana</i> IC ₅₀ 1,5 µM <i>Plasmodium falciparum</i> IC ₅₀ 5,8 µM	[32]
Venturamida A	<i>Oscillatoria</i> sp. Panamá	<i>Plasmodium falciparum</i> IC ₅₀ 8,2 µM <i>Trypanosoma cruzi</i> IC ₅₀ 14,6 µM	[33]
Venturamida B	<i>Oscillatoria</i> sp. Panamá	<i>Plasmodium falciparum</i> IC ₅₀ 5,2 µM <i>Trypanosoma cruzi</i> IC ₅₀ 15,8 µM	[33]
Symplostatina 4	<i>Symploca</i> sp. Y <i>Schizothrix</i> sp.	<i>Plasmodium falciparum</i> EC ₅₀ 74 nM	[34]

Otra molécula de especial interés es la viridamida A (Figura 1.5), que dentro de su estructura contiene aminoácidos *N*-Metilados e hidroxilados, además del ácido 5-metoxidec-9-inoico reportado por primera vez en estos compuestos y del éster metílico del aminoácido prolina que es bastante inusual. Esta molécula presenta actividad contra el parásito *Trypanosoma cruzi* responsable de la enfermedad de Chagas [32]. Compuestos que presenten actividad contra este parásito, son de suma importancia, ya que los medicamentos utilizados actualmente solo son efectivos contra las formas cutáneas de la enfermedad [27].

De otro lado, la symplostatina 4, un depsipéptido lineal con características estructurales únicas como una unidad *N*-terminal dimetilada, una unidad de ácido 4-amino-2-penteóico y una unidad *C*-terminal de *N*-acil-pirridolina, presenta actividad en el rango de nanomolar contra el parásito *Plasmodium falciparum*. Debido a esto se han realizado estudios de relación estructura-actividad sobre esta molécula y esfuerzos para realizar su síntesis

total, para continuar con el desarrollo de estas moléculas como posibles medicamentos antimaláricos [35].

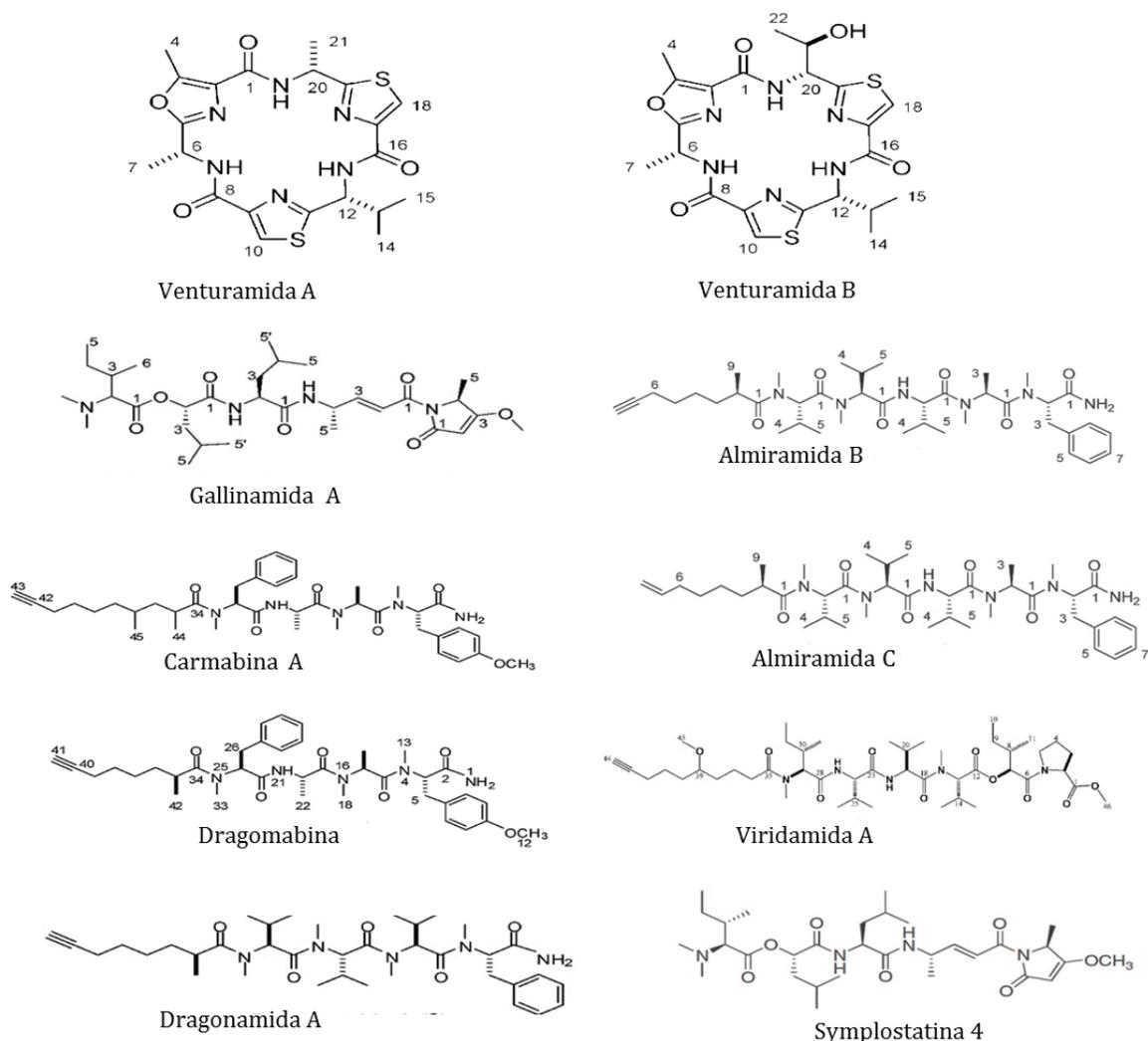


Figura 1.5: Metabolitos provenientes de cianobacterias con actividad antiparasitaria

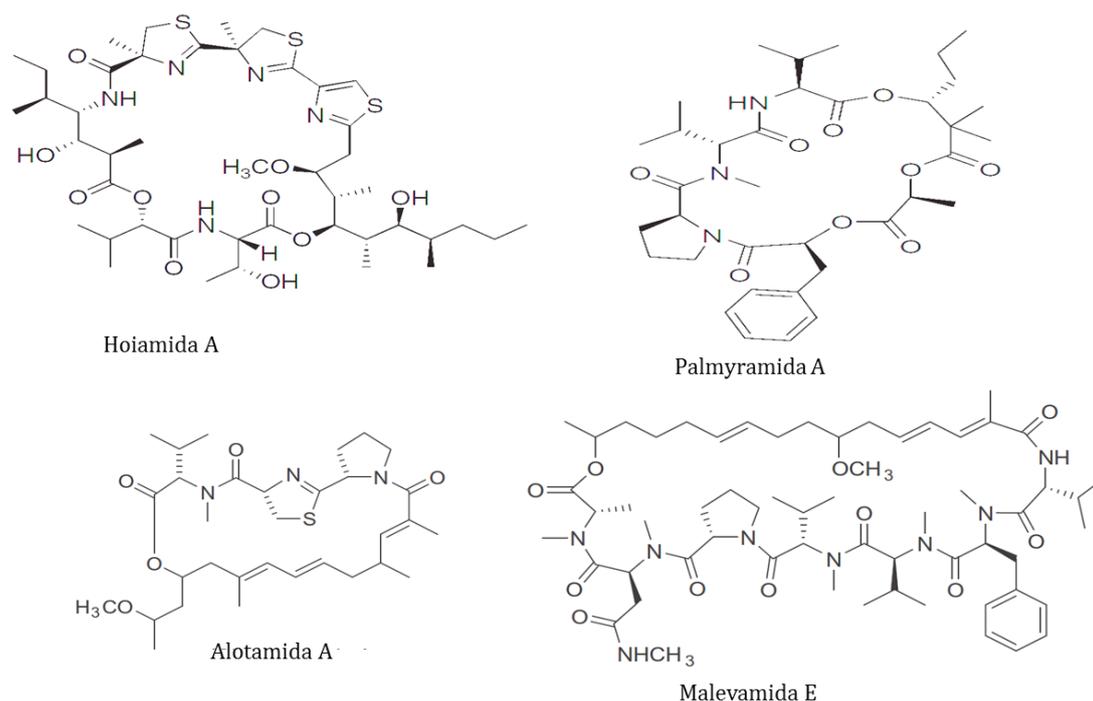
1.1.2 Agentes neurofarmacológicos

Muchos compuestos aislados de cianobacterias marinas se han caracterizado por ser altamente neurotóxicos, estos compuestos suelen actuar bloqueando o activando los canales de sodio transmembranales que están ubicados en neuronas y músculos y que se encuentran relacionados con los impulsos eléctricos[36]. Adicionalmente, se ha observado que compuestos que interactúen con los canales de sodio, en especial aquellos que bloquean el flujo de iones a través de la membrana pueden llegar a ser utilizados en tratamientos de desórdenes neurológicos entre los que se encuentran arritmias cardiacas, epilepsia, enfermedades neurodegenerativas y dolor neuropático[28].

Tabla 1.2: Agentes neurofarmacológicos aislados de cianobacterias marinas

Compuesto	Fuente	Actividad Biológica	Ref
Hoiamida A	<i>Lyngbya majuscula</i> y <i>Phormidium gracile</i> Papua Nueva Guinea	Activador de canales de sodio EC ₅₀ 1,7 μM en neuronas neocorticales de ratón	[37]
Palmyramida A	<i>Lyngbya majuscula</i> con alga roja <i>Centrocerca ssp.</i> Atolon de Palmyra	Citotoxicidad de neuro-2 ^a cells IC ₅₀ 17.5 μM	[34]
Malevamida E	<i>Symploca laete-viridis</i> Hawái	Inhibidor del flujo de calcio en celulas HEK	[34]
Alotamida A	<i>Lyngbya bouillonii</i> Papua Nueva Guinea	Activador del flujo de calcio EC ₅₀ 4,18 μM en neuronas cerebrocorticales de ratón	[25]

Cabe resaltar que muchos de los compuestos que han presentado este tipo de actividad presentan estructuras cíclicas. Dentro de este grupo de moléculas se destaca la Hoiamida A, este compuesto es un híbrido de la ruta biosintética de los policétidos y los péptidos no ribosomales con varias subestructuras únicas como una unidad de isoleucina extendida, dos unidades de tiazolina metiladas y una unidad de tiazol; adicionalmente, presenta un alto grado de metilación y oxigenación en la parte del policétido [37].

**Figura 1.6:** Estructura de compuestos con actividad neurofarmacologica

1.1.3 Cianobacterias marinas como fuente de compuestos con actividad citotóxica.

La actividad biológica que ha revestido una mayor importancia entre los compuestos aislados de cianobacterias marinas, es su actividad citotóxica contra líneas celulares tumorales y por ende su potencial uso como agentes terapéuticos contra el cáncer. Varios de estos compuestos y algunos de sus análogos sintéticos están en la actualidad en fases clínicas de estudio. Se ha estimado, que de los 20 agentes anticancerígenos que actualmente están en pruebas clínicas, al menos un 35% de éstos, basados en similitudes estructurales, pueden tener a las cianobacterias marinas como fuente primaria [38].

Algunos de los compuestos aislados de cianobacterias marinas que han mostrado actividad citotóxica son presentados a continuación (Tabla 1.3 y Figura 1.7). Cabe resaltar que todos estos compuestos han presentado actividad *in vitro* contra líneas celulares tumorales del rango de μM e incluso algunos encuentran valores de IC_{50} del rango de nM.

Tabla 1.3: Algunos ejemplos de compuestos aislados de cianobacterias que han presentado actividad citotóxica.

Compuesto	Fuente	Actividad Biológica	Ref
Bisebromoamida	<i>Lyngbya sp.</i> Okinawa	IC_{50} contra HeLa S3 de 0,04 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Valor promedio de GI_{50} de 40nM para 39 líneas celulares de cáncer humanas	[39]
Pompanopeptina A	<i>Lyngbya confervoides</i> Florida	Inhibición de tripsina IC_{50} 2,4 μM	[40]
Hantupeptina A	<i>Lyngbya majuscula</i> Singapur	IC_{50} contra línea celular MOLT-4 de 32nM	[41]
Cocosamida A	<i>Lyngbya majuscula</i> Guam	IC_{50} contra línea celular HT-29 de 24 μM IC_{50} contra línea celular MCF7 de 30 μM	[42]
Cocosamida B	<i>Lyngbya majuscula</i> Guam	IC_{50} contra línea celular HT-29 de 11 μM IC_{50} contra línea celular MCF7 de 39 μM	[42]
Veraguamida A	<i>Oscillatoria margaritifera</i> Panamá	LD_{50} contra línea celular H-460 de 141 nM	[43]
Veraguamida D y E	<i>Symploca hydroides</i> Guam	Valores de IC_{50} entre 0,54 y 1,5 μM contra las líneas celulares HT29 y HeLa	[43]
Lynbyaciclámidas A y B	<i>Lyngya sp.</i> Okinawa	IC_{50} contra la línea celular B16 de 0,7 μM	[44]
Symploclamida A	<i>Symploca sp.</i> Papua Nueva Guinea	IC_{50} contra línea celular H-460 de 40nM	[28]

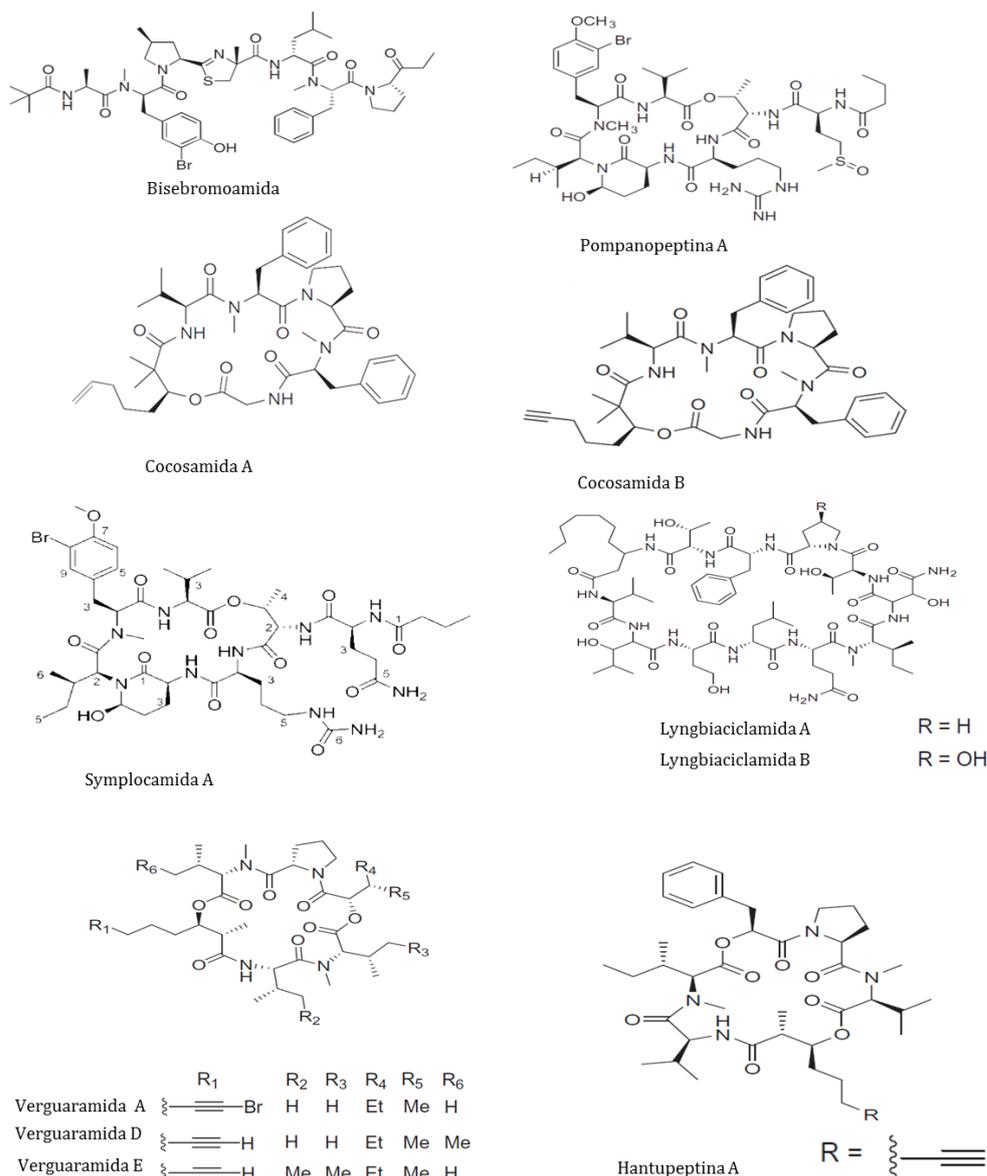


Figura 1.7: Estructuras de compuestos con actividad citotóxica

Otro de los ejemplos más relevantes de compuestos aislados de cianobacterias con actividad anticancerígena potente es la Curacina A, un lipopéptido con un anillo de tiazolina aislado de *Lyngbya majuscula* recolectada en Curazao y que ha sido probada contra más de 60 líneas de células tumorales, mostrando valores de IC₅₀, del orden de 0,72 μM. Esta molécula fue sometida a varios estudios *SAR* (*Structure activity relation*) con lo cual se han desarrollado varios análogos estructurales con mayor y mejor actividad, Figura 1.8 [45, 46].

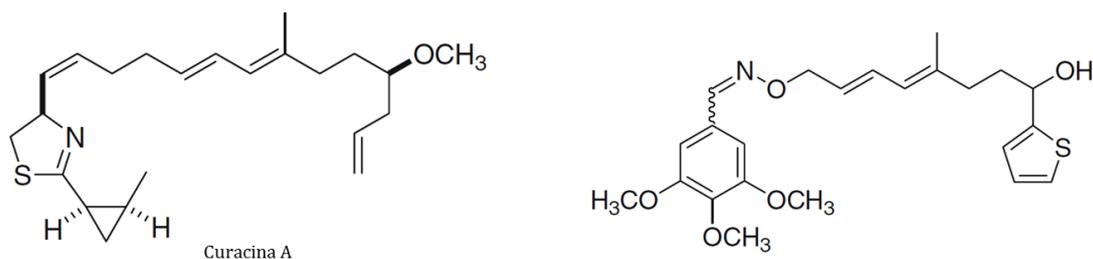


Figura 1.8: Estructura de la Curacina A y uno de los análogos estructurales más promisorios

El ejemplo más exitoso de compuestos aislados de cianobacterias como agente terapéuticos contra el cáncer es el caso de la dolastatinas 10 y 15 y sus respectivos análogos sintéticos (Figura 1.9). La dolastatina 10, debido a los buenos resultados obtenidos en los ensayos *in vitro*, rápidamente fue llevada a ensayos clínicos. Sin embargo, tuvo que ser retirada debido a la falta de eficacia y al reporte de neuropatías periféricas en algunos pacientes. Con estos resultados se realizó la síntesis de análogos estructurales; Entre éstas moléculas se puede encontrar el TZT-1027 (soblidotina), un derivado semisintético de la dolastatina 10, que redujo la toxicidad y permitió eliminar los efectos secundarios como el desarrollo de neuropatías, mejorando su efectividad contra algunas líneas celulares, lo cual le permitió alcanzar etapas de la fase clínica III de ensayos clínicos, en Estados Unidos, Europa y Japón [46].

De otro lado, la Dolastatina 15 presentó una menor actividad en ensayos *in vitro* por lo que no fue llevada a ensayos clínicos, pero su estructura ha permitido el desarrollo de otros compuestos como el LX651 (synthadotina o tasidotina) desarrollado como la tercera generación de análogos de la dolastatina 15 con mejores propiedades farmacológicas y farmacocinéticas, se encuentra actualmente en fase clínica II, observándose una muy buena actividad, sin efectos colaterales como la cardiotoxicidad mostrada por otros análogos [28].

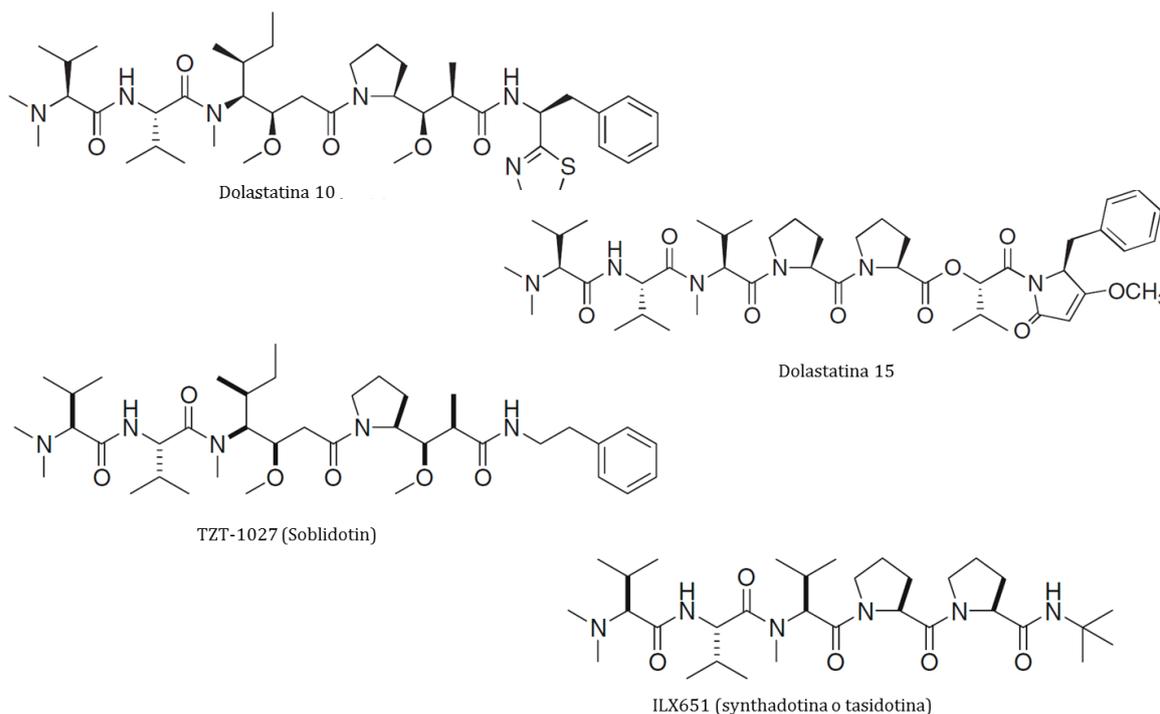


Figura 1.9: Estructuras de las Dolastatinas 10 y 15 junto con sus análogos sintéticos más exitosos

El desarrollo más importante de moléculas inspiradas en los compuestos aislados por cianobacterias hasta el momento es el Bretuximabvetodin® (Figura 1.10), el cual fue aprobado por la FDA en agosto de 2011 para el tratamiento del linfoma de Hodgkin y otros tipos de linfomas. Su estructura consiste en un anticuerpo monoclonal que tiene como diana los receptores CD30 presente en las células cancerosas unido mediante un “linker” a un análogo de la Dolastatina 10 (Monometilauristatina E)[20].

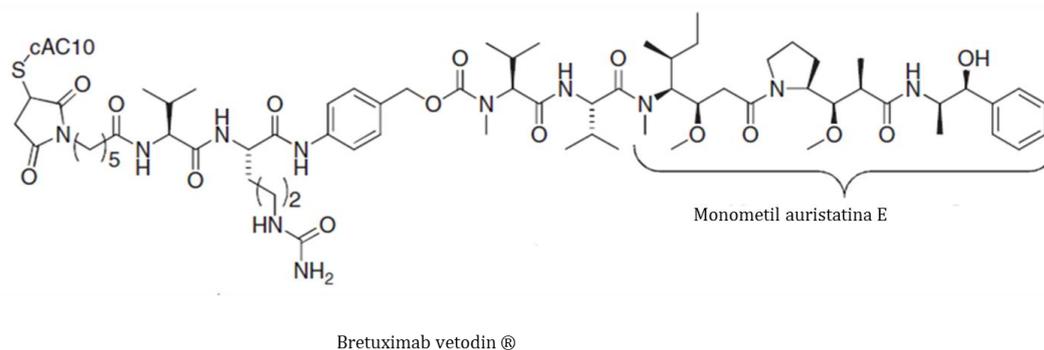


Figura 1.10: Estructura de Bretuximabvetodin®

Se ha observado que en muchos de los compuestos aislados de cianobacterias marinas, el mecanismo de acción consiste en actuar como antimetabólicos, interfiriendo con los microtúbulos, como es el caso de las Dolastatinas y la Curacina A. De otra forma, la versatilidad que tienen para actuar como anticancerígenos, no solo se limita a este modo de acción, también han sido aislados compuestos que pueden actuar como inhibidores de las histona de acetilasa (HDAC), inhibidores de la serina proteasa, moléculas que modulan la apoptosis, y otras que muestran mecanismos de acción y blancos farmacológicos específicos desconocidos, lo cual comprueba el potencial que tienen los compuestos provenientes de estos microorganismos para ser utilizados en terapias contra el cáncer [46].

1.2 El cáncer

A nivel mundial el cáncer es una de las principales causas de muerte. Se calcula que en 2008 se produjeron alrededor de 7,5 millones de muertes debido a esta enfermedad, siendo: pulmón, mama, colón, estómago y próstata los que se presentan con mayor frecuencia. En el caso de Colombia, anualmente se presentan alrededor de 113 muertes por cada 100.000 habitantes en hombres y 92 muertes por cada 100.000 habitantes en mujeres. En total, las muertes debidas al cáncer, corresponden al 17% del total de muertes causadas por ENT (Enfermedades no transmisibles), con lo cual, se presenta como una de las principales causas de muerte en el país [47, 48].

El cáncer es una enfermedad en la que se presenta una alteración en el proceso normal de división celular, la cual es usualmente controlada por el material genético (ADN) de la célula. Esto puede ser causado por la interacción de la célula con los agentes carcinógenos, los cuales pueden ser de tipo químico, físicos (radiación) o biológico (virus). Las mutaciones y por ende, la posterior aparición de tumores cancerígenos, se pueden presentar en prácticamente cualquier célula del cuerpo, pero las células que se dividen con mayor frecuencia suelen ser las más propensas a desarrollar mutaciones, ya que los procesos de corrección del ADN son menos efectivos [49].

La transformación de una célula normal en una célula cancerosa, se da mediante varios estadios que pueden tomar años en completarse. Las etapas de la carcinogénesis se dividen en tres: iniciación, promoción y progresión. En la etapa inicial se producen modificaciones en el ADN (mutaciones), sin que necesariamente, se produzcan cambios en el fenotipo del individuo, estas mutaciones son producto de la interacción del ADN con

algún agente carcinogénico. En la segunda etapa, un agente promotor, induce la proliferación de la célula mutante, formando nódulos celulares precancerosos. Durante este periodo, características del estilo de vida del individuo, pueden evitar o favorecer la aparición de tumores cancerosos. La progresión, tercera y última etapa, se caracteriza por la invasión a los tejidos vecinos, la formación de metástasis y una heterogeneidad celular; En esta última etapa los tejidos cancerosos, se han repartido por todo el organismo del individuo y la supervivencia a la enfermedad suele ser de periodos cortos [50].

1.2.1 ¿Por qué continuar con la búsqueda de compuestos anticancerígenos?

El primer tratamiento de quimioterapia contra el cáncer, fue utilizado hace más de cincuenta años. La investigación en compuestos que sean útiles en el tratamiento de esta enfermedad sigue tan vigente como lo era en sus principios, ya que durante este tiempo, se han observado varios casos en los que la quimioterapia con los medicamentos existentes resulta inefectiva debido a la aparición de resistencia a medicamentos desarrollada por las células tumorales. A pesar de los avances la inestabilidad genética y la alta velocidad con que se presentan mutaciones en estas células, demuestra que el solo uso de quimioterapia, puede generar la resistencia antes mencionada [51].

A pesar del aumento en los reportes de nuevos medicamentos anticancer, se siguen observando casos clínicos, en los que al tratar tumores sólidos avanzados, la quimioterapia falla debido a la resistencia primaria o desarrollo de dicha resistencia durante el tratamiento. La exposición secuencial o simultánea de tumores, a compuestos citotóxicos que tienen mecanismos de acción no relacionados ha dominado las prácticas oncológicas. Esto fue implementado con el fin de aumentar la muerte de células malignas y evitar el desarrollo de resistencia por parte de las células que conforman el tumor. A pesar del éxito de este tipo de terapias, se ha reportado el desarrollo de mecanismos de resistencia a estos cocteles [38].

La resistencia a los cocteles de medicamentos anticancer es la principal razón por la cual se observa un descenso en la eficiencia de los tratamientos basados en quimioterapia. Los tumores suelen ser una mezcla de poblaciones de células malignas, algunas de ellas son sensibles a los medicamentos, mientras que otras son resistentes [52]. Lo anterior hace evidente la necesidad de continuar con la búsqueda y el desarrollo de nuevos compuestos que puedan ser utilizados en tratamientos contra las diferentes variaciones que presenta esta enfermedad.

1.3 ¿Por qué estudiar Cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano?

En estudios recientes realizados por nuestro grupo de investigación sobre cianobacterias bentónicas arrecifales recolectadas en la localidad de Islas del Rosario, San Andrés y Providencia, se encontró que los afloramientos de cianobacterias que se han presentado en el Caribe colombiano están conformados por cianobacterias de los géneros *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Symploca*, *Spirulina* y *Blennothrix*. Adicionalmente se logró identificar 11 especies de cianobacterias (*Lyngbya majuscula*, *L. sordida*, *L. confervoides*, *Oscillatoria margaritifera*, *O. nigro-viridis*, *O. acuminata*, *Symploca hydnoidea*, *Phormidium submembranaceum*, *P. gracile*, *Spirulina subsalsay* *Blennothrix glutinosa*), de las cuales cinco especies (*Oscillatoria margaritifera*, *Oscillatoria nigro-viridis*, *Phormidium gracile*, *Oscillatoria acuminata* y *Blennothrix glutinosa*) son nuevos reportes para el Caribe colombiano [23].

De otro lado, se observó que muchos de los extractos evaluados en el ensayo de citotoxicidad presentaron actividad contra al menos una de las líneas celulares evaluadas (A549, MDA-MB-231, MCF-7, HeLa y PC3). Algunos de los extractos presentaron una actividad a concentraciones incluso menores que la doxorrubicina, utilizada como control positivo en el bioensayo. Los primeros estudios químicos realizados por nuestro grupo de investigación sobre un extracto de *Oscillatoria nigro-viridis* y un segundo extracto de *Lyngbya majuscula*, permitieron identificar lipopéptidos de la familia de las almiramidas reportando en estos trabajos seis nuevos compuestos de los cuales, dos (almiramida B y D) presentaron actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas [23, 43, 44]. Así se observa como estos extractos podrían representar una fuente de compuestos con actividad citotóxica, la cual hasta ahora empieza a ser explorada en el país

En la actualidad se cuenta con una colección de extractos de 49 *matts* de cianobacterias obtenidas de diferentes localidades del Caribe colombiano (San Andrés, Providencia, Santa Marta e Islas del Rosario). Este volumen de muestras, algunas de ellas en cantidades pequeñas, requiere de una aproximación metodológica diferente a la aproximación tradicional en productos naturales (Aislamiento y elucidación de moléculas a partir de cada uno de los extractos), planteando la necesidad de generar herramientas que permitan una caracterización rápida que conlleve a una priorización eficiente de los extractos a estudiar.

En este sentido, la metabolómica, que consiste en el estudio del metaboloma (conjunto de todos los compuestos que produce un organismo en determinado momento [53]), se presenta como una herramienta útil para abordar el estudio de estos organismos, ya que mediante estas metodologías, se puede tener un panorama general y característico de cada una de las muestras recolectadas, con el fin de realizar la selección de aquellos extractos que representen un mayor interés químico o biológico para estudiar su composición química más a fondo.

En este trabajo, con el ánimo de contribuir al estudio químico de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales recolectadas en el Caribe colombiano como fuente de compuestos con actividad citotóxica, se realizó un estudio metabolómico sobre las 49 muestras de cianobacterias bentónicas arrecifales antes mencionadas, utilizando métodos de cromatografía líquida de alta eficiencia, con el fin de evaluar si existen variaciones temporales o espaciales en la producción metabólica de estos microorganismos. Esta información biológica acerca de las similitudes y diferencias en la expresión metabólica, apoyada en los resultados de ensayos de actividad citotóxica y antiparasitaria permitió la priorización de extractos para su estudio químico. Esta aproximación busca generar criterios de selección de muestras para este y futuros estudios químicos. Una vez seleccionados los extractos a estudiar se realizó el aislamiento y elucidación de los compuestos mayoritarios y la evaluación de dichos compuestos en ensayos de actividad biológica, para de esta manera explorar y explotar el potencial bioactivo que tienen los compuestos producidos por estos microorganismos.

1.4 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Goldblatt C, Lenton TM, Watson AJ. Bistability of atmospheric oxygen and the Great Oxidation. *Nature* 2006;443:683-6.
- [2] Metting FB, Jr. Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 1996;17:477-89.
- [3] Bano A, Siddiqui PJA. Characterization of five marine cyanobacterial species with respect to their pH and salinity requirements. *Pakistan Journal of Botany* 2004;36:133-43.
- [4] Abed RMM, Dobretsov S, Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology* 2009;106:1-12.
- [5] Sompong U, Hawkins PR, Besley C, Peerapornpisal Y. The distribution of cyanobacteria across physical and chemical gradients in hot springs in northern Thailand. *FEMS Microbiology Ecology* 2005;52:365-76.

- [6] Burja AM, Banaigs B, Abou-Mansour E, Grant Burgess J, Wright PC. Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 2001;57:9347-77.
- [7] Paerl HW, Paul VJ. Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Research* 2012;46:1349-63.
- [8] Paul V. Global warming and cyanobacterial harmful algal blooms. In: Hudnell HK, editor. *Cyanobacterial Harmful Algal Blooms: State of the Science and Research Needs*: Springer New York; 2008. p. 239-57.
- [9] Thacker RW, Paul VJ. Morphological, Chemical, and Genetic Diversity of Tropical Marine Cyanobacteria *Lyngbya* spp. and *Symploca* spp. (Oscillatoriales). *Applied and Environmental Microbiology* 2004;70:3305-12.
- [10] Hoffman L. Marine cyanobacteria in tropical regions: diversity and ecology. *European Journal of Phycology* 1999;34:371-9.
- [11] Tan LT. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry* 2007;68:954-79.
- [12] Leao PN, Engene N, Antunes A, Gerwick WH, Vasconcelos V. The chemical ecology of cyanobacteria. *Natural Product Reports* 2012;29:372-91.
- [13] Paul V, Thacker R, Banks K, Golubic S. Benthic cyanobacterial bloom impacts the reefs of South Florida (Broward County, USA). *Coral Reefs* 2005;24:693-7.
- [14] Ritson-Williams R, Paul V, Bonito V. Marine benthic cyanobacteria overgrow coral reef organisms. *Coral Reefs* 2005;24:629-.
- [15] Pennings SC, Pablo SR, Paul VJ. Chemical defense of the tropical, benthic marine cyanobacterium *hormothamnion* enteromorphides: Diverse consumers and synergisms. *Limnology and Oceanography* 1997;42:911-7.
- [16] Nagle DG, Paul VJ. Chemical defense of a marine cyanobacterial bloom. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 1998;225:29-38.
- [17] Diaz-Pulido G, McCook LJ. The fate of bleached corals: patterns and dynamics of algal recruitment. *Marine Ecology Progress Series* 2002;232:115-28.
- [18] Stal LJ. Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. *New Phytologist* 1995;131:1-32.
- [19] Dörr FA, Pinto E, Soares RM, Feliciano de Oliveira e Azevedo SM. Microcystins in South American aquatic ecosystems: Occurrence, toxicity and toxicological assays. *Toxicon* 2010;56:1247-56.
- [20] Gerwick William H, Moore Bradley S. Lessons from the Past and Charting the Future of Marine Natural Products Drug Discovery and Chemical Biology. *Chemistry & biology* 2012;19:85-98.

- [21] Williams PG. Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends in Biotechnology* 2009;27:45-52.
- [22] Choi H, Pereira AR, Cao Z, Shuman CF, Engene N, Byrum T, et al. The Hoiamides, Structurally Intriguing Neurotoxic Lipopeptides from Papua New Guinea Marine Cyanobacteria. *Journal of Natural Products* 2010;73:1411-21.
- [23] Prato J. Afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas en San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario (Caribe colombiano): Caracterización y evaluación de su posible papel ecológico. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Maestría en Microbiología; 2013.
- [24] Gerwick WH, Coates C, Engene N, Gerwick L, Grindberg RV, Jones AC, et al. Giant Marine Cyanobacteria Produce Exciting Potential Pharmaceuticals. *Microbe* 2008;3:277-84.
- [25] Soria-Mercado IE, Pereira A, Cao Z, Murray TF, Gerwick WH. Alotamide A, a Novel Neuropharmacological Agent from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya bouillonii*. *Organic Letters* 2009;11:4704-7.
- [26] Engene N, Gunasekera SP, Gerwick WH, Paul VJ. Phylogenetic Inferences Reveal a Large Extent of Novel Biodiversity in Chemically Rich Tropical Marine Cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 2013;79:1882-8.
- [27] Nwaka S, Ridley RG. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003;2:919-28.
- [28] Tan LT. Pharmaceutical agents from filamentous marine cyanobacteria. *Drug Discovery Today* 2013;18:863-71.
- [29] Sanchez LM, Lopez D, Vesely BA, Della Togna G, Gerwick WH, Kyle DE, et al. Almiramides A–C: Discovery and Development of a New Class of Leishmaniasis Lead Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 2010;53:4187-97.
- [30] Linington RG, Clark BR, Trimble EE, Almanza A, Ureña L-D, Kyle DE, et al. Antimalarial Peptides from Marine Cyanobacteria: Isolation and Structural Elucidation of Gallinamide A. *Journal of Natural Products* 2008;72:14-7.
- [31] McPhail KL, Correa J, Linington RG, González J, Ortega-Barría E, Capson TL, et al. Antimalarial Linear Lipopeptides from a Panamanian Strain of the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products* 2007;70:984-8.
- [32] Simmons LT, Engene N, Ureña LD, Romero LI, Ortega-Barría E, Gerwick L, et al. Viridamides A and B, Lipodepsipeptides with Antiprotozoal Activity from the Marine Cyanobacterium *Oscillatoria nigro-viridis*. *Journal of Natural Products* 2008;71:1544-50.

- [33] Linington RG, González J, Ureña L-D, Romero LI, Ortega-Barría E, Gerwick WH. Venturamides A and B: Antimalarial Constituents of the Panamanian Marine Cyanobacterium *Oscillatoria* sp.L. *Journal of Natural Products* 2007;70:397-401.
- [34] Tan LT. Chapter 4 - Marine Cyanobacteria: A Treasure Trove of Bioactive Secondary Metabolites for Drug Discovery. In: Atta ur R, editor. *Studies in Natural Products Chemistry*: Elsevier; 2012. p. 67-110.
- [35] Conroy T, Guo JT, Hunt NH, Payne RJ. Total Synthesis and Antimalarial Activity of Symplostatin 4. *Organic Letters* 2010;12:5576-9.
- [36] Nagarajan M, Maruthanayagam V, Sundararaman M. A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. *Journal of Applied Toxicology* 2012;32:153-85.
- [37] Pereira A, Cao Z, Murray TF, Gerwick WH. Hoiamide A, a Sodium Channel Activator of Unusual Architecture from a Consortium of Two Papua New Guinea Cyanobacteria. *Chemistry & Biology* 2009;16:893-906.
- [38] Tan DSW, Gerlinger M, Teh B-T, Swanton C. Anti-cancer drug resistance: Understanding the mechanisms through the use of integrative genomics and functional RNA interference. *European Journal of Cancer* 2010;46:2166-77.
- [39] Teruya T, Sasaki H, Fukazawa H, Suenaga K. Bisebromoamide, a Potent Cytotoxic Peptide from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya* sp.: Isolation, Stereostructure, and Biological Activity. *Organic Letters* 2009;11:5062-5.
- [40] Matthew S, Ross C, Paul VJ, Luesch H. Pompanopeptins A and B, new cyclic peptides from the marine cyanobacterium *Lyngbya confervoides*. *Tetrahedron* 2008;64:4081-9.
- [41] Tripathi A, Puddick J, Prinsep MR, Lee PPF, Tan LT. Hantupeptin A, a Cytotoxic Cyclic Depsipeptide from a Singapore Collection of *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products* 2008;72:29-32.
- [42] Gunasekera SP, Owle CS, Montaser R, Luesch H, Paul VJ. Malyngamide 3 and Cocosamides A and B from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula* from Cocos Lagoon, Guam. *Journal of Natural Products* 2011;74:871-6.
- [43] Bayona LM. Estudio de compuestos con actividad citotóxica aislados de cianobacterias bentónicas del Caribe colombiano. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia- Trabajo de Grado, Departamento de Química; 2012.
- [44] Quintana J, Bayona LM, Castellanos L, Puyana M, Camargo P, Aristizabal F, et al. Almiramides D-E, cytotoxic peptides from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigroviridis*. *Phytochemistry* 2013;Sometido.
- [45] Gerwick WH, Proteau PJ, Nagle DG, Hamel E, Blokhin A, Slate DL. Structure of Curacin A, a Novel Antimitotic, Antiproliferative and Brine Shrimp Toxic Natural Product from the

Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *The Journal of Organic Chemistry* 1994;59:1243-5.

[46] Tan L. Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery. *J Appl Phycol* 2010;22:659-76.

[47] Alwan A. Global status report on noncommunicable diseases 2010. In: WHO, editor. 2010.

[48] Jaramillo FL, Montoya LP. Mortalidad por cáncer en Colombia en 2005. *Revista Facultad de Medicina* 2009;57:304-15.

[49] Spinel C. *Biología molecular de la célula eucariótica animal*. Primera ed. Bogotá: Biogénesis fondo editorial; 2002.

[50] Reddy L, Odhav B, Bhoola KD. Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology & Therapeutics* 2003;99:1-13.

[51] Browder T, Butterfield C, Kräling B, Shi B, Marshall B, O'Reilly M, et al. Antiangiogenic Scheduling of Chemotherapy Improves Efficacy Against Experimental Drug-resistant Cancer. *Cancer Research* 2000;60:1878-86.

[52] Perdissis A. Cancer multidrug resistance. *Nature Biotechnology* 1999;17:94-5.

[53] Gordon BR, Leggat W. Symbiodinium—Invertebrate Symbioses and the Role of Metabolomics. *Marine Drugs* 2010;8:2546-68.

2. Estudio metabolómico de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano

2.1 Introducción

Como se mencionó en el capítulo anterior, nuestro grupo ha sido pionero en el estudio de Cianobacterias bentónicas arrecifales en el país. A partir de estos estudios, ha sido posible determinar algunas de las especies predominantes en los afloramientos y realizar los primeros estudios químicos sobre estos organismos[1-3]. El número de extractos y la poca cantidad en que estos son obtenidos hacen difícil una aproximación tradicional al estudio químico de estos microorganismos. A continuación se presenta una aproximación que ha sido recientemente utilizada en estudios que presentan este tipo de dificultades.

2.1.1 Las tecnologías “ómicas”

Las “ómicas” (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) son un grupo de tecnologías que han revolucionado la manera en que se estudian los sistemas biológicos debido a que estas aproximaciones no se limitan a ver una parte del sistema sino que este es estudiado como un todo. El sufijo griego “*ome*” significa colección o cuerpo, el término “ómica” representa el estudio riguroso de un conjunto de moléculas, rutas biosintéticas y fenómenos que suceden dentro un sistema [4].

En cuanto a la genómica, a pesar de los avances que se han realizado desde que se secuenció el genoma humano y posteriormente la secuenciación de otros genomas como el de *Arabidopsis thaliana* y el del arroz, aún existen una gran cantidad de genes a los cuales no se les ha asignado una función específica junto con varios marcos de lectura abierta o ORFs por sus siglas en inglés, las cuales no permiten saber el inicio del gen por lo que es imposible conocer la secuencia del gen y así mismo determinar para que proteína codifica o cuál es su función. Por tal razón, al tiempo que se hacen avances en genómica, el estudio

del transcriptoma (transcriptómica) y el proteoma (proteómica) se ha venido desarrollando en los últimos años [5].

A pesar de saber que el mRNA es el medio por cual se transmite información del genoma a la maquinaria celular para la síntesis de proteínas, los niveles de mRNA no siempre correlacionan adecuadamente con los niveles de proteínas. De otro modo, los diferentes cambios post transduccionales pueden conllevar a que una proteína resulte siendo o no funcional. Por esta razón, cambios en transcriptoma y en el proteoma no siempre resultan en cambios fenotípicos en el organismo [6].

Por todo lo anterior, una nueva “ómica”, la metabolómica, que contempla el estudio de los productos finales de las rutas metabólicas ha aparecido dentro de estos grupos de tecnologías como una forma de estudiar de manera más directa los cambios que presentan los sistemas biológicos ante cambios genéticos o ambientales [7].

2.1.2 ¿Qué es la metabolómica?

No existe un consenso en cuanto a los estudios que se enmarcan dentro de la metabolómica, lo cual es de esperar teniendo en cuenta que esta es una tecnología que tiene menos de quince años de desarrollo [8]. No obstante, esta puede ser definida de manera general como el estudio exhaustivo de los metabolitos de bajo peso molecular presentes en un sistema biológico (célula, tejido, biofluido, órgano u organismo) en un momento determinado [9-11].

Sin embargo, un estudio metabolómico como el descrito anteriormente es imposible de realizar con los métodos de análisis y separación con los que se cuenta actualmente. Prueba de esto es que se ha determinado que el metaboloma de una planta puede tener cerca de 200.000 metabolitos, pero los estudios realizados hasta ahora en este campo solo han logrado analizar desde 50 hasta unos cientos de compuestos, muchos de los cuales no han sido identificados químicamente [12].

De otro lado, los metabolitos secundarios tienen una gran variación en sus propiedades químicas (peso molecular, polaridad, solubilidad) y físicas (volatilidad) lo cual hace que un análisis metabolómico deba incluir desde compuestos polares volátiles como el etanol, hasta compuestos con mayores pesos moleculares, que pueden ser polares como los carbohidratos o no polares como terpenoides y lípidos. Esto hace que el estudio del metaboloma represente un problema mucho más complejo cuando se compara con el

proteoma (arreglos de 20 aminoácidos) y el transcriptoma (arreglos de 4 bases nitrogenadas) [13].

Por lo anterior se han planteado una serie de aproximaciones que se incluyen dentro de la definición de estudio metabolómico como se muestra a continuación [13, 14]:

- ✓ **Análisis con metabolitos objetivo:** Es el análisis cuantitativo o cualitativo de un grupo de metabolitos pertenecientes a una ruta enzimática específica que pueden ser afectados por perturbaciones bióticas o abióticas.
- ✓ **Metabolómica:** Consiste en el análisis exhaustivo de todos los metabolitos presentes en un sistema biológico bajo un determinado grupo de condiciones.
- ✓ **Perfil metabólico:** consiste en la identificación y cuantificación de un determinado número de metabolitos predeterminados, que por lo general se encuentran relacionados con una ruta metabólica específica.
- ✓ **Huella metabólica:** Consiste en un análisis rápido y global que permite clasificar las muestras basados en su origen o relevancia biológica. No suele realizarse cuantificación o identificación de los metabolitos.
- ✓ **Metabonómica:** Evalúa los cambios en los metabolitos causados por una enfermedad, tratamientos médicos o exposición a toxinas.

Por último, es importante resaltar que todas las aproximaciones metabolómicas mencionadas anteriormente presentan bastantes ventajas con respecto a los métodos de análisis químico convencional (extracción, fraccionamiento, purificación y bioensayos) dado que todos los compuestos se miden en un único paso haciendo más probable que compuestos inestables o aquellos que se pierden en el proceso de fraccionamiento puedan ser detectados [11].

2.1.3 Aplicaciones de la metabolómica

La metabolómica es una técnica muy versátil que está siendo ampliamente utilizada en las ciencias biológicas que van desde la ciencia de alimentos, hasta la medicina y la ecología. Por ejemplo en la ciencia de alimentos la metabolómica se utiliza en el análisis de componentes y monitoreo de consumo[15]. En las ciencias médicas esta técnica se utiliza en investigación de medicamentos y medicina personalizada, entre otros. Un ejemplo de

esto son estudios que permitieron diferenciar varias formas de enfermedades coronarias mediante análisis de muestras de sangre [16].

De otro lado, la metabolómica ambiental es una aplicación que está en auge, aumentando el número de investigaciones en este tema. Esta se puede entender como la aplicación de estas técnicas para estudiar como los organismos se relacionan con el ambiente a su alrededor con el fin de aprender y entender cómo se ven afectados por las condiciones ambientales. Mediante estos estudios es posible caracterizar la respuesta de los organismos ante el estrés tóxico con el fin de encontrar biomarcadores que permitan realizar diagnósticos ambientales o encontrar compuestos bioactivos a partir de interacciones ecológicas [17].

En los últimos años los estudios metabolómicos se han convertido en la piedra angular de la genómica funcional y de la biología de sistemas, ya que los cambios observados en el metaboloma muestran de manera directa cuáles genes afectan la función de cual ruta metabólica. Midiendo el metaboloma en diferentes estados fisiológicos es posible realizar estudios de biología sistemática [18, 19].

En organismos marinos los estudios metabolómicos han sido menos numerosos en comparación a los realizados para organismos terrestres. La mayoría de estudios se enfocan a metabolómica ambiental, buscando encontrar cambios metabólicos como respuesta a estrés ambiental, aunque también existen algunos otros enfocados a la búsqueda de marcadores quimiotaxonomicos e incluso compuestos con actividad biológica [9, 20].

Entre algunos ejemplos de los trabajos realizados con organismos marinos están el uso de la aproximación de huella metabolómica para establecer marcadores quimiotaxonómicos haciendo el perfil de ácidos grasos en más de 200 cepas de microalgas entre las que se encuentran varias diatomeas [21]. También se encuentran estudios sobre el metaboloma del mejillón *Mytilus californianus* basados en CLAE-EM y CG-EM para determinar las diferencias en la producción metabólica durante el ciclo de vida [22]. Por último en cianobacterias marinas se han realizado trabajos utilizando espectrometría de masas de imágenes que han permitido visualizar la distribución espacial de los metabolitos secundarios producidos por estos microorganismos [23].

2.1.4 Técnicas analíticas utilizadas en estudios metabólico

Es un hecho aceptado que una única técnica analítica no permite visualizar el metaboloma completo, por lo que es necesario usar combinaciones de las diferentes técnicas para obtener una visión global del sistema de estudio. Entre las técnicas que han sido utilizadas en estos estudios se encuentran: Espectroscopía infrarroja (IR), resonancia magnética (RMN), cromatografía en capa delgada (CCD), cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a detector de arreglo de diodos o espectrometría de masas (CLAE-DAD/ CLAE-EM), electroforesis capilar con detector ultravioleta o de espectrometría de masa (EC-UV/ EC-EM), cromatografía de gases acoplada a detector de masas y cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas (CLAE-RMN-EM)[5].

La espectroscopía RMN es utilizada en estudios metabólicos debido a que es una técnica robusta, confiable y no destructiva que permite detectar metabolitos en concentraciones del orden de micromolar (μM). Sin embargo, estos estudios suelen enfocarse en la búsqueda de biomarcadores o de compuestos químicos característicos que puedan ser indicativos de un estado específico del sistema biológico como por ejemplo una enfermedad [24].

La espectrometría de masas es junto a la resonancia magnética nuclear, la técnica más utilizada en estudios metabólicos. Dentro de esta técnica se incluyen varias aproximaciones que van desde estudios por inyección directa de los extractos hasta técnicas que incluyen una separación previa de los metabolitos como CLAE-EM, CG-EM o EC-EM [5].

Entre los métodos de inyección directa se incluyen nuevas tecnologías de ionización que permiten un análisis directo que requieren un menor pretratamiento de la muestra como es el caso de DESI, EESI y MALDI con los que es posible detectar compuestos nuevos, que no habían sido descubiertos antes probablemente debido a que se degradaban durante el proceso de extracción [13]. Dentro de estas se destaca la técnica MALDI a partir de la cual se ha desarrollado la espectrometría de masas de imágenes con la cual es posible determinar en qué parte de la célula, tejido u órgano se están produciendo los metabolitos de interés lo cual ha permitido conocer más acerca de cómo se llevan a cabo los procesos biológicos que suceden dentro de un organismo [25].

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas ha probado ser una técnica muy útil en la realización de perfiles metabólicos ya que es una técnica muy robusta que

permite obtener información semicuantitativa de los metabolitos presentes en la muestra además de separar mezclas muy complejas con lo cual se pueden llegar a observar más de cien compuestos en un único análisis [18]. De otro lado esta técnica requiere que los metabolitos sean volátiles por lo cual en muchas ocasiones es necesario derivatizar las muestras lo que requiere un gasto adicional de tiempo además de una mayor varianza [5].

Por último, la cromatografía líquida de alta eficiencia es una técnica de separación más universal que puede ser utilizada bien sea para análisis de metabolitos objetivos o para análisis exhaustivos. Al acoplar esta técnica a un detector de espectrometría de masas se obtiene una mejor ionización de los compuestos presentes en la muestra con lo cual se facilita la detección y diferenciación de compuestos, además de que con el uso de bases de datos permitiría avanzar en el proceso de identificación. Las fuentes de ionización más utilizadas son ESI y APCI principalmente. A diferencia de la cromatografía de gases, los equipos de cromatografía líquida se pueden encontrar acoplados a una gran cantidad de analizadores de masas [6]. De otro lado, aunque en menor cantidad también se han realizado análisis metabolómicos utilizando cromatografía líquida acoplada a detectores de arreglo de diodos, con los cuales, a pesar de la poca información estructural para la identificación de los compuestos que pueden dar comparado con espectros de RMN y EM, permiten obtener perfiles metabólicos que incluyen una gran cantidad de metabolitos para los análisis estadísticos de la información [5].

2.1.5 Análisis estadístico

Dentro del desarrollo de las “ómicas” la bioinformática ha jugado un papel fundamental, debido a la gran cantidad de información que se obtiene a partir de los datos de los diferentes experimentos que se realizan, en nuestro caso, datos cromatográficos y espectroscópicos. En la metabolómica los métodos de análisis multivariado han sido de mucha ayuda en la simplificación y extracción de información a partir de los datos, estos se pueden dividir en dos grandes grupos: no supervisados (análisis de componentes principales y análisis de conglomerados jerárquicos) y supervisados. La diferencia entre estos dos es que en el segundo se utiliza un grupo de datos con los cuales se “entrena” el algoritmo, para realizar este “entrenamiento” es necesario poseer información previa acerca de las muestras que se están analizando [26].

✓ **Análisis de componentes principales**

Este tipo de análisis es uno de los más antiguos y más utilizados en el análisis multivariados. Cuando se realiza la recolección de los datos por cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente, la cantidad de datos que se obtienen hacen que la interpretación directa de estos sea prácticamente imposible. El análisis de componente principal (ACP) tiene como objetivo la estructuración de los datos mediante la reducción de variables con lo cual se facilita la interpretación de la información contenida en los datos [27].

De manera general, el ACP consiste en describir la varianza de un grupo de datos multivariados en términos de un grupo de variables ortogonales (componentes principales). En este sentido las nuevas variables (componentes principales) pueden ser representadas como combinaciones lineales de las variables originales (en este caso corresponde a la concentración de metabolitos), estas nuevas variables contendrán un mayor porcentaje de la varianza de los datos con respecto a las variables originales [5].

✓ **Análisis de conglomerados o clústeres jerárquicos**

Este es un método de agrupación que busca separar un grupo de objetos de tal forma que los objetos de un mismo grupo sean similares y objetos de grupos diferentes sean disímiles. Para conformar los grupos se debe definir una medida de la similitud de las muestras que pueden ser medidas de distancia como la distancia euclidiana o Manhattan, medidas de correlación como el coeficiente producto de Pearson, entre otras. Adicionalmente se debe determinar la forma en que se forman los grupos la cual puede ser mediante enlace simple, enlace completo o método de Ward. Los resultados de este tipo de análisis se representan mediante un dendrograma o árbol donde la longitud de cada una de las ramas es proporcional a la distancia entre los grupos, lo que permite visualizar de manera sencilla la similaridad de algunas muestras en un grupo de datos [5, 27].

2.1.6 Pertinencia del análisis metabolómico de cianobacterias

En este capítulo se presenta el estudio metabolómico de 49 extractos de cianobacterias, algunos de ellos en pequeñas cantidades, con el fin de responder a ciertas preguntas de investigación como son: ¿Cianobacterias clasificadas como las mismas especies están teniendo la misma producción metabólica?, ¿Existe alguna relación entre el año de recolección o el lugar de recolección con la producción metabólica de las cianobacterias recolectadas? Adicionalmente, permitirá establecer un criterio para la selección de las muestras que se van a estudiar; También permitirá desarrollar criterios para en algunos

casos soportar y en otros cuestionar la clasificación que se había realizado previamente a las muestras analizadas.

2.2 Metodología

2.2.1 Instrumentación y reactivos

Los análisis de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a un detector de arreglo de diodos (CLAE-DAD) fueron realizados en un equipo Merck® Hitachi acoplado a una bomba multicanal L6200A, un detector de arreglo de diodos (DAD) L-4500 y una columna analítica X-Terra C18 (WATERS®, 250 mm x 4,60 mm d.i. x 5µm de tamaño de partícula). Para los análisis se utilizaron solventes grado HPLC. Para la extracción y fraccionamiento se utilizaron solventes grado Reactivo Analítico.

2.2.2 Recolección y clasificación del material biológico

La recolección de las muestras se realizó mediante buceo autónomo SCUBA, en las islas de San Andrés y Providencia e Islas del Rosario, durante los meses de Julio a Octubre, en los cuales se presentaron los afloramientos en 2009, 2010, 2011 y 2012. Las muestras fueron congeladas luego de su recolección y enviadas por vía aérea al laboratorio en la ciudad de Bogotá. Para este estudio se incluyeron las muestras identificadas previamente por sus caracteres morfológicos y morfométricos, así como varias muestras sin identificar las cuales solo han sido caracterizadas por su morfología macroscópica como algodonosas y filamentosas.

La identificación de las muestras fue realizada basados en caracteres morfométricos y morfológicos por la Profesora Mónica Puyana y Julián Prato en la Universidad Jorge Tadeo Lozano [1]. La información obtenida en cuanto a clasificación o descripción de la morfología de las muestras empleadas en este trabajo se presenta en la Tabla 2.1

Tabla 2.1: Clasificación morfológica e información de recolección de los “mats” de cianobacterias

Código	Descripción	Año	Lugar
1	<i>Lyngbya sordida</i> / <i>L. majuscula</i>	2009	Providencia
2	<i>Oscillatoria nigro-viridis</i>	2009	Providencia
3	<i>Lyngbya spp</i> / <i>O. margaritifera</i>	2009	San Andrés

Estudio químico y evaluación de la actividad citotóxica de metabolitos secundarios provenientes de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano

4	<i>P. submembranaceum / S. hydroides/ O. acuminata</i>	2010	Providencia
5	<i>O. acuminata/Spirulina spp</i>	2010	Providencia
6	<i>P. submembranaceum / S. hydroides/ O. acuminata</i>	2010	Providencia
7	<i>Phormidium. submembranaceum/ Symploca. hydroides</i>	2010	Providencia
8	<i>P. submembranaceum/ S. hydroides</i>	2010	Providencia
9	<i>P. submembranaceum/ S. hydroides</i>	2010	Providencia
10	<i>Lyngbya spp.</i>	2010	San Andrés
11	<i>O. acuminata /Spirulina sp</i>	2010	Providencia
12	<i>P. submembranaceum / S. hydroides</i>	2010	Providencia
13	<i>P. submembranaceum / S. hydroides</i>	2010	Providencia
14	<i>Oscillatoria acuminata/Spirulina sp</i>	2010	Providencia
15	<i>L. majuscula / L. sordida</i>	2010	Providencia
16	Algodonosa	2010	San Andrés
17	Algodonosa	2009	San Andrés
18	<i>P. submembranaceum / S. hydroides</i>	2009	Providencia
19	<i>Lyngbyaspp / O.nigro-viridis</i>	2009	San Andrés
20	<i>Blennothrix glutinosa / Lyngbya spp.</i>	2009	Providencia
21	Filamentosa	2009	Providencia
22	<i>S.hydroides</i>	2009	Providencia
23	<i>S. hydroides/Phormidium spp</i>	2009	Providencia
24	<i>S. hydroides/Phormidium spp</i>	2009	Providencia
25	Filamentosa	2009	Providencia
26	Algodonosa	2009	Providencia
27	<i>S. hydroides/Phormidium spp</i>	2009	Providencia
28	<i>Lyngbya spp/Oscillatoria spp.</i>	2009	Providencia
29	<i>S. hydroides/Phormidium spp.</i>	2009	Providencia
30	Algodonosa	2009	Providencia
31	Algodonosa	2009	Providencia
32	Algodonosa	2009	Providencia
33	Algodonosa	2009	Providencia
34	Algodonosa	2009	Providencia
35	Algodonosa	2009	Providencia
36	Filamentosa	2009	Providencia
37	Algodonosa	2011	Islas del Rosario
38	Algodonosa	2011	Islas del Rosario
39	Algodonosa	2011	Islas del Rosario
40	Filamentosa	2012	Providencia
41	Algodonosa	2012	Providencia
42	Filamentosa	2012	Providencia
43	Algodonosa	2012	Providencia
44	Filamentosa	2012	Providencia
45	<i>L. majuscula/ O. margaritifera</i>	2009	Providencia
46	Filamentosa	2012	Providencia

47	Filamentosa	2012	Islas del Rosario
48	Filamentosa	2012	Islas del Rosario
49	Filamentosa	2012	Providencia

2.2.3 Preparación de las muestras

Las muestras fueron liofilizadas y posteriormente se extrajeron por maceración con DCM/MeOH en proporción 1:1 tres veces. Los extractos fueron filtrados y posteriormente fueron secados. Se obtuvo un total de 49 extractos crudos. De cada uno de estos extractos se tomaron 100 mg los cuales fueron sometidos a un fraccionamiento cromatográfico sobre un cartucho de extracción en fase sólida (Diol) utilizando como fase móvil mezclas de polaridad creciente de hexano/acetato de etilo y acetato de etilo/metanol para obtener un total de cinco fracciones: Fracción 1 (Hexano/AcOEt 8:2), Fracción 2 (Hexano/ AcOEt 1:1), Fracción 3 (AcOEt 100%), Fracción 4 (AcOEt/MeOH 1:1) y Fracción 5 (MeOH 100%). Las fracciones fueron secadas en un rotavapor y almacenadas en un congelador a -4 °C hasta el momento de su análisis

2.2.4 Condiciones cromatográficas

Basados en los trabajos previos del grupo de investigación, donde los compuestos activos usualmente se encontraban en fracciones con polaridad media [2, 3], se seleccionó la fracción 3 (AcOEt 100%) como la fracción de mayor interés por el contenido de compuestos tipo péptido y policétidos. A partir de esta fracción se prepararon soluciones de 1mg/mL, inyectando 100 µL mediante un autoinyector. Para realizar los perfiles metabólicos por CLAE se usó un programa multigradiente de ACN/ Ac. Fórmico 0.05% como sigue: ACN/H₂O 30:70 por 5 min, seguido por un primer gradiente hasta ACN/Ac. Fórmico 80:20 en 30 min, seguido de un segundo gradiente hasta ACN 100% en 5 min y manteniendo ACN 100% por 5 min a un flujo de 1 mL/min. Se realizó detección entre 210 y 450 nm graficando los cromatogramas a 210 nm.

2.2.5 Análisis de datos

Con los datos cromatográficos obtenidos se procedió a la construcción de una matriz para cada una de las muestras, la cual contenía el área normalizada de todos los picos del perfil

cromatográfico contra los tiempos de retención. La identificación del pico en diferentes cromatogramas se realizó por medio de la comparación de los espectros UV de cada pico en el cromatograma obtenido para cada muestra. Sobre esta matriz se aplicaron algoritmos para el pretratamiento de los datos de Centrado y Escalamiento (centrado, auto escalamiento, escalamiento de rango, escalamiento de nivel, escalamiento “Pareto” y escalamiento “vast”)[28] con lo cual se obtuvo siete matrices de datos. Sobre todas ellas se realizó un análisis de componentes principales y análisis de conglomerados (*Cluster*) utilizando el paquete comercial para análisis estadísticos Minitab 16 (para el análisis de conglomerados se utilizó como método de unión el método de Ward y como medida de distancia el coeficiente producto momento de *Pearson*).

El coeficiente producto momento de *Pearson* el cual determina el grado de correlación o asociación lineal entre casos está definido como:

$$r_{jk} = \frac{\sum_i (X_{ij} - \bar{X}_j)(X_{ik} - \bar{X}_k)}{\sqrt{\sum_i (X_{ij} - \bar{X}_j)^2} \sqrt{\sum_i (X_{ik} - \bar{X}_k)^2}}$$

Donde X_{ij} es el valor de la variable i para el extracto j , y \bar{X}_j es la medida de todas las variables que definen al extracto j . [27]

El método de Ward busca la mínima variación sobre los conglomerados, en cada paso se unen los conglomerados que poseen menor distancia entre ellos. Esto se mide mediante la suma de los cuadrados de Ward:

$$SCW = \frac{1}{(1/n_h + 1/n_k)} \|\bar{X}_h - \bar{X}_k\|^2$$

Donde \bar{X}_h y \bar{X}_k son los centroides, n_h y n_k los tamaños de los conglomerados h y k respectivamente. [27]

2.2.5 Ensayos de actividad Biológica

Diecinueve de los 49 extractos fueron evaluados en ensayos de actividad *in vitro* en los siguientes ensayos: Citotoxicidad contra la línea celular MCF-7 (Cáncer de mama) consiste

en un ensayo colorimétrico utilizando como revelador sulforodamina B y como control positivo adriamicina[29]. El ensayo Antimalaria se realizó contra el parásito *Plasmodium falciparum* sepa W2 (resistente a Cloroquina) por un método fluorométrico utilizando como revelador Picogreen® y como control positivo cloroquina[30]. Para la enfermedad de Chagas se utilizó el parásito *Trypanosoma cruzi* en un ensayo colorimétrico utilizando como control positivo Benznidazol y como revelador rojo de clorofenol[31]. Por último, el ensayo para la leishmaniasis se realizó sobre el parásito *Leishmania donovani donovani* (Leishmaniasis visceral) en su estadio amastigote, por medio de un ensayo fluorométrico utilizando como revelador Picogreen® y como control positivo anfotericina B [32]. Para todos los ensayos se evaluaron concentraciones de extracto de 10 µg/mL. Los extractos fueron seleccionados teniendo en cuenta la identificación realizada previamente y el año de recolección. Los ensayos fueron realizados en el INDICASAT- Panamá por el grupo de la Dr. Carmenza Spadafora.

2.3 Resultados y discusión

Se trabajó con 49 extractos de cianobacterias recolectadas en los años 2009 a 2012 en diferentes lugares del Caribe colombiano, algunas muestras de estas cuentan con una clasificación basada en características morfológicas macro y microscópicas y características morfométricas, mientras que de otras solo se tienen las observaciones realizadas al momento de la recolecta (Tabla 2.1). Sin embargo, en trabajos previos se ha observado que características morfológicas macroscópicas de los consorcios de cianobacterias se pueden asociar en muchos casos a las especies presentes. De este modo, muestras con formas “algodonosas” suelen estar conformadas por consorcios de cianobacterias de los géneros *Phormidium* y *Symploca*, mientras que muestras con morfologías filamentosas se asocian a consorcios de los géneros *Lyngbya* y *Oscillatoria* preferentemente (Figura 2.1)[1].

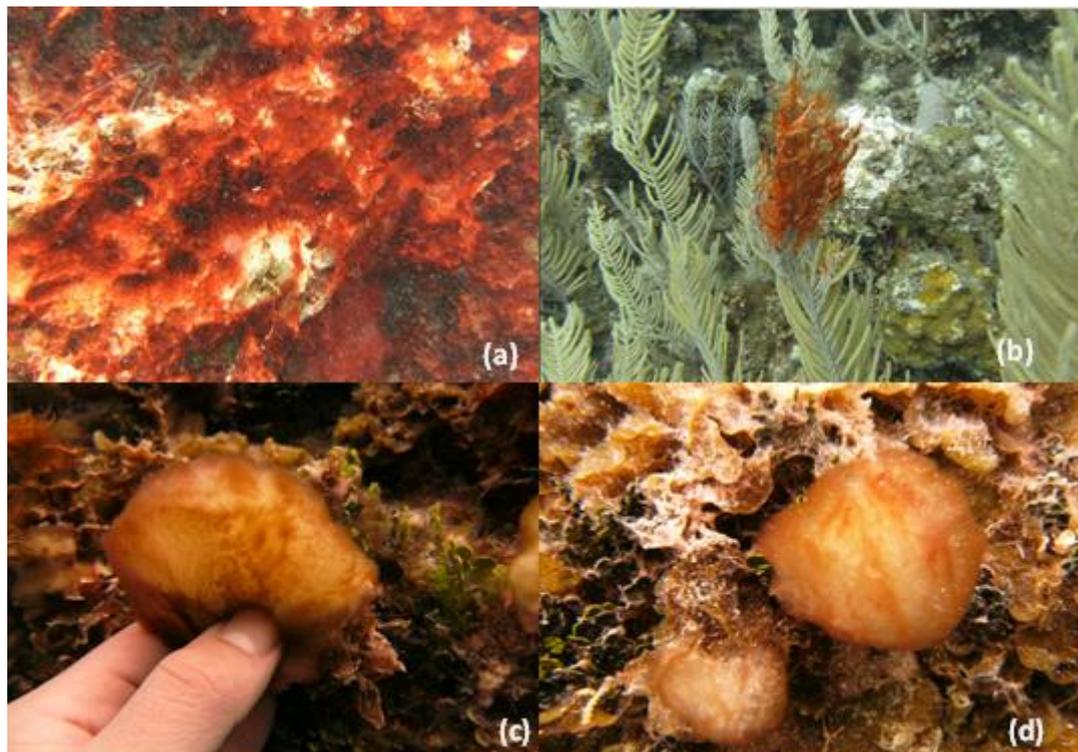


Figura 2.1: Fotografías de los tapetes de cianobacterias recolectados, con morfologías filamentosas (a) y (b) y morfologías algodonosas (c) y (d).

Las condiciones cromatográficas para la realización de los perfiles de los extractos se obtuvieron utilizando como modelo el extracto número 1 que había sido previamente estudiado (Figura 2.2)[3]. La Fracción 3 fue seleccionada para realizar los estudios debido a que, es en esta fracción donde se han encontrado los compuestos más interesantes desde el punto de vista de su actividad biológica y su estructura química; adicionalmente, las fracciones 1 y 5 son descartadas ya que contienen principalmente grasas y sales, respectivamente.

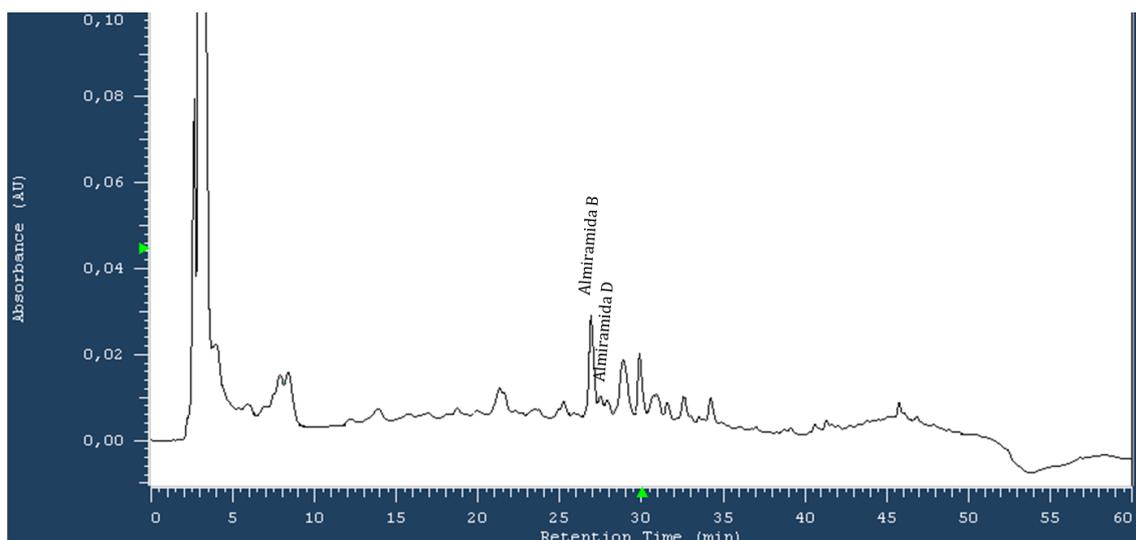


Figura 2.2: Cromatograma de la fracción 3 del extracto número 1 que fue utilizado como modelo para la obtención de condiciones cromatográficas.

Es importante resaltar que este método cromatográfico permitió obtener una separación adecuada de los compuestos presentes en la fracción 3 teniendo en cuenta que esa era una fracción bastante compleja, principalmente en la zona entre 20 y 40 minutos que es donde se observa una mayor cantidad de picos cromatográficos.

De igual manera, la aplicación de este método para el análisis de las 49 muestras permitió obtener buenas separaciones cromatográficas en términos de resolución. Los cromatogramas obtenidos para todas las muestras tienen entre 20 y 60 picos, la mayoría de los cuales tenían tiempos de retención entre 20 y 40 minutos.

La matriz para el estudio metabolómico se construyó a partir de los datos obtenidos en los cromatogramas de cada una de las muestras, tomando los tiempos de retención y área bajo la curva para cada uno de los picos. Los datos con tiempos de retención menores a 3 minutos y mayores a 58 minutos fueron eliminados de la matriz debido a que corresponden a efectos de deflexión del solvente o cambios en la absorbancia debido al gradiente.

2.3.1 Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales ha sido uno de los métodos estadísticos más ampliamente reportado en la literatura para la realización de estudios metabolómicos [8, 33]. Sin embargo, al realizarlo con la matriz de datos que se obtuvo en este trabajo se observó que las primeras dos componentes, que son sobre las que se suelen realizar los

análisis, contenían tan solo el 20% de la variabilidad de los datos originales por lo cual no es útil ni informativo realizar un análisis sobre los resultados obtenidos en estos análisis (Anexo A).

Lo anterior se comprobó al realizar el gráfico de las primeras dos componentes en cual no es posible observar ningún tipo de agrupamiento entre las muestras estudiadas y solo se observa que una de las muestras (la número 45) sale completamente de la tendencia como se muestra en la Figura 2.3. Así, los resultados obtenidos por ACP no permiten obtener información concluyente a partir de las muestras analizadas.

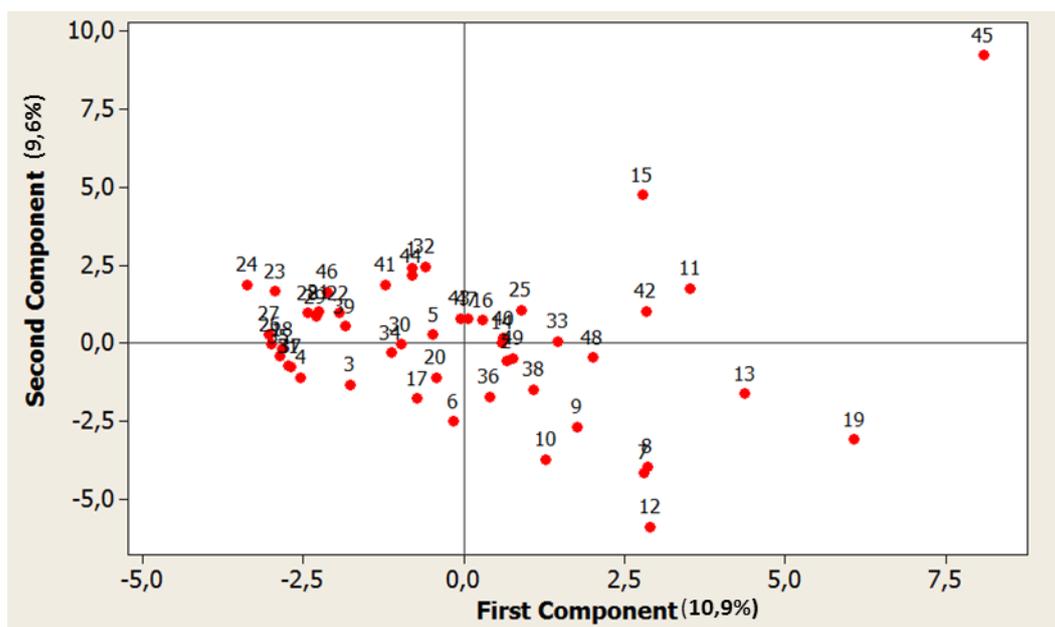


Figura 2.3: Gráfica de las dos primeras componente obtenidas por ACP

2.3.2 Análisis de conglomerados o “cluster” jerárquicos

Después del análisis de componentes principales, el análisis de conglomerados o “clusters” es uno de los más utilizados en los estudios metabolómicos debido a que es mucho más útil en la conformación de grupos, a diferencia del análisis de componentes principales el objetivo de este método es unir individuos que posean características similares y separar aquellos que tienen características diferentes [34].

Para el análisis de conglomerados se obtuvo siete matrices las cuales incluían, la matriz de los datos sin tratamiento y los 6 tratamientos realizados para los datos (centrado, autoescalamiento, escalamiento de rango, escalamiento “Pareto”, escalamiento “Vast” y

escalamiento de nivel). Es importante tener en cuenta que no todos los tratamientos de datos permiten facilitar la comprensión de los datos obtenidos, esto dependerá de los datos en sí mismos y del método con el cual sean posteriormente analizados [28].

Para este conjunto de datos se encontró que sin importar el tratamiento que se utilice el dendrograma obtenido es el mismo (Figura 2.4 y Anexo B). Esto es interesante desde un punto de vista estadístico ya que nos muestra que el uso de estos pretratamientos mantiene la naturaleza de los datos y por consiguiente no se está forzando la obtención de conclusiones, validando así los análisis aquí presentados.

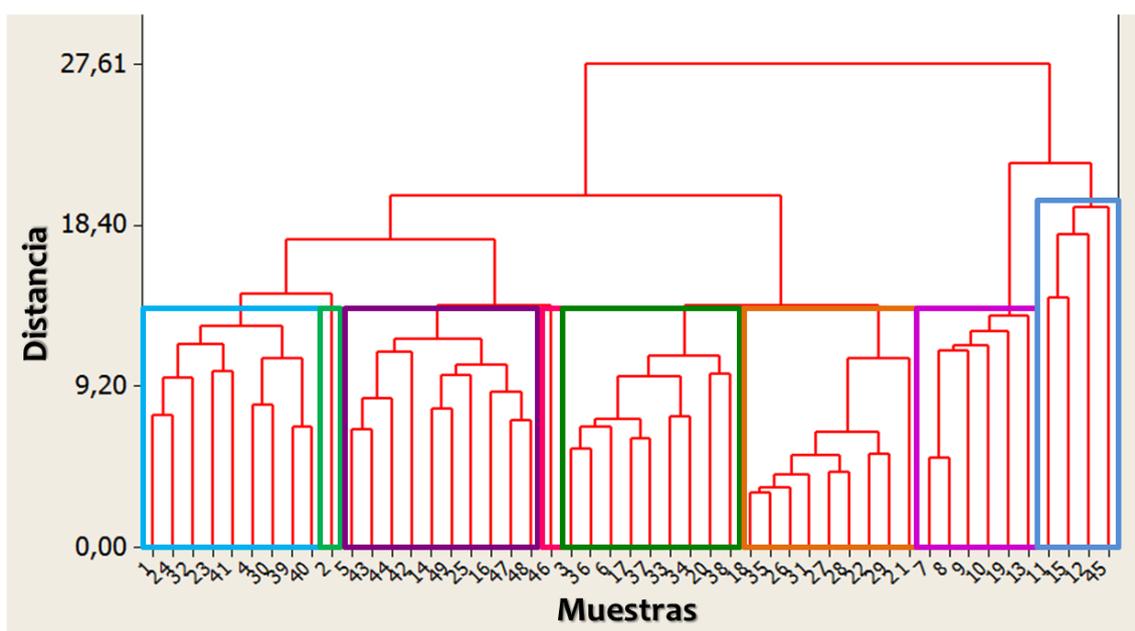


Figura 2.4: Dendrograma obtenido para el análisis de conglomerados de los datos sin tratamiento

A partir del dendrograma obtenido es posible obtener información acerca de las muestras analizadas que de otra manera era imposible ver. En primer lugar es posible reunir las 49 muestras en 8 grupos o conglomerados (Tabla 2.2),

2.3.4 Composición de los grupos obtenidos

De los 8 grupos formados, existen dos que se encuentran conformados por un único individuo (grupos 2 y 4). De un lado, el grupo 2 es la única muestra que ha sido clasificada como una única especie de cianobacterias (*Oscillatorianigro-viridis*) esto es un caso particular debido a que en estudios previos se ha observado que estos microorganismos suelen crecer como consorcios que pueden contener diferentes especies del mismo género o de diferentes géneros [1].

El grupo 4 está conformado por la muestra 46 que si bien no está clasificada tiene la particularidad de que fue recolectada cerca a la playa en aguas someras mientras que el resto de las muestras fueron recolectadas entre 8 y 20 metros de profundidad. Esto hace que las condiciones de crecimiento de este consorcio sean muy diferentes debido a que factores como la cantidad de luz de la que disponen o la presión a la que se encuentran sometidas podría afectar su producción metabólica.

De las muestras que se encuentran clasificadas, aquellas que corresponden a consorcios de cianobacterias de los géneros *Symploca* y *Phormidium* se encuentran en tres de los grupos (grupos 1, 6 y 7). Por un lado las muestras presentes en los grupos 6 y 7 se observa como claramente están dominados por muestras compuestas por dichos géneros contando solo con unas pocas excepciones.

De otro lado, en el grupo 1 se encuentran muestras clasificadas pero muy alejadas de las demás muestras (23 y 24) junto con otras seis muestras que no están clasificadas pero con una morfología macroscópica algodonosa lo cual puede indicar que estas muestras corresponden a cianobacterias de los géneros *Symploca* o *Phormidium*. Adicionalmente, también se encuentra en este grupo dos muestras atípicas, una clasificada como un consorcio de dos especies del género *Lyngbya* y una no clasificada con morfología filamentosa.

Tabla 2.2: Grupos formados a partir del análisis de conglomerados junto con la descripción de cada una de las muestras

Grupo	Código	Descripción	Año	Lugar
1	1	<i>Lyngbya sordida</i> / <i>L. majuscula</i>	2009	Providencia
	24	<i>Symplocahydnoides</i> / <i>Phormidium</i> spp	2009	Providencia
	32	Algodonosa	2009	Providencia
	23	<i>S.hydnoides</i> / <i>Phormidium</i> spp	2009	Providencia
	41	Algodonosa	2012	Providencia
	4	<i>P. submembranaceum</i> / <i>S. hydnoides</i> / <i>O. acuminata</i>	2010	Providencia
	30	Algodonosa	2009	Providencia
	39	Algodonosa	2011	Islas del Rosario
	40	Filamentosa	2012	Providencia
2	2	<i>Oscillatorianigro-viridis</i>	2009	Providencia
3	5	<i>O.acuminata</i> / <i>Spirulina</i> sp	2010	Providencia
	43	Algodonosa	2012	Providencia
	44	Filamentosa	2012	Providencia
	42	Filamentosa	2012	Providencia
	14	<i>O.acuminata</i> / <i>Spirulina</i> sp	2010	Providencia
	49	Filamentosa	2012	Providencia
	25	Filamentosa	2009	Providencia
	16	Algodonosa	2010	San Andrés
	47	Filamentosa	2012	Islas del Rosario
	48	Filamentosa	2012	Islas del Rosario
4	46	Filamentosa	2012	Providencia
5	3	<i>Lyngbya sp.</i> / <i>O. margaritifera</i>	2009	San Andrés
	36	Filamentosa	2009	Providencia
	6	<i>P. submembranaceum</i> / <i>S. hydnoides</i> / <i>O.acuminata</i>	2010	Providencia
	17	Algodonosa	2009	San Andrés
	37	Algodonosa	2011	Islas del Rosario
	33	Algodonosa	2009	Providencia
	34	Algodonosa	2009	Providencia
	20	<i>Blennothrix glutinosa</i> / <i>Lyngbya spp.</i>	2009	Providencia
	38	Algodonosa	2011	Islas del Rosario
6	18	<i>S.hydnoides</i> / <i>P. submembranaceum</i>	2009	Providencia
	35	Algodonosa	2009	Providencia
	26	Algodonosa	2009	Providencia
	31	Algodonosa	2009	Providencia
	27	<i>S.hydnoides</i> / <i>Phormidium</i> spp	2009	Providencia
	28	<i>Lyngbya spp</i> / <i>Oscillatoriaspp.</i>	2009	Providencia
	22	<i>S.hydnoides</i>	2009	Providencia
	29	<i>Shydnoides</i> / <i>Phormidium</i> spp	2009	Providencia

	21	Filamentosa	2009	Providencia
7	7	<i>P. submembranaceum / S. hydroides</i>	2010	Providencia
	8	<i>P. submembranaceum / S. hydroides</i>	2010	Providencia
	9	<i>P. submembranaceum / S. hydroides</i>	2010	Providencia
	10	<i>Lyngbya sp.</i>	2010	San Andrés
	19	<i>Lyngbya spp./ O.nigro-viridis</i>	2009	San Andrés
	13	<i>P. submembranaceum / S. hydroides</i>	2010	Providencia
8	11	<i>O.acuminata/ Spirulinasp</i>	2010	Providencia
	15	<i>L.majuscula/ L. sordida</i>	2010	Providencia
	12	<i>P. submembranaceum / S. hydroides</i>	2010	Providencia
	45	<i>L.majuscula / O.margaritifera</i>	2010	Providencia

El grupo tres contiene solo dos muestras que cuentan con clasificación morfológica, ambas se encuentran clasificadas como consorcios de *Oscillatoria acuminata* y *Spirulina sp.* Adicionalmente, la mayoría de las muestras que no se encuentran clasificadas tienen una morfología macroscópica filamentosa lo cual está en concordancia con lo que se había encontrado en trabajos previos que relacionan la composición de los *mats* y sus caracteres morfológicos macroscópicos como se mencionó anteriormente [1].

El grupo cinco está conformado por nueve muestras, dos de ellas conformadas por consorcios de *Oscillatoria spp.* con otras especies. En este caso, las muestras no identificadas presentan una morfología macroscópica algodonosa ya que probablemente aunque están presentes cianobacterias del género *Oscillatoria* se encuentran en consorcios con cianobacterias de los géneros *Oscillatoria*, *Phormidium* y *Symploca*, los cuales si poseen una morfología macroscópica algodonosa, lo cual no es evidente desde la descripción de la muestra pero si desde la comparación de sus perfiles metabólicos, siendo esta una de las ventajas de usar aproximaciones metabólica para obtener una visión general al afrontar este tipo de problemas.

Dentro del último grupo (grupo 8), que está conformado por cuatro muestras no se observa una relación evidente ya que todas ellas están clasificadas como consorcios de diferentes especies cianobacterias. Esta heterogeneidad en las muestras se debe a que las muestras en este grupo se encuentran mucho más distantes entre ellas (Figura 2.4), como se observa en el dendrograma, e incluso cada una de las muestras que se encuentran en este grupo se podrían considerar como grupos con un único individuo. Cabe resaltar que al igual que en el análisis de componentes principales la muestra que se encuentra a una mayor distancia de los grupos es la muestra número 45.

Teniendo en cuenta la agrupación presentada anteriormente y a pesar de que una de las ideas iniciales era reunir extractos de acuerdo a su clasificación morfológica, esta aproximación no resulta adecuada debido a que consorcios de cianobacterias clasificadas como el mismo tipo de muestras desde un punto de vista morfológico, mostraron estar produciendo compuestos diferentes, por lo que sus extractos deberían ser estudiados de manera individual. Ejemplo de esto son las muestras 4 y 6 que presentan la misma clasificación pero que están en agrupaciones muy separadas; mientras que una se encuentra en el grupo 1 la otra esta agrupada en el grupo 5 y al observar los cromatogramas es claro que tienen una producción metabólica diferente (Ver anexo C).

2.3.5 Análisis de la variación temporal y espacial

En cuanto a la variación temporal, se encontraron dos situaciones: en primer lugar se tiene el caso de los grupos seis y siete que estando conformados mayoritariamente por consorcios de cianobacterias de los géneros *Symploca* y *Phormidium*; Por una lado, el grupo seis está conformado en su mayoría por muestras recolectadas en el año 2009 mientras que el grupo siete está conformado exclusivamente por muestras recolectadas en 2010. Este hecho indica que los afloramientos conformados por dichas cianobacterias están presentando una producción metabólica diferente en eventos de afloramientos de diferentes años, lo cual puede deberse a diferentes factores ambientales como la temperatura, el pH y la salinidad que pueden estar afectando la expresión genética de dichos microorganismos.

De otro lado, los grupos 3 y 5 se encuentran conformados por muestras recolectadas en distintos años, por un lado el grupo tres tiene muestras de 2009, 2010 y 2012 mientras que el grupo cinco tiene muestras recolectadas en 2009, 2010 y 2011. Lo anterior indica que para este tipo de consorcios conformados por *Oscillatoria* se puede encontrar parecidos en la producción metabólica para eventos de afloramiento separados en el tiempo y cambios en dicha producción dependerán más de las especies con las que se formen los consorcios que de otros factores.

Por último, las muestras que han sido clasificadas como *Lynghya* no presentan ninguna agrupación clara, se encuentran en casi todos los grupos, en algunas ocasiones junto con muestras cuya observación macroscópica indica que son filamentosas lo cual es de esperar. Sin embargo, en otros grupos también se encuentra junto a muestras clasificadas como consorcios de *Symploca sp.* y *Phormidium sp.* Este comportamiento será discutido en la siguiente sección.

Del mismo modo, al observar los grupos formados no se encuentra una correlación clara entre dichos grupos y el sitio de recolección. Sin embargo, es posible ver que las muestras de Islas del Rosario no agrupan entre ellas, incluso quedando distribuidas en diferentes grupos junto con muestras de San Andrés y Providencia. Esto refleja un hecho que se evidencia en la literatura donde, el mismo compuesto o compuestos estructuralmente muy relacionados (Ej: Curacinas y Malingamidas) han sido aislados de cianobacterias recolectadas en lugares muy distantes [35-38], tal vez soportando el hecho de la agrupación observada en nuestros análisis esté más dominada por la especie que por el sitio de recolección.

2.3.6 Agrupación de cianobacterias del género *Lyngbya*.

Tal y como se expresó anteriormente, las muestras que han sido clasificadas como *Lyngbya* no presentan ninguna agrupación clara, se encuentran en casi todos los grupos en algunas ocasiones junto con muestras cuya observación macroscópica indica que son filamentosas lo cual es de esperar teniendo en cuenta los estudios previos mencionados anteriormente que relacionan la morfología macroscópica con cianobacterias de este género. Sin embargo, en otros grupos también se encuentra junto a muestras clasificadas como consorcios de *Symploca sp.* y *Phormidium sp.*

Este comportamiento de la agrupación de las muestras clasificadas morfológicamente en este género se puede explicar debido a que las cianobacterias que han venido siendo clasificadas como *Lyngbya spp.*, se encuentran mal clasificadas, siendo este un grupo polifiletico que contiene uno o más géneros. Estudios realizados por Engene *et al.*[39-42] han demostrado que los caracteres morfológicos tradicionalmente utilizados para la clasificación de cianobacterias marinas son basados en caracteres de cianobacterias típicas de ambientes dulceacuícolas o estuarianos, particularmente de los géneros *Lyngbya* y *Oscillatoria*.

Basados en estudios filogenéticos de la secuencia de la subunidad 16S del gen ribosomal y utilizando algunos marcadores quimiotaxonómicos, las cianobacterias del genero *Lyngbya* han sido reclasificadas en dos nuevos géneros. Por un lado el nuevo género *Moorea* que contiene especies como *Moorea producens* y *Moorea bouillonii* que filogenéticamente se encuentra cerca de géneros como *Symploca*[41], y lejana de agrupamiento de muestras pertenecientes al género *Lyngbya* “*sensu stricto*” como se observa en la figura 2.5.

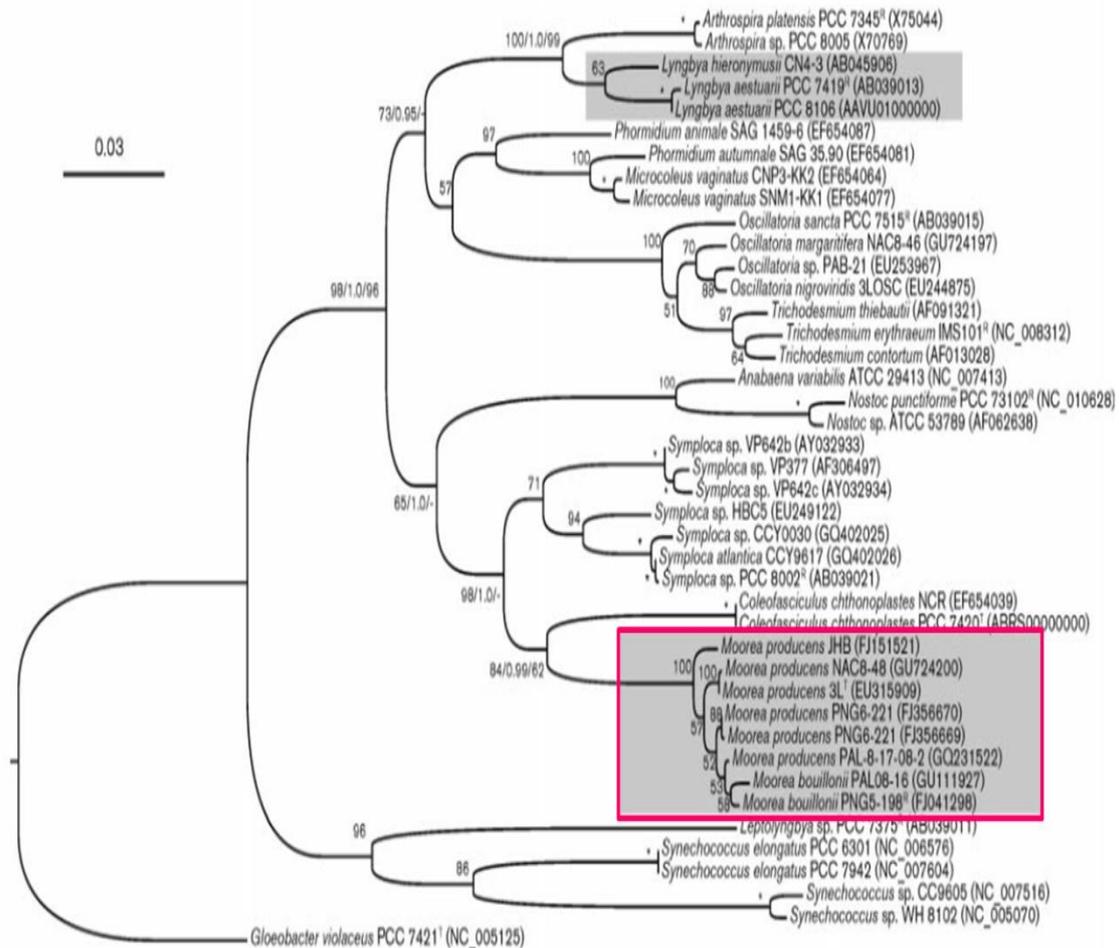


Figura 2.5: Filograma para las cianobacterias de los géneros *Lyngbya* y *Moorea* basado en el estudio de la subunidad ribosomal del gen 16S. Tomado de [41]

De otro lado, está el nuevo género *Okeania*, descrito a finales del año 2013, que incluyó muestras previamente descritas como pertenecientes a los géneros *Oscillatoria* y *Lyngbya* recolectadas en el Caribe, las cuales se encuentran filogenéticamente más cercanas a cianobacterias del género *Trichodesmium* y a muestras del género *Oscillatoria* y distantes del género *Moorea* (Figura 2.6). Dentro de este nuevo género se han descrito hasta el momento cinco nuevas especies, entre las que se encuentran *Okeania lorea*, *Okeania plumata*, *Okeania hirsuta*, *Okeania cominata* y *Okeania erythroflocculosa*. Cabe resaltar que los caracteres morfológicos y morfométricos utilizados hasta el momento para la descripción de las muestras recolectadas son similares para *Moorea*, *Okeania* y *Oscillatoria*.

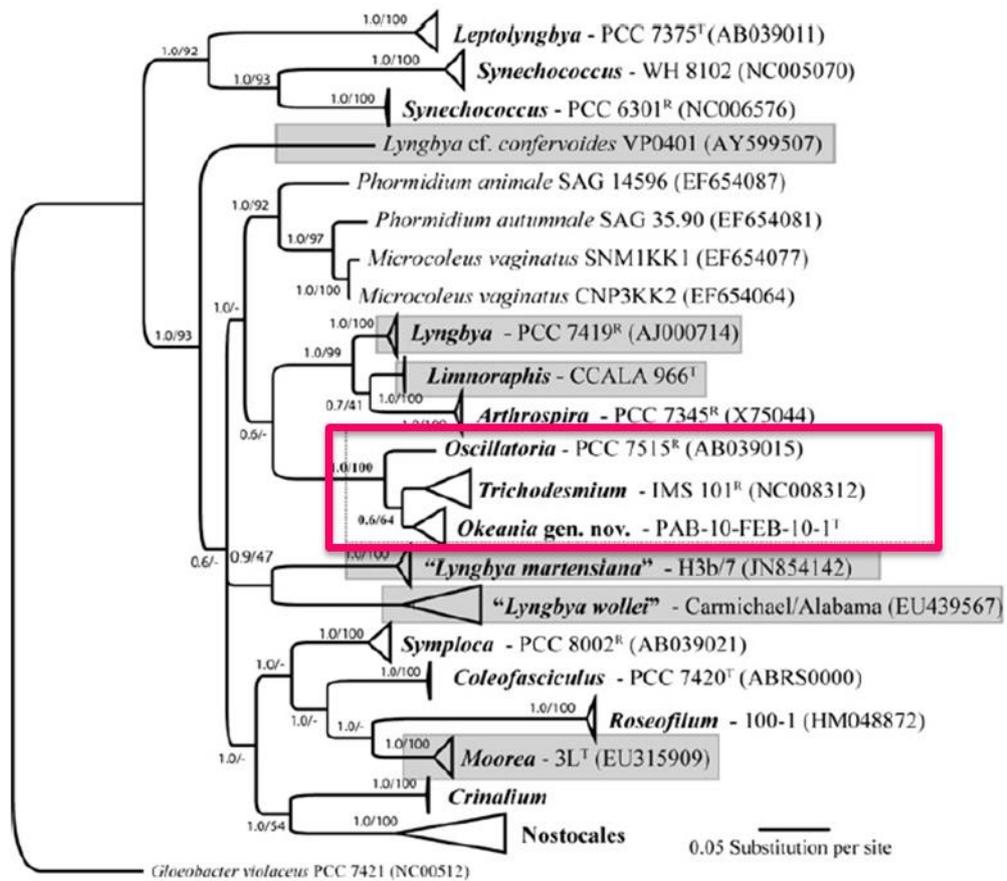


Figura 2.6: Filograma resaltado la relación de *Okeania* con otros géneros, en gris se resaltan todos los géneros relacionados con *Lyngbya*. Tomado de [42]

Lo anterior presenta una nueva forma de analizar los grupos obtenidos a partir del análisis metabólico de este trabajo, debido a que muestras como la 1, 28, 10 y 19 se agrupan en conglomerados donde también se encuentran cianobacterias del género *Symploca*, lo cual, por la cercanía filogenética establecida por Engene *et al.* [41] puede sugerir que estas muestras filamentosas realmente podrían corresponder a cianobacterias del género *Moorea*.

De otro lado, muestras como la 3 identificada como *Lyngbya* sp y *Oscillatoria margaritifera*, presente en el conglomerado 4, se encuentra agrupada junto con cianobacterias del género *Oscillatoria*. Por las consideraciones antes expuestas, estas muestras podrían corresponder a cianobacterias del género *Okeania*. Sin embargo, esta propuesta debe ser corroborada mediante una reclasificación basada en las características macroscópicas morfológicas y morfométricas de las muestras recolectadas, empleando la información recientemente descrita junto con un estudio filogenético de la subunidad 16S del gen ribosomal.

Los datos aquí obtenidos pueden ser utilizados para realizar un proceso de taxonomía integral, que permita tener varios criterios para la identificación de las muestras de cianobacterias bentónicas arrecifales, principalmente cuando se ha observado que los métodos de clasificación tradicional son insuficientes o inadecuados para la clasificación de estos microorganismos.

2.3.7 Ensayos de actividad biológica

De las cuarenta y nueve muestras utilizadas en el estudio metabolómico 19 fueron evaluadas en cuatro ensayos de actividad biológica, las cuales fueron seleccionadas teniendo en cuenta su clasificación, año y lugar de recolección con el fin de tener al menos un representante de cada año lugar y género de cianobacterias.

Tres de los ensayos fueron contra parásitos que son los responsables de causar enfermedades tropicales como la Malaria (*Plasmodium falciparum*), Leishmaniasis (*Leishmania sp.*) y la enfermedad de Chagas (*Trypanosoma cruzi*). La búsqueda de compuestos que puedan ser utilizados como medicamentos contra estas enfermedades es de suma importancia para países como el nuestro ubicados en zonas tropicales y subtropicales ya que este tipo de enfermedades suelen ser endémicas de estas regiones y por esta razón la investigación que se realiza en países desarrollados suele ser muy escasa [43].

El cuarto ensayo consistió en un ensayo de citotoxicidad contra la línea de células tumorales de cáncer de mama (MCF-7). Este ensayo se realizó debido al gran potencial que han demostrado estos microorganismos como fuente de compuestos con actividad citotóxica y que inclusive han sido utilizados como agentes terapéuticos en tratamientos contra diferentes tipos de cáncer [44].

Tabla 2.3: Resultados de los ensayos de actividad biológica para los 19 extractos evaluados

Código	Descripción	%I.C. <i>Leishmaniadon ovani</i> *	%I.C. <i>Plasmodium falciparum</i> *	%I.C. <i>Trypanosoma. cruzi</i> *	%C. MCF-7 Cáncer**
2	<i>Oscillatoria nigro-viridis</i>	3,7	15,2	0,9	17,6
3	<i>Lyngbya sp / O. margaritifera</i>	6,8	54,1	0,0	99,9
4	<i>P. submembranaceum / S. hydnoides / O. acuminata</i>	9,6	18,7	0,0	25,7
6	<i>P. submembranaceum / S. hydnoides / O. acuminata</i>	13,3	22,5	0,0	17,0
7	<i>P. submembranaceum / S. hydnoides</i>	11,0	17,5	6,2	11,0
10	<i>Lyngbya sp.</i>	1,3	82,0	0,0	0,9
13	<i>P. submembranaceum / S. hydnoides</i>	8,6	35,1	4,7	11,3
14	<i>Oscillatoria acuminata / Spirulina sp</i>	3,6	14,9	0,0	50,0
15	<i>Lyngbya majuscula / L. sordida</i>	1,0	38,0	3,8	23,1
16	Algodonosa	9,9	1,4	0,0	93,4
18	<i>S. hydnoides / P. submembranaceum</i>	3,2	32,5	1,6	8,2
19	<i>Lyngbyasp. / O. nigro-viridis</i>	9,1	11,9	0,0	100,0
29	<i>S. hydnoides / Phormidium sp</i>	12,9	10,3	0,0	90,3
39	Algodonosa	0,0	4,4	0,0	100,0
45	<i>L. majuscula / O. margaritifera</i>	12,9	25,6	6,9	11,1
46	Filamentosa	2,9	3,8	0,0	100,0
47	Filamentosa	0,0	1,2	0,0	87,4
48	Filamentosa	0,8	25,8	0,0	21,0
49	Filamentosa	6,7	1,4	0,0	40,3

* Porcentaje de inhibición de crecimiento del parásito (*Leishmaniadonovani*, *Plasmodiumfalciparum* y *Trypanosomacruzi*) se considera activo valores superiores al 70 % de inhibición[45].

** Porcentaje de crecimiento de células MFC-/ (Cáncer de mama) se considera activo valores inferiores al 25% de crecimiento[45].

De los diecinueve extractos evaluados, nueve de ellos presentaron actividad citotóxica contra la línea celular MFC-7, esto comprueba el potencial que poseen estos microorganismos para producir compuestos con actividad citotóxica. En cuanto a los ensayos contra los diferentes parásitos, el extracto 10, el cual había mostrado la mayor actividad citotóxica, presentó actividad contra *Plasmodium falciparum*, mientras que contra los parásitos *Leishmania donovani* y *T. cruzi* ninguno de los extractos resulto activo.

Al comparar los grupos obtenidos mediante los estudios metabolómicos con los resultados de actividad biológica no es posible encontrar una relación clara entre estos dos resultados ya que se encuentran agrupamientos entre muestras muy activas con muestras sin actividad. Esto se debe a que al realizar un análisis metabolómico se observa un gran número de compuestos y a todos ellos se les da la misma importancia, mientras que los compuestos responsables de la actividad biológica observada dentro de un extracto es uno o unos cuantos compuestos. Así, un compuesto que puede marcar una alta variabilidad en los perfiles cromatográficos no necesariamente es bioactivo y viceversa.

2.3.8 Selección de las muestras para estudios químicos

Uno de los principales objetivos de realizar los estudios mostrados anteriormente (Estudio metabolómico y actividad biológica) era generar criterios de selección para decidir cuáles de las 49 muestras serían candidatas para realizar un estudio de su composición química.

A partir de los estudios metabolómicos se observa que el extracto de la muestra 45 se encuentra distanciado de todas las demás muestras (Figuras 2.3 y 2.4). En el dendrograma obtenido, esta muestra es la que se encuentra a una mayor distancia con respecto a la muestra más cercana y en la gráfica del análisis de componentes principales ésta es la única muestra que se encuentra claramente separada del grupo, razón por la cual se selecciona como uno de los posibles candidatos para estudios de su composición química, pues su composición no parece tener relación con las otras muestras de este estudio.

Al observar el cromatograma de la fracción 3 de este extracto (Figura 2.7) se observa que a diferencia de los demás extractos, en los que los compuestos mayoritarios eluyen entre los 25 y 40 minutos, en este extracto los compuestos mayoritarios eluyen en los primeros treinta minutos, lo cual indica que estos compuestos son bastante más polares que los que se encuentran en los otros extractos, por lo que desde un punto de vista químico se hace interesante su estudio.

Por último, este extracto fue uno de los que mostró ser citotóxico en los ensayos de actividad biológica, con un porcentaje de crecimiento tan solo 11.1 %. Teniendo en cuenta que este ensayo se realizó sobre extractos crudos, este extracto es promisorio para la búsqueda de compuestos con actividad citotóxica.

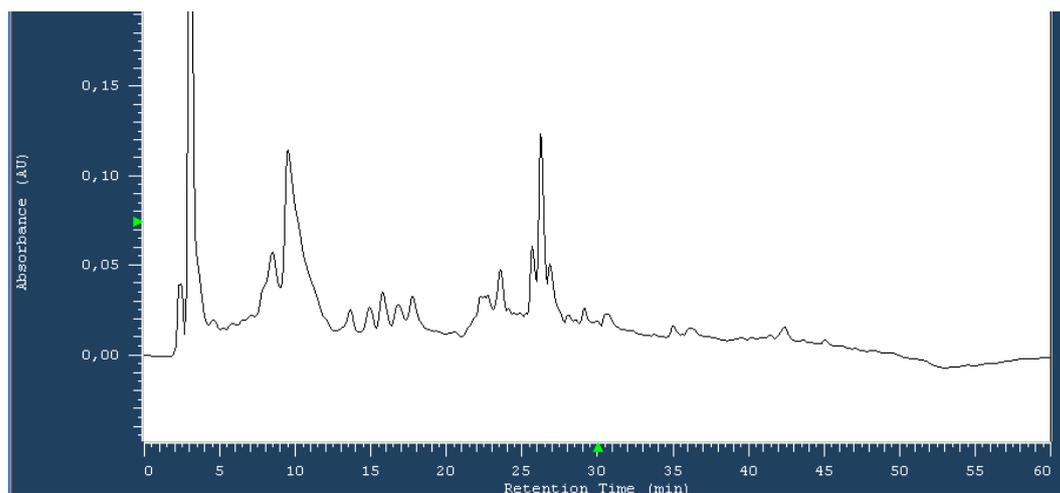


Figura 2.7: Cromatograma de la Fracción 3 del extracto de la muestra 45

Por otro lado se observó que dentro del grupo siete, que está conformado principalmente por muestras clasificadas como consorcios de cianobacterias de los géneros *Symploca* y *Phormidium* del año 2010, hay dos muestras clasificadas como consorcios de *Lyngbya* (muestras 10 y 19), las cuales, desde este punto de vista sería interesante establecer si los compuestos presentes en estos extractos son más parecidos a los reportados hasta ahora para especies de *Lyngbya* sp. (*Moorea* sp.) o para especies identificadas como pertenecientes al género *Symploca*.

Estos dos extractos fueron evaluados en los ensayos de actividad biológica, donde el extracto 19 fue inactivo para todos los ensayos mientras que el extracto 10 presentó actividad citotóxica contra las células MCF-7 y adicionalmente fue el único que presentó actividad contra el parásito *Plasmodium falciparum* por lo cual entre estos dos extractos se seleccionó el número 10 para realizar su estudio químico.

En cuanto al perfil cromatográfico que presenta la muestra 10 (Figura 2.8) se observa que existe un compuesto mayoritario que eluye con un tiempo de retención alrededor de 35 minutos, lo cual resulta conveniente pues puede facilitar el aislamiento del compuesto responsable de la actividad biológica mencionada anteriormente.

El estudio de la composición química de estos dos extractos se presentará en el capítulo 3 de este trabajo.

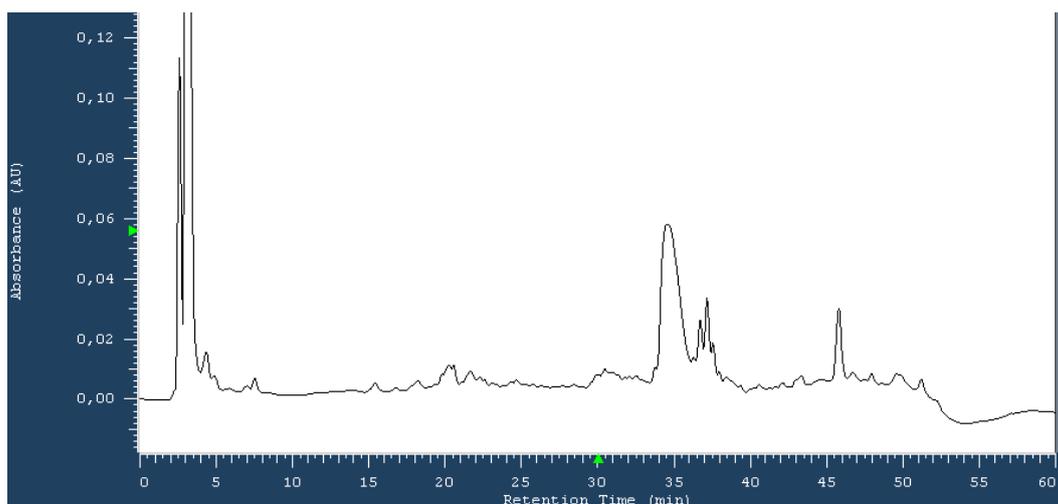


Figura 2.8: Cromatograma de la Fracción 3 del extracto numero 10

2.4 Conclusiones

En este capítulo se presentó el desarrollo e implementación de una metodología metabolómica para el estudio de 49 extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales recolectadas en el Caribe colombiano, lo cual permitió y permitirá tener criterios de selección de muestras para este y futuros estudios de la composición química de muestras obtenidas a partir de este tipo de microorganismos.

El estudio metabolómico de 49 extractos de cianobacterias recolectadas en el Caribe colombiano mostró que consorcios de cianobacterias clasificadas como *Symploca* y *Phormidium* poseen una producción metabólica distinta en los eventos de afloramiento del 2009 y 2010.

De otro lado las cianobacterias del género *Oscillatoria* tienen una producción metabólica similar en diferentes eventos de afloramiento y los cambios en su producción metabólica se ven más relacionados con las especies con las que se encuentra formando un consorcio, que con parámetros ambientales o del origen geográfico de las muestras.

Las muestras de cianobacterias identificadas como pertenecientes al género *Lyngbya* no se agrupan bajo ningún patrón probablemente debido a su diversidad metabólica y a una información insuficiente en cuanto a su clasificación por caracteres morfométricos y morfológicos.

Se seleccionaron dos extractos para continuar con los estudios químicos. El extracto número 45 debido a que en los estudios metabolómicos se presentaba como una muestra

totalmente diferente y su perfil cromatográfico mostraba que podía contener compuestos no comunes a las otras muestras, lo cual resulta interesante desde el punto de vista químico, además de haber presentado actividad citotóxica. Adicionalmente, se seleccionó el extracto 10 para el estudio de su composición química teniendo en cuenta que es una muestra clasificada como *Lyngbya* que se encuentra en un grupo dominado por consorcios de *Symploca* y *Phormidium* y la actividad biológica que presentó en dos de los cuatro ensayos realizados.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Prato J. Afloramientos de cianobacterias marinas bentónicas en San Andrés, Providencia y las Islas del Rosario (Caribe colombiano): Caracterización y evaluación de su posible papel ecológico. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia-Maestría en Microbiología; 2013.
- [2] Quintana J, Bayona LM, Castellanos L, Puyana M, Camargo P, Aristizabal F, et al. Almiramides D-E, cytotoxic peptides from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigroviridis*. *Phytochemistry* 2013;Sometido.
- [3] Bayona LM. Estudio de compuestos con actividad citotóxica aislados de cianobacterias bentónicas del Caribe colombiano. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia - Trabajo de grado en Química; 2012.
- [4] Cho WS. Omics Approaches in Cancer Research. In: Cho WCS, editor. *An Omics Perspective on Cancer Research*: Springer Netherlands; 2010. p. 1-9.
- [5] Sumner LW, Mendes P, Dixon RA. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. *Phytochemistry* 2003;62:817-36.
- [6] Bedair M, Sumner LW. Current and emerging mass-spectrometry technologies for metabolomics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2008;27:238-50.
- [7] Ryan D, Robards K. Metabolomics: The Greatest Omics of Them All? *Analytical Chemistry* 2006;78:7954-8.
- [8] Beyoğlu D, Idle JR. Metabolomics and its potential in drug development. *Biochemical Pharmacology* 2013;85:12-20.
- [9] Viant M. Metabolomics of aquatic organisms: the new 'omics' on the block. *Marine Ecology Progress Series* 2007;332:301-6.
- [10] Katajamaa M, Orešič M. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Chromatography A* 2007;1158:318-28.
- [11] Sardans J, Peñuelas J, Rivas-Ubach A. Ecological metabolomics: overview of current developments and future challenges. *Chemoecology* 2011;21:191-225.

- [12] Hur M, Campbell AA, Almeida-de-Macedo M, Li L, Ransom N, Jose A, et al. A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery. *Natural Product Reports* 2013;30:565-83.
- [13] Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2005;24:285-94.
- [14] Goodacre R, Vaidyanathan S, Dunn WB, Harrigan GG, Kell DB. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends in Biotechnology* 2004;22:245-52.
- [15] Macel M, Van Dam NM, Keurentjes JJB. Metabolomics: the chemistry between ecology and genetics. *Molecular Ecology Resources* 2010;10:583-93.
- [16] Kell DB. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Current Opinion in Microbiology* 2004;7:296-307.
- [17] Viant M. Applications of metabolomics to the environmental sciences. *Metabolomics* 2009;5:1-2.
- [18] Krall L, Huege J, Catchpole G, Steinhauser D, Willmitzer L. Assessment of sampling strategies for gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS) based metabolomics of cyanobacteria. *Journal of Chromatography B* 2009;877:2952-60.
- [19] Burja AM, Dhamwichukorn S, Wright PC. Cyanobacterial postgenomic research and systems biology. *Trends in Biotechnology* 2003;21:504-11.
- [20] Goulitquer S, Potin P, Tonon T. Mass Spectrometry-Based Metabolomics to Elucidate Functions in Marine Organisms and Ecosystems. *Marine Drugs* 2012;10:849-80.
- [21] Lang I, Hodac L, Friedl T, Feussner I. Fatty acid profiles and their distribution patterns in microalgae: a comprehensive analysis of more than 2000 strains from the SAG culture collection. *BMC Plant Biology* 2011;11:124.
- [22] Connor KM, Gracey AY. High-resolution analysis of metabolic cycles in the intertidal mussel *Mytilus californianus*. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2011;302:R103-R11.
- [23] Esquenazi E, Coates C, Simmons L, Gonzalez D, Gerwick WH, Dorrestein PC. Visualizing the spatial distribution of secondary metabolites produced by marine cyanobacteria and sponges via MALDI-TOF imaging. *Molecular BioSystems* 2008;4:562-70.
- [24] Smolinska A, Blanchet L, Buydens LMC, Wijmenga SS. NMR and pattern recognition methods in metabolomics: From data acquisition to biomarker discovery: A review. *Analytica Chimica Acta* 2012;750:82-97.
- [25] Li Y, Shrestha B, Vertes A. Atmospheric Pressure Infrared MALDI Imaging Mass Spectrometry for Plant Metabolomics. *Analytical Chemistry* 2007;80:407-20.

- [26] Want EJ, Nordström A, Morita H, Siuzdak G. From Exogenous to Endogenous: The Inevitable Imprint of Mass Spectrometry in Metabolomics. *Journal of Proteome Research* 2006;6:459-68.
- [27] Diaz LG. Estadística multivariada: Inferencia y métodos. Segunda Edición ed. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias; 2007.
- [28] van den Berg R, Hoefsloot H, Westerhuis J, Smilde A, van der Werf M. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. *BMC Genomics* 2006;7:142.
- [29] Gutiérrez M, Suyama TL, Engene N, Wingerd JS, Matainaho T, Gerwick WH. Apratoxin D, a Potent Cytotoxic Cyclodepsipeptide from Papua New Guinea Collections of the Marine Cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Lyngbya sordida*. *Journal of Natural Products* 2008;71:1099-103.
- [30] Gutiérrez M, Capson TL, Guzmán HM, González J, Ortega-Barría E, Quiñoá E, et al. Antiplasmodial Metabolites Isolated from the Marine Octocoral *Muricea austera*. *Journal of Natural Products* 2006;69:1379-83.
- [31] Romanha AJ, Castro SLd, Soeiro MdNC, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2010;105:233-8.
- [32] Montenegro H, Gutiérrez M, Romero LI, Ortega-Barría E, Capson TL, Rios LC. Aporphine Alkaloids from *Guatteria* spp. with Leishmanicidal Activity. *Planta Medica* 2003;69:3.
- [33] Fukusaki E, Kobayashi A. Plant metabolomics: potential for practical operation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 2005;100:347-54.
- [34] Miller JN, Miller JC. Estadística y quimiometría para química analítica. Madrid: Pearson Prentice Hall; 2002. p. 228-32.
- [35] Márquez B, Verdier-Pinard P, Hamel E, Gerwick WH. Curacin D, aN antimitotic agent from the marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Phytochemistry* 1998;49:2387-9.
- [36] Gerwick WH, Proteau PJ, Nagle DG, Hamel E, Blokhin A, Slate DL. Structure of Curacin A, a Novel Antimitotic, Antiproliferative and Brine Shrimp Toxic Natural Product from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *The Journal of Organic Chemistry* 1994;59:1243-5.
- [37] McPhail KL, Gerwick WH. Three New Malyngamides from a Papua New Guinea Collection of the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products* 2002;66:132-5.

- [38] Milligan KE, Márquez B, Williamson RT, Davies-Coleman M, Gerwick WH. Two New Malyngamides from a Madagascan *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products* 2000;63:965-8.
- [39] Engene N, Choi H, Esquenazi E, Rottacker EC, Ellisman MH, Dorrestein PC, et al. Underestimated biodiversity as a major explanation for the perceived rich secondary metabolite capacity of the cyanobacterial genus *Lyngbya*. *Environmental Microbiology* 2011;13:1601-10.
- [40] Engene N, Gunasekera SP, Gerwick WH, Paul VJ. Phylogenetic inferences reveal a large extent of novel biodiversity in chemically rich tropical marine cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology* 2013;79:1882-8.
- [41] Engene N, Rottacker EC, Kaštovský J, Byrum T, Choi H, Ellisman MH, et al. *Moorea producens* gen. nov., sp. nov. and *Moorea bouillonii* comb. nov., tropical marine cyanobacteria rich in bioactive secondary metabolites. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 2012;62:1171-8.
- [42] Engene N, Paul VJ, Byrum T, Gerwick WH, Thor A, Ellisman MH. Five chemically rich species of tropical marine cyanobacteria of the genus *Okeania* gen. nov. (Oscillatoriales, Cyanoprokaryota). *Journal of Phycology* 2013;49:1095-106.
- [43] Nwaka S, Ridley RG. Virtual drug discovery and development for neglected diseases through public-private partnerships. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003;2:919-28.
- [44] Tan DSW, Gerlinger M, Teh B-T, Swanton C. Anti-cancer drug resistance: Understanding the mechanisms through the use of integrative genomics and functional RNA interference. *European Journal of Cancer* 2010;46:2166-77.
- [45] Boya CA. Productos Naturales derivados de la 3,4-Dihidroisocumarina aislados de la bacteria marina *Bacillus sp.* Panamá: Universidad Autónoma de Chiriquí - Trabajo de grado licenciatura en química; 2010.

3. Aislamiento y Elucidación de compuestos a partir de extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales del género *Lyngbya* con actividad citotóxica, recolectadas en el Caribe Colombiano.

3.1 Introducción

Como se estableció en el capítulo 1, las cianobacterias marinas son una de las fuentes más prolíficas de compuestos, muchos de los cuales han presentado potente actividad biológica en diferentes ensayos *in vitro* e incluso ensayos clínicos. Sin embargo, esta es solo una de las razones por las cuales estos microorganismos han sido ampliamente estudiados; Otros de los factores por lo cual se realizan estudios de la composición química de sus extractos es que entre los compuestos aislados se han encontrado estructuras únicas y muy interesantes desde el punto de vista biosintético. De otro lado, solo en algunas ocasiones su función ecológica ha sido establecida, razón por la cual, si se pretende profundizar en las dinámicas de los afloramientos de cianobacterias, y en los posibles efectos de estos afloramientos, es necesario entender más de cerca las interacciones ecológicas de estos organismos [1, 2].

Entre los metabolitos secundarios aislados de cianobacterias marinas, los productos mixtos entre las rutas biosintéticas de los péptidos no ribosomales (NRP por sus siglas en inglés) y policétidos (PK por sus siglas en inglés) han sido los más importantes. Estos compuestos pueden iniciar con una cadena de policétido y posteriormente realizar una transición a una cadena de aminoácidos o viceversa. Dependiendo de cuál de las dos rutas tome pueden recibir el nombre de cetopéptido o peptocétido. Alrededor del 60% de estos compuestos poseen estructuras cíclicas. Otra característica que es relativamente común es la presencia de halógenos en sus estructuras (cerca del 36 %) [1].

En cuanto a los aminoácidos que son incorporados mediante la ruta de los NRP a las cadenas peptídicas, la mitad de estos, son aminoácidos esenciales que han sufrido algún tipo de modificación. Entre las más comunes, como se muestra en la figura 3.1, se encuentran la *N*-metilación (17%), *N,N*-dimetilación (3%), incorporación de anillos heterocíclicos (13%), extensión de la cadena alifática (6%), hidroxilaciones, las cuales ocurren normalmente en posiciones β (4%), y la *O*-metilación (2%) [1, 3].

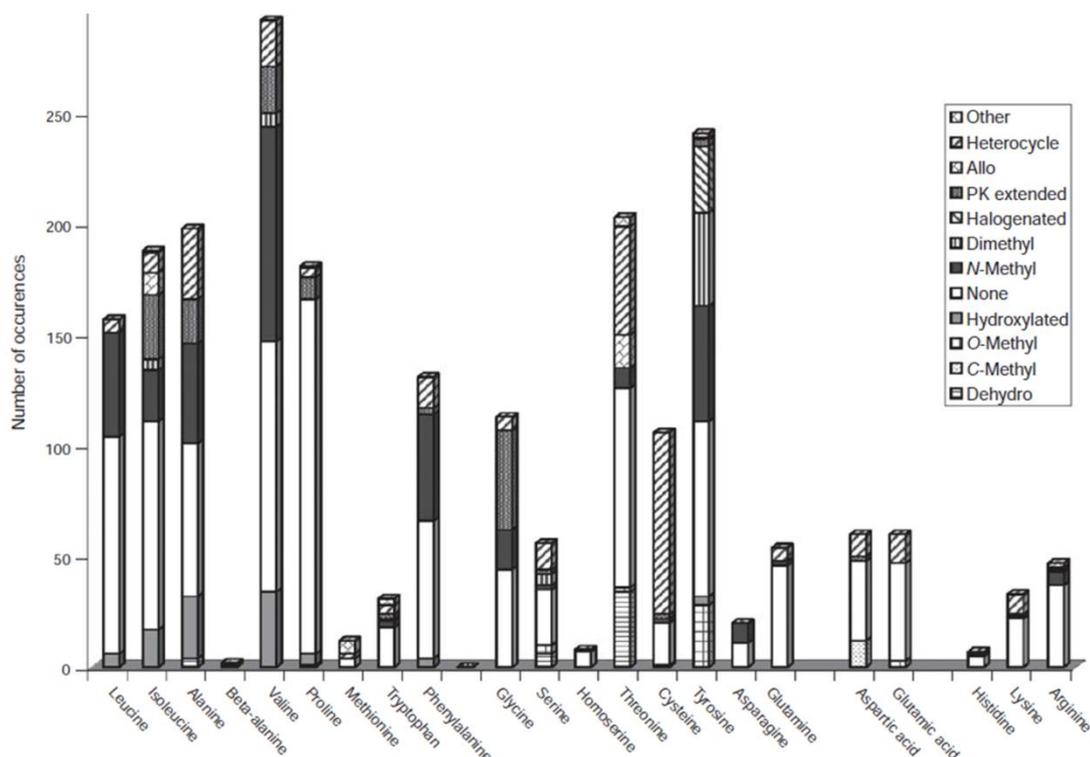


Figura 3.1: Modificaciones de los aminoácidos en metabolitos secundarios aislados de cianobacterias marinas. Tomado de [1]

Algunos ejemplos de compuestos aislados de cianobacterias marinas que han sido estructural o biosintéticamente interesantes se mencionan a continuación y/o se muestran en la Figura 3.2:

Las coibacinas, una serie de compuestos aislados de cianobacterias clasificadas como *Oscillatoria* sp. recolectada en Panamá, que contienen por un lado un anillo de metilciclopropilo, característico de las curacinas aisladas de *Moorea producens* (También conocida como *Lyngbya majuscula*) y unidades de clorovinilo presentes en las jamaicamidas (también aisladas de *M. producens*). El estudio de la biosíntesis de las coibacinas mostró que los mecanismos para la formación de estas dos subunidades están íntimamente relacionados [4-6].

Las apratoxinas, un grupo de depsipéptidos cíclicos producidos por cianobacterias del género *Lyngbya* (algunos de estos reclasificados como *Moorea*), que se caracterizan por la presencia de una unidad de tiazolina y una subunidad que corresponde a la extensión por la ruta de PK como parte de la estructura del macrociclo. También se han encontrado análogos en los que el azufre del anillo de tiazol se encuentra como sulfóxido [7].

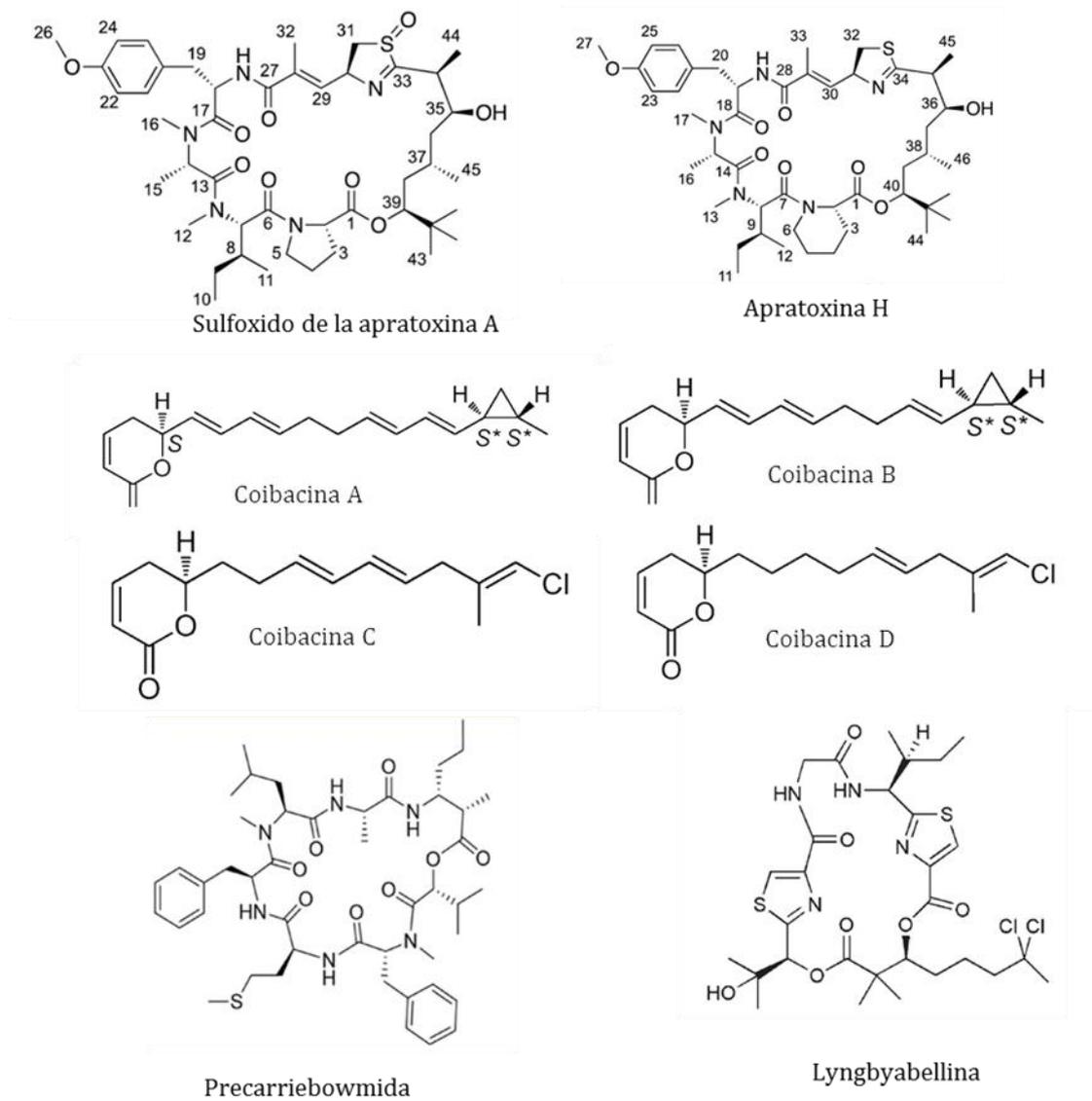


Figura 3.2: Ejemplos de compuestos estructuralmente interesantes aislados de cianobacterias marinas.

Las cianobacterias marinas son una fuente de compuestos que no solamente poseen actividad biológica sino que también poseen estructuras nuevas y novedosas difícilmente encontradas en otros organismos. Desde este punto de vista, el estudio químico de estos microorganismos resulta muy interesante tanto por la actividad biológica como por la

novedad estructural de los compuestos producidos por estos organismos. En este capítulo se presentará el proceso de aislamiento y elucidación estructural de los compuestos mayoritarios provenientes de dos extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales recolectadas en el Caribe colombiano.

3.2 Metodología

3.2.1 General

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados en un espectrómetro Bruker Advance (400 MHz para RMN ^1H y 100 MHz RMN ^{13}C) y en un espectrómetro Jeol Eclipse +400 (400 MHz para RMN ^1H y 100 MHz RMN ^{13}C). Se utilizaron como disolventes CDCl_3 (Merck) grado de deuteración 99.8% y $\text{DMSO-}d_6$ (Merck) grado de deuteración 99.9%.

Para el fraccionamiento y separación se utilizaron cartuchos de extracción en fase sólida se utilizaron cartuchos Hypersep C18 Thermo empacados son 5g de fase estacionaria y con una capacidad de 50 mL. Se utilizaron como solventes metanol grado reactivo analítico (Merck) y agua destilada. Para separaciones por cromatografía de exclusión por tamaño en columna se empleó como soporte Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech).

Para los análisis por CLAE-DAD se empleó metanol grado cromatográfico (Merck) y agua desionizada, obtenida de un equipo Simplicity Millipore. El análisis por CLAE-DAD fue realizado en un equipo Merck-Hitachi equipado con un detector DAD L-4250 y UV L-4200, bomba L-6000A, automuestreador 6200A, y empleando para las separaciones una columna Phenomenex synergy Fusion- RP 250 x 10 mm, 10 μm .

Los análisis de CLAE-EM de alta resolución fueron realizados en un equipo LCMS-IT-TOF (Shimadzu), con ionización por electrospray ESI; el flujo de nebulización fue de 1,5 L/min, el gas de nebulización fue nitrógeno, el voltaje de la fuente de ionización fue 1,5 kV, y la temperatura del CDL fue de 250°C, se registraron iones entre 100 y 1000 m/z en modo positivo y negativo.

La rotación óptica de los compuestos fue medida en un polarímetro Polartronic E, Schmidt+Haensch. Se utilizó como solvente metanol Merck grado LC-MS.

3.2.2 Extracción y Purificación

El extracto de la muestra 45, clasificada como un consorcio de *Lyngbya majuscula* y *Oscillatoria margaritifera*, fue realizado por maceración en DCM/MeOH (1:1), según se mostró en el capítulo 2 (Página 31). Se obtuvieron 1,3 g de extracto crudo, de los cuales 1,0 g fueron separados en un cartucho Hypersep C-18. La Fracción número 4 (F 45.4 – 187,9 mg) fue sometida a cromatografía líquida de alta eficiencia preparativa utilizando el equipo Merck Hitachi y la columna, descritos anteriormente, empleando el siguiente gradiente: de 0 a 5 min se mantuvo en una proporción de MeOH/H₂O 50:50, de 5 a 40 minutos se llevó hasta 100% MeOH, el cual se mantuvo hasta el minuto 50, seguido de un gradiente de MeOH 100% hasta MeOH/H₂O 50:50, entre 50 y 58 minutos se llevó nuevamente a y manteniéndolo así por dos minutos más hasta el minuto 60, con un flujo de 1mL/min y detectando a una longitud de onda de 210 nm. De esta manera se obtuvieron el compuesto **1** (2,5 mg) y la fracción F45.4.9 que fue purificada posteriormente por CLAE utilizando un método isocrático MeOH/H₂O 60:40 con un flujo de 2 mL/min obteniendo el compuesto **2** (1,2 mg) y el compuesto **3** (0,5 mg).

Del extracto de la muestra 10, clasificada preliminarmente como *Lyngbya* sp, se obtuvo un total de 2,5 g de extracto crudo, de los cuales se tomaron 2 g de este extracto que fueron fraccionados utilizando un cartucho Hypersep C-18 y como fase móvil mezclas de polaridad decreciente (1, MeOH/H₂O 2:8; 2, MeOH/H₂O 4:6; 3, MeOH/H₂O 6:4 ; 4, MeOH/H₂O 8:2; 5, MeOH 100%; 6, CH₂Cl₂/ MeOH 1:1) obteniéndose 6 fracciones (F10.1 a F10.6). Las fracciones fueron evaluadas en ensayos de actividad antiparasitaria y citotoxicidad, a partir de lo cual se seleccionó a la fracción F10.4. Esta fracción fue nuevamente sometida a una separación en cartucho Hypersep C18 utilizando un gradiente MeOH/H₂O (1, MeOH/H₂O 1:9; 2, MeOH/H₂O 2:8; 3, MeOH/H₂O 3:7; 4, MeOH/H₂O 35:65; 5, MeOH/H₂O 4:6; 6, MeOH/H₂O 1:1; 7, MeOH/H₂O 6:4; 8, MeOH/H₂O 8:2; 9, MeOH 100%) Para obtener un total de 9 fracciones (F10.4.1 a F10.4.9). La fracción F10.4.9 fue sometida a una separación cromatográfica por exclusión por tamaño empleando Sephadex LH-20. Cada una de las muestras fueron disueltas en la menor cantidad de metanol posible y la separación se realizó usando metanol a un flujo de aproximadamente 0,3 mL/min recogiendo fracciones de 5 mL. La separación fue monitoreada por cromatografía en capa delgada utilizando como revelador sulfato cérico amónico. De esta forma fue posible obtener 8 fracciones (F10.4.9.1 a F10.4.9.9). La fracción F10.4.9.2 (10,3 mg) fue analizada por CLAE-EM utilizando una columna Thermo Hypersil-Keystone 100x2,1 mm tamaño de

partícula 3µm. Se utilizó un gradiente MeOH/H₂O, iniciando en una proporción 50:50. Se mantuvo así por un minuto, luego se llevó a una proporción de MeOH/H₂O 95:5 en 8 minutos donde se mantuvo esta proporción por 3 minutos más y finalmente en dos minutos de retorna a las condiciones iniciales. Esta fracción (10,3 mg) consiste en una mezcla del compuesto 4 y compuesto 5, los cuales no se lograron separar.

3.2.3 Ensayos de actividad biológica

Las fracciones y compuestos que fueron evaluados en los ensayos de citotoxicidad, contra *Plasmodium falciparum*, *Leishmania donovani* y contra *T. cruzi*, fueron ensayados siguiendo los procedimientos mostrados en el capítulo 2.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Estudio químico del extracto de la muestra número 45 clasificada como un consorcio de *Lyngbya majuscula* y *Oscillatoria margaritifera*

El estudio químico del extracto de la muestra 45, se inició con el fraccionamiento del extracto, utilizando un cartucho de C18 debido a que en trabajos preliminares se observó que mediante esta metodología es posible obtener fracciones de menor complejidad facilitando la separación de los compuestos mayoritarios [8]. Del fraccionamiento se obtuvieron seis fracciones (F45.1-F45.6, Figura 3.3).

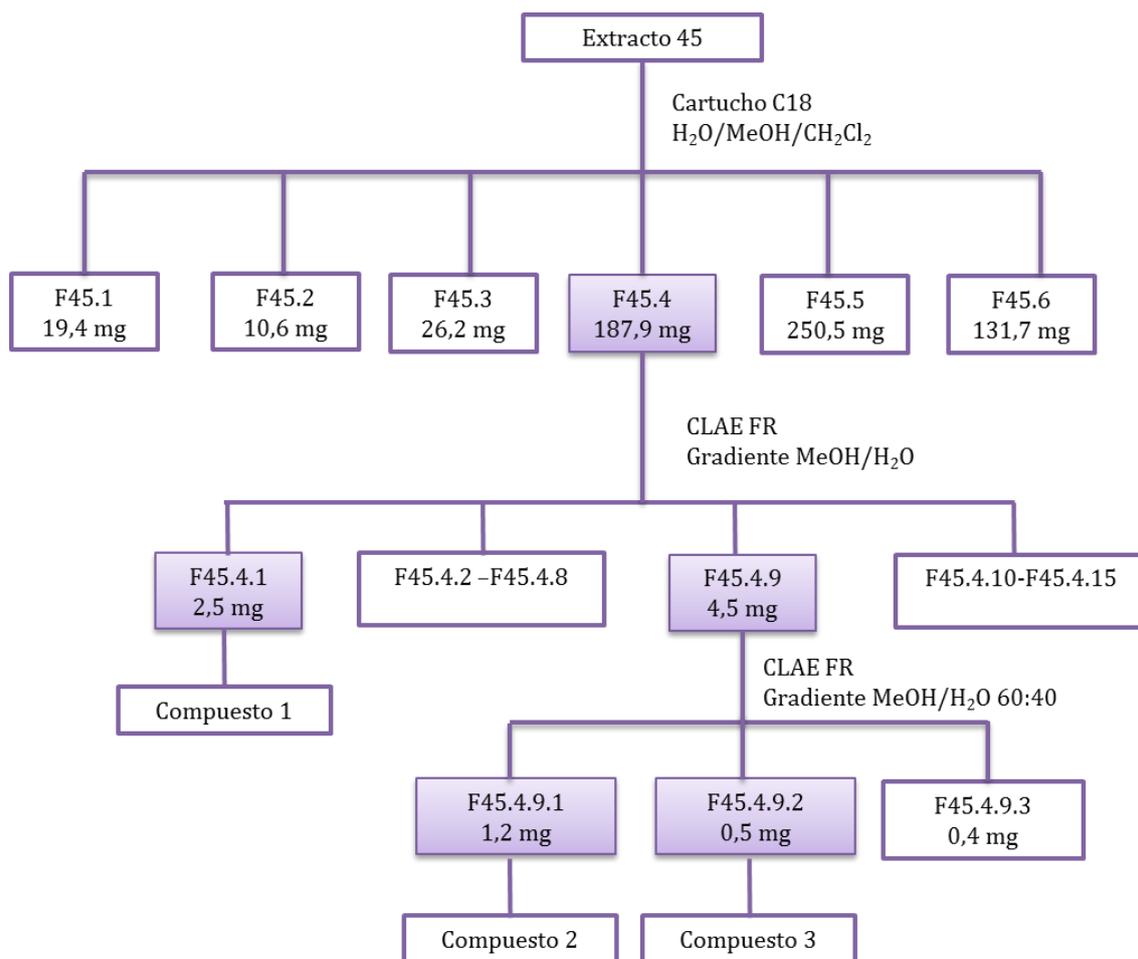


Figura 3.3: Esquema de fraccionamiento del extracto 45

La fracción F45.4 fue seleccionada para continuar con el estudio químico debido a la masa obtenida y las señales observadas en RMN-¹H, en donde se observan varias señales entre 0,0 y 1,0 ppm lo que indica la presencia de varios metilos terminales, señales de singletess altos entre 3,0 y 4,0 ppm las cuales corresponden a *O*-metilos o *N*-metilos y señales entre 4,0 y 5,5 ppm características de protones α de aminoácidos, las cuales son características para compuestos tipo péptido (Figura 3.4).

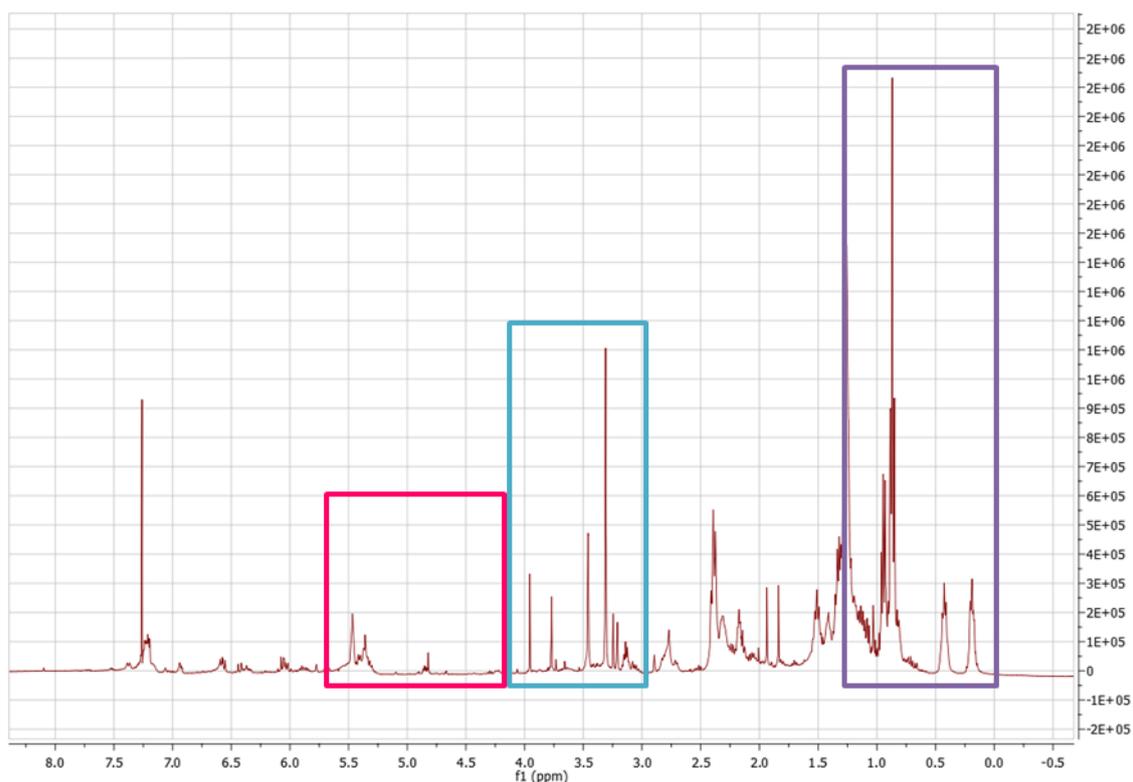


Figura 3.4: Espectro ^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz) de la fracción F45.4.

A partir del fraccionamiento la fracción F45.4 mediante CLAE preparativo (Figura 3.3 y anexo D) fue posible obtener el compuesto **1** (2,4 mg) como un sólido amarillo, ópticamente activo con un $[\alpha]_D = 3,73$ ($c = 0,1$ mg/mL, MeOH). Los análisis de los espectros de masas obtenidos por ionización ESI en modo positivo mostraron un ión intenso en m/z 270,0809, junto con un ión con una abundancia relativa cercana al 99% en m/z 272,0835 (Figura 3.5). Este patrón isotópico indica la presencia de bromo en la molécula [9]. El ión en m/z 270,0809 corresponde a una fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{BrO}$.

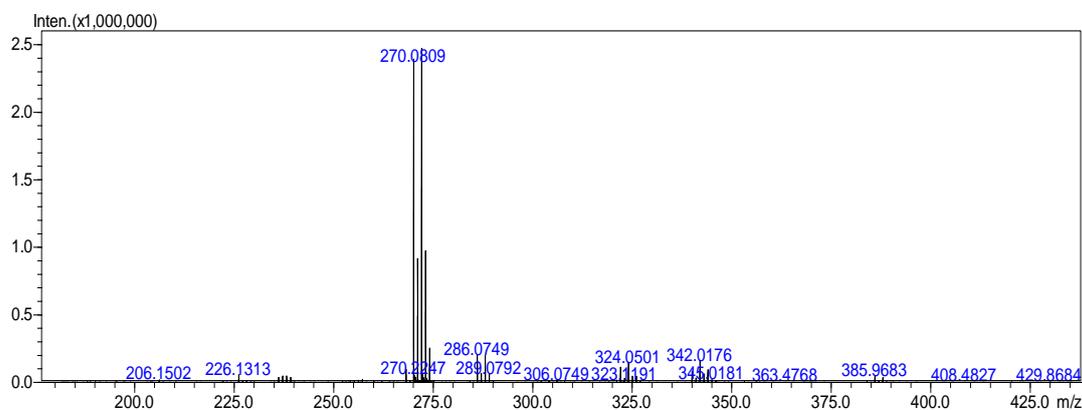


Figura 3.5: Espectro de masas obtenido para el compuesto **1** (ESI, inyección directa)

En el espectro de RMN- ^1H (CDCl_3 , 400MHz) del compuesto **1** (Figura 3.6) se observaron cuatro señales para hidrógenos sobre dobles enlaces en δ_{H} 6,60 (1H, dd, $J = 7,1$ y $10,0$ Hz); 6,40 (1H, dd, $J = 10,0$ y $14,8$ Hz); 6,09 (1H, d, $J = 7,1$ Hz) y 5,92 (1H, m). Señales para los protones diastereotópicos de un metileno unido a un heteroátomo en δ_{H} 3,94 (1H, bs) y 3,66 (1H, bs). Señales para metilenos y metinos alifáticos en δ_{H} 2,92 (2H, m); 2,82 (1H, m); 2,29 (2H, m); 2,20 (1H, m); 2,02 (1H, m); 1,96 (4H, m) y 1,50 (1H, m). Por último una señal para un único metilo en δ_{H} 1,11 (3H, bs).

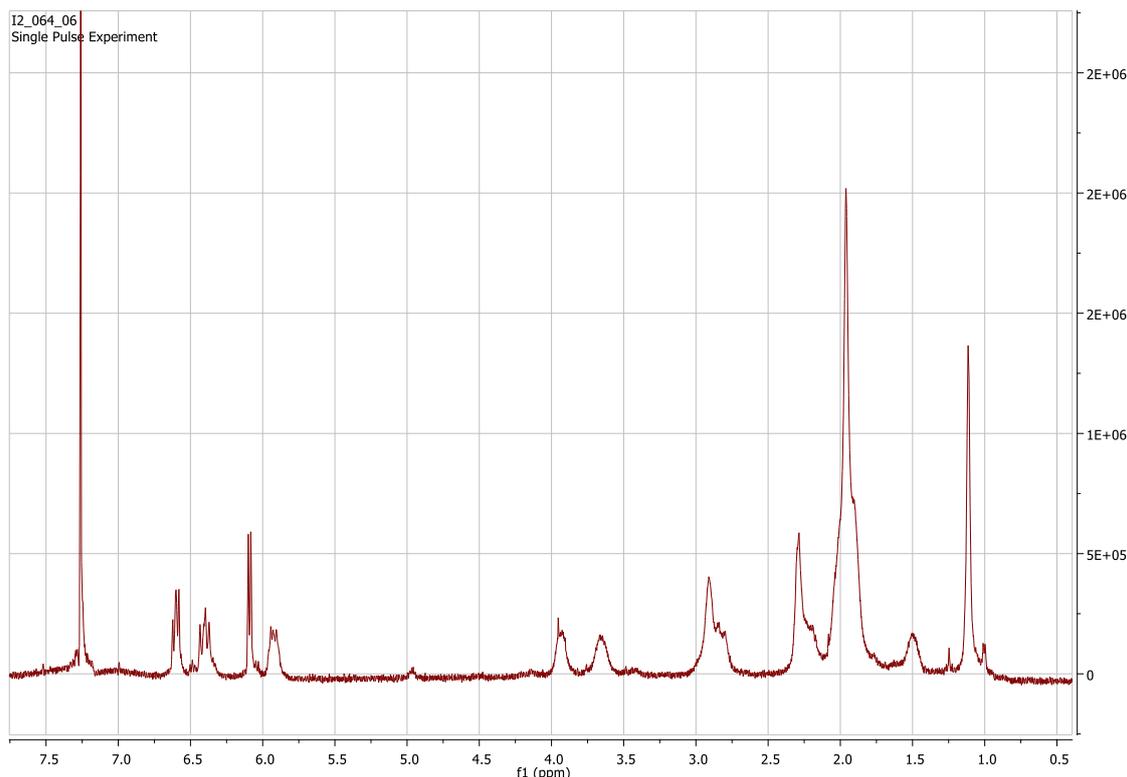


Figura 3.6: Espectro de ^1H RMN (CDCl_3 , 400MHz) del compuesto **1**

A partir del análisis de los espectros de RMN- ^{13}C y DEPT-135 (CDCl_3 , 100MHz,) para el compuesto **1** (Figura 3.7, Anexo E), se observaron señales para un carbonilo en δ_{C} 189,4 correspondiente a una cetona a juzgar por su desplazamiento químico. Señales para 4 carbonos olefínicos en δ_{C} 136,6; 132,2; 127,8 y 107,1. Una señal para un metileno en δ_{C} 46,6. Señales para 5 metilenos alifáticos en δ_{C} 37,9; 37,1; 32,2; 27,5 y 26,1. Una señal para un metino en δ_{C} 24,3. Por último, una señal para un único metilo en δ_{C} 20,7.

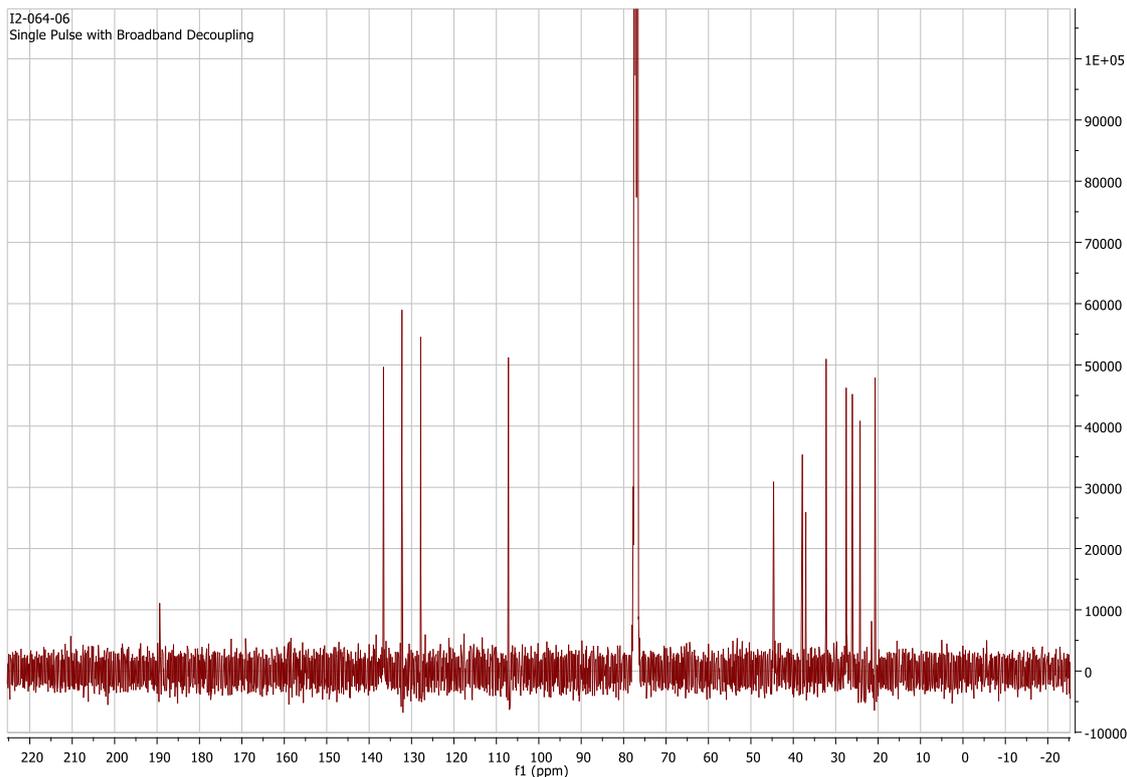


Figura 3.7: espectro de ^{13}C RMN (CDCl_3 , 100MHz) del compuesto **1**

A partir del espectro de HSQC fue posible observar las correlaciones H-C a un enlace y de esta manera establecer los hidrógenos que se encuentran sobre cada uno de los carbonos como se presentan en la Tabla 3.1, confirmando que los hidrógenos en δ_{H} 3,60 y 3,94; δ_{H} 2,20 y 2,82; y δ_{H} 1,50 y 2,02 son parejas de hidrógenos diastereotópicos, lo que indica que cerca de estos metilenos deben haber sustituyentes que generan que estos hidrógenos no sean magnéticamente equivalentes.

Tabla 3.1: Datos de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto 1 (RMN- ^1H CDCl_3 , 400MHz, RMN- ^{13}C , CDCl_3 , 100MHz).

Posición	$^{13}\text{C}(\delta \text{ ppm})$	$^1\text{H}(\delta \text{ ppm})$	Mult.(J en Hz)
1a	44,7	3,60	bs
1b		3,94	bs
2	189,4	---	---
3a	37,9	2,20	m
3b		2,82	m
4	24,3	1,96	m
5a	27,5	1,50	bs
5b		2,02	m
6	37,1	2,92	m
7	26,1	1,96	m
8	32,3	2,29	m
9	136,6	5,92	m
10	127,8	6,40	dd, (10,0 y 14,8)
11	132,2	6,60	dd, (7,1 y 10,0)
12	107,1	6,09	d(7,1)
13	20,7	1,11	bs

El análisis de los espectros COSY y HMBC permitieron establecer dos subestructuras lineales como se muestra en la Figura 3.8a. Sin embargo, no se encontraron correlaciones que permitieran realizar la conexión de estas dos subestructuras, por lo cual se tomaron de nuevo estos espectros esta vez utilizando como solvente MeOD donde se observaron las correlaciones entre el metino H-4 en δ_{H} 1,96 y el carbonilo C-2 en δ_{C} 189,4, para proponer la subestructura mostrada en la Figura 3.8b.

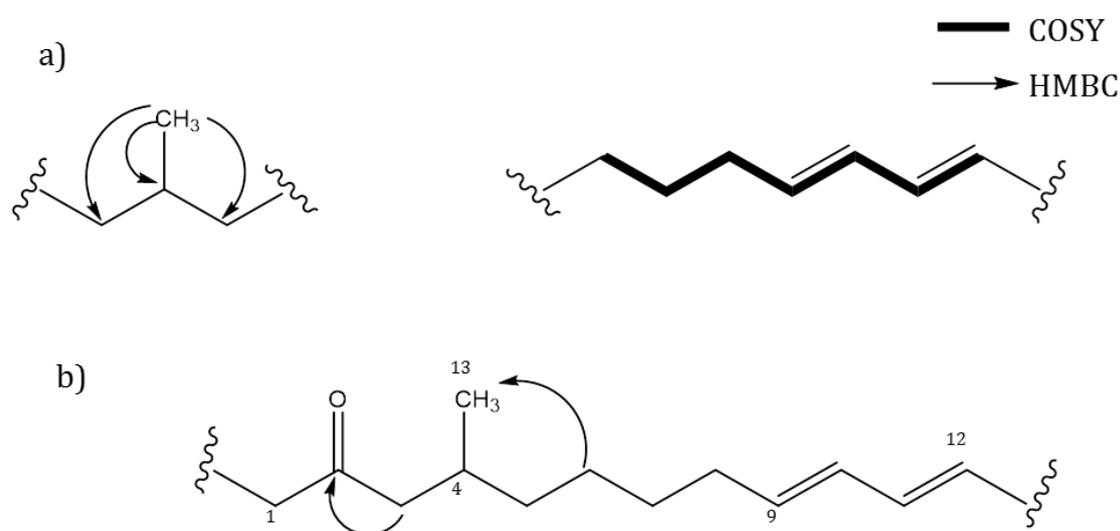


Figura 3.8: a) subestructuras obtenidas por análisis del COSY y HMBC tomados en CDCl_3 , b) unión de las dos subestructuras por las correlaciones observadas HMBC tomados en MeOD.

En la primera subestructura de la figura 3.8a observa el desplazamiento para el metilo en δ_c 20,7 ppm, cuyos protones correlacionan con las señales de carbono para un metino en δ_c 24,3 en y dos metilenos en δ_c 27,5 y 37,9, indicando que esta molécula no contiene metilos terminales. Para el compuesto **1**, se determinó la estereoquímica de los dobles enlaces como 9-*trans* y 11-*cis*, basados en los valores de las constantes de acoplamiento (Tabla 3.1) [10].

El desplazamiento del carbono olefínico asignado a la posición 12 en δ_c 107,1 es característico de átomos de bromo sobre dobles enlaces terminales, como el que se observa en el lyngbyalosido A el lyngbouillosido, aislados de un “*mat*” clasificado como *Lyngbya* sp. recolectado en Palau [10]. Finalmente, el metileno en 44,7, asignado a la posición 1, deberá estar enlazado a un halógeno probablemente un bromo, permitiendo proponer la estructura del compuesto **1** como se presenta en la figura 3.9. Con la estructura propuesta, el ión observado en el espectro de masas corresponde al aducto $[\text{M}-\text{HBr}]^+$. Las pérdidas de átomos de bromo como Br^- o HBr son relativamente comunes incluso en condiciones de ionización de baja energía [11, 12].

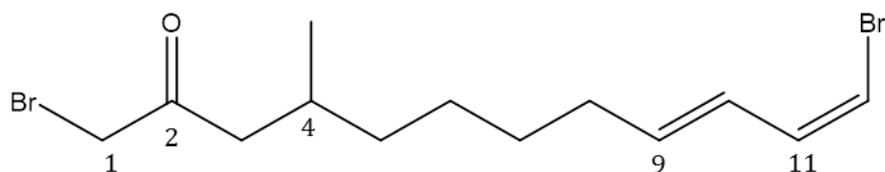


Figura 3.9: Estructura del compuesto 1

La estructura del compuesto **1** (*9E,11Z*-1,12-dibromo-4-metildodeca-9,11-dien-2-ona) fue buscada en las bases de datos Antibase, MarinLit y SciFinder y no se encontró ningún reporte para esta estructura por lo cual este es el primer reporte de este compuesto en la naturaleza y tampoco ha sido obtenido por síntesis por lo que se considera un compuesto nuevo. Finalmente, este compuesto fue evaluado en los cuatro ensayos de actividad biológica mencionados anteriormente a una concentración de 10 µg/mL, encontrando que no presento actividad en ninguno de los ensayos (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Resultados de ensayos de actividad biológica para el compuesto 1

	%I.C. <i>Leishmania donovani</i> *	%I.C. <i>Plasmodium falciparum</i> *	%I.C. <i>Trypanosoma cruzi</i> *	%C. MCF-7 Cáncer**
Compuesto 1	4,8	27,1	0,00	100,0

* Porcentaje de inhibición de crecimiento del parásito (*Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma cruzi*) se considera activo valores superiores al 70 % de inhibición[13].

** Porcentaje de crecimiento de células MFC-/ (Cáncer de mama) se considera activo valores inferiores al 25% de crecimiento[13]

El compuesto **2** (1,2 mg) fue obtenido como un sólido blanco ópticamente activo con una rotación óptica de $[\alpha]_D$ de 433,7 ($c = 0,1$ mg/mL, MeOH). En el espectro de masas de observa un ión $[M+H]^+$ con un m/z de 619,3568 y el aducto de sodio $[M+Na]^+$ con un m/z de 641,3369, que concuerdan con la formula molecular $C_{32}H_{50}N_4O_6S$ (Figura 3.10).

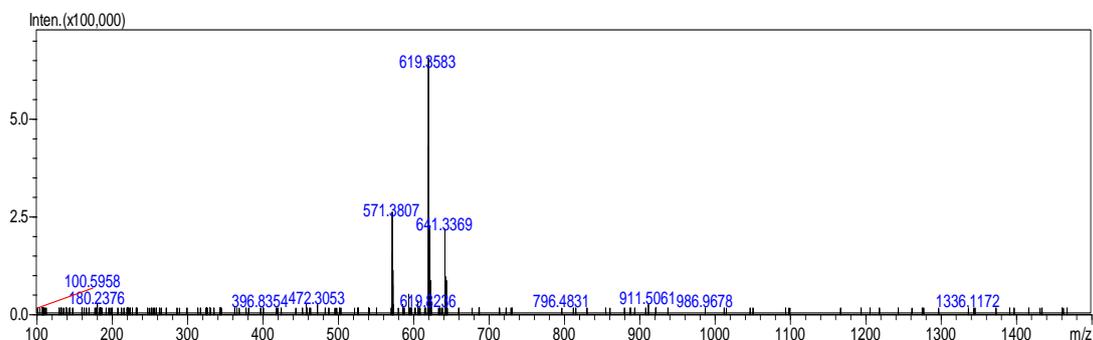


Figura 3.10: Espectro de masas del compuesto 2

En el espectro RMN-¹H (CDCl₃, 400MHz), del compuesto **2** (Figura 3.11), se observaron las señales características de un compuesto tipo péptido, con señales para un anillo aromático monosustituido en δ_H 7,24 (1H, bs); 7,21 (2H, t, J= 3,1 Hz) y 6,94 (2H, bs). Señales para cinco hidrógenos α a carboxilos en δ_H 6,43 (1H, d, J = 10,8 Hz); 5,67 (1H, dd, J = 4,3Hz y 10,5Hz); 4,86 (1H, dd, J = 3,2 Hz y 4,6 Hz); 4,82 (1H, s) y 4,12 (1H, bs), sugiriendo la presencia de cinco residuos. Señales de metilos unidos a heteroátomos en δ_H 3,79 (3H, s); 3,25 (3H, s); 3,22 (3H, s) y 3,02 (3H, s). Señales para metinos y metilenos de las cadenas alifáticas de los residuos de aminoácidos en δ_H 3,43 (1H, dd, J = 4,5 Hz y 14,1 Hz); 3,11 (1H, dd, J= 3,2 Hz y 14,1 Hz); 2,30 (1H, bs); 2,14 (1H, bs); 1,83 (1H, m); 1,51 (1H, m); 1,47 (2H, m); 1,29 (1H, m); 1,09 (1H, m). Finalmente, se observan señales para seis metilos en δ_H 1,36 (3H, d, J = 5,8); 0,98 (3H, m); 0,97 (3H, m); 0,94 (3H, m); 0,88 (3H, d, J = 6,7) y 0,84 (3H, t, J = 7,4).

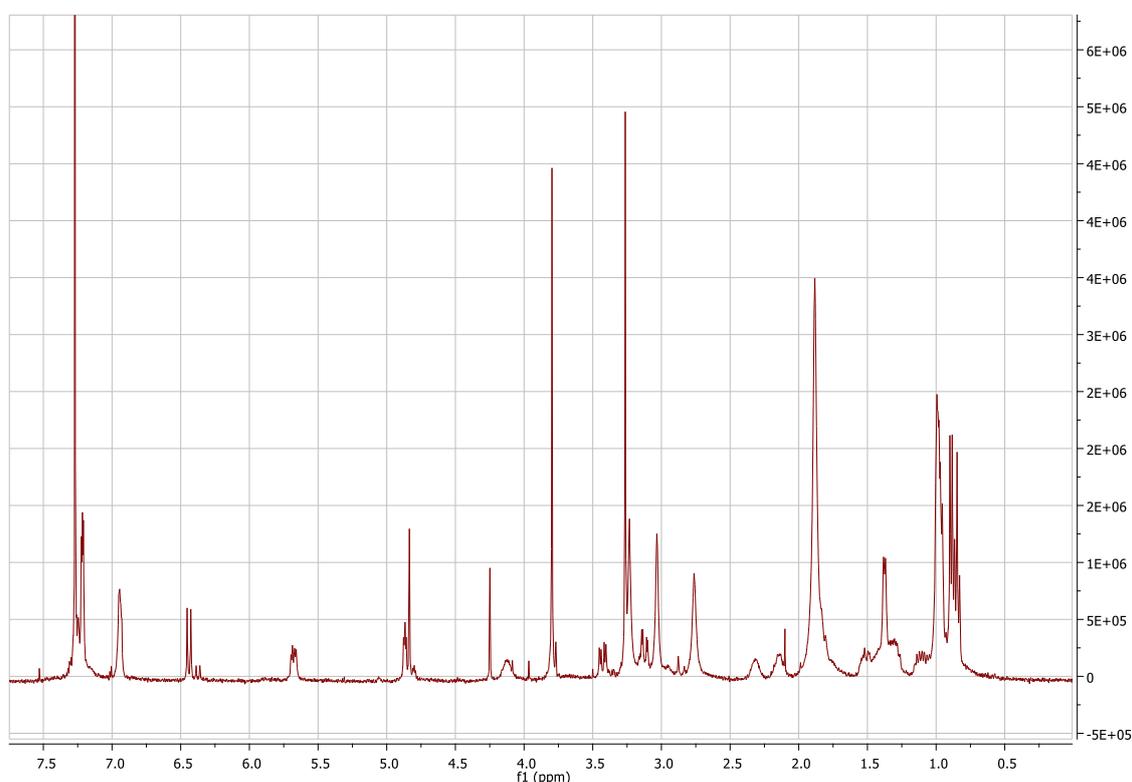


Figura 3.11: Espectro RMN- ¹H (CDCl₃, 400MHz) del compuesto **2**

En el espectro RMN-¹³C (CDCl₃, 100MHz), del compuesto **2**, (Figura 3.12), se observan señales características de un péptido con cinco carboxilos en δ_C 177,8; 172,0; 171,7; 169,0 y 168,1, confirmando la presencia de 5 residuos. Señales para carbonos de un anillo aromático monosustituido δ_C 134,3; 129,5 (x2); 128,2 (x2) y 127,2. Una señal para un carbono unido a dos heteroátomos en δ_C 94,9. Señales para cuatro metinos α al carboxilo en δ_C 66,7; 59,6; 58,3 y 51,4. Señales para tres metinos alifáticos en δ_C 33,9; 29,7 y 25,4.

Por último se observan señales para diez metilos de las cuales las señales en δ_c 58,4; 37,5; 32,3 y 31,5 se encuentran unidos a heteroátomos y las señales en δ_c 23,3; 21,4; 20,5; 18,8; 14,5 y 10,5 son metilos sobre cadenas alifáticas.

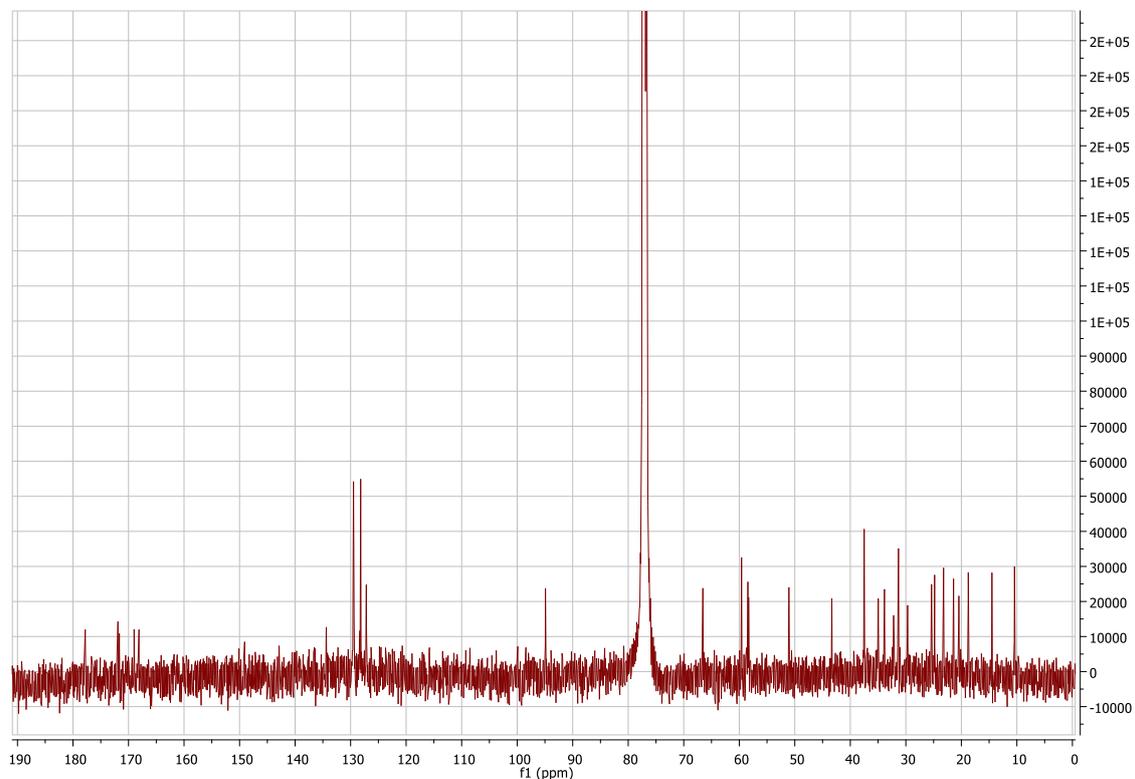


Figura 3.12: Espectro RMN-¹³C (CDCl₃, 100MHz) del compuesto **2**

A partir del espectro HSQC fue posible observar las correlaciones H-C a un enlace y de esta manera establecer los hidrógenos que se encuentran sobre cada uno de los carbonos como se presenta en la Tabla 3.3. También es posible ver que los hidrógenos en δ_H 3,43 y 3,11; 1,29 y 1,09 y 1,83 y 1,51 son parejas de hidrógenos diasterotópicos lo que indica que cerca de estos metinos deben haber sustituyentes que generan que estos hidrógenos no sean magnéticamente equivalentes.

Tabla 3.3: Datos de RMN ^1H y ^{13}C para el compuesto 2 (RMN ^1H CDCl_3 , 400MHz, RMN ^{13}C CDCl_3 , 100MHz)

Posición	$^{13}\text{C}(\delta \text{ ppm})$	$^1\text{H}(\delta \text{ ppm})$	Mult.(J en Hz)
OMe Phe			
1	177,8	----	----
2	59,6	4,86	dd(3,2 , 4,6)
3a	35,1	3,43	dd(4,5, 14,1)
3b		3,11	dd(3,2, 14,1)
4	134,4	----	----
5	129,5	7,24	t
6	128,2	6,93	bs
7	127,2	7,24	bs
OMe	58,4	3,79	s
NMe Ile			
1	171,7	----	----
2	58,3	6,43	d
3	33,9	2,14	bs
4a	24,9	1,29	m
4b		1,09	m
5	10,5	0,84	t(7,4)
6	14,9	0,88	d(6,7)
NMe	31,3	3,25	m
NMe Val			
1	172,0	----	----
2	66,7	4,11	bs
3	29,8	2,30	bs
4	18,8	0,98	m
5	20,5	1,36	d(5,8)
NMe	37,5	3,02	s
NMe α-aminoGly			
1	169,0	----	----
2	94,9	4,82	s
NMe	32,3	3,22	s
α-MIHA			
1	168,2	----	----
2	51,1	5,67	dd(4,3, 10,5)
3a	37,5	1,83	m
3b		1,51	m
4	25,4	1,47	m
5	21,4	0,94	m
6	23,3	0,97	m

A partir del análisis de los espectros COSY y HMBC se observaron correlaciones que permitieron construir las subestructuras correspondientes a los cinco residuos que son mostradas en la Figura 3.13. En esta figura se puede observar la presencia del éster metílico de la fenilalanina (PheOMe), un residuo de *N*-Me Valina (*N*-Me-Val), *N*-Me Isoleucina (*N*-Me-Ile), aminoácidos no proteínogénicos comunes en compuestos aislados de cianobacterias y la presencia de dos residuos inusuales del ácido α -mercaptoisohexanoico (α -MIHA)-y la *N*-Me α -aminoglicina (*N*-Me- α -aminoGly). Debido a la ausencia de correlaciones para cada aminoácido, no se logró asignar de manera directa los carboxilos en δ_H 168,2 y 172,0 a los residuos de (α -MIHA) y *N*-Me-Val. Su asignación se presentará más adelante.

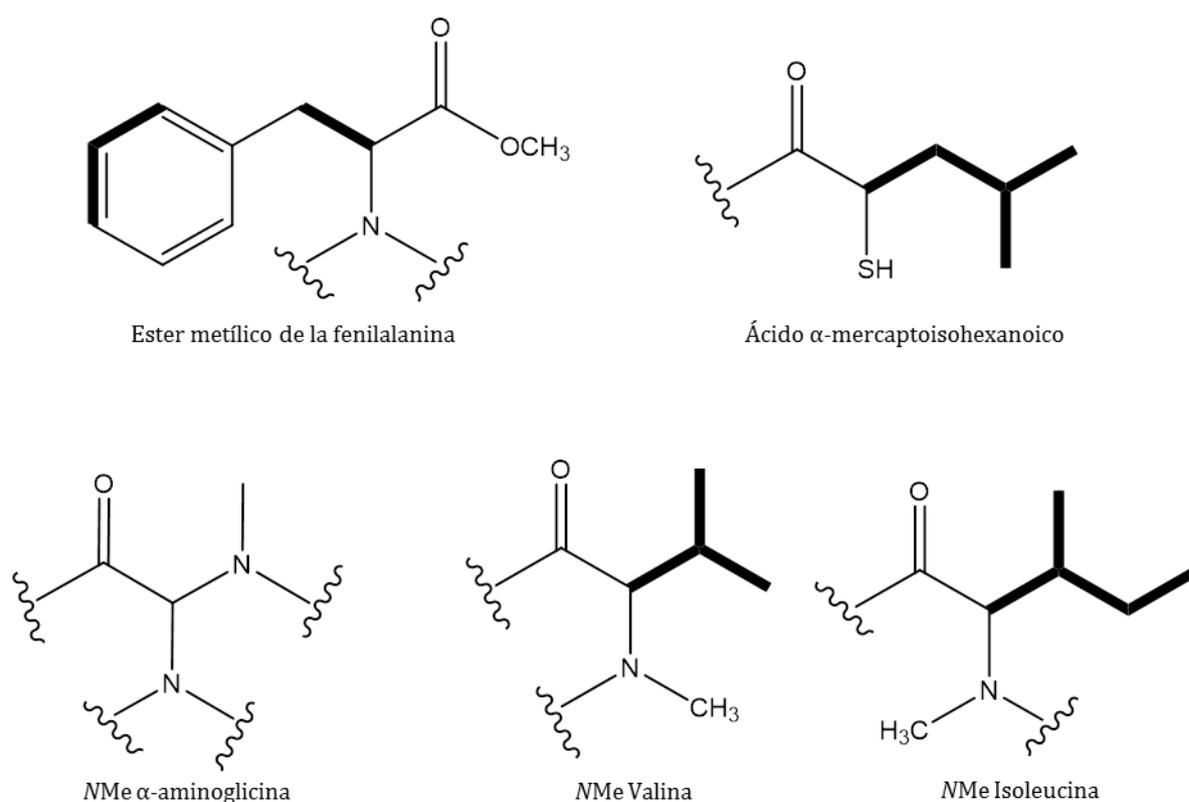


Figura 3.13: Unidades de los aminoácidos presentes en el compuesto **2**

La secuencia del compuesto **2**, basada en las correlaciones observadas en HMBC se propone como se presenta a continuación (Figura 3.14): La correlación entre el protón α del residuo de la *N*-Me α -aminoglicina en δ_H 4,82 con el carbono α de la PheOMe en δ_C 59,6 y del *N*-Metilo de la *N*-Me α -aminoglicina con el carboxilo en δ_C 168,1 asignado al residuo del ácido α -mercaptoisohexanoico, permite proponer la subestructura **a** en la figura 3.14. De otro lado la correlación de los protones del *N*-Metilo del residuo de la *N*-Me Ile con el carboxilo en 172,0 permite de una parte asignar este último al residuo de la *N*-Me Val, y de

otra parte proponer la subestructura de la figura 3.14 (Subestructura b). La asignación de este carboxilo al residuo de la N-Me Val, permite asignar el carboxilo en 168,2 al residuo de α -MIHA como se presenta en la Tabla 3.3.

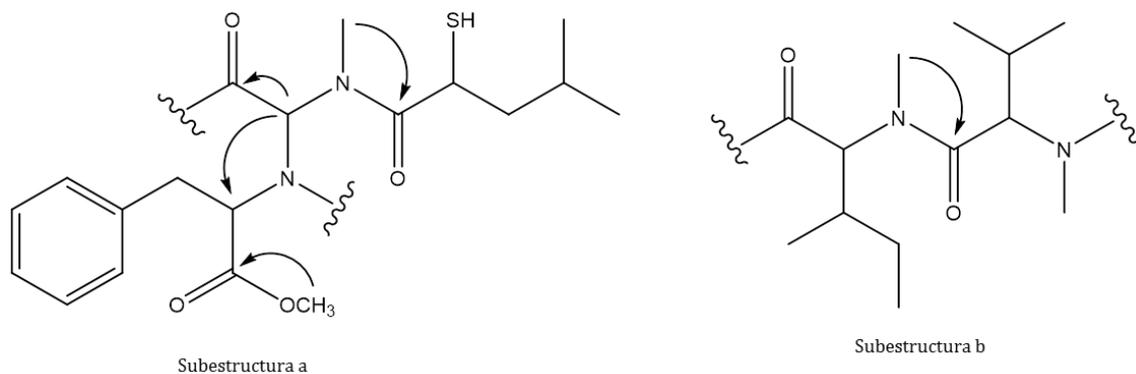


Figura 3.14: Subestructuras para el compuesto 2

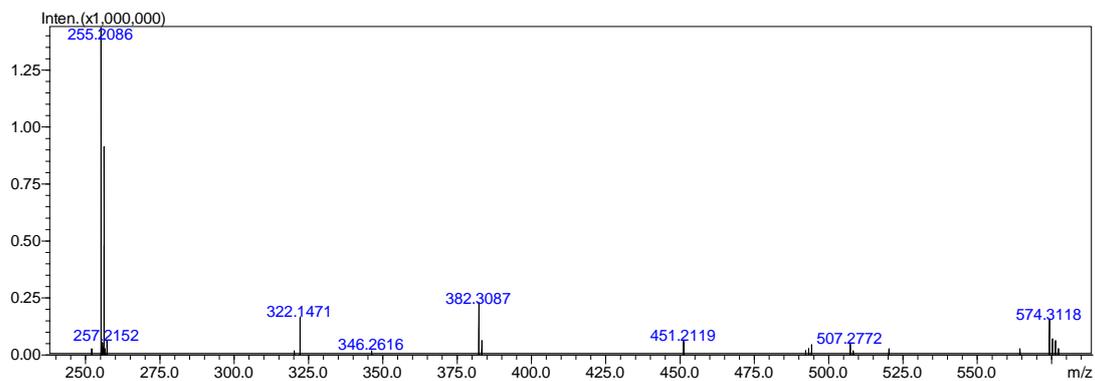


Figura 3.15: Espectro de EM/EM del compuesto 2

Finalmente, la estructura del compuesto 2 se propone como se presenta en la figura 3.16 donde se presenta la única forma lógica de unión de las dos subestructuras. Esta propuesta se soporta sobre los datos obtenidos por CLAE-EM y EM/EM Figura 3.15, donde se observa un ión en m/z 255,2086, calculado para una fórmula molecular de $C_{13}H_{25}N_3O_2$, que corresponde al fragmento NMe Val - NMe Ile. Sin embargo, este análisis por espectrometría de masas no se puede hacer para los otros residuos de la molécula debido a que la interpretación de la fragmentación en espectros de MS/MS de los péptidos cíclicos es mucho más compleja ya que no es posible predecir por cuál de los enlaces se van a dar las fragmentaciones del ciclo [14].

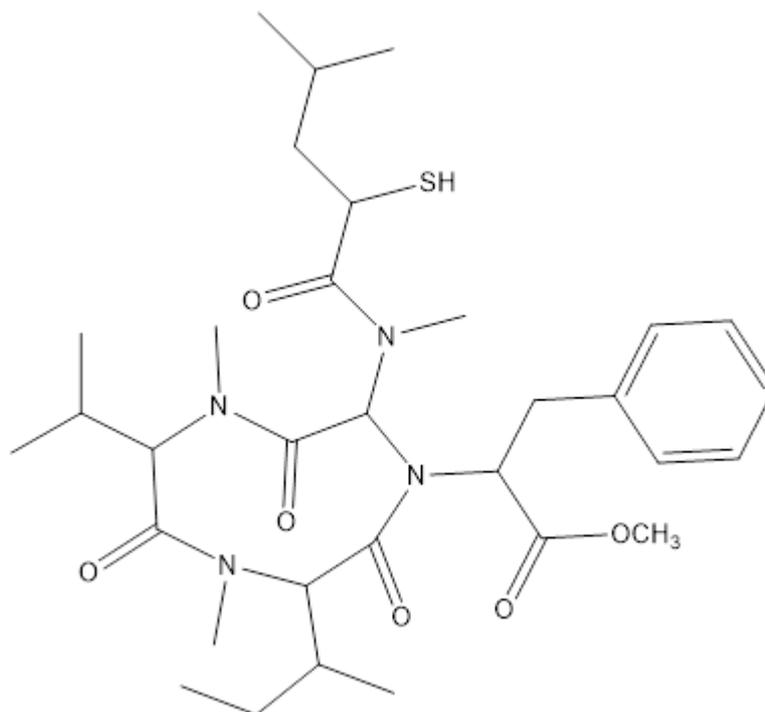


Figura 3.16: Estructura del compuesto 2

La estructura del compuesto 2 presenta una unidad de *N*-Metil- α -aminoglicina, este aminoácido (del cual no se han encontrado reportes de su aislamiento a partir de fuentes naturales), tiene un carbono unido a dos átomos de nitrógeno, este aminoácido es muy extraña debido a que este tipo de estructuras son intermediarios en las reacciones de formación de iminas y solo se conoce como un intermediario de síntesis con los dos nitrógenos protegidos [15, 16]. Sin embargo, el desplazamiento característico de este carbono unido a dos heteroátomos en δ_c 94,9, junto con la constante de acoplamiento C-H a un enlace de 178Hz, característica de un carbono unido a dos nitrógenos (reportada en 175 Hz,[17]), la cual se puede calcular a partir de los satélites del hidrogeno α observados en el espectro HMBC (Figura 3.17), permite confirmar la propuesta aquí presentada. Por último, tanto la estructura aquí propuesta como la fórmula molecular del compuesto fueron buscadas en las bases de datos SciFinder y AntiMarine, respectivamente, donde no se encontró ningún reporte por lo cual se considera que este compuesto podría ser nuevo.

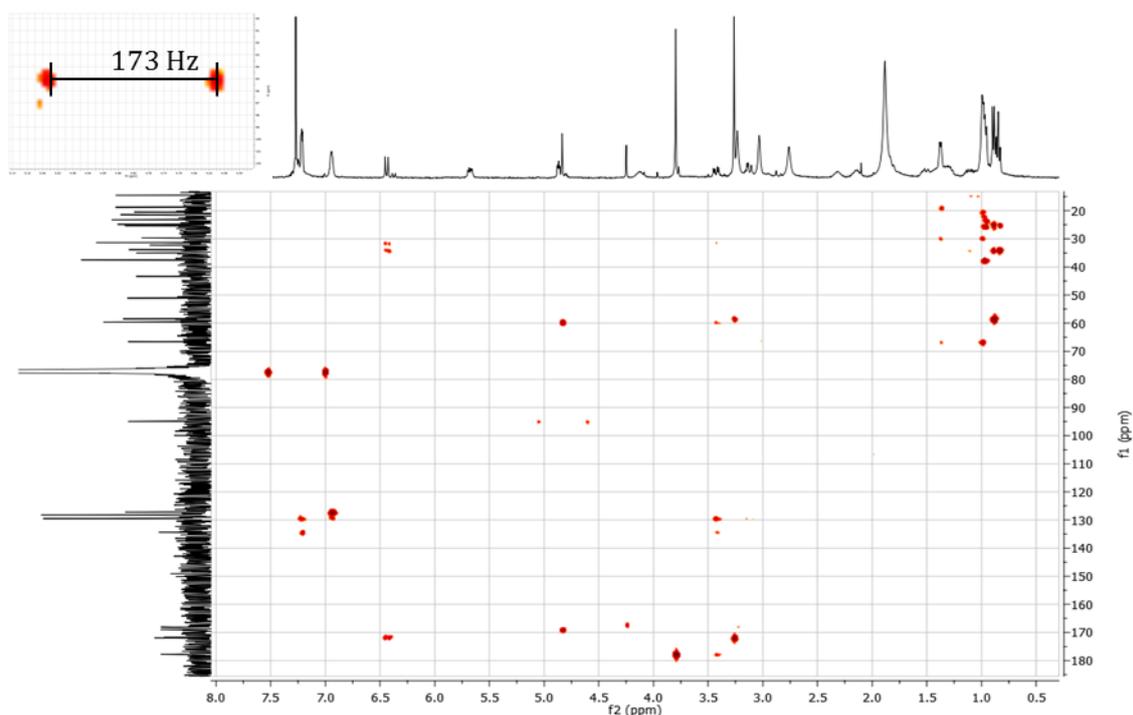


Figura 3.17: Espectro HMBC del compuesto **2** y cálculo de la constante de acoplamiento C-H a un enlace para el carbono en δ_c 94,9

De otro lado el compuesto **3** (0,5 mg) fue obtenido en una cantidad muy pequeña, lo cual no permitió realizar su análisis por RMN. Sin embargo, al realizar análisis de CLAE-EM y EM/EM se observó un ión $[M+H]^+$ 585,3963, para una fórmula molecular de $C_{32}H_{49}N_4O_6$, el cual presenta una diferencia de 34 um con respecto al compuesto **2**. De otro lado, el espectro obtenido por EM/EM del ion 585,3963 muestra los iones en m/z 255,2090, 331,2046, 382,3126, 458,3098 y 549,3511 (Figura 3.16), donde los iones en 255,2090 y 382,3126 permiten comprobar que el compuesto **3** es un análogo estructural del compuesto **2**.

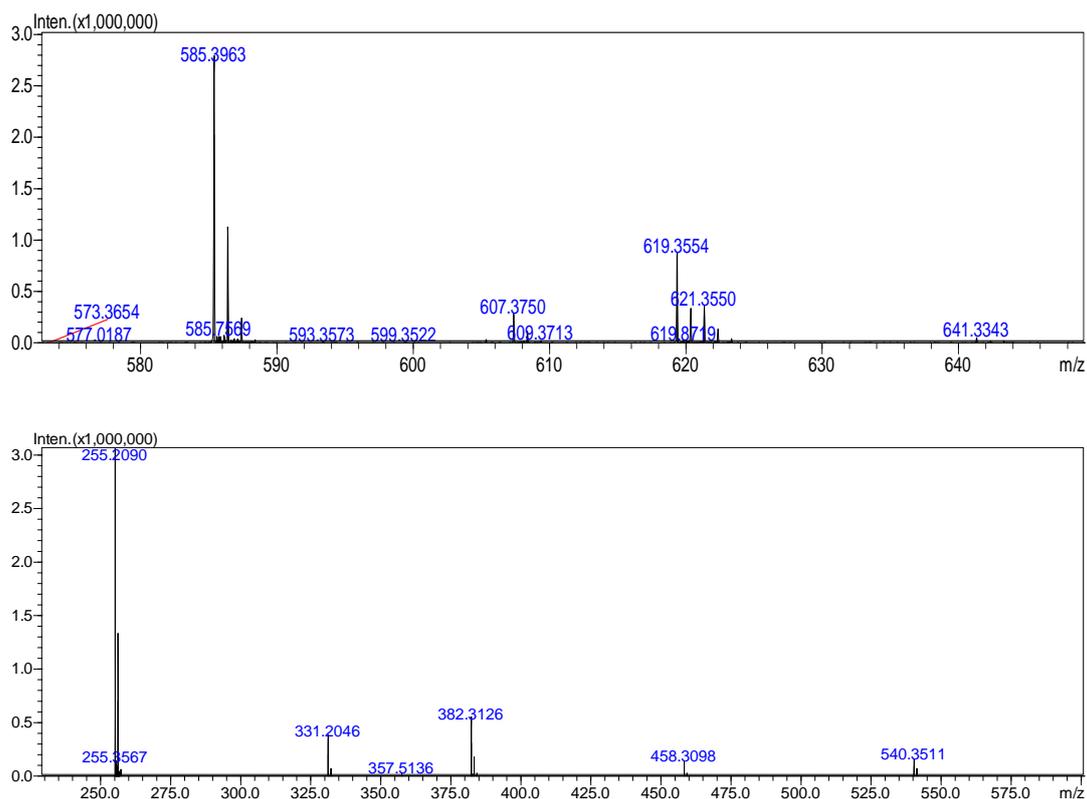


Figura 3.18: Espectros de masa y EM/EM del compuesto 3

La diferencia estructural del compuesto **3**, se propone a partir del análisis de los datos de EM, donde el ion en 585,3963 y el ion en 540,3511 obtenidos por EM/EM indican que en el compuesto **3** están ausentes dos hidrógenos y un azufre, lo cual podría deberse a la presencia de un doble enlace en las posiciones 2 y 3 del ácido de la subestructura b de la Figura 3.14 , a partir de lo cual se propone la estructura de la Figura 3.19.

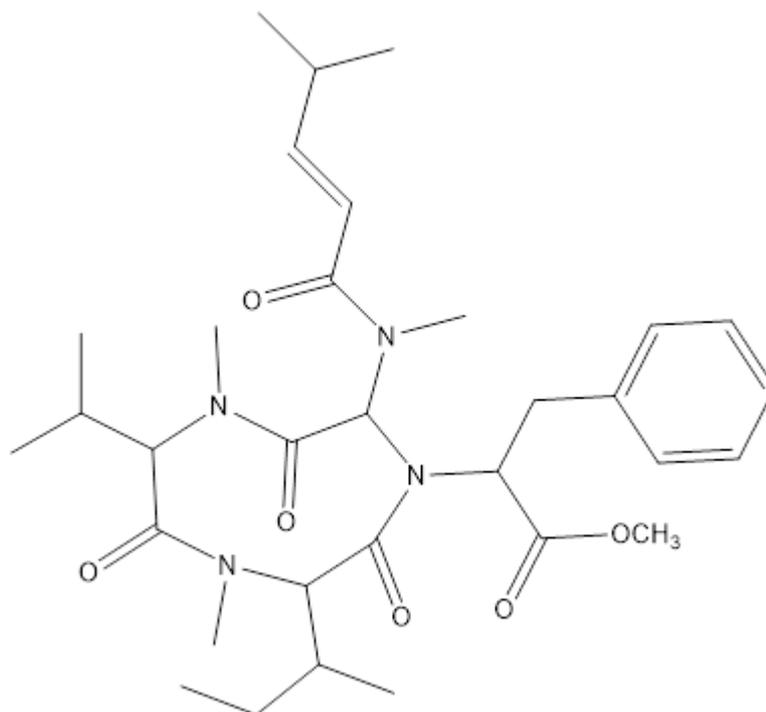


Figura 3.19: Estructura del compuesto 3

Finalmente, debido a la poca cantidad en que fue posible aislar estos compuestos no fueron evaluados en los ensayos de actividad biológica. No obstante, la fracción F45.4.9 que estaba conformada mayoritariamente por el compuesto 2, si fue evaluada en los cuatro ensayos de actividad biológica, mostrando actividad contra malaria y actividad citotóxica Tabla 3.4. A partir de estos resultados resulta razonable sugerir que estos dos compuestos sean los responsables de la actividad observada para el extracto crudo 45.

Tabla 3.4: Resultados de ensayos de actividad biológica de la fracción F45.4.9

	%I.C. <i>Leishmania donovani</i> *	%I.C. <i>Plasmodium falciparum</i> *	%I.C. <i>Trypanosoma cruzi</i> *	%C. MCF-7 Cáncer**
F45.4.9	14,3	100,0	23,20	19,7

* Porcentaje de inhibición de crecimiento del parásito (*Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma cruzi*) se considera activo valores superiores al 70 % de inhibición[13].

** Porcentaje de crecimiento de células MFC-/ (Cáncer de mama) se considera activo valores inferiores al 25% de crecimiento[13]

3.3.2 Estudio químico del extracto de la muestra número 10 (*Lyngbya spp.*)

Para el estudio químico del extracto 10, el cual fue clasificado teniendo en cuenta los caracteres morfológicos como un consorcio de varias especies de cianobacterias del género *Lyngbya sp.*, se realizó un primer fraccionamiento utilizando un cartucho de C18 obteniéndose seis fracciones (F10.1-F10.6, Figura 3.20).

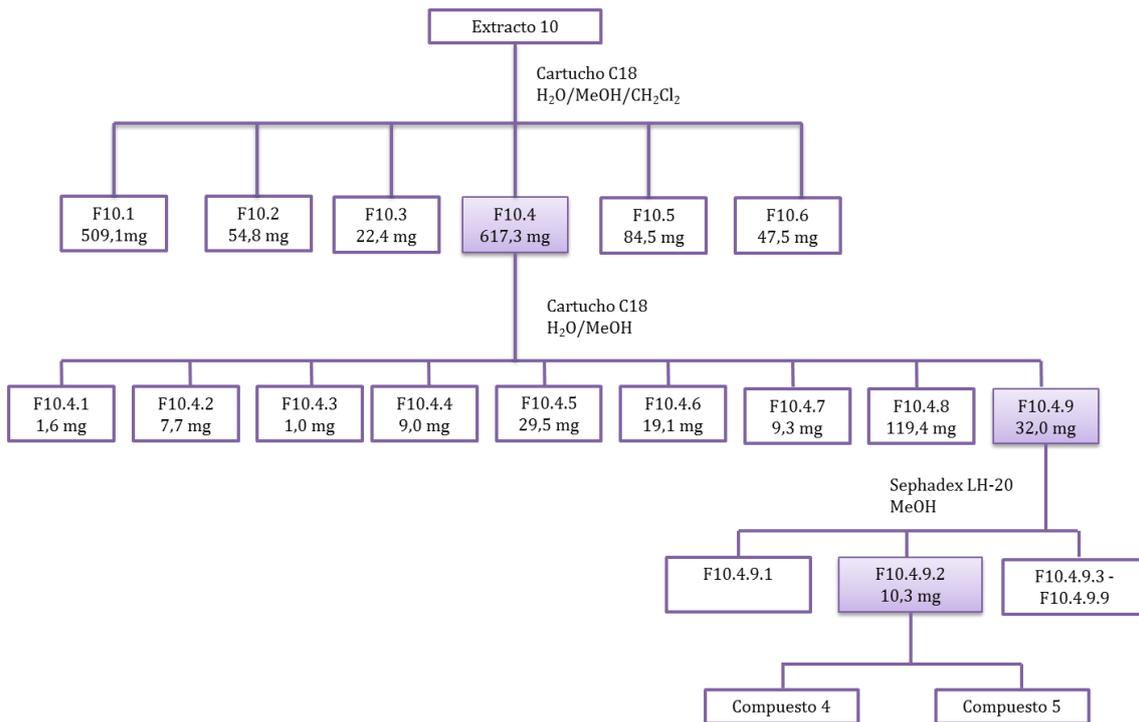


Figura 3.20: Esquema de separación del extracto 10

De las seis fracciones obtenidas, F10.4 que fue eluida con una fase móvil MeOH/H₂O 8:2 fue la única que presentó actividad biológica mostrando ser activa en el ensayo antimalaria y de citotoxicidad (Tabla 3.5), razón por la cual esta fracción fue seleccionada para continuar con el fraccionamiento, como se muestra en el esquema de la figura 3.20.

Tabla 3.5: Resultados de actividad biológica de las fracciones obtenidas del extracto 10

Código	Solvente de elución	%I.C. <i>Leishmania donovani</i> *	%I.C. <i>Plasmodium falciparum</i> *	%I.C. <i>Trypanosoma cruzi</i> *	%C. MCF-7 Cáncer**
F10.1	MeOH/H ₂ O 2:8	7,1	14,2	0,9	100,0
F10.2	MeOH/H ₂ O 4:6	6,7	16,3	0,1	100,0
F10.3	MeOH/H ₂ O 6:4	11,2	49,1	3,4	100,0
F10.4	MeOH/H ₂ O 8:2	2,5	100,0	3,0	2,1
F10.5	MeOH 100%	6,2	30,5	8,8	65,6
F10.6	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 1:1	0,0	15,1	5,8	100,0

* Porcentaje de inhibición de crecimiento del parásito (*Leishmania donovani*, *Plasmodium falciparum* y *Trypanosoma cruzi*) se considera activo valores superiores al 70 % de inhibición [13].

** Porcentaje de crecimiento de células MFC-/ (Cáncer de mama) se considera activo valores inferiores al 25% de crecimiento [13]

La fracción F10.4.9.2 obtenida por el fraccionamiento de F10.4.9 en una columna de Sephadex LH-20 fue analizada mediante CLAE-UV-MS donde se observó, en el cromatograma obtenido a 210 nm, un compuesto mayoritario con tiempo de retención 6,4 minutos. Sin embargo, al revisar el TIC de este pico se observó que en realidad contenía dos compuestos (Figura 3.21), en la primera parte del TIC se observa un ión correspondiente a $[M+H]^+$ con un m/z de 763,5764 seguido de una región donde el pico base es un ión con dos unidades de masa menos, $[M+H]^+$ 761, 5610, lo cual indica que estos dos compuestos poseen una estructura muy similar y que los compuestos **4** y **5** diferencian su fórmula en dos hidrógenos.

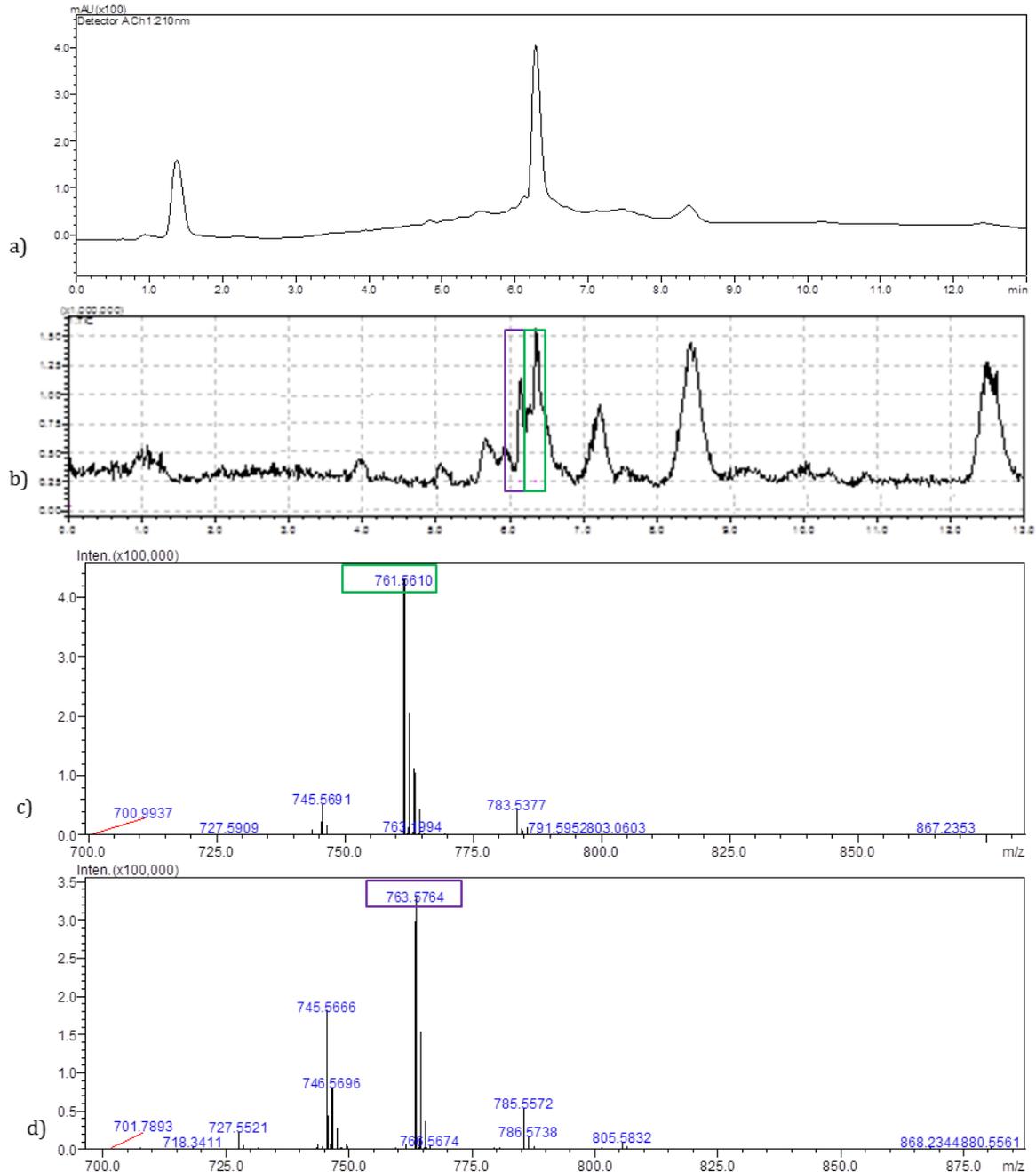


Figura 3.21: Análisis por CLAE-EM de la fracción F10.4.9.2 a) Cromatograma con detección a 210 nm, b) TIC, c) Espectro de masas del compuesto 4, d) Espectro de masas del compuesto 5

En el espectro RMN ^1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de esta fracción (Figura 3.22, Tabla 3.6, anexo G), se observaron señales para 5 protones sobre carbonos unidos a heteroátomos en δ_{H} 5,02 (1H, dt, $J = 2,4$ Hz y 3,9 Hz); 3,79 (1H, dt, $J = 5,5$ Hz y 10,5 Hz); 3,62 (1H, m); 3,55 (1H, m); y señales para dos hidrógenos en 3,44 (2H, m). Se observaron también señales para hidrógenos de hidroxilos en 4,49 (1H, d, $J = 4,6$ Hz); 4,40 (1H, d, $J = 4,6$ Hz); 4,30 (3H, m) y

4,24 (4H, m). Señales para metilenos y metinos en δ_H 2,27 (1H, d, $J = 8,7$); 2,08 (1H, m); 2,05 (1H, m); 1,56 (1H, m); 1,46 (1H, m); 1,44 (1H, m); 1,41 (6H, m); 1,39 (1H, m); 1,31 (21H, m); 1,23 (16H, m); 1,15 (1H, m) y 1,01 (1H, m). Por último señales para metilos en δ_H 0,87 (3H, m); 0,85 (3H, m) y 0,82 (3H, m).

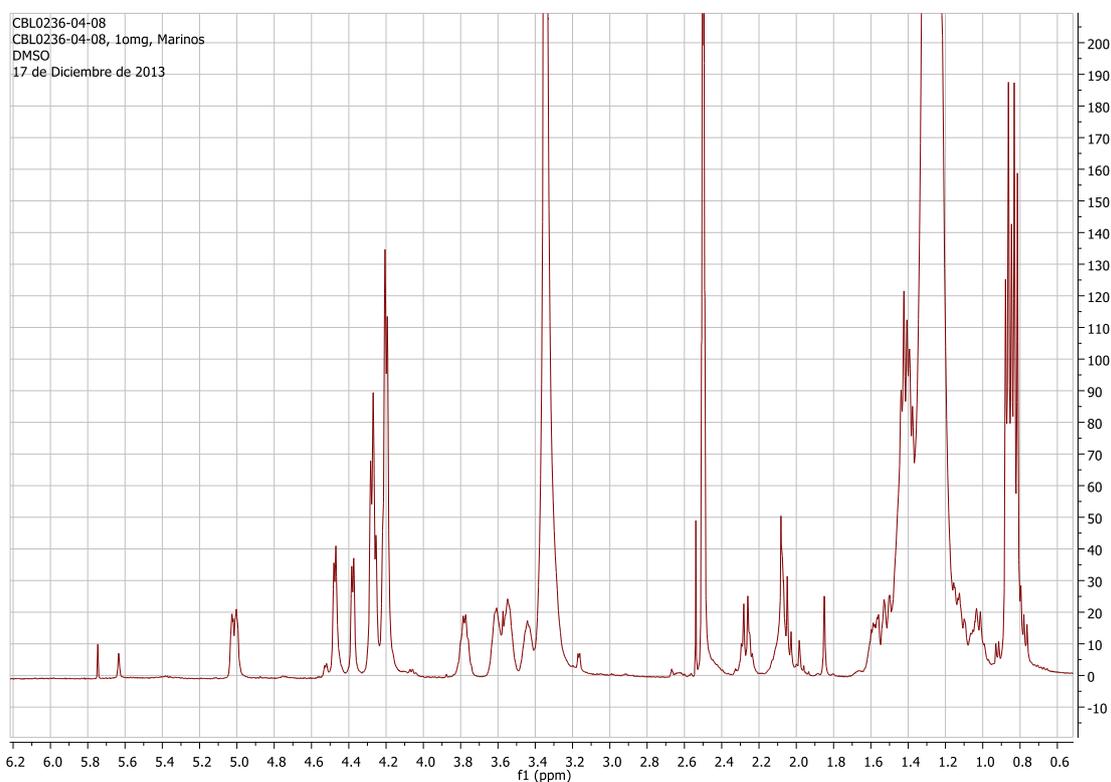


Figura 3.22: Espectro de RMN- 1H (DMSO- d_6 , 400 MHz) de la fracción F10.4.9.2

En el espectro RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 400 MHz) de esta fracción (Figura 3.23, Tabla 3.6), se observaron señales para un carboxilo en δ_c 172.1, señales para 10 carbonos enlazados a oxígeno en δ_c 73,7; 69,7; 69,6 (x 2); 69,4; 68,2; 67,2; 66,6; 66,5 y 66,1. Señales para dos metinos alifáticos en δ_c 36,4 y 26,7. Señales para 26 metilenos alifáticos en δ_c 44,6; 44,2; 43,9; 42,3; 38,8 (x2); 38,4; 38,3; 37,3 (x4); 37,2 (x2); 37,1; 36,9; 31,8; 28,9; 22,3; 21,7 (x2); 21,6 (x4) y 21,0. Por último, se observaron señales para tres metilos en δ_c 19,1; 14,7 y 13,9, para un total de 42 carbonos.

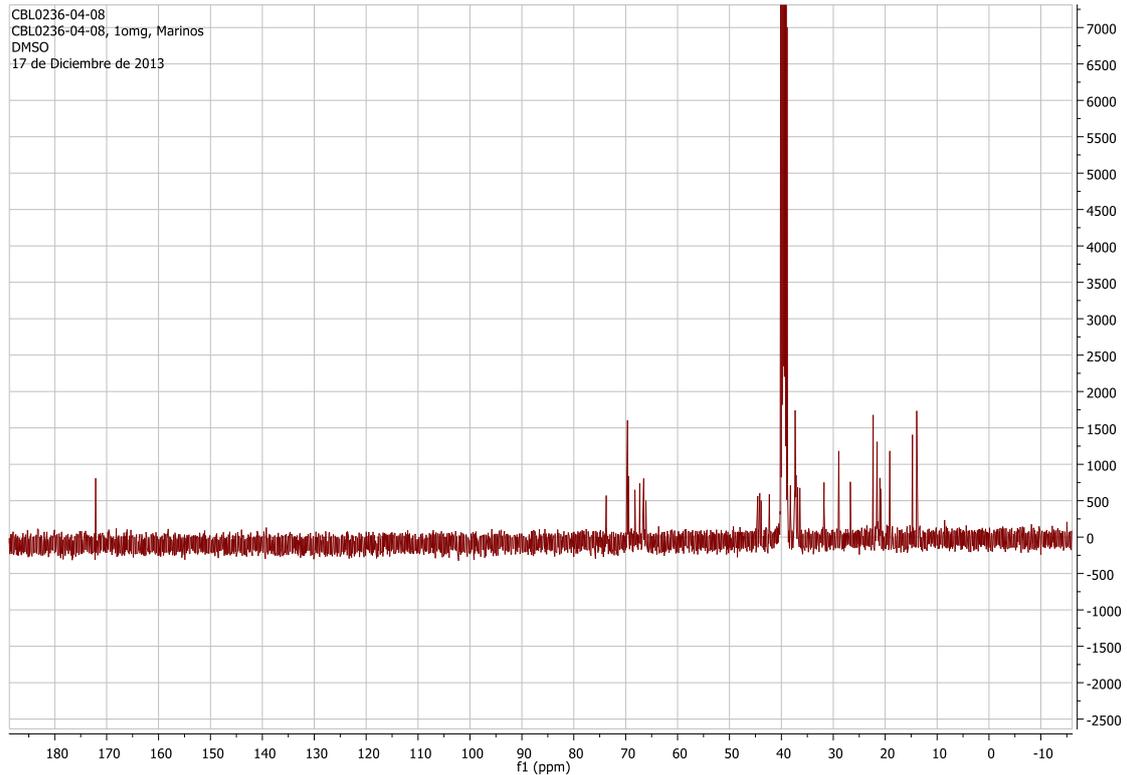


Figura 3.23: Espectro de RMN- ^{13}C (DMSO- d_6 , 100 MHz) de la fracción F10.4.9.2

Al realizar una búsqueda por derreplicación en la base de datos AntiMarin, especializada en productos naturales marinos, con la información mencionada anteriormente se encontró que el compuesto mayoritario de esta fracción, aquí identificado como **4**, corresponde al caylobolido A (Figura 3.24, Tabla 3.6), un policétido macrocíclico el cual fue previamente aislado de un “mat” de cianobacterias clasificada como *Lyngbya majuscula* recolectada en las Bahamas. Este compuesto presentó actividad citotóxica contra células tumorales de colon (IC_{50} HCT 116 = $9,9\mu\text{M}$), por lo que se considera que este compuesto debe ser el responsable o uno de los responsables de la actividad presentada por el extracto y la fracción estudiada, en los ensayos de citotoxicidad [18].

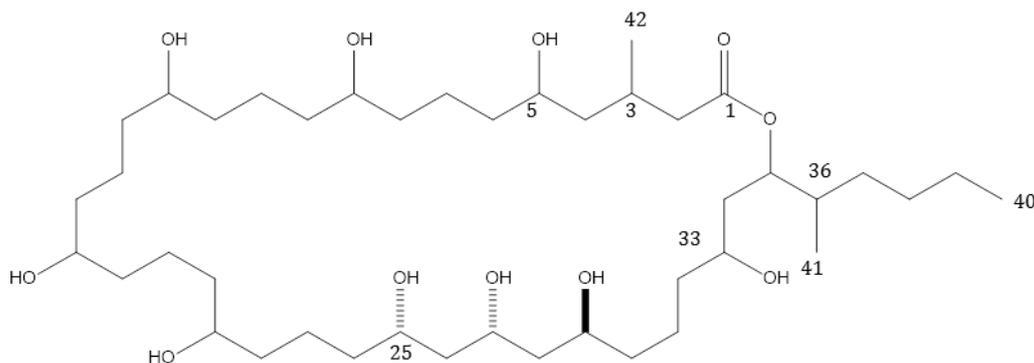


Figura 3.24: Estructura del caylobolido A

Tabla 3.6: Comparación de las señales de RMN obtenidas para la fracción F10.4.9.2 con los desplazamientos reportados para el caylobolido A tomados en DMSO-*d*₆.

Posición	¹³ C Lit* (δ ppm)	¹³ C Exp* (δ ppm)	¹ H Lit* (δ ppm)	¹ H Exp* (δ ppm)
1	172,1	172,1		
2 ^a	45,5	42,3	2,28	2,27
2 ^b			2,05	2,05
3	26,7	26,7	2,08	2,08
4	42,3	38,8	1,35	1,31
5	66,6	66,6	3,46	3,44
6	43,5	43,9	1,55	1,41
7	21,6	21,6	1,26	1,23
8	38	37,4	1,45	1,31
9	69,6	69,4	3,20	3,20
10	21,6	21,0	1,45	1,31
11	21,6	21,6	1,26	1,23
12	38,0	37,3	1,45	1,31
13	69,6	69,7	3,20	3,35
14	38,0	37,2	1,45	1,31
15	21,6	21,7	1,26	1,23
16	38,0	37,2	1,45	1,31
17	69,6	69,6	3,20	3,35
18	38,0	37,4	1,45	1,31
19	21,6	21,7	1,26	1,23
20	38,0	37,4	1,45	1,31
21	69,6	69,6	3,20	3,35
22	38,0	37,4	1,45	1,31
23	21,6	21,6	1,26	1,23
24	38,6	38,4	1,51	1,41
25	68,2	68,2	3,63	3,55
26 ^a	44,2	44,2	1,56	1,44
26 ^b			1,23	1,15
27	66,5	66,5	3,85	3,62
28 ^a	44,6	44,6	1,50	1,46
28 ^b			1,32	1,39
29	66,1	66,1	3,55	3,79
30	38,4	38,3	1,54	1,41
31	21,3	21,6	1,23	1,23
32	37,4	36,9	1,36	1,31
33	67,3	67,2	3,25	3,44
34	42,3	38,8	1,58	1,56
35	73,7	73,7	5,02	5,02

36	36,4	36,4	1,60	1,31
37	31,8	31,8	1,16	1,01
38	29,0	28,9	1,26	1,23
39	22,3	22,3	1,23	1,23
40	14,0	13,9	0,83	0,82
41	14,8	14,7	0,85	0,85
42	19,1	19,1	0,88	0,87

Los datos aquí presentados muestran una alta correlación con lo publicados por MacMillan y Molinsky [18]. Las diferencias en los desplazamientos químicos aquí observadas pueden corresponder a cambios conformacionales en la estructura del macrociclo [19].

De otro lado, para el compuesto **5**, al realizar el proceso de derreplicación frente a la base de datos AntiMarine para el ion $[M+H]^+$ 761,5610, se encontró que se podría tratar del caylobólido B, un análogo del caylobólido A, que se diferencia en la presencia de un doble enlace en la posición 2, la presencia de una hidroxilación en la posición 7 y la ausencia de hidroxilo en la posición 5 (Figura 3.25). Este compuesto fue aislado de una “mat” de cianobacterias clasificadas como *Phormidium* sp. recolectadas en la Florida [20].

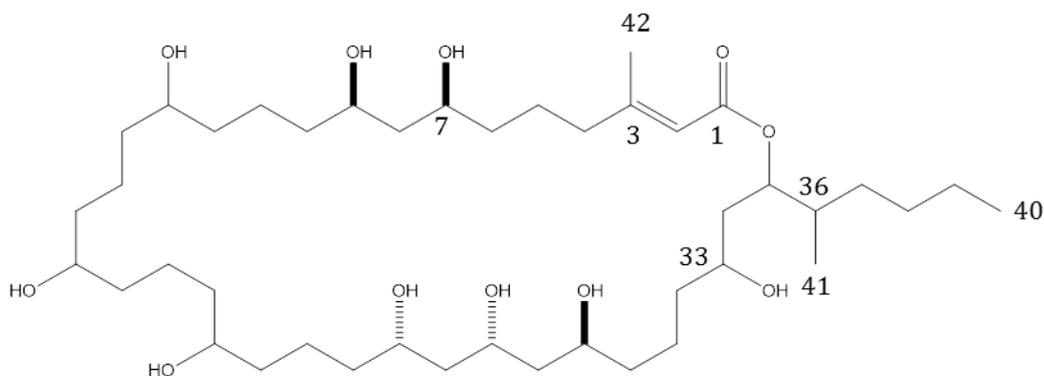


Figura 3.25: Estructura del caylobólido B

La confirmación de la presencia de este compuesto en la mezcla, se realizó a partir del análisis de las señales minoritarias presentes en los espectros de RMN mono y bidimensionales del caylobólido A. Particularmente, en el espectro de RMN- ^1H , se observan dos señales minoritarias a campo bajo en δ_{H} 5,64 (s), que coincide con la señal reportada para el protón olefínico sobre el carbono 2 del caylobólido B [20]. Esta señal presenta correlación en HMQC con un carbono en δ_{C} 116,9, confirmando la presencia del doble enlace. Adicionalmente, en el espectro de RMN-H, se observó una señal en δ_{H} 1,85

(s) correspondiente al metilo 42 que se desplaza a campo alto debido a que se encuentra sobre un carbono olefínico. Lo anterior se confirma por las correlaciones observadas en HMBC entre la señal en δ_H 1,85 y los carbonos en δ_C 116,9 y 160,0, permitiendo establecer la presencia del caylobólido B (compuesto **5**) en el extracto 10. Al igual que para el compuesto **4**, el caylobólido B (**5**) tiene asignada la estereoquímica de los carbonos en las posiciones 25, 27 y 29. Adicionalmente, esta molécula permitió asignar la estereoquímica de los carbonos 7 y 9 como se muestra en la Figura 3.25 [20].

Vale la pena mencionar que, de acuerdo a la literatura, este compuesto también mostró actividad citotóxica contra líneas celulares cancerosas HT29 ($IC_{50} = 4,5 \mu M$) y HeLa ($IC_{50} = 12,2 \mu M$) [9]. Así, de esta manera se logró determinar que los compuestos responsables de la actividad citotóxica observada en el extracto 10 son el caylobólido A y el caylobólido B. Sin embargo, aún hace falta determinar si son estos u otros los compuestos responsables de la actividad antimalárica observada en este extracto.

Finalmente es importante resaltar que si bien el caylobólido A había sido previamente aislado de un "mat" clasificado como *Lyngbya spp*, el caylobólido B que es un análogo estructural muy similar fue aislado de un "mat" clasificado como *Phormidium spp*, lo cual es un indicio de que a pesar de ser cianobacterias de géneros diferentes pueden compartir rutas metabólicas que los lleven a la producción de compuestos estructuralmente muy similares y esta sería la razón por la cual el extracto 10 clasificado como *Lyngbya spp*. dentro del estudio metabolómico presentado en el capítulo 2 se encuentra agrupado dentro de un grupo donde predominan "matts" clasificados como consorcios de *Symploca sp.* y *Phormidium sp.*

3.4 Conclusiones

A partir del estudio de la composición química de dos extractos de cianobacterias bentónicas arrecifales recolectadas en el Caribe colombiano fue posible identificar cinco compuestos.

Del extracto 45, una muestra clasificada como un consorcio de *Lyngbya majuscula-Oscillatoria margaritifera*, fue posible aislar tres compuestos, ninguno de los cuales había sido reportado antes en la literatura. El compuesto **1** identificado como el (9E,11Z)-1,12-dibromo-4-metildodeca-9,11-dien-2-ona resultó inactivo en todos los ensayos, mientras que una fracción compuesta mayoritariamente por los compuestos **2** Catalinamida A y **3** Catalinamida B presentó actividad citotóxica y antimalárica, por lo

resulta altamente probable que estos dos compuestos sean los responsables de la actividad biológica que mostró inicialmente el extracto.

De otro lado, a partir del extracto 10, una muestra clasificada como *Lyngbya* spp. fue posible identificar a los caylobolidos A y B. Estos compuestos habían presentado actividad contra líneas celulares tumorales por lo cual se propone que estos compuestos sean los responsables de la actividad citotóxica que presento el extracto crudo.

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Tidgewell K, Clark BR, Gerwick WH. 2.06 - The Natural Products Chemistry of Cyanobacteria. In: Liu H-W, Mander L, editors. Comprehensive Natural Products II. Oxford: Elsevier; 2010. p. 141-88.
- [2] Tan LT. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry* 2007;68:954-79.
- [3] Tan L. Filamentous tropical marine cyanobacteria: a rich source of natural products for anticancer drug discovery. *J Appl Phycol* 2010;22:659-76.
- [4] Balunas MJ, Grosso MF, Villa FA, Engene N, McPhail KL, Tidgewell K, et al. Coibacins A-D, Antileishmanial Marine Cyanobacterial Polyketides with Intriguing Biosynthetic Origins. *Organic Letters* 2012;14:3878-81.
- [5] Chang Z, Sitachitta N, Rossi JV, Roberts MA, Flatt PM, Jia J, et al. Biosynthetic Pathway and Gene Cluster Analysis of Curacin A, an Antitubulin Natural Product from the Tropical Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*†. *Journal of Natural Products* 2004;67:1356-67.
- [6] Edwards DJ, Marquez BL, Nogle LM, McPhail K, Goeger DE, Roberts MA, et al. Structure and Biosynthesis of the Jamaicamides, New Mixed Polyketide-Peptide Neurotoxins from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *Chemistry & Biology* 2004;11:817-33.
- [7] Thornburg CC, Cowley ES, Sikorska J, Shaala LA, Ishmael JE, Youssef DTA, et al. Apratoxin H and Apratoxin A Sulfoxide from the Red Sea Cyanobacterium *Moorea producens*. *Journal of Natural Products* 2013;76:1781-8.
- [8] Cardenas B. Estudio químico de un extracto de cianobacterias bentónicas arrecifales del caribe colombiano en la búsqueda de compuestos con potencial bioactivo Bogotá: Universidad Nacional de Colombia - Trabajo de grado en Química 2013.
- [9] Crews P, Rodríguez J, Jaspars M. Organic structure analysis. Second Edition ed. Oxford: Oxford University Press; 2010.

- [10] Luesch H, Yoshida WY, Harrigan GG, Doom JP, Moore RE, Paul VJ. Lyngbyalosite B, a New Glycoside Macrolide from a Palauan Marine Cyanobacterium, *Lyngbya* sp.1. *Journal of Natural Products* 2002;65:1945-8.
- [11] Tollbäck J, Crescenzi C, Dyremark E. Determination of the flame retardant tetrabromobisphenol A in air samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2006;1104:106-12.
- [12] Holčápek M, Volná K, Vaněrková D. Effects of functional groups on the fragmentation of dyes in electrospray and atmospheric pressure chemical ionization mass spectra. *Dyes and Pigments* 2007;75:156-65.
- [13] Boya CA. Productos Naturales derivados de la 3,4-Dihidroisocumarina aislados de la bacteria marina *Bacillus* sp. Panamá: Universidad Autónoma de Chiriquí - Trabajo de grado licenciatura en química; 2010.
- [14] Ngoka LCM, Gross ML. Multistep tandem mass spectrometry for sequencing cyclic peptides in an ion-trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 1999;10:732-46.
- [15] Bock MG, DiPardo RM, Freidinger RM. Differentially protected .alpha.-aminoglycine. *The Journal of Organic Chemistry* 1986;51:3718-20.
- [16] Qasmi D, René L, Badet B. An α -aminoglycine derivative suitable for solid phase peptide synthesis using Fmoc strategy. *Tetrahedron Letters* 1993;34:3861-2.
- [17] Balci M. 14 - Spin-Spin Coupling. In: Balci M, editor. *Basic ^1H - and ^{13}C -NMR Spectroscopy*. Amsterdam: Elsevier Science; 2005. p. 325-37.
- [18] MacMillan JB, Molinski TF. Caylobolide A, a Unique 36-Membered Macrolactone from a Bahamian *Lyngbya* majuscula†. *Organic Letters* 2002;4:1535-8.
- [19] Juaristi E. Introduction to stereochemistry and conformational analysis. In: Publications WI, editor. *Introduction to stereochemistry and conformational analysis*. New York: John Wiley and Sons INC; 1991. p. 253-69.
- [20] Salvador LA, Paul VJ, Luesch H. Caylobolide B, a Macrolactone from *Symplostatin* 1-Producing Marine Cyanobacteria *Phormidium* spp. from Florida. *Journal of Natural Products* 2010;73:1606-9.

4. Conclusiones generales y recomendaciones

4.1 Conclusiones

Se implementó un método para realizar estudios metabolómicos con muestras de cianobacterias bentónicas arrecifales del Caribe colombiano, utilizando como método de análisis cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado a un detector de arreglo de diodos.

A partir de los resultados obtenidos en los estudios metabolómicos fue posible establecer que la clasificación morfológica de las muestras no es criterio suficiente para reunir diferentes extractos, debido a que muestras que están compuestas por las mismas especies de cianobacterias pueden estar teniendo una producción metabólica diferente. Aun así es posible sugerir la mezcla de las muestras clasificadas como consorcios de *Symploca* sp. y *Phormidium* sp. presentes en el grupo 6 y las mezclas de las muestras clasificadas como *Symploca* sp y *Phormidium* sp. presentes en grupo 7 teniendo en cuenta su agrupación y la homogeneidad de la clasificación de las muestras que conforman este grupo.

Adicionalmente fue posible determinar que para los consorcios conformados por cianobacterias de los géneros *Symploca* y *Phormium* existe una variación en la producción metabólica de acuerdo al año de recolección mientras que para consorcios conformados por cianobacterias del género *Oscillatoria* no se observan dichas diferencias y los cambios en la producción metabólica pueden depender de los consorcios en los que se encuentran.

De otro lado se encontraron que la agrupación del cianobacterias del género *Lyngbya* se encuentra en concordancia con los recientes trabajos presentados por Engene *et al* y la nueva división de este género en los nuevos géneros *Moorea* y *Okeania*. La información aquí obtenida puede ser utilizada para completar el trabajo de clasificación de los afloramientos recolectados en el Caribe colombiano.

Finalmente, a partir de los estudios metabolómicos junto con ensayos de actividad biológica se seleccionaron los extractos de las muestras 10 (*Lyngbya* spp) y 45 (*Lyngbya*

majuscula y *Oscillatoria margaritifera*) para realizar estudios de su composición química y actividad biológica.

a partir del extracto 45 se identificaron tres compuestos nuevos. El compuesto **1** identificado como el 9*E*,11*Z*-1,12-dibromo-4-metildodeca-9,11-dien-2-ona, el cual resulto inactivo en todos los ensayos; mientras que a partir de una fracción activa frente a ensayos de citotoxicidad contra la línea celular MCF-7 (cáncer de senos) y actividad antimalárica contra el parásito *Plasmodium falciparum*, se aislaron los compuestos **2** Catalinamida A y **3** Catalinamida B, por lo que resulta altamente probable que estos dos compuestos sean los responsables de la actividad biológica que mostró inicialmente el extracto. Las estructuras de los compuestos aislados anteriormente tienen subunidades no reportadas antes en la naturaleza y pueden una de las razones por las cuales este extracto se separa de todos los demás en el estudio metabolómico.

Por último, a partir del extracto 10 se identificaron el caylobolido A (**4**) y B (**5**) que habían sido aisladas de cianobacterias de los géneros *Lyngbya spp* y *Phormidium spp* respectivamente. Esta puede ser una explicación a que en los estudios metabolómicos el extracto de la muestra 10 clasificada como *Lyngbya spp* estuviera agrupado en un grupo dominado por muestras conformadas por consorcios de cianobacterias de los géneros *Symploca* y *Phormidium*. Finalmente estos dos compuestos habían presentado actividad contra líneas celulares tumorales presentando por cual se consideran los responsables de la actividad citotóxica presentada por el extracto.

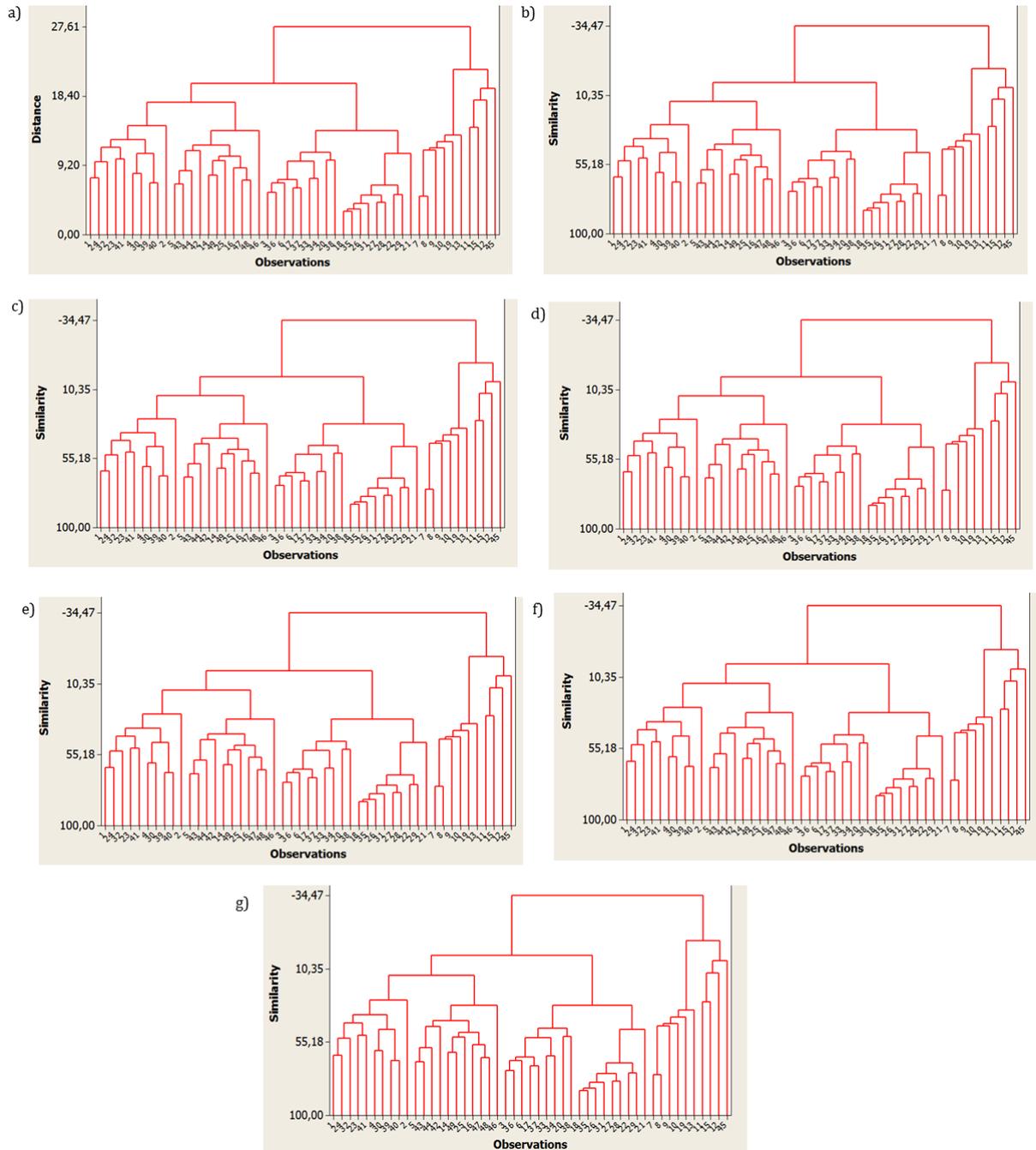
4.2 Recomendaciones

A partir del estudio metabolómico y lo mostrado recientemente en la literatura es claro que existen problemas con la clasificación de las cianobacterias bentónicas marinas por lo cual se recomienda la revisión de la clasificación de las muestras de cianobacterias recolectadas en el Caribe colombiano, utilizando un proceso de taxonomía integral que incluya información morfológica, morfométrica, molecular, química e incluso ecológica.

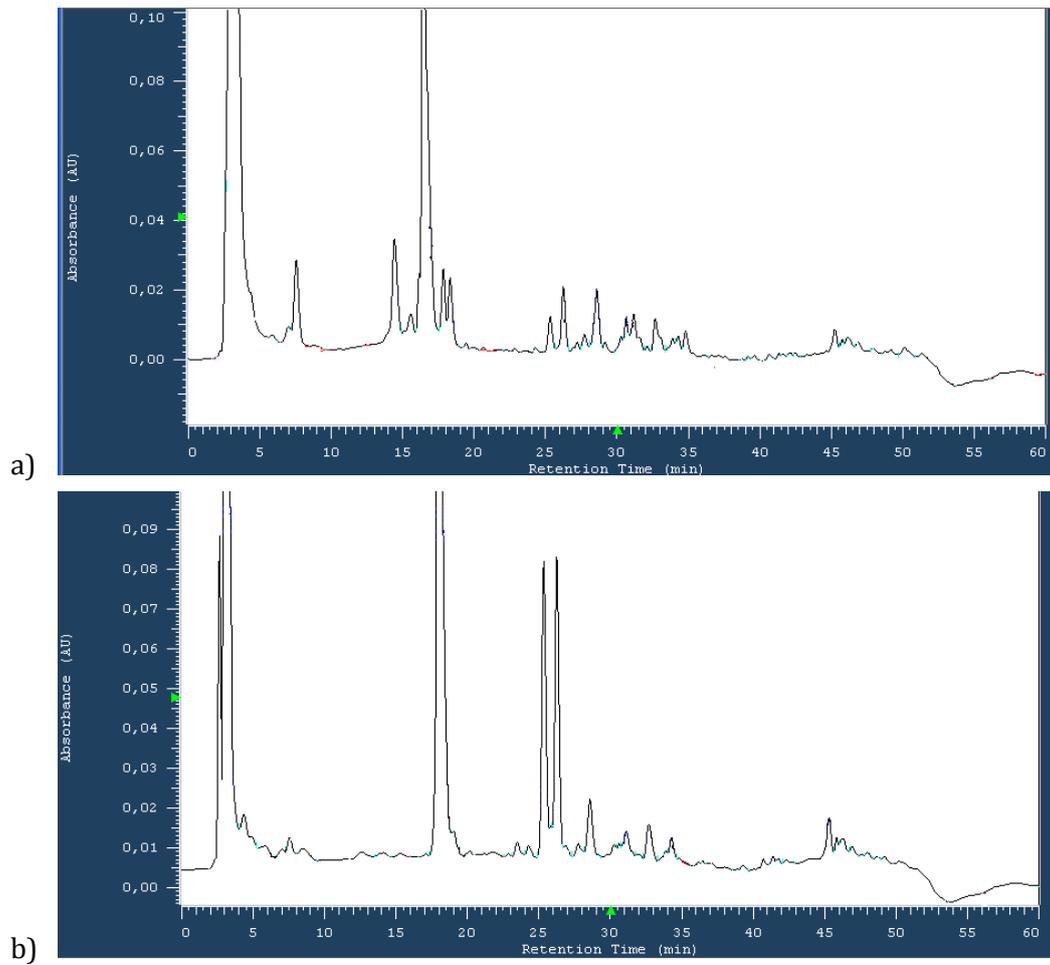
Se recomienda continuar con estudios químicos de la muestra 46 debido a que es una muestra 46 debido a que a diferencia del resto de las muestras fue colectada en aguas someras y el hecho de que se encuentre en un grupo con un único individuo indica que esta teniendo una producción metabólica diferente. De otro lado las muestras del grupo 6 y 7 se podrían reunir para iniciar estudios químicos de dichos extractos.

Se recomienda tomar espectros de RMN para la catalinamida A en equipos de alto campo con el fin de obtener mejores espectros que permitan comprobar la estructura presentada. Adicionalmente se debe realizar la determinación de la estereoquímica absoluta de los compuestos aislados, para el compuesto *9E,11Z*-1,12-dibromo-4-metildodeca-9,11-dien-2-ona, se debe realizar la determinación del metilo mediante la reducción seletiva de la cetona para posteriormente aplicar el método de Murata y para la Catalinamida A la estereoquímica de los residuos de aminoácidos debe ser determinada mediante el método avanzado de Marfey.

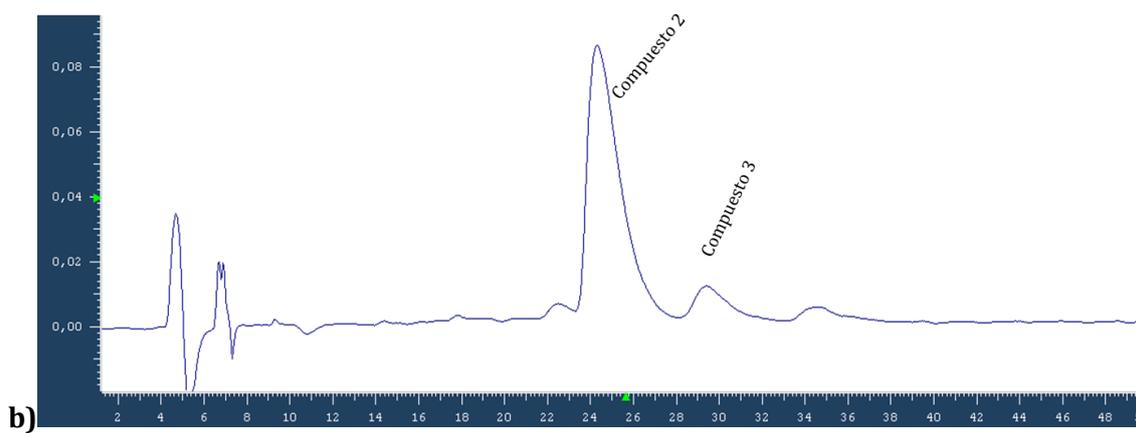
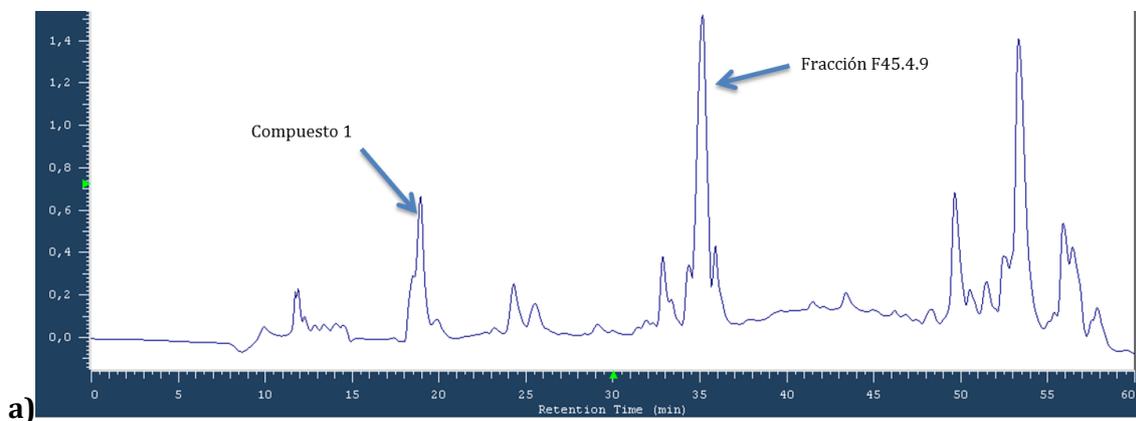
Anexo B: Dendrogramas obtenidos para la matriz de datos sin tratamiento y con los seis tratamientos .a) Datos sin tratamiento, b) Tratamiento centrado, c) Tratamiento auto escalamiento, d) Tratamiento de escalamiento de rango, e) Tratamiento espacialiento “Pareto” f) Tratamiento escalamiento “Vast” g) Tratamiento de escalamiento de nivel Todos los dendrogramas poseen la misma forma.



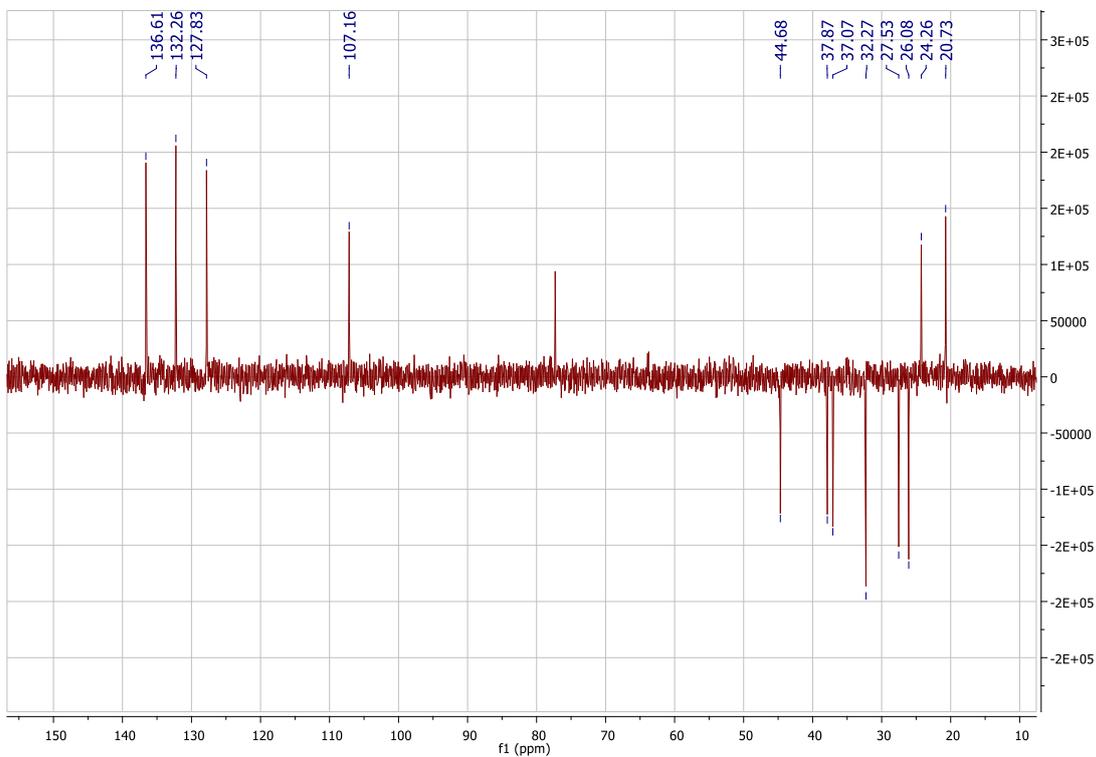
Anexo C: Cromatogramas de la fracción 3 de las muestra numero 4 (a) y 6 (b) los cuales están clasificados morfológicamente como *Phormidium. Submembranaceum* / *S ymploca. hydnoides* / *Oscillatoria acuminata*



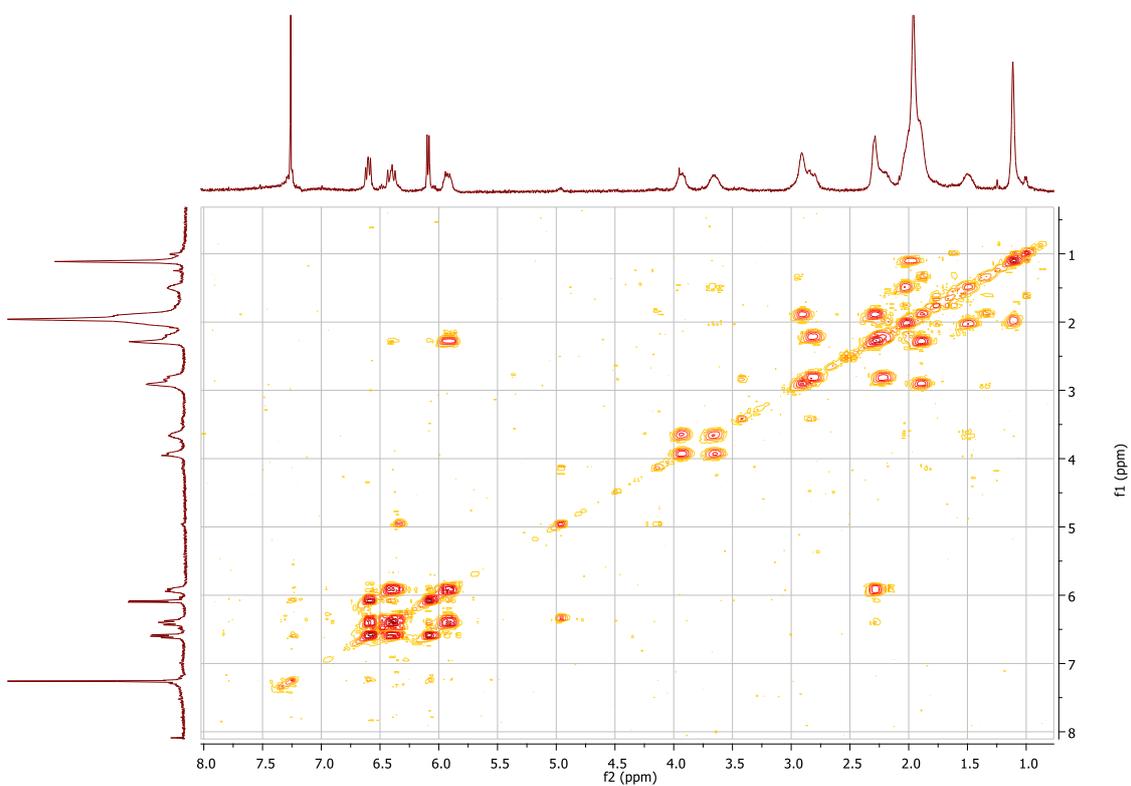
Anexo D: Comatogramas obtenidos para la separación del extracto 45. a) cromatograma de la fracción F45.4. b) cromatograma de la fracción F45.4.9



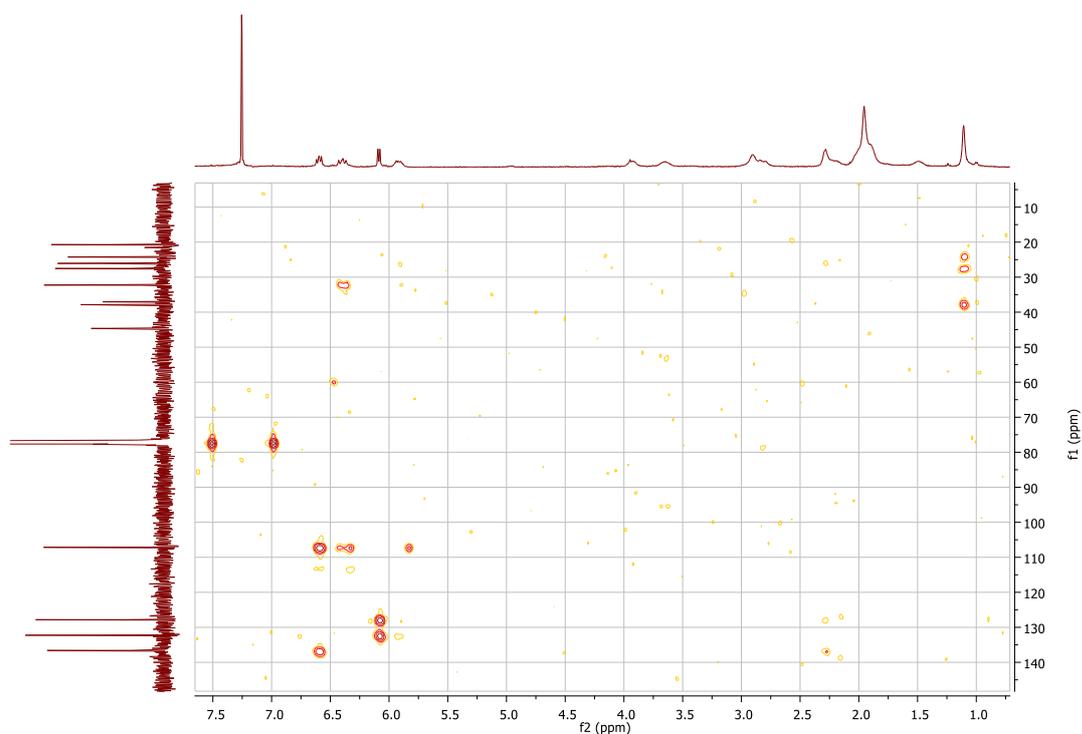
Anexo E: Espectros de RMN Compuesto 1



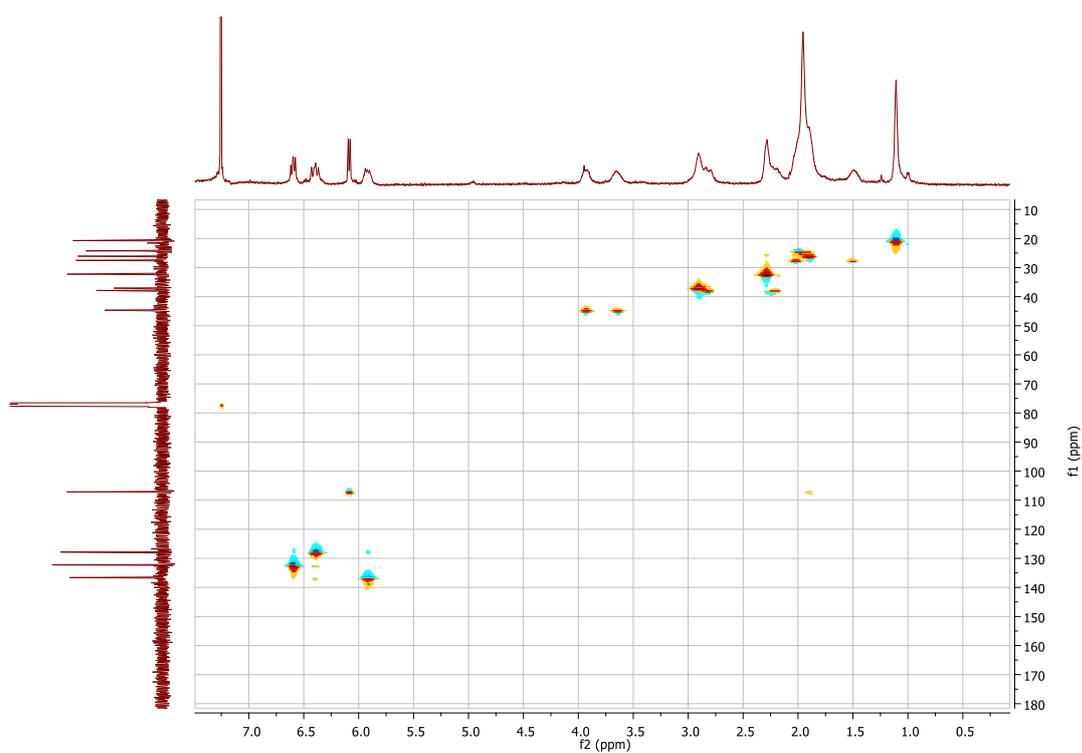
DEPT compuesto 1 tomado en CDCl_3 400MHz



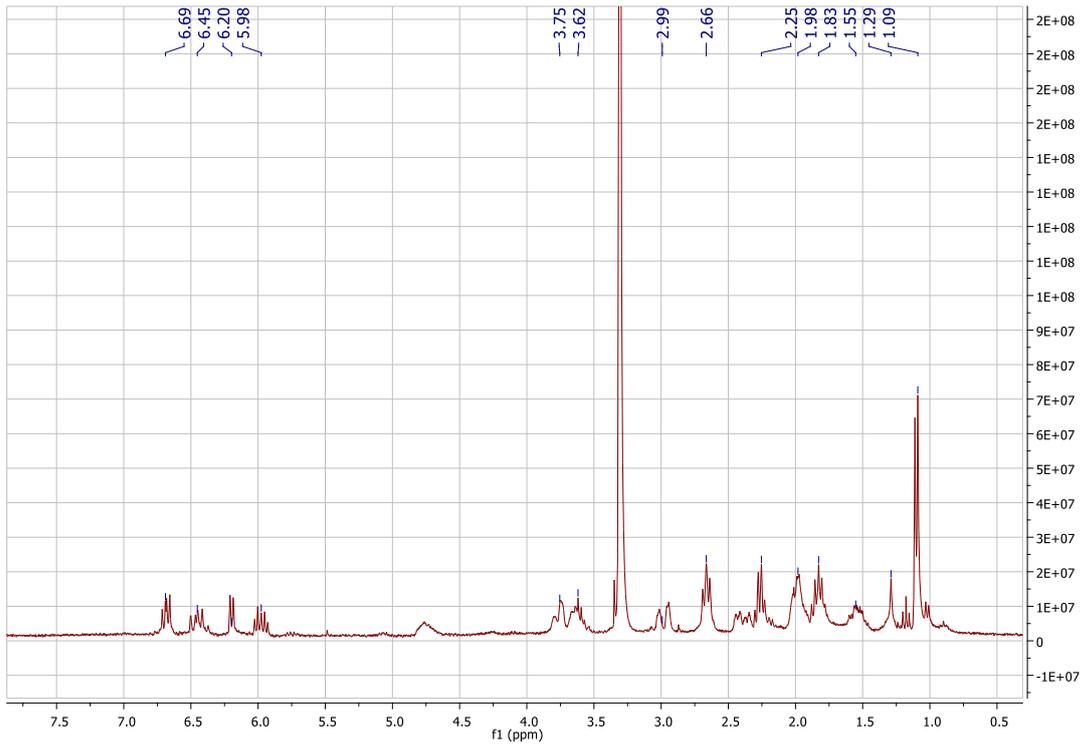
COSY compuesto 1 tomado en CDCl_3 400MHz



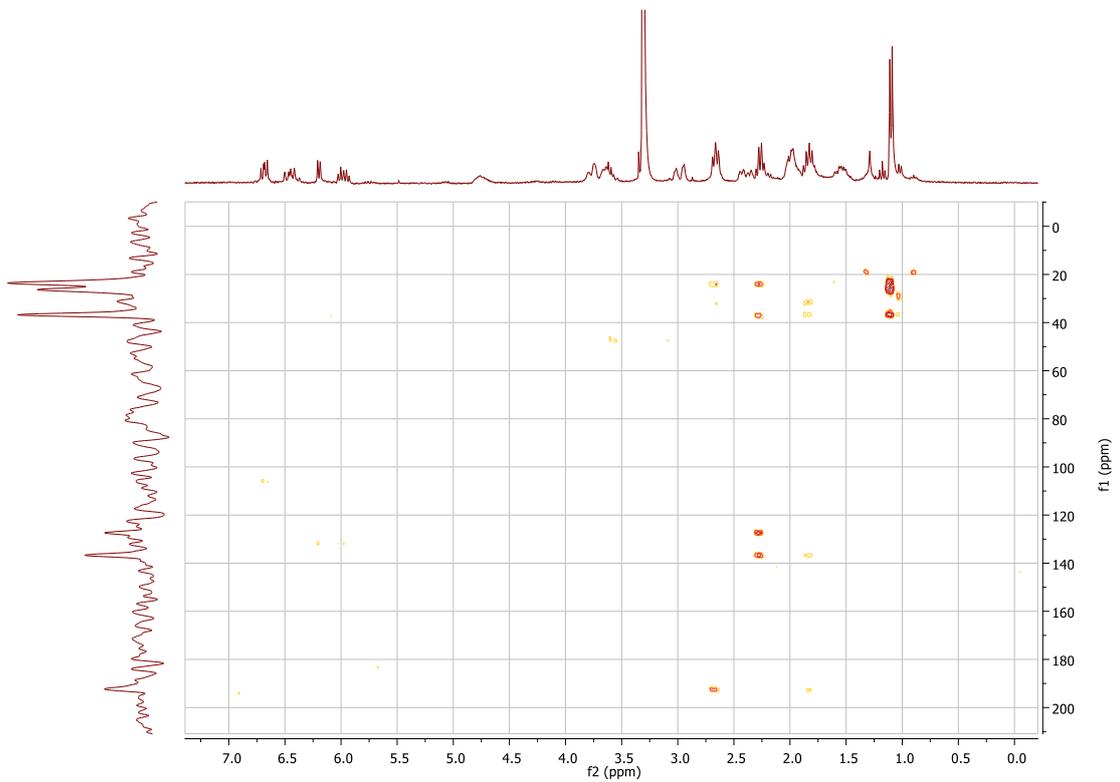
HMBC compuesto 1 tomado en CDCl_3 400MHz



HSQC compuesto 1 tomado en CDCl_3 400MHz

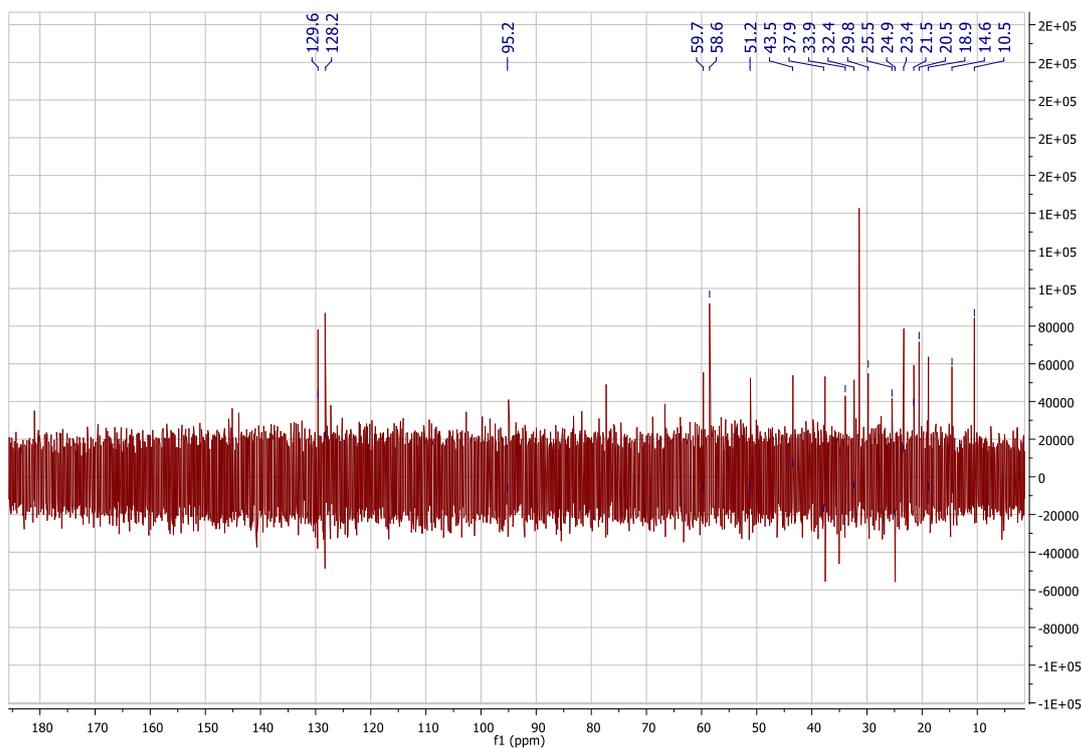


RMN ¹H del compuesto 1 tomado en MeOD 300MHz

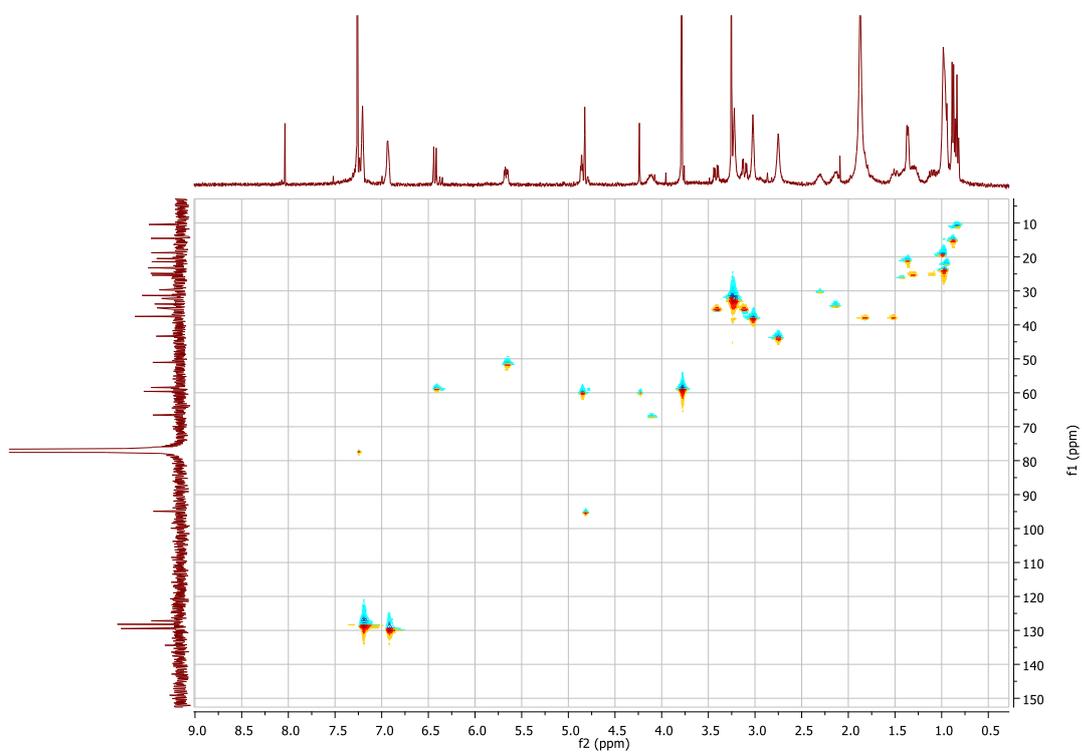


HMBC del compuesto 1 tomado en MeOD 300MHz

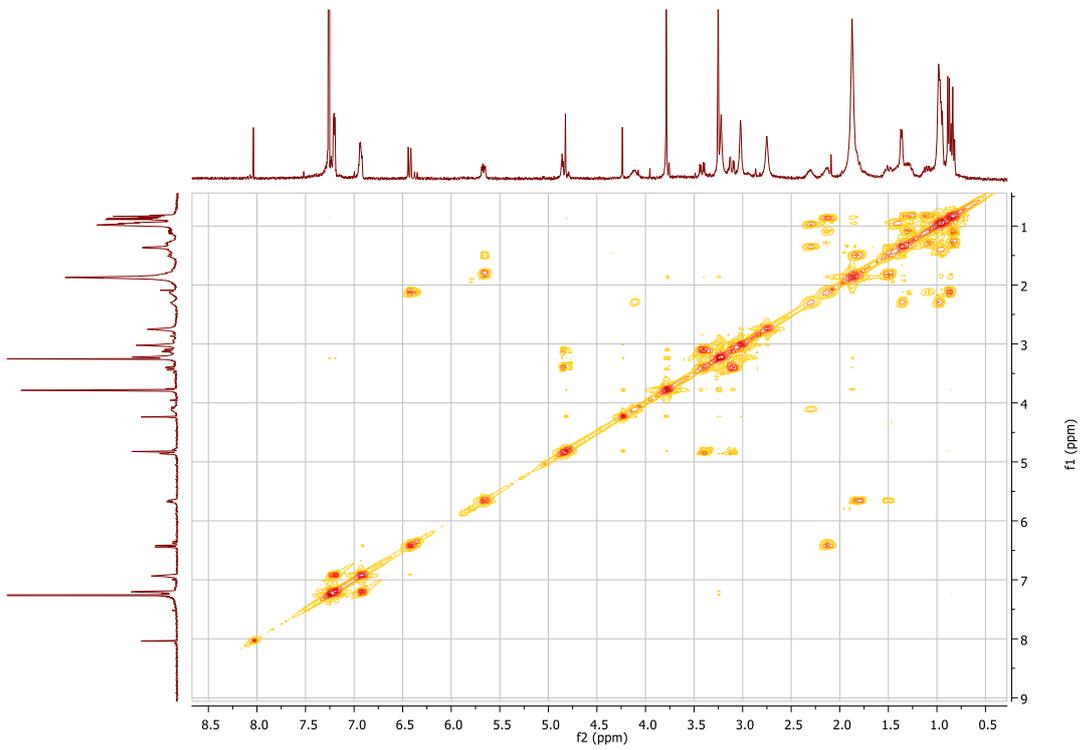
Anexo F: Espectros RMN Compuesto 2



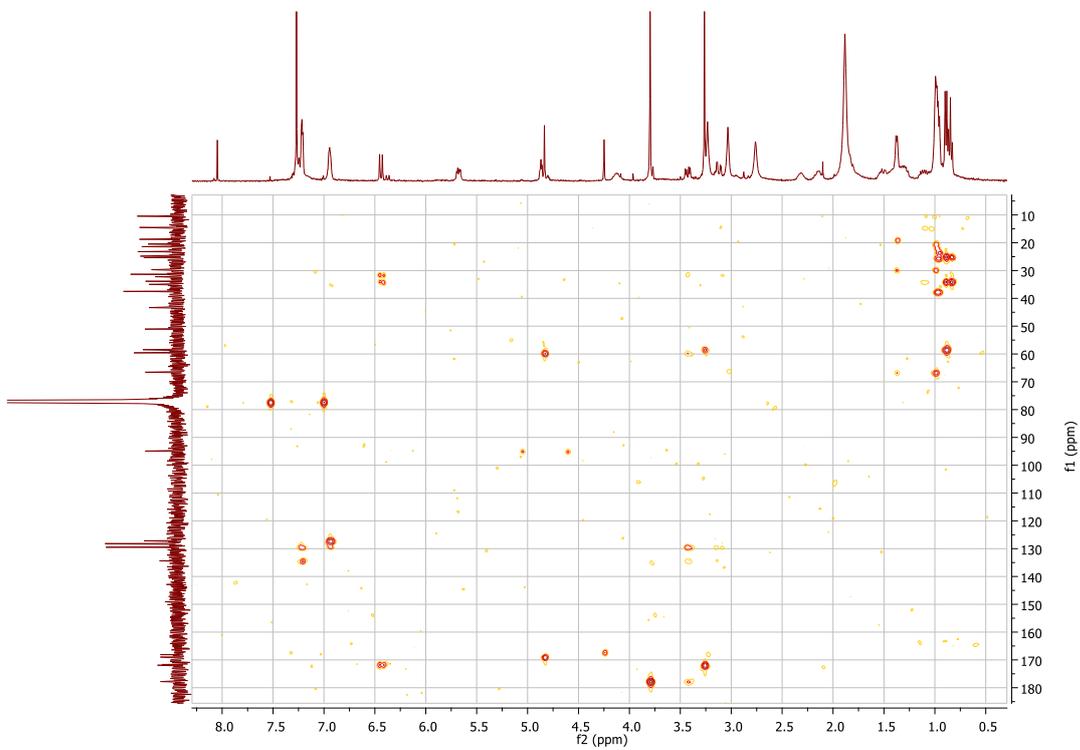
DEPT del compuesto2 tomado en CDCl₃, 400MHz



HSQC del compuesto2 tomado en CDCl₃, 400MHz

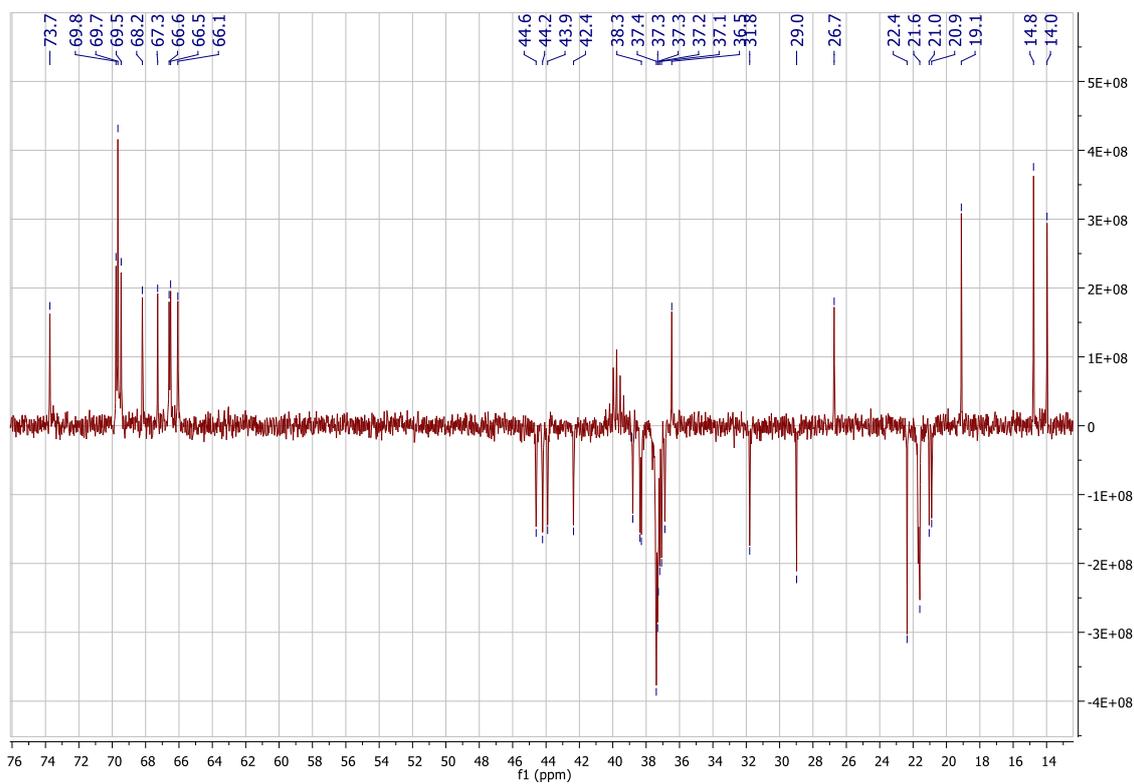


COSY del compuesto2 tomado en CDCl₃, 400MHz

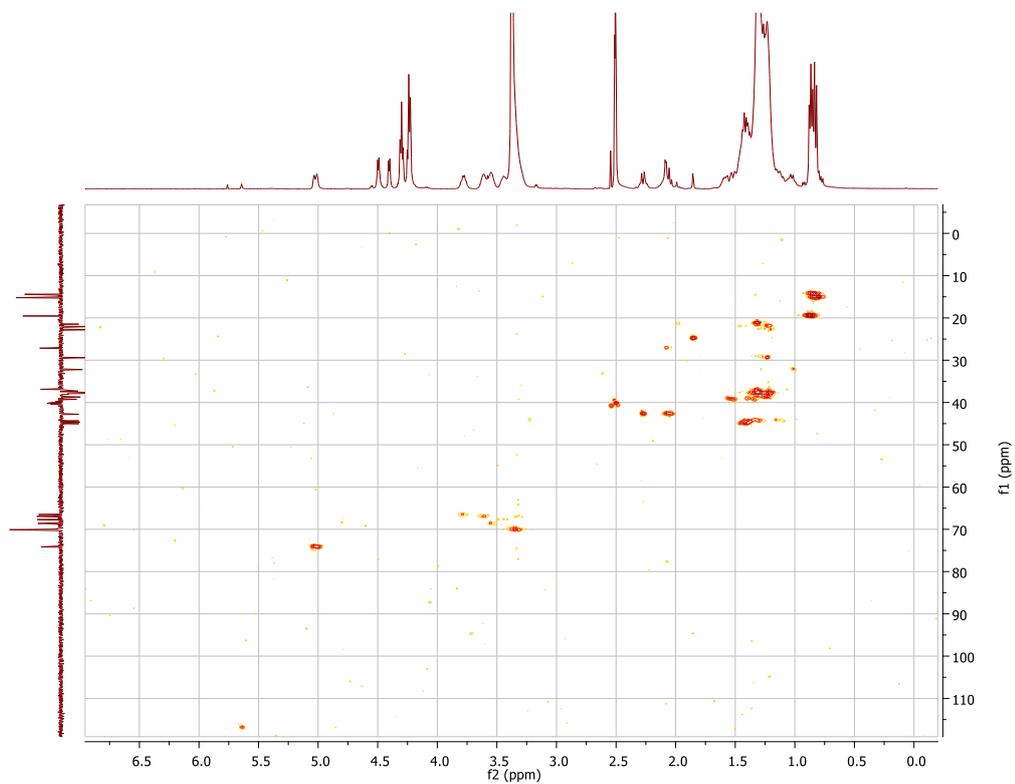


HMBC del compuesto2 tomado en CDCl₃, 400MHz

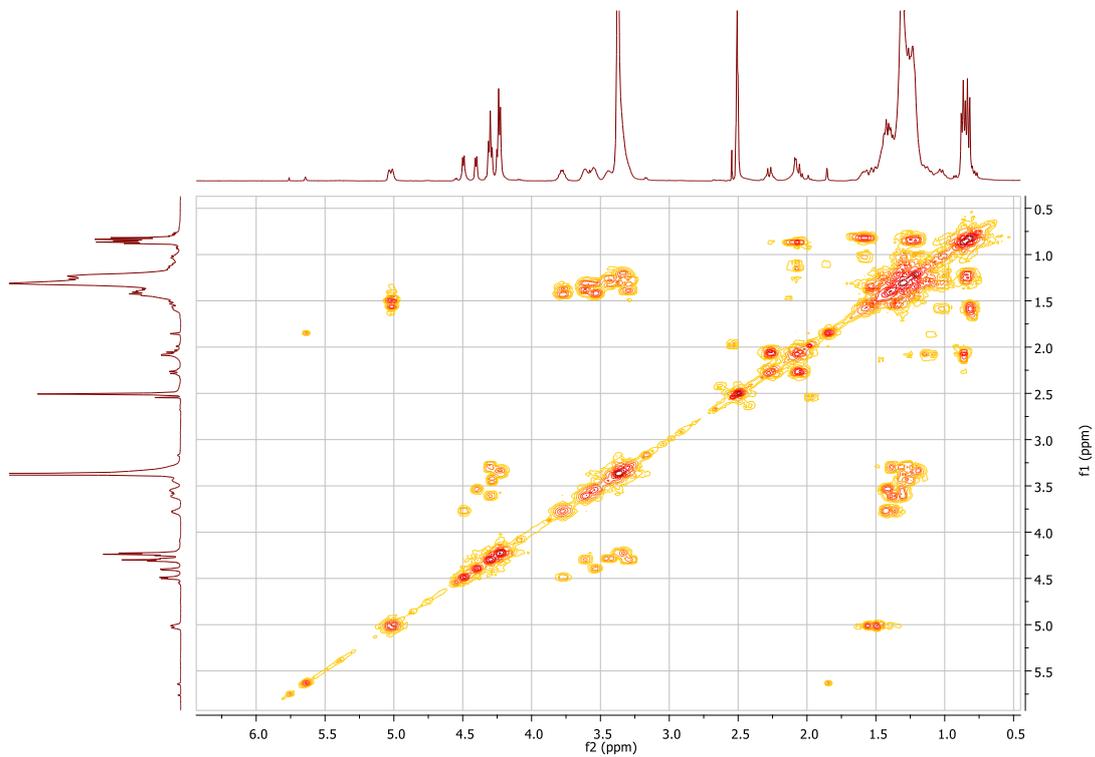
Anexo G: Espectros RMN fracción F10.4.9.2 (compuesto 4 y 5)



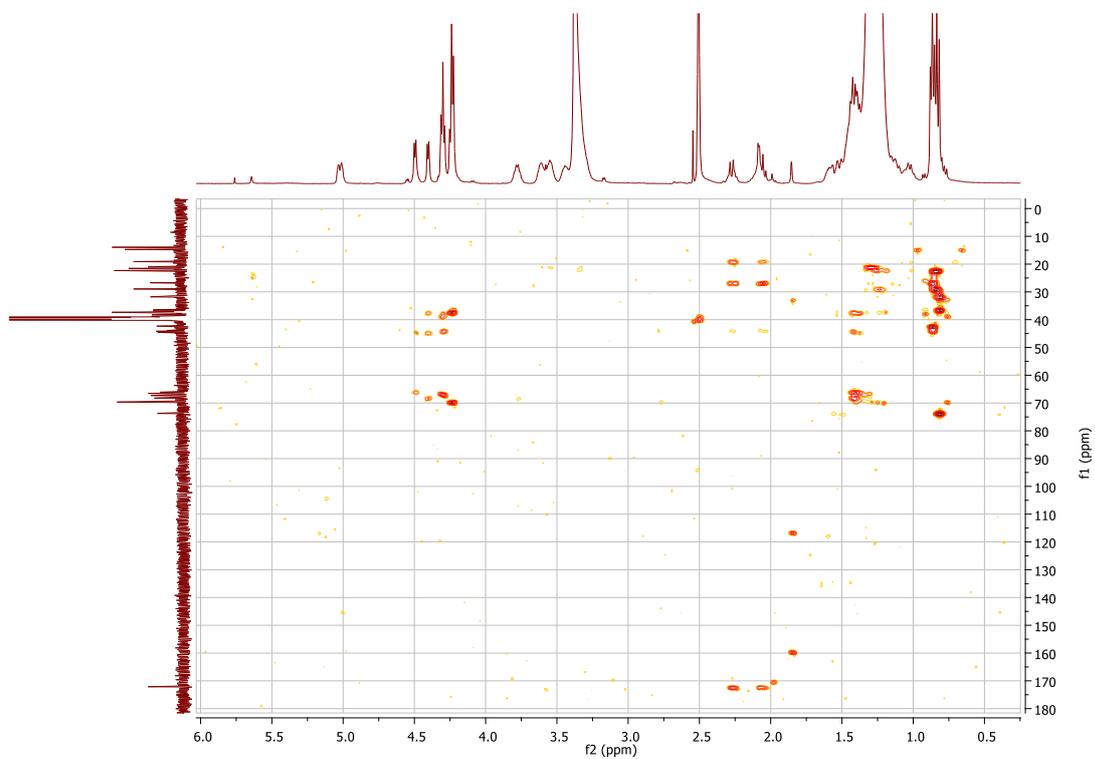
DEPT 135 de la fracción F10.4.9.2 tomado en DMSO-*d*₆, 400MHz



HMQC de la fracción F10.4.9.2 tomado en DMSO-*d*₆, 400MHz



COSY de la fracción F10.4.9.2 tomado en DMSO-*d*₆, 400MHz



HMBC de la fracción F10.4.9.2 tomado en DMSO-*d*₆, 400MHz