

METODE DE SEPARARE A METABOLIȚILOR SECUNDARI BIOACTIVI DIN BIOMASA UNOR CIANOBACTERII ȘI PROPRIETĂȚILE LOR CURATIVE ȘI TOXICOLOGICE

Valentina BULIMAGA, Liliana ZOSIM, Maria PISOV, Valeriu RUDIC

Universitatea de Stat din Moldova

În acest articol este prezentată o imagine de ansamblu asupra metodelor de extragere, izolare, detectare a metaboliților bioactivi secundari produși de cianobacterii, inclusiv microcistine, anatoxine, lipopolizaharide. În acest context, se face referire la studiile mai recente ce abordează proprietățile citotoxice, anticancer, antimicrobiene, antibacteriene ale unor metaboliți secundari produși de cianobacterii.

Cuvinte-cheie: *cianobacterii, cianotoxine, microcistine, lipopolizaharide, metaboliți secundari bioactivi.*

METHODS OF SEPARATION BIOACTIVE SECONDARY METABOLITES FROM CYANOBACTERIA BIOMASS AND THEIR THERAPEUTIC AND TOXIC PROPERTIES

This article provides an overview of the methods of extraction, isolation, detection of bioactive secondary metabolites produced by cyanobacteria, including microcystins, anatoxins, lipopolysaccharide, as well as recent studies connected to the properties of cytotoxic, anticancer, antimicrobial, antibacterial of secondary metabolites produced by some cyanobacteria.

Keywords: *cyanobacteria, cyanotoxins, microcystins, lipopolysaccharides, bioactives secondary metabolites.*

Introducere

La momentul actual, cianobacteriile reprezintă unul dintre cele mai promițătoare grupuri de organisme fotosintetizante pentru a fi explorate în calitate de surse potențiale de noi compuși bioactivi [4,12,19,24,29,46]. Screeningul cianobacteriilor pentru identificarea surselor producătoare de antibiotice și de alți compuși farmacologic activi prezintă un interes sporit, făcând posibilă aplicarea lor în calitate de surse de noi remedii curative naturale. Metaboliții secundari produși de cianobacterii demonstrează un șir de activități biologice interesante, și anume: antimicrobiană, anticancer, antivirală, imunosupresantă, insecticidă, antiinflamatorie, precum și de inhibare a activității proteinazelor, devenind în prezent obiective de cercetare biomedicală [1,9,11-13,16,17,19,28,44,51,52,68,71,78].

Dat fiind faptul că majoritatea metaboliților secundari pot manifesta toxicitate [4,14], în special microcistinele [48], devine necesară elaborarea unor strategii de izolare și purificare cât mai eficiente, precum și înlăturarea completă a lor din biomasa celulară în vederea extragerii și a altor principii bioactive cu efecte sanogene.

Metode de extragere și separare a metaboliților secundari

Izolarea eficientă a metaboliților secundari intracelulari din celulele cianobacteriene este imposibilă fără distrugerea structurii trainice a peretelui celular. Majoritatea procedurilor utilizează în acest scop congelarea-uscarea sau congelarea-decongelarea. Extragerea lor s-a dovedit a fi mai eficientă la distrugerea suplimentară a celulelor prin tratarea cu ultrasunet. Majoritatea cianotoxinelor pot fi extrase cu metanol apos (acidulat) [11]. S-a constatat că liofilizarea, urmată de extracția cu metanol de 75%, a fost cea mai eficientă metodă pentru extragerea toxinelor din celulele de *Microcystis aeruginosa*. Un alt pas important înainte de analiza lor este îndepărtarea impurităților și concentrarea probei de analiză. În aceste scopuri se utilizează extracția în fază solidă cu utilizarea cartușului de C18 Sep-Pak [43]. Pentru distrugerea pereților celulari acești autori am utilizat metodele: sonicare cu ultrasunet, congelare-decongelare repetată, liofilizare, agitare intensă cu mărgelile de sticlă, precum și adăugarea detergentului Triton X-100 (1%). Un conținut mai înalt de microcistină extrasă din celule a fost obținut în cazul biomasei supuse liofilizării, utilizând ca solvenți H₂O sau metanolul de 75%, precum și lizarea celulelor cu utilizarea mărgelilor de sticlă cu diametrul de 0,1 sau 0,5 mm la agitare intensă.

Pentru extragerea microcistinelor din biomasa cianobacteriilor *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis flos-aquae* și *Anabaenopsis elenkinii* au fost utilizați diverși solvenți: soluție apoasă de 5% acid acetic ce conținea 0,1% acid trifluoroacetic, metanol de 70-75% sau apă/metanol/butanol (75/20/5% v.v.) [35,41].

Pentru anatoxina-a și anatoxina-a(S) a mai fost aplicată și extracția apoasă, iar izolarea anatoxinei-a din biomasa cianobacteriei *Aphanizomenon issatschenkoi* a fost efectuată prin extragere la presiune înaltă și tra-

tare termică de scurtă durată (1-5 min.). Extractele au fost colectate în amestecul de solvenți de acetonă și hexan, fiind ulterior acidulate cu 50 pl de acid formic (pH~3). Extractul a fost apoi evaporat și resuspendat în 1 ml de 50% metanol în apă [25]. Extragerea lichidă sub presiune înaltă pentru eliberarea metaboliților secundari intracelulari a fost utilizată și de alți autori.

Pentru purificarea apei de ploaie dintr-un rezervor de apă cu conținut de toxine produse de cianobacterii și pentru înlăturarea microcistinelor și endotoxinelor au fost utilizate trei filtre cu nisip BioSand, unde în calitate de filtre au fost preparate trei coloane mari cu nisip. Prima coloană încărcată doar cu nisip avea dimensiunile de 35x46 cm (BSF1), a doua era constituită din 2 straturi de nisip, separate la mijloc printr-un strat de 5 cm de cărbune, amplasat într-un sac din textile, pentru a evita plutirea cărbunelui (BSE2). A treia coloană (BSF3) era constituită de asemenea din 2 straturi de nisip, separate unul de altul printr-un strat din mijloc de 5 cm de granule de cărbune activ [10]. Toate 3 filtre s-au dovedit a fi eficiente pentru înlăturarea microcistinelor din apa de ploaie, iar pentru lipopolizaharide, așa-numitele endotoxine, filtrul BSF3, cu conținut de nisip și granule de cărbune activ, a demonstrat o rată înaltă de înlăturare a lor, comparativ cu celelalte 2 filtre, ceea ce s-ar putea datora adsorbției lor mai înalte pe cărbunele activ.

Un alt grup de metaboliți secundari sunt lipopolizaharidele. Ele pot fi separate prin extracție din tulpini brute de cianobacterii cu acid tricloroacetic (ATA), fenol [74], sau fenol-cloroform-eter petroleic sau alte metode [43]. Lipopolizaharidele extrase cu ATA sunt structural similare cu cele extrase cu fenol, fiind similare la analiza electroforetică [23] și după endotoxicitate. Diferențele principale rezidă în cantitățile de acizi nucleici și proteine, contaminanți rămași după extracție. La purificarea ulterioară prin cromatografia de gel-filtrare se elimină o mare parte din proteinele prezente în extractul fenolic de LPS, dar are ca rezultat un preparat ce conține 10-20% acizi nucleici. Purificarea în continuare prin cromatografie de schimb ionic dă un produs de lipopolizaharide care conține <1% proteine și <1% ARN [76]. Mai este cunoscută extragerea, pe cale rapidă și simplă, a tipurilor dure de endotoxine cu izobutirat de amoniu [21].

Unii cercetători [100], pentru extragerea lipopolizaharidelor și separarea lor de proteine, propun utilizarea unei soluții complexe, constituite din 200 mM Tris, pH 7.4; 300 mM NaCl; 5 mM EDTA; 5 ~ 10% isopropanol. Este pe larg utilizată și metoda de separare a lipopolizaharidelor de proteine în sistemul micelar de două faze [2].

Pentru extragerea metaboliților intracelulari din cianobacteriile *Westulopsis sp. VN* și *Lyngbya majuscula* a fost utilizată macerarea biomasei cu nisip într-o piuliță, apoi distrugerea pereților celulari cu ajutorul ultrasunetului, utilizând în calitate de extragent hexanul în raport de 5:50 (m/V). Extracția a fost efectuată de 3 ori. Restul biomasei a fost tratat de 3 ori cu etilacetat, iar după separarea extractului cu etilacetat, din restul rămas s-a efectuat extracția repetată cu metanol. Pentru evaluarea metaboliților intracelulari din biomasa de *Scytonema ocellatum*, *Calotrix javanica* și *Nostoc sp.* de asemenea la prima etapă s-a efectuat extracția cu hexan, după care restul biomasei a fost tratat cu metanol, iar după separarea extractului metanolic din restul rămas s-a efectuat extracția cu H₂O. Extractele obținute cu diverși solvenți erau supuse evaporării în vid și analizate prin cromatografia pe coloana cu sefadex LH 20 sau cromatografia cu faze inverse (RP) pe C18 și cromatografia cu faze inverse HPLC Synergi Polar RP80A [42].

Pentru extragerea exometaboliților, soluția obținută după concentrarea lichidului cultural, rezultat după separarea celulelor cianobacteriene de *Anabaena sp.* sau alte specii, a fost tratată cu un volum egal de etilacetat. După înlăturarea solventului probele obținute erau analizate prin aceleași metode cromatografice, descrise mai sus. În majoritatea cazurilor, un conținut mai înalt de metaboliți intracelulari a fost evaluat în fracția metanolică, urmat de fracția apoasă, iar în fracția hexanică și în lichidul cultural a fost depistat un conținut mai scăzut de metaboliți [42].

Extractele metanolice obținute din biomasa cianobacteriilor, menționate mai sus, au demonstrat o activitate antimicrobiană moderată contra bacteriilor gram-pozitive, iar metaboliții obținuți prin extragere cu etilacetat din lichidul cultural al tulpinilor *Westiellopsis sp. VN* și *Anabaena sp.* au manifestat o activitate inhibitoare foarte puternică față de *Escherichia coli* [42].

Patru metode diferite de extracție au fost utilizate de unii cercetători pentru evaluarea toxicității și profilului de toxine produse de cianobacteria *Lyngbya wollei*, separată dintr-o probă de sol. Aceste proceduri de extracție au fost: (1) extragerea cu 50 mM acid acetic și distrugerea celulelor prin sonicare, timp de 5 minute; (2) extragerea cu 0,1 M HCl din biomasa celulară, supusă sonicării și fierberii timp de 5 minute; (3,4) extracția cu etanol de 80%, în decurs de o noapte la 4°C, pH 3,5, și extracția cu metanol de 25% în aceleași condiții.

Pentru extragerea alcaloizilor din *Westiellopsis sp.* și *Fischerella muscicola* la temperatura camerei a fost utilizat solventul mixt CH₂Cl₂/MeOH (1:1 v/v) [37].

Pentru izolarea exometaboliților din lichidul cultural al cianobacteriei *Nostoc insulare* a fost utilizată adsorbția pe coloana de Amberlit XAD 1180, apoi eluția cu metanol.

Așadar, metodele de extragere a metaboliților secundari din biomasa cianobacteriilor, utilizate de diverși cercetători, sunt variate și depind de tipul și componența chimică a metaboliților extrași. Totodată, pentru extragerea completă a metaboliților intracelulari este necesară distrugerea pereților celulari prin una dintre metodele cunoscute sau prin combinarea lor: congelarea și decongelarea repetată (de circa 3 ori), tratarea cu ultrasunet, distrugerea mecanică a pereților celulari prin titrare cu ajutorul nisipului sau a mărgelilor de sticlă, precum și tratarea termică.

Pentru extragerea metaboliților secundari se aplică diverși solvenți: soluție apoasă de 5% acid acetic ce conține 0,1% acid trifluoroacetic, metanol de 70-75% sau apă/metanol/butanol (75/20/5% v.v.) – pentru extragerea microcistinilor, extracția apoasă – pentru anatoxina-a și anatoxina-a(S), precum și extragerea lichidă la presiune înaltă [8].

Izolarea exometaboliților din lichidul cultural este precedată de concentrarea acestuia. Extragerea exometaboliților toxici din lichidul cultural, rezultat după separarea celulelor de cianobacterii, se efectuează cu etilacetat sau prin metoda de extracție solidă pe cartridje de C18 Sep-Pak, pe cărbune activ sau rășini de tipul Amberlit.

Un șir de metode au fost dezvoltate pentru îndepărtarea endotoxinelor (lipopolizaharide - LPS). Totuși, aceste metode au unele limite în aplicare. Astfel, pentru a dezvolta o metodă de îndepărtare a endotoxinelor, este necesar de a lua în considerare interacțiunea dintre proteine și endotoxine [75]. În condiții fiziologice, LPS poartă de obicei sarcina negativă pentru interacțiunea electrostatică cu proteinele și alți biopolimeri. În același timp, fragmentul lipidic al LPS are, de asemenea, și interacțiuni hidrofobe cu proteinele. O strategie alternativă pentru îndepărtarea endotoxinei ar trebui să fie menținerea sarcinii sumare a proteinelor, de asemenea negativă. Prin urmare, ar trebui să avem proteine la valori ale pH-ului mai mari de punctul izoelectric (PI), în cazul în care punctul izoelectric nu are valori prea înalte. În acest scop ar putea fi utilizat tamponul Tris, ca mediu pentru îndepărtarea endotoxinelor. Datorită structurii sale unice, gruparea amină primară la Tris (pKa 8.1) va fi protonată sub pH-ul 7,4. Ionul de amoniu fiind încărcat pozitiv, endotoxinele s-ar lega competitiv cu Tris- tamponul și nu cu proteinele. Mai poate fi utilizată și extragerea endotoxinelor cu izobutirat de amoniu. Ar putea fi utilizată și clorura de sodiu în concentrații mai înalte, ce ar contribui la slăbirea legăturii lipolizaharidelor cu proteina și extragerea lor. Ca solvent organic ar putea fi utilizat izopropanolul, care poate forma interacțiuni hidrofobe cu partea lipidică a LPS, asemenea detergentilor.

Așadar, metodele de extragere și izolare a metaboliților secundari sunt variate și depind de natura chimică a compusului bioactiv, de localizarea lui intra- sau exocelulară, precum și de interacțiunea cu alte substanțe prezente în extract.

Metode de identificare a metaboliților secundari bioactivi

Sunt cunoscute diverse metode de detectare a toxinelor din cianobacterii. Ele pot fi divizate în metode fizico-chimice instrumentale și metode biologice [8,32,41,53,60,67,70]. Selectarea metodei chimice pentru detectarea cianotoxinelor depinde de structura chimică a compusului respectiv. Diverse abordări metodologice au fost dezvoltate pentru detectarea chimică și cuantificarea cianotoxinelor. Cromatografia lichidă de performanță înaltă (HPLC) și cromatografia gazoasă (GC) sunt tehnicile cele mai frecvent utilizate. Aceste metode, cuplate cu spectrometria de masă (MS), sau modificarea acesteia (bombardarea cu atomi rapizi, FAB), și/sau rezonanța magnetică nucleară (RMN), pot servi ca mijloace pentru identificarea metaboliților secundari.

Pentru analiza microcistinilor cel mai frecvent este utilizată metoda cromatografică cu fază inversă (RP-HPLC). Pentru concentrarea și purificarea toxinelor au fost dezvoltate și coloane de imunoafinitate [40,70], care sunt de perspectivă, datorită nivelului înalt de specificitate pentru microcistine. Detectorii folosiți pentru identificarea lor sunt de obicei detectorii UV sau UV fotodiod (PDA), potriviți pentru spectrele de absorbție tipice microcistinilor. Au fost publicate diverse variante ale RP-HPLC [32,41,53]. Fazele mobile compuse din diferite combinații de acetonitril cu alți solvenți sunt cele mai utilizate pe scară largă [64,41]. Pe lângă detectarea în UV, au fost folosite cu succes și alte sisteme de detectare combinate cu RP-HPLC în detectarea și determinarea structurii de noi cianotoxine [57]. Aceste tehnici se caracterizează printr-o sensibilitate înaltă și detectare selectivă, care permite identificarea tipurilor de MC. Din cauza că HPLC necesită prezența unor toxine standard, ea nu permite și evaluarea cantitativă a unor noi toxine.

Pentru detectarea microcistinilor (MS) și a altor metaboliți secundari toxici au fost dezvoltate și metode biologice. Biotestul pe șoareci este cea mai simplă metodă. Acest test de screening oferă un indice global de

toxicitate a unei probe [22,32]. Cu toate acestea, datorită sensibilității scăzute și fiabilității, precum și din motive etice, acest test biologic este înlocuit cu alte metode de detectare.

Profitând de capacitatea microcistinilor de a inhiba proteinfosfataza (PP), a fost dezvoltat un test de inhibare enzimatică pentru detectarea lor. Acest test-kit pentru determinarea colorimetrică informează despre toxicitatea probei [72]. Cu toate acestea, proteinfosfataza, poate fi de asemenea inhibată de alți compuși, care pot manifesta o inhibare nespecifică.

A fost descrisă și metoda ELISA de detectare a MC. Această metodă se bazează pe anticorpi monoclonali (MAbs) sau policlonali (PABS) și are avantajul de a fi foarte specifică. Cu toate acestea, deoarece anticorpii recunosc, de obicei, lanțul de ADDA, comun pentru toate microcistinele și nodularinele (hepatotoxină pentaciclică), pot fi și interpretări eronate, asociate cu reactivitatea încrucișată. În plus, deoarece recunoașterea se bazează pe structură (nu pe toxicitate), imunotestul poate fi fals pozitiv din punct de vedere toxicologic. Astfel, testul ELISA nu poate fi cantitativ. Pentru obținerea unor rezultate sigure privind structura și toxicitatea microcistinilor a fost utilizată metoda combinată, bazată pe testul de inhibare a proteinfosfatazei și pe testul ELISA [50].

Alte tehnici similare de separare, cum ar fi electroforeza capilară și tehnici conexe, trebuie de asemenea luate în considerare pentru separarea și cuantificarea hepatotoxinelor peptidice. Acestea dispun de o sensibilitate mai înaltă, comparativ cu procedurile HPLC, dar nu sunt potrivite pentru monitorizarea permanentă a calității apei. Electroforeza capilară nu poate fi considerată suficient de comodă pentru utilizare în laborator în analize de rutină. Importanța metodei de separare a microcistinilor prin electroforeză și sensibilitatea detectării lor a crescut datorită utilizării derivaților fluorescenți, folosind și detectoare fluorescente cu laser [80].

Cromatografia în strat subțire (TLC) de asemenea poate fi utilizată pentru separarea microcistinilor. Cu ajutorul sistemelor corespunzătoare de detecție pot fi înregistrate spectrele UV ale componentelor separate. După spectrele UV caracteristice microcistinilor, ele pot fi identificate într-un mod analogic cu detecția prin HPLC. Cu toate că este posibilă și efectuarea unor analize cantitative, această metodă este mai puțin utilizată în ultimii ani, fiind substituită de tehnici mai performante.

Așadar, niciuna dintre metodele tradiționale de detectare a toxinelor nu este ideală. Alegerea metodei de detectare depinde de scop și, deoarece diverse metode oferă informații diferite și complementare, combinația lor va oferi o analiză totală și completă.

Astfel, cercetările din ultimii ani au demonstrat că utilizarea unor metode eficiente de extragere, concentrare, separare și detectare a toxinelor într-un proces integrat poate asigura identificarea cianotoxinilor de diversă natură. Pentru concentrarea și detectarea a nouă cianotoxine simultan, inclusiv a șase microcistine congenerice, nodularina, anatoxina-a și cilindrospermopsina, în apele dulci și naturale cercetătorii chinezi au utilizat extracția în fază solidă (SPE), cromatografia lichidă (LC) și spectrometria de masă (MS) [79]. O metodă de detectare sensibilă a cianotoxinilor neurotoxice a fost dezvoltată folosind, de asemenea, extracția în fază solidă (SPE) în combinație cu cromatografia lichidă de înaltă presiune cu detectare după fluorescență (HPLC / FD), complementată de cromatografia lichidă în tandem cu spectrometria de masă (LC / MS / MS) [3].

Alte toxine produse de cianobacterii sunt endotoxinele – așa-numitele lipopolizaharide (LPS). Aceste toxine sunt constituenți ai peretelui exterior al cianobacteriei heterotrofe și ai bacteriilor gram-negative [36]. LPS produse de cianobacterii sunt mai puțin toxice decât cele produse de bacterii; cu toate acestea, ele pot fi responsabile de astfel de boli, cum ar fi gastroenterita. Prin urmare, pentru a exclude implicații ale influenței toxice a LPS asupra organismului uman, este necesară efectuarea unor studii de izolare și detectare a lor [14].

Lipopolizaharidele pot fi extrase din biomasa de cianobacterii, folosind metoda standard de „extracție în apă caldă fenol”, modificată de Bernadova și colab. [7]. Biomasa liofilizată se resuspendează în apă apirogenă, la care se adaugă un volum egal de 90% fenol (în apă) și se efectuează extragerea (la agitare) la 68°C, timp de 20 minute. Stratul apos se înlătură prin centrifugare (2500 g, timp de 30 min.) și fenolul rămas se extrage a doua oară cu apă. Frațiunile apoase reunite se supun dializei față de apa distilată și se liofilizează. Proba liofilizată este redizolvată în tampon 0,1 M Tris cu 25 mcg/ml/ RnaseA și se supune incubării la 37°C timp de 16 ore. Un volum egal de fenol se adaugă la proba resuspendată și după incubare (la temperatura camerei timp de 4 min.), stratul apos este colectat prin centrifugare, apoi este dializat a doua oară și liofilizat pentru a obține LPS sub formă de pudră.

Pentru LPS sunt cunoscute metode specifice de detectare. Una dintre acestea constă în determinarea activității toxice prin testul cromogenic al lizatului de *Limulus amoebocyte* (LAL-test). Acesta este un test cantitativ pentru

endotoxinele bacteriilor gram-negative. O probă se amestecă cu LAL furnizat în test-Kit și se incubează la 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) timp de 10 minute. O soluție de substrat este apoi amestecată cu eșantionul de LAL și se incubează la 37°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) timp de încă 6 minute. Reacția este stopată cu un reagent de stopare (25% v/v acetic acid glacial în apă; sau soluție de dodecilsulfat de sodiu (SDS), 10g/100 ml de apă). Dacă endotoxina este prezentă în probă, apare o culoare galbenă. Absorbanta probei poate fi determinată spectrofotometric la 405-410 nm. Concentrația de endotoxine poate fi calculată dintr-o curbă standard conform certificatului de analiză [76].

Pentru detectarea sensibilă a lipopolizaharidelor bacteriene la nivel de nanograme în gel de poliacrilamidă sunt folosite diverse metode de colorare cu argint, care sunt bazate pe soluții amoniacale de argint și un dezvoltant. Una dintre ele este metoda utilizată pentru proteine, care a fost supusă modificării. Aceasta constă în utilizarea unei soluții neutre de nitrat de argint și a unui dezvoltant alcalin, pentru vizualizarea lipopolizaharidelor în geluri de poliacrilamidă. Metoda respectivă are o sensibilitate mai înaltă și este mai puțin predispusă la formarea colorației nespecifice de fond, decât în cazul dezvoltantului acid [39].

Într-un alt studiu a fost utilizată metoda de colorare a LPS cu Ag în prezența acidului ascorbic (Vc) în soluție alcalină de tiosulfat de sodiu. Această metodă are o limită de detectare de 4 ng de LPS [81].

Un nou test pentru detectarea sensibilă a endotoxinelor a fost dezvoltat recent. El este bazat pe detectarea selectivă a lipopolizaharidelor fixate pe microplăci, datorită capacității lor intrinseci de a activa forma zimogenă a factorului C, care generează în final un semnal fluorescencent prin transformarea unui substrat. Capturarea selectivă de lipopolizaharide (LPS) este realizată folosind o proteină receptor-fag derivată, care prezintă afinitate și specificitate mare pentru regiunea conservativă a LPS. Avantajul metodei constă în posibilitatea de a înlătura prin spălare alți componenți secundari, care ar putea avea interferență sau ar influența sensibilitatea reacției. Endotoxinele pot fi detectate în diapazonul de la 0,05 EU / ml până la 500 EU / ml [27].

În pofida proprietăților toxice ale metaboliților secundari produși de cianobacterii, prin numeroasele cercetări efectuate în ultimele decenii a fost demonstrat că cianobacteriile pot servi în calitate de noi surse excelente de substanțe bioactive cu proprietăți imunomodulatoare, anticancer, antimicrobiene, antioxidante etc. [11,12,16,62,63,65,68]. În continuare sunt expuse rezultatele unor cercetări efectuate la nivel mondial, referitoare la cianobacterii ca surse potențiale de produse bioactive cu aplicare în farmacologie și în alte domenii.

Proprietățile curative și toxicologice ale unor metaboliți produși de cianobacterii

Cianobacteriile de apă dulce și marine sunt bine recunoscute pentru producerea diversilor metaboliți secundari bioactivi citotoxici cu o diversitate structurală vastă [63] și cu posibilități largi de aplicare în medicină. Studiile anterioare au scos în evidență că un procent relativ înalt din extractele obținute din biomasa de cianobacterii a demonstrat activitate citotoxică *in vivo*, inclusiv împotriva liniei celulare KB (carcinom epidermoid uman nazofaringian) cu concentrația minimă de inhibiție (CMI) $< 30\mu\text{g/ml}$ [49].

Cercetările efectuate de către Gerwick et al., începând cu anul 1994, la Universitatea de Stat din Oregon și continuate până în prezent de alți cercetători au fost axate pe evaluarea și screeningul cianobacteriilor marine producătoare de compuși cu activitate anticancer [11,60-62,66,69]. În urma cercetărilor întreprinse a fost stabilit că aproximativ 40% din compușii produși de cianobacteriile marine posedă activitate anticancer/antitumorală, ceea ce le atribuie un potențial terapeutic valoros. Cianobacteriile pot servi și ca resurse de compuși cu activitate antileucemică cu un potențial bogat de aplicații farmaceutice [19].

Printre metaboliții cianobacterieni cu activități puternice de destabilizare a tubulinei se evidențiază criptoficinele care sunt considerate *de facto* drept cei mai proeminenți candidați pentru producerea de noi medicamente împotriva cancerului. Criptoficina extrasă din cianobacteria *Nostoc sp. ATCC* s-a dovedit a fi unul dintre cei mai puternici agenți de destabilizare a tubulinei cunoscuți până în prezent [66]. Cu toate că analogul sintetic al criptoficinei – criptoficina 52 – a ajuns până la faza a II-a de studii clinice [17], costurile ridicate de producție și efectele secundare toxice ale criptoficinei 52 au constituit o piedică în efectuarea studiilor ulterioare. De aceea, cercetătorii sunt în căutare de noi surse naturale de criptoficină produsă prin biosinteza celulară. Tulpina de *Nostoc muscorum* a manifestat și activitate antibiotică în studii de laborator [18].

Au fost raportate și rezultatele unor cercetări referitoare la rolul metaboliților secundari cianobacterieni cu proprietăți toxice în calitate de chelatori de fier, inhibitori de proteaze, inhibitori de creștere, precum și reglatori de creștere a plantelor [52,54,55,59,78].

Unii metaboliți, cum ar fi microcistinele, saxitoxinele sau anatoxinele, atrag o atenție sporită a cercetătorilor la nivel global din cauza toxicității lor înalte, iar, pe de altă parte, ele posedă un potențial de activități biologice semnificative. Acești metaboliți pot fi utilizați pentru dezvoltarea și aplicarea în calitate de algicide,

fungicide, erbicide și insecticide. Activitatea biocidă împotriva mai multor ciuperci fitopatogene a fost observată în extractele din *Anabaena*, dat fiind faptul că enzimele hidrolitice produse de aceste genuri joacă un rol important în calitate de agenți de biocontrol [74]. S-a constatat că cianotoxinele – anatoxina -a, microcistinele și cylindrospermopsina, obținute de la *Anabaena sp.*, *Microcystis sp.* și *Cylindrospermopsis sp.*, respectiv, posedă o activitate larvicidă cu mortalitatea > 50% [9].

Cianobacteriile contribuie de asemenea la producerea stimulatoarelor de creștere a plantelor – fitohormonilor, care includ un spectru mai larg de activitate și niveluri optime din punct de vedere biologic. Acestea au avantaje față de cele sintetice produse prin sinteza chimică și care sunt mai costisitoare. Unele studii au demonstrat că extractele din cianobacterii posedă activitate de stimulare a creșterii plantelor și de regenerare a plantelor și formare a plantulelor [58,61].

Au fost raportate și unele aplicații farmaceutice și industriale ale inhibitorilor de proteaze [6,33]. Recent, compusul nostocarbolina, un inhibitor al acetil- și butirilcolinesterazei și tripsinei, [6] a fost izolat din tulpina de *Nostoc 78 - 12A* care posedă activitate algicidală puternică atât împotriva fototrofilor eucarioti, cât și a celor procarioti. Diferite variante de aeruginozine au fost izolate de la unele genuri cianobacteriene planctonice, cum ar fi *Microcystis*, *Nodularia* și *Planktothrix* [38]. În particular, aeruginozinele inhibă serinproteazele (tripsina, chimotripsina, trombina sau elastaza) și au fost considerate un candidat promițător pentru utilizare în calitate de remediu farmaceutic [33].

Endotoxinele cu activitate joasă stimulează răspunsul imun [14], iar cele cu activitate înaltă pot provoca un șoc septic. Analiza unor probe de endotoxine extrase din câteva specii de cianobacterii a scos în evidență că cea mai înaltă activitate a lor a fost atestată în probele din *Aphanizomenon sp.* [7].

Micosporinele similare cu aminoacizii (MAAS) sunt adevărați metaboliți secundari multipli [56]. Considerate ca fiind fotoprotectanți naturali, ele pot fi exploatate biotehnologic pe diverse căi, inclusiv utilizate în prepararea cremelor antiaging. Cei mai mulți dintre metaboliții cianobacterieni sunt acumulați în biomasa cianobacteriilor. Totodată, cianobacteriile elimină diferiți compuși organici în mediul lor de habitare. Până în prezent, o serie de compuși biologic activi au fost identificați în rândul acestor exometaboliți, de exemplu, unele diterpenoide antibacteriene în *Nostoc commune* [34].

Printre metaboliții secundari produși de cianobacterii se numără și sideroforii. În cazul instalării unor deficiențe de fier în mediul de habitare a cianobacteriilor sunt excretate astfel de compuși extracelulari ca sideroforii, care au rolul de captare, chelatare și transport al fierului transmembranar. În ultimii ani a fost dovedită posibilitatea de utilizare a lor ca medicamente, atât în tratamentul supradozării cu fier, cât și în condițiile toxicității acute și cronice provocate de acest metal [54], precum și în alte domenii, de la biomateriale până la biosensori [22].

Mai este cunoscută o familie de metaboliți cu citotoxicitate celulară de excepție față de celulele de cancer – apratoxinele, care sunt lipopeptide ciclice cianobacteriene [44]. Structural, acestea sunt conforme destul de bine la tendințele din metabolismul secundar al cianobacteriilor, având două secțiuni de poliketide intercalate printre mai multe resturi de aminoacizi. Una dintre caracteristicile lor distinctive este și prezența la un capăt terminal al moleculei a unei grupări terț-butil. Au fost caracterizate șapte apratoxine și depistate două dintre apratoxine cu cel mai puternic efect toxic asupra celulelor de cancer [44,73]. Studiile privind mecanismul de acțiune a apratoxinelor au scos în evidență că ele pot avea o multitudine de efecte asupra celulelor canceroase, inclusiv direcționarea proteinelor de soc termic (HSP90) [62], precum și calea secretorie. Sinteza totală a apratoxinei a fost realizată în mai multe laboratoare, ceea ce a asigurat accesul la acești compuși pentru o investigație mai detaliată [23].

Investigarea unei tulpini de *Lyngbya majuscula* a scos în evidență capacitatea ei de a produce un compus lipopeptidic dimeric neurotoxic, extrem de neobișnuit, numit somocistinamida A, care conține două grupuri distincte de N - metilanemidă. Un program de screening ulterior a demonstrat că celulele canceroase cu un sistem activ al caspazei-8 au fost extrem de sensibile la efectul de inducere a apoptozei la acțiunea somocistinamidei A. Autorii presupun că somocistinamida A acționează prin activarea complexului de semnalizare care induce moartea în celulele membranare, activând astfel secvențial caspazele 8 și 3 pentru a induce calea extrinsecă de moarte a celulelor apoptotice.

Bisebromoamida, un nou compus citotoxic pentru celula de cancer, a fost obținut de la o colecție de *Lyngbya sp.* din Okinawa [69]. Profilul de toxicitate nu a fost corelat cu agenți antitubulinici, fapt confirmat de testul biochimic. Un nivel submicromolar de activitate a fost observat la inhibarea fosforilării ERK (extra-

cellular signal-regulating kinase). În general, structura bisebromoamidei este remarcabilă, deoarece șase din cele opt subunități logice, care formează molecula, au caracteristici structurale interesante, inclusiv un acid pivalic, un rest de tirozină bromurată, o prolină metilică, un inel tiazolină α - metil, o d - leucină, și un 2 - (1 - oxo - propil) – reziduu de pirolidină a metaboliților bioactivi și a proprietăților lor farmacologice.

Alt component toxic, produs de cianobacteria *Lyngbya majuscula*, este lipopeptida liniară – dragomide E, care include în structura sa 5 aminoacizi legați în catenă cu 5 atomi de carbon ai cozilor de acizi grași [5].

Recent, mai multe lipopeptide au fost caracterizate ca substanțe cu activități de surfactant, antimicrobiene și citotoxice. Proprietățile lipopeptidelor pot conduce la aplicații în diverse domenii industriale, inclusiv în industria farmaceutică pentru a fi utilizate ca antibiotice convenționale; în industria cosmetică – pentru dezvoltarea de produse dermatologice, datorită proprietăților antirid și surfactante, în producția de alimente în calitate de emulgatori, precum și în domeniul biotehnologiei ca biosurfactanți [45].

Două ciclodepside au fost raportate la *L. majuscula* colectate în Madagascar (tanikolide dimer) [30] și Panama (malnygolide dimer) [31,47]. Alți metaboliți bioactivi produși de *Lyngbya sp.* sunt apratoxinele – depseptide ciclice.

Molecule proeminente, ca agenții antimicrotubulinici, curacina A și dolastatina 10, au fost testate în studii preclinice și/sau clinice ca remedii anticancer potențiale [19]. Ciclopeptidele cianobacteriene, inclusiv microcistinele și nodularinele, sunt considerate un pericol pentru sănătatea oamenilor, ca urmare a posibilelor efecte toxice la un consum sporit. Microcistinele sunt heptapeptide ciclice hidrofille stabile, cu un potențial de a provoca daune celulare în urma absorbției de polipeptidele transportatoare de anioni organici (OATPs). Efectele lor biologice intracelulare implică inhibarea subunităților catalitice ale proteinfosfatazei 1 (PP1) și 2 (PP2), precum și epuizarea glutationului și generarea de specii reactive de oxigen (ROS). Citotoxicitatea microcistinei și analogilor ei se datorează corelării cu inhibarea PP2A în celulele canceroase și inducerea rapide a morții lor prin condensarea cromatinei și fragmentării celulare [48]. Astfel, în terapia direcționată a cancerului, cianotoxinele reprezintă o sursă bogată de compuși naturali citotoxici, cu un potențial terapeutic promițător.

Așadar, în multe tulpini de cianobacterii au fost detectați diverși metaboliți bioactivi cu un spectru vast de acțiune asupra organismului uman: citostatică, antimicrobiană, antibacteriană, anticancer, imunomodulatorie etc. Printre tulpinile producătoare de substanțe cu efect toxic asupra celulelor de cancer pot fi menționate *Lyngbya sp.* La *Lyngbya majuscula* au fost detectate lipopeptidele – somocistinamida A și aprotaxina A, precum și ciclodepsidele. Dintr-o colecție de tulpini de *Lyngbya sp.* a fost obținut și compusul citotoxic bisebromoamida [26,69]. La *Nostoc sp.* au fost identificate criptocicinele, ce manifestă activități semnificative de destabilizare a tubulinei. Acestea sunt considerate drept cei mai proeminenți candidați pentru producerea de noi medicamente împotriva cancerului.

Totuși, având în vedere faptul că cianotoxinele prezente în majoritatea tulpinilor de cianobacterii exercită acțiune toxică asupra organismului uman și animal, manipulările cu cianobacteriile producătoare de toxine necesită măsuri speciale de precauție pentru a evita inhalarea, contactul direct cu pielea, cu mucoasele bucale și nazale, precum și evitarea nemijlocită a contactului direct în caz de leziuni ale pielii de diversă etiologie.

Bibliografie:

1. ABED, R., DOBRETsov, S., SUDESH, K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. In: *J. Applied Microbiol.*, 2009, vol.106, p.1-12.
2. AIDA, Y., PABST, M.J. Removal of endotoxin from protein solutions by phase separation using Triton X-114. In: *J. Immunol Methods*, 1990, vol.132, no.2, p.191-195.
3. AL-SAMMAK, M., HOAGLAND, K., CASSADA, D., et al. Co-occurrence of the cyanotoxins BMAA, DABA and anatoxin-a in Nebraska reservoirs, fish, and aquatic plants. In: *Toxins* (Basel), 2014, vol.6, no.2, p.488-508.
4. BAJPAI, R., SUSEELA, M. Cyanobacterial toxins: A Growing Environmental Concern. In: *International Society of Environmental Botanists*, 2012, vol.18, no.2, p.6-7.
5. BALUNAS, M., LININGTON, R., TIDGEWELL, K., et al. Dragonamide E, a modified linear lipopeptide from *Lyngbyamajuscula* with antileishmanial activity. In: *J Nat Prod.*, 2010, vol.73, no.1, p.60-66.
6. BECHER, P., BAUMANN, H., GADEMANN, K. et al., The cyanobacterial alkaloid nostocarboline: an inhibitor of acetylcholinesterase and trypsin. In: *J. Appl. Phycol.*, 2008, vol.21, p.103-110.
7. BERNARDOVA, K., BABICA, P., MARSALEK, B. et al. Isolation and endotoxin activities of lipopolysaccharides from cyanobacterial cultures and complex water blooms and comparison with the effects of heterotrophic bacteria and green alga. In: *J. Appl. Toxicol.* 2008, vol.28, no.1, p.72-77.

8. BLAHA, L., MARSALEK, B. Methods for detection and quantification of cyanobacterial toxins – a review. In: *Algological Studies*, 2000, vol.99, p.1-22.
9. BERRY, J., GANTAR, M., PEREZ, M., et al. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. In: *Mar. Drugs*, 2008, vol.6, p.117–146.
10. BOJCEVSKA, H., JERGIL, E. *Removal of cyanobacterial toxins (LPS endotoxin and microcystin) in drinking-water using the biosand household water filter*. Committee of Tropical Ecology Uppsala University, Sweden, May 2003.
11. BOROWITZKA, M. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. In: *J. Appl. Phycol.*, 1995, vol.7, p.3-15.
12. BURJA, AM, BANAIGS, B, ABOU-MANSOUR, E. et al. Marine cyanobacteria- a prolific source of natural products. In: *Tetrahedron*, 2001, vol.57, p.9347-9377.
13. BERRY, J., GANTAR, M, PEREZ, M. et al. Cyanobacterial toxins as allelochemicals with potential applications as algacides, herbicides and insecticides. In: *Mar. Drugs*, 2008, vol.6, p.117-146.
14. CARMICHAEL, W. *Human Health Effects from Harmful Algal Blooms: a Synthesis*. Submitted by the HPAB to the International Joint Commission November 22, 2013.
15. CODD, G. Cyanobacterial toxins: Occurrence, properties and biological significance. In: *Water Sci. Tech.*, 1995, vol.32, no.4, p.149-156.
16. COSTA, M., COSTA-RODRIGUES, J., FERNANDES, M. et al. Marine cyanobacteria compounds with anticancer properties: A Review on the Implication of Apoptosis. In: *Mar. Drugs*, 2012, vol.10, no.10, p.2181-2207.
17. D'AGOSTINO, G., DEL CAMPO, J., MELLADO, B. et al. A multicenter phase II study of the cryptophycin analog LY355703 in patients with platinum-resistant ovarian cancer. In: *Int. J. Gynecol. Cancer*, 2006, vol.16, p.71-76.
18. De Cano, M., DeMule, M., De Caire, G. et al. Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc muscorum*. In: *J. Appl. Phycol.*, 1990, vol.2, p.79-81.
19. DIXIT, R., SUSEELA, M. Cyanobacteria: potential candidates for drug discovery. In: *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2013, vol.103, no.5, p.947-961.
20. DOI, T., NUMAJIRI, Y., MUNAKATA, A., et al. Total synthesis of apratoxin. In: *A Org. Lett.*, 2006, vol.8, p.531-534.
21. EL HAMIDI, A., TIRSOAGA, A., NOVIKOV, A. et al. Microextraction of bacterial lipid A: easy and rapid method for mass spectrometric characterization. In: *J. of Lipid Research.*, 2005, vol.46, p.1773-1778.
22. FALCONER, I. Measurement of toxins from bluegreen algae in water and foodstuffs. In: FALCONER, I.R, ed. *Algal toxins in seafood and drinking water*. London: Academic Press, 1999, p.3165-175.
23. FOMSGAARD, A., FREUDENBERG, M., GALANOS, C. Modification of the silver staining technique to detect lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. In: *J. of Clinical Microb.*, 1991, vol.28, no.12, p.2627-2631.
24. GADEMANN, K, Cyanobacterial natural products for the inhibition of biofilm formation and biofouling. In: *Chimia*, 2007, vol.61, p.373-377.
25. GAGNON, A., PICK, F. Effect of nitrogen on cellular production and release of the neurotoxin anatoxin-a in a nitrogen-fixing cyanobacterium. In: *Front. Microbiol.*, 2012, vol.3, p.211-214.
26. GAO, X., LIU, Y., KWONG, S. et al. Total synthesis and stereochemical reassignment of bisbromoamide. In: *Org. Lett.*, 2010, vol.12, p.3018-3021.
27. GALLERT, H., LEOPOLDSEDER, S., SCHUETT, M. et al. EndoLISA®: a novel and reliable method for endotoxin detection. In: *Nature Methods*, 2011, vol.8, no.10.
28. GROMOV, B., VEPRITSKIY, A., TITOVA, N. et al. Production of the antibiotic cyanobacterium LU-1 by *Nostoclinckia CALU 892*. In: *J. Appl. Phycol.*, 1991, vol.3, p.55-59.
29. GUPTA, V., PRASANNA, R. Cyanobacterial bioactive molecules – Biosynthesis and genetic regulation. In: *Microbiol Res.*, 2012, Disponibil: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.07.005>
30. GUTIERREZ, M., ANDRIANASOLO, E., SHIN, W. Structural and synthetic investigations of tanikolide dimer, a SIRT2 selective inhibitor, and tanikolideseco-acid from the Madagascar marine cyanobacterium *Lyngbyamajuscula*. In: *J. Org. Chem.*, 2009, vol.74, p.5267–5275.
31. GUTIERREZ, M., TIDGEWELL, K., CAPSON, T. et al. Malyngolide dimer, a bioactive symmetric cyclodepside from the Panamanian marine cyanobacterium *Lyngbyamajuscula*. In: *J. Nat. Prod.*, 2010, vol.73, p.709-711.
32. HEINZE, R. A biotest for hepatotoxins using primary rat hepatocytes. *Phycologia* 35 (Suppl.), 1996, p.89-93.
33. ISHIDA, K., OKITA, Y., MATSUDA, H. Aeruginosins, protease inhibitors from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. In: *Tetrahedron*, 1999, vol.55, p.10971-10988.
34. JAKI, B., HEILMANN, J., STICHER, O. New antibacterial metabolites from the cyanobacterium *Nostoc commune* (EAWAG 122b). In: *J. Nat. Prod.*, 2000, vol.63, p.1283–1285.
35. KABZINSKI, A., JUSZCZAK, R., MIEKOS, E. et al. The First Report about the Presence of Cyanobacterial Toxins in Polish Lakes. In: *Polish. J. of Environ. Studies*, 2000, vol.9, no.3, p.171-178.
36. KELETI, G., SYKORA, J. Production and Properties of Cyanobacterial Endotoxins. In: *Applied and Environmental Microbiology*, 1982, vol.43, no.1, p.104-109.

37. KIM H. et al., Indole Alkaloids from Two Cultured Cyanobacteria, *Westiellopsis sp.* and *Fischerellamuscicola*. In: *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, vol.20, no.17, p.5290-5295.
38. KIM, I., NGUYEN, G., KIM, S. et al. Evaluation of Methods for Cyanobacterial Cell Lysis and Toxin (Microcystin-LR) Extraction Using Chromatographic and Mass Spectrometric Analyses. In: *Environ. Eng. Res.*, 2009, vol.14, no.4, p.250-254.
39. KITTELBERGER, R., HILBINK, F. Sensitive silver-staining detection of bacterial lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. In: *J Biochem. And Biophys. Methods*, 1993, vol.26, no.1, p.81-86.
40. LAWRENCE, J., MENARD, C. Determination of microcystins in blue-green algae, fish and water using liquid chromatography with ultraviolet detection after sample clean-up employing immunoaffinity chromatography. In: *J. Chromatog. A.*, 2001, vol.922, no.1-2, p.111-117.
41. LAWTON, L., EDWARDS, C., CODD, G. Extraction and high performance liquid chromatography method for the determination of microcystins in raw and treated waters. In: *Analyst*, 1994, vol.119, p.1525-1530.
42. LE THI ANH TUYET. *Chemical and Biological Investigations of Vietnamese Cyanobacteria* /Inaugural dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerumnaturalium. Greifswald, Juli 2010, 198p.
43. LINDSAY, J., METCALF, J., CODD, G. Comparison of four methods for the extraction of lipopolysaccharide from cyanobacteria. In: *Toxicol and Environ.Chem.*, 2009, vol.91, no.7, p.1253-1262.
44. LUESCH, H., YOSHIDA, W., MOORE, R. et al. Total structure determination of apratoxin A, a potent novel cytotoxin from the marine cyanobacterium *Lyngbyamajuscula*. In: *J. Am. Chem. Soc.* 2001, vol.123, p.5418-5423.
45. MANDAL, S., BARBOSA, A., FRANCO, O. Lipopeptides in microbial infection control: Scope and reality for industry. In: *Biotechnol. Advances*, 2013, vol.31, no.2, p.338-345.
46. MARSALEK, B., BLAHA, L., HINDAK, F. Review of toxicity of cyanobacteria in Slovakia. In: *Biologia*, 2000, vol.55, no.6, p.645-652.
47. MEDINA, R., GOEGER, D., HILLS, P. Coibamide A, a potent antiproliferative cyclic depsipeptide from the Panamanian marine cyanobacterium *Leptolyngbya sp.* In: *J Am Chem Soc.*, 2008, vol.130, p.6234-6235.
48. MONKS, N., LIU, S., XU, Y. ET AL. Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. In: *Mol. Cancer Ther.*, 2007, vol.6, no.2, p.587-598.
49. MOORE, R., CORBETT, T., PATTERSON, G. ET AL. The search for new antitumor drugs from blue-green algae. In: *Curr. Pharm. Des.*, 1996, vol.2, p.317-330.
50. MOUNTFORTA, D., HOLLANDA, P., SPROSEN, J. Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS. In: *Toxicol.*, 2005, vol.45, no.2, p.199-206.
51. MUNDT, S., KREITLOWA, S., NOWOTNYA, A. et al. Biochemical and pharmacological investigations of selected cyanobacteria. In: *Int. J of Hygiene and Environ. Health.*, 2001, vol.203, no.4, p.327-334.
52. NAJDENSKI, H., GIGOVA, L., ILIEV, I. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. In: *Int. J. Food Sci. Tech.*, 2013, vol.48, no.7, p.1533-1540.
53. NAMIKOSHI, M., RINEHART, K., Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In: *J. Int. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, vol.17, p.373-384.
54. NEILANDS, J. Microbial iron transport compounds (siderophores) as chelating agents. In: A.E. MARTELL, W.F. ANDERSON, AND D.G. BADMAN (eds.). *Development of iron chelators for clinical use*, New York: Elsevier, North Holland, 1981, p.13-31.
55. NUNNERY, J., MEVERS, E., GERWICK, W. Biologically active secondary metabolites from marine cyanobacteria. In: *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, vol.21, p.787-793.
56. OREN, A., GUNDE-CIMERMAN, N., Mycosporines and mycosporine-like amino acids: UV protectants or multi-purpose secondary metabolites? In: *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, vol.269, p.1-10.
57. POON, G., GRIGGS, L., EDWARDS, C. Liquid chromatography-electrospray ionization mass- spectrometry of cyanobacterial toxins. In: *J. Chromatog.*, 1993, vol.628, p.215-233.
58. PRASANNA, R., SOOD, A., JAISWAL, P. Rediscovering cyanobacteria as valuable sources of bioactive compounds. In: *Appl. Biochem. Micro.*, 2010, vol.46, p.119-134.
59. RAMASWAMY, A., FLATT, P., EDWARDS, D. et al. The Secondary Metabolites and Biosynthetic Gene Clusters of Marine Cyanobacteria. Applications in Biotechnology, cap.5 in: PROKSCH, P., Muller, W. (Eds) *Frontiers in marine biotechnology*, HORIZON BIOSCIENCE: 2006, p.175-223.
60. RIVASSEAU, C., HENNION, M. Potential of immunextraction coupled to analytical and bioanalytical methods (Liquid chromatography, ELISA kit and phosphatase inhibition test) for an improved environmental monitoring of cyanobacterial toxins. In: *Anal. Chim. Acta.*, 1999, vol.399, p.75-87.
61. SERGEEVA, E., LIAIMER, A., BERGMAN B., Evidence for production of the phytohormone indole-3-acetic acid by cyanobacteria. In: *Planta*, 2002, vol.215, p.229-238.

62. SHEN, S., ZHANG, P., LOVCHIK, M. et al. Cyclopeptide toxin promotes the degradation of Hsp90 client proteins through chaperone-mediated autophagy. In: *J. Cell. Biol.*, 2009, vol.185, no.4, p.629-639.
63. SINGH, S., KATE, B., BANERJEE, U. Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: an overview. In: *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2005, vol.25, no.3, p.73-95.
64. SIVONEN, K., NAMIKOSHI, M., EVANS, W. et al. Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. In: *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, vol.58, p.2495-2500.
65. SIVONEN, K., BORNER, T. Bioactive compounds produced by cyanobacteria. In: A. HERRARO and E. FLORES (ed.), *The cyanobacteria: molecular biology, genomics and evolution*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom, 2008, p.159-197.
66. SMITH, C., ZHANG, X., MOOBERRY, S. et al. Cryptophycin: a new antimicrotubule agent active against drug-resistant cells. In: *Cancer Res.*, 1994, vol.54, p.3779-3784.
67. STEWART, I., CARMICHAEL, W., SADLER, R. et al. Occupational and environmental hazard assessments for the isolation, purification and toxicity testing of cyanobacterial toxins. In: *Environmental Health*, 2009, vol.8, no.1, p.52.
68. TAN, L. Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. In: *Phytochemistry*, 2007, vol.68, p.954-979.
69. TERUYA, T., SASAKI, H., FUKAZAWA, H. et al. Bisebromoamide, a potent cytotoxic peptide from the marine cyanobacterium *Lyngbya sp.*: Isolation, stereostructure and biological activity. In: *Org. Lett.*, 2009, vol.11, p.5062-5065.
70. TSUTSUMI, T., NAGATA, S., HASEGAWA, A. et al. Immunoaffinity column as clean-up tool for determination of trace amounts of microcystins in tap water. In: *Food Chem. Toxicol.*, 2000, vol.38, p.593-597.
71. VOLK, R. Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. In: *Microbiological Research*, 2006, vol.161, no.2, p.180-186.
72. WARD, C., BEATTIE, K., LEE, E. et al. Colorimetric protein phosphatase inhibition assay of laboratory strains and natural blooms of cyanobacteria: comparisons with high-performance liquid chromatographic analysis for microcystins. In: *FEMS Microbiol. Letters*, 1997, vol.153, no.2, p.465-473.
73. WASE, N., WRIGHT, P. Systems biology of cyanobacterial secondary metabolite production and its role in drug discovery. In: *Exp. Opin. Drug. Discov.*, 2008, vol.3, p.903-929.
74. WESTPHAL, O., AND JANN, K. Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenolwater and further applications of the procedure. In: *Methods in Carbohydrate Chem.*, 1965, vol.5, p.92-93, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J., USA.
75. www.jinkai.org/Endotoxin.html
76. www.lonza.com/coa
77. www.sigmaaldrich.com/technicaldocuments/articles/biology/glycobiology/lipopolysaccharides.
78. YADAV, S., SINHA, R., TYAG, M. et al. Cyanobacterial secondary metabolites. In: *Intern. J. of Pharma and Bio Sciences*, 2011, vol.2, no.2, p.144-167.
79. YEN, H., LIN, T., LIAO, P. Simultaneous detection of nine cyanotoxins in drinking water using dual solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. In: *Toxicon.*, 2011, vol.58, no.2, p.209-218.
80. YU, H., JANG, A., KIM, L. et al. Bead-based competitive fluorescence immunoassay for sensitive and rapid diagnosis of cyanotoxin risk in drinking water. In: *Environ. Sci. Technol.*, 2011, vol.45, no.18, p.7804-7811.
81. ZHU, Z-X, CONG, W-T, NI, M-W. et al. An improved silver stain for the visualization of lipopolysaccharides on polyacrylamide gels. In: *Electrophoresis*, 2012, vol.33, no.7, p.1220-1223.

Notă: Lucrarea a fost efectuată în cadrul Proiectului Instituțional 11.817.08.44A

Prezentat la 15.05.2014