

Informe final publicable de proyecto Síntesis de Ciclopéptidos Análogos a Productos Naturales como Potenciales Herbicidas e Inhibidores de Cianobacterias

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_155516

23/08/2022

SERRA LEMES, Gloria (Responsable Técnico - Científico)

BADAGIAN, Natalia (Investigador)

IRABUENA, Camila (Investigador)

AUBRIOT BENIA, Luis Eduardo (Investigador)

POSADA TRINDADE, Laura Florencia (Investigador)

VILLALBA, Juana (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE QUÍMICA (Institución Proponente) \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE AGRONOMÍA \\
UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS \\
FACULTAD DE QUÍMICA. FUNDACIÓN PARA EL PROGRESO DE LA QUÍMICA

Resumen del proyecto

El crecimiento económico que ha tenido el Uruguay entre los años 2003 y 2013 ha sido en gran parte debido al aumento de la agricultura en granos, principalmente en soja, aumentando las importaciones de herbicidas y fertilizantes. Estas prácticas agrícolas han producido un impacto generalizado en el medio acuático por el incremento de sustancias inorgánicas en el mismo. Lo anterior, sumado al calentamiento global y a las alteraciones hidrológicas, promueve la floración de cianobacterias productoras de toxinas (microcistinas).

En este proyecto nos propusimos preparar ciclopéptidos de distinto tamaño análogos a productos naturales que han demostrado actividad como herbicidas y/o inhibidores del crecimiento de cianobacterias.

Las investigaciones permitieron obtener 28 ciclopéptidos de distinto tamaño, algunos con actividades muy interesantes.

Los compuestos más activos como herbicidas, resultaron ser tres ciclotetrapéptidos. Dentro de ellos, se destaca el producto natural Versicotide D (LP150), sintetizado por nosotros, que además de inhibir el crecimiento radicular, inhibe la germinación y el desarrollo de hojas.

En cuanto a la inhibición del crecimiento de cianobacterias, los compuestos más prometedores son los ciclotetrapéptidos LP150, LP 163 y C1. Con estos compuestos se observa además una reducción de la concentración de microcistinas en los medios de cultivo que para el caso de LP150 (a 40 ug/mL) es comparable al control positivo, colistina (a 30 ug/mL), indicando la posibilidad de que LP150 tenga efecto en la inhibición de la producción de toxinas por la cianobacteria.

Estos ciclopéptidos serían candidatos para un desarrollo posterior y su potencial uso, podría tener beneficios comparado con el de los herbicidas utilizados actualmente, dado que la presencia de los mismos podría inhibir las floraciones de cianobacterias.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Químicas / Química Orgánica / Agroquímicos-Alguicidas

Palabras clave: ciclopéptidos / herbicida / alguicida /

Introducción

El crecimiento económico que ha tenido el Uruguay entre los años 2003 y 2013 ha sido en gran parte debido al aumento de la agricultura en granos principalmente en soja que creció en dicho período un 120%. Esto hizo que entre 2002-2014 las importaciones en Kg de herbicidas aumentaron 874 % y de fertilizantes 340 % (DIEA- MGAP 2016).(1)

Dichas prácticas agrícolas han producido un impacto generalizado en el medio acuático.(2) Lo anterior, sumado al calentamiento global y las alteraciones hidrológicas, promueve la floración de cianobacterias productoras de toxinas. La presencia de cianobacterias ha sido detectada en zonas de desarrollo agroindustrial como el Río Uruguay, Río Negro, represas artificiales etc. y también en playas del sur, en el río Santa Lucía y lagunas costeras, por lo que estos organismos y las toxinas (principalmente microcistinas) se encuentran en aguas con fines recreativos y en el agua para beber. (3) En particular, en el verano de 2019, se produjo una de las mayores floraciones de cianobacterias registradas en la costa uruguaya.

Los productos naturales han sido una importante fuente de compuestos bioactivos con diversas aplicaciones. Sin embargo solo el 8% de los herbicidas convencionales son derivados de compuestos naturales.(4) Dado que se utilizan grandes volúmenes de herbicidas para combatir malezas, el origen de los mismos y su degradación es de gran importancia.(5) Hay una necesidad urgente de nuevos herbicidas toxicológicamente seguros y con un perfil ambiental adecuado dado que algunos son poco seguros y además, se ha producido un aumento de resistencia a los mismos.

Un número importante de productos naturales derivados de aminoácidos han sido descritos con actividad herbicida, fungicida ó insecticida.(6) Dentro de ellos se destacan los ciclopéptidos como el ciclotetrapéptido tentoxin (1), Figura 1, un herbicida que produce clorosis en plantas. Tentoxin induce la clorosis de una variedad de malezas de maíz y soja tal como *Ipomoea hederacea* (boniatillo), *Cassia obtusifolia* and *Sorghum halepense* (sorgo de halepo) sin afectar el cultivo correspondiente(7). Esta molécula contiene NMe-L-Ala y N-Me-dehydroPhe lo que le confiere rigidez a la estructura que se correlaciona muy bien con la especificidad y la bioactividad.

Por otro lado, en los últimos años se han aislado de cianobacterias las llamadas ciclamidas, con interesantes actividades biológicas, como la hapalociclamida (2),(8) las aeruciclamidas,(9) las microciclamidas,(10) y ciclopentapéptidos como la anabaenopeptins, (3),(11) Figura 1.

Existen escasos antecedentes del uso de péptidos cíclicos no tóxicos, y de compuestos volátiles producidos por algunas

bacterias y cianobacterias, para producir la lisis celular de *Mycrocystis aeruginosa*,⁽¹²⁾ una de las cianobacterias responsables de las floraciones de algas más importantes y productora de las hepatotoxinas microcistinas causantes de los mayores problemas tanto en playas como en el agua para potabilizar. Uno de los ejemplos de este tipo de compuestos, son los ciclopentapéptidos anabaenopeptins para los que se ha descrito que cuando están presentes en el agua con floración, interfiere con el metabolismo de las cianobacterias por activación de su lisis.

Basados en todo lo anterior, nos planteamos la síntesis de nuevos ciclopéptidos de distinto tamaño, análogos a productos naturales de estructura general 4 (Figura 1) y el estudio de sus potenciales actividades como herbicidas y como inhibidores del crecimiento de cianobacterias determinándose además, la concentración de microcistinas en el medio de cultivo con el fin de evaluar si su potencial uso podría tener beneficios comparado con los herbicidas utilizados actualmente.

Los trabajos previos de nuestro grupo en síntesis orgánica (13), han permitido ganar experiencia en diversas metodologías sintéticas, en particular en las reacciones de macrociclación para la obtención de ciclopéptidos, en el uso de agentes acoplantes y de resinas para la síntesis de péptidos en fase sólida. Además, se han utilizado aminoácidos N-Metilados para la obtención de ciclopéptidos antimaláricos y se ha comprobado la importancia de los mismos en la conformación de los ciclopéptidos. Para los ciclopéptidos con N-Me aminoácidos se ha descrito un comportamiento "camaleónico", con conformaciones distintas según se encuentren en medio acuoso o lipídico, que les permiten permear a través de las membranas.⁽¹⁴⁾

Todo lo anterior sumado a que se ha descrito actividad herbicida e inhibidor de cianobacterias (por producir lisis) para algunos ciclopéptidos y al gran problema nacional y regional mediambiental descrito en antecedentes, nos impulsó a conformar un grupo con investigadores de otras áreas para sustentar la presente postulación.

El tema principal es la síntesis de péptidos y ciclopéptidos conteniendo N-metil aminoácidos para su evaluación biológica como herbicida e inhibidor de cianobacterias. También se determinará la concentración de microcistinas en el medio de cultivo conteniendo los productos sintetizados y se analizarán sus propiedades fisicoquímicas (Log P, solubilidad).

Se espera que del estudio de los resultados, surja algún ó algunos ciclopéptidos o sus precursores abiertos, que puedan ser buenos herbicidas de malezas y a su vez puedan producir la lisis de cianobacterias con el consiguiente beneficio para el medio ambiente.

Metodología/diseño del estudio

1. Síntesis de ciclopéptidos, determinación estructural y de propiedades fisicoquímicas. Se utilizaron distintas estrategias para preparar ciclopéptidos (tetra, penta y hexapéptidos):

i) SPPS y macrociclación en solución.

Se utilizó la resina 2-Cloro-Tritilo (2-CTC) y la estrategia Fmoc, Esquema 1. (referencia) Luego de anclar el primer aminoácido a la resina, se aplicaron ciclos de desprotección de Fmoc y acoplamiento hasta obtener el péptido deseado que fue escindido de la resina con TFA (ácido trifluoroacético) al 1%. Posteriormente el péptido fue macrociclado en solución para luego de su purificación realizar la espectroscopía completa (HRMS, NMR de 1H, 13C y bidimensionales).

ii) SPPS y macrociclación en resina 2-CTC

El primer aminoácido se ancló a la resina a través de un grupo carboxilo existente en la cadena lateral y su grupo alfa-carboxílico fue protegido como éster alílico, Esquema 1. Posteriormente ciclos de desprotección de Fmoc y acoplamiento, seguido de desprotección del éster alílico dió lugar al péptido con los extremos N y C-terminal desprotegidos. Acoplamiento entre estos grupos produjo el ciclopéptido unido a la resina que por tratamiento con TFA al 1% se escindió de la misma. Se realizó la espectroscopía completa (HRMS, NMR de 1H, 13C y bidimensionales) para la determinación estructural.

A los ciclopéptidos obtenidos se le determinó Log P mediante técnicas de HPLC como fue reportado previamente por nuestro grupo (13d).

2. Evaluación biológica

d

i) Determinación de la actividad herbicida

El ensayo fue realizado en agar utilizando semillas de Raigrás (*Lolium multiflorum*), evaluando las variables de

germinación, desarrollo foliar y longitud radicular post 10 días de incubación con los compuestos de interés. Se colocaron a germinar en la cámara de crecimiento en condiciones controladas de temperatura (20 °C) y fotoperiodo (16/8). El ensayo se realiza por triplicado, utilizando como control positivo una solución comercial de S-metolaclor, DMSO como control negativo y un testigo sin agregado.

ii) Determinación de inhibición de crecimiento de cianobacterias

Se determinó la inhibición de crecimiento de cianobacterias incubadas durante 7-10 días con los compuestos obtenidos. Se utilizaron cianobacterias que producen floraciones frecuentes en Uruguay: *Microcystis* sp. Las cianobacterias se mantuvieron en medio de cultivo BG11, a una temperatura de 25°C e intensidad de luz de 50 $\mu\text{mol fotón m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (fotoperiodo 16:8, luz:oscuridad respectivamente). El crecimiento se cuantificó por densidad óptica (D0750 nm) y conteo celular al microscopio. Se evaluó además la concentración de clorofila a por fluorimetría.

iii) Determinación de la concentración de microcistinas

Se tomaron muestras de los cultivos realizados en ii) para el análisis de microcistinas al inicio y al final del experimento de incubación.

La medición de la concentración de las microcistinas presentes en el medio de cultivo de las cianobacterias, se realizaron por ELISA utilizando un inmunoensayo con un anticuerpo policlonal.

Resultados, análisis y discusión

Síntesis de péptidos lineales y ciclopéptidos

Los compuestos propuestos para sintetizar son análogos a la Tentoxina, Dextrusinas ó Anabaenopeptinas; buscando explorar la influencia del aumento del tamaño del anillo, la presencia de aminoácidos N-metilados y la presencia de beta-alanina tanto en la actividad herbicida como su acción como inhibidores del crecimiento de cianobacterias y de la producción de microcistinas.

Para la obtención de los ciclopéptidos, se planteó la ruta de síntesis mostrada en el Esquema 1. En primera instancia se lleva a cabo la síntesis de los precursores lineales a través de la metodología de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPPS), utilizando la resina Cloruro de 2-Cloro tritilo (2-CTC) mediante la estrategia Fmoc. La carga del primer aminoácido se realiza en CH_2Cl_2 y exceso de DIPEA, en donde el primer aminoácido utilizado fue Fmoc-Gly-OH, Fmoc-NMeGly-OH, Fmoc beta-alanina, Fmoc-NMe-Phe o Fmoc-NMe-D-Phe. La elongación de la cadena se realiza con ciclos repetitivos de desprotección y acoplamiento hasta la obtención de la secuencia péptidica deseada. Para la etapa de acoplamiento fueron utilizados agentes acoplantes tales como HBTU, HATU u Oxyma Puere/DIC, dependiendo de la naturaleza de la amina que va a participar en la formación del nuevo enlace, pudiendo ser primaria o secundaria respectivamente. El monitoreo de cada etapa de acoplamiento y desprotección se realiza a través de HPLC y test colorimétricos (Kaiser y Cloranil). En algunos casos, se tuvieron que realizar etapas adicionales de desprotección y acoplamiento.

Una vez completada la elongación deseada, se procede a la escisión del péptido de la resina utilizando una solución de Ácido trifluoroacético (TFA) al 1% en CH_2Cl_2 . Se obtienen de esta manera péptidos lineales como sales de trifluoroacetato con muy buenos rendimientos y excelentes purezas (ver Tabla 1 y Figura 3).

La elucidación estructural fue llevada a cabo a partir de análisis por RMN y MS. Las purezas fueron determinadas por HPLC utilizando una columna EVO C18 5 μm , 150 x 4.6mm, gradiente lineal 8% en MeCN, 0.1% Ácido fórmico: H₂O, 0.1% Ácido fórmico, 15 min a un flujo de 1.25 ml/min a 30 °C, obteniendo en todos los casos purezas mayores al 90% a 220 y 280nm.

Una vez obtenidos los precursores lineales, se procede a la macrociclación de los mismos en solución, utilizando como agentes acoplantes HBTU, HATU u Oxyma Puere/EDCI, dependiendo de si se tiene una amina primaria o una secundaria en el extremo amino terminal. De la serie CI, se obtienen un total de 11 ciclotetrapéptidos, 2 ciclopentapéptidos y 2 ciclohexapéptidos, las correspondientes estructuras y rendimientos se muestran en Figura 2.

De la serie LP por macrociclación tanto en solución como en la resina, se obtienen un total de 7 ciclotetrapéptidos, 5 ciclopentapéptidos y 1 ciclohexapéptido; las estructuras y los rendimientos de obtención se muestran en la Figura 3.

Los rendimientos de las macrociclaciones son variables que van desde 2%-90%, lo que podría explicarse por las diferencias en la secuencia que hacen más o menos favorable la ciclación. Es de destacar que los rendimientos que están entre 2 y 5% no están optimizados. Los compuestos se pueden encontrar en distintas conformaciones las cuales muestran un comportamiento distinto en solubilidad y esto dificulta su aislamiento y purificación.

Para el compuesto C1, la macrociclación fue llevada a cabo probando tres condiciones de acoplamiento: Oxyma pure/EDCI, HBTU/DIPEA y HATU/DIPEA, en donde el mejor rendimiento fue el obtenido con la última condición mencionada. Para las demás macrociclaciones de la serie CI, se consideraron las condiciones HBTU/DIPEA o HATU/DIPEA.

En lo que respecta a los cambios en la secuencia que favorecen la macrociclación, si comparamos los rendimientos obtenidos para C1 vs C3, se concluye que el cambio de Phe por D-Phe lleva a un aumento en el rendimiento. La presencia de D-aminoácidos, aminoácidos N-metilados o presencia de Prolina en la secuencia, considerados "inductores de giro", promueven giros en la cadena peptídica que favorecen la cercanía de la amina y carboxilo terminal para la formación del enlace lactámico. Esto no resulta tan evidente al comparar los rendimientos obtenidos para C6 vs C7, en donde el cambio de D-Phe por Phe no lleva a grandes diferencias.

Por otra parte, si consideramos el cambio de Gly por beta-Ala, en todos los casos se tiene un aumento en el rendimiento: C3 vs C10, C5 vs C11 y C14 vs C15, por lo que se concluye que la presencia de un CH₂ adicional otorgando más flexibilidad, favorecería el acercamiento de los grupos involucrados en la macrociclación.

En las Tablas 2 y 3 se informan los valores de LogP para los ciclopéptidos obtenidos para la serie CI y LP, respectivamente.

Actividad herbicida

Los diferentes compuestos fueron sometidos a un screening primario para conocer su potencial actividad herbicida. El ensayo fue realizado en agar utilizando semillas de Raigrás (*Lolium multiflorum*), evaluando las variables de germinación, desarrollo foliar y longitud radicular post 10 días de incubación con los compuestos de interés. El ensayo se realiza por triplicado, utilizando como control positivo una solución comercial de S-metolaclor, DMSO como control negativo y un testigo sin agregado. Los compuestos fueron ensayados a una concentración de 67 ug/mL, utilizando S-metolaclor como control positivo (2.1 ug/mL).

Para el caso de los compuestos de la serie CI (Figura 2 y Tabla 1), de las variables evaluadas, la longitud radicular resulta ser donde se ven diferencias significativas respecto al control negativo. A partir de los valores obtenidos para esta variable, se calcula el % de inhibición (% I) de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% I = (L_o - L_c) / L_o * 100$$

Siendo L_o la longitud radicular observada para el control negativo, y L_c la longitud radicular observada para el compuesto de interés.

Los valores obtenidos para los compuestos evaluados de la serie CI, se expresan en la Gráfica 1. Clasificando como activos los compuestos con 70 % o más de inhibición, de la serie CI encontramos 8 compuestos activos: 4 ciclotetrapéptidos y 4 péptidos lineales.

L4 resulta ser el más activo, se trata de un tretapéptido lineal que posee NMe-D-Phe en su secuencia; se trata del precursor del ciclotetrapéptido C4, el segundo compuesto más activo de los evaluados. Nos encontramos entonces, con una secuencia promisoriosa.

El tercer compuesto más activo de los evaluados resulta ser L14, un hexapéptido lineal; si comparamos su actividad frente a L15, vemos que el cambio de Gly por ?-Ala lleva a una disminución de la actividad. Si vemos el % de inhibición obtenido para C15, queda en evidencia que la macrociclación de L15 lleva a pérdida de la actividad.

Para el caso de C3 vs L3, puede verse en este caso, que la macrociclación del precursor lineal lleva a un compuesto activo, siendo L3 inactivo. Para el compuesto C2, el agregado de un N-Me en la secuencia de C1 (cambio de Phe por NMePhe) mejora la actividad y el precursor lineal resulta inactivo (compuesto L2).

El agregado de Ala en las secuencias de C1 y C2, para la obtención de los ciclopentapéptidos C12 y C13, lleva a la pérdida de actividad.

De la serie LP, ver Gráfica 2, encontramos 4 ciclopéptidos activos: 2 ciclotetrapéptidos (LP150 y LP156), 1 ciclopentapéptido (LP164) y 1 ciclohexapéptido (LP170, dondese incorporó Leu a la secuencia). A diferencia de lo que ocurrió en la serie CI, uno de los cicloterapéptidos el compuesto LP150, cuya estructura corresponde la producto natural Versicotide D, además de inhibir el crecimiento radicular, inhibió la germinación y el desarrollo foliar.

Actividad frente a cianobacterias

Para la determinación de la actividad frente a cianobacterias, se procedió a la exposición de las mismas frente a los compuestos a evaluar a concentraciones de 40 ug/mL, incubándolas por un período de 7 a 10 días. Las variables a medir son la densidad óptica por día y la clorofila inicial y final de cada uno de los cultivos, ambos parámetros indicadores del crecimiento de cianobacterias. Para este ensayo se tiene como control positivo Colisitina (inhibidor de cianobacterias a una concentración de 30 ug/mL) y DMSO como control negativo.

Con los valores de densidad óptica y concentración de Clorofila a final, teniendo en cuenta los valores del día 7 para cada

uno de los compuestos y los controles, se procede al cálculo del % inhibición de igual manera al mencionado para la actividad herbicida. Los resultados se muestran en Gráfica 3 y Gráfica 4 .

De los resultados de la serie CI, se tienen 3 compuestos con interesante actividad. El compuesto que presenta una mejor actividad es C1, con un % de inhibición del 66%; teniendo éste como referencia, resulta evidente que el cambio de Phe por NMePhe lleva a una disminución de la actividad, compuesto C2, también se puede ver que el aumento del tamaño del anillo dado por el agregado de Ala en la secuencia, compuesto C12, lleva a una disminución de la actividad. En el caso del cambio de Phe por D-Phe, compuesto C3, se ve pérdida de actividad.

De los resultados de la serie LP, Gráfica 4, se tienen dos ciclotetrapéptidos (LP 150 y LP 163) con un % de inhibición del crecimiento de cianobacterias por encima del 70% y un ciclopentapéptido con un 57% de inhibición. Es de destacar otra vez la actividad del producto natural LP 150, Versicotide D y la del LP 163 donde se incorpora una Cys con su SH bencilado y la presencia de dos NMe-Gly.

Determinación de la concentración de microcistinas

Las muestras frizadas de los cultivos de *Microcystis* incubados con los compuestos obtenidos, así como con el control positivo (colistine) y negativo (DMSO) fueron descongeladas y se procede a la lisis celular para liberar las toxinas intracelulares. Luego de la filtración (0.22 µm) las muestras se analizan por ELISA, usando un nanobody de llama nanobody (clon A2), (15) y se realizan las curvas de calibración con MC-LR (Abraxis) en el rango de concentración de: 0.2 – 2.5 µg/L. En las gráficas 5 y 6 se registra el % de reducción de microcistinas calculado.

De la serie CI, (Gráfica 5) los compuestos C1, C2 y C3 son los que se muestran más activos, con una reducción de microcistinas por encima del 30%.

De la serie LP, (Gráfica 6), LP163 presenta más de un 50% de reducción de microcistinas. Por otra parte, LP150 muestra una destacada actividad produciendo a una concentración de 40 µg/mL una reducción del 83%, similar al control positivo, colistina a 30 µg/mL que redujo en un 86%.

Conclusiones y recomendaciones

Las investigaciones permitieron obtener 28 ciclopéptidos de distinto tamaño y sus precursores abiertos en su gran mayoría con buenos o muy buenos rendimientos. Se deberían optimizar los rendimientos para cuatro ciclopéptidos de la serie CI cuyos rendimientos fueron muy bajos.

Esta biblioteca de compuestos fueron evaluados en sus actividades como herbicidas, inhibidores de cianobacterias y microcistinas. Afortunadamente se han encontrado actividades muy interesantes como resultado de las evaluaciones.

En líneas generales, los compuestos más activos como herbicidas, resultaron ser los ciclotetrapéptidos conteniendo aminoácidos NMe. Dentro de ellos, se destaca el producto natural Versicotide D, sintetizado por nosotros, que además de inhibir el crecimiento radicular, inhibe la germinación y el desarrollo de hojas. También se encontró un ciclopentapéptido y un cilohexapéptidos que demostraron actividad herbicida.

En cuanto a la inhibición del crecimiento de cianobacterias, los compuestos más prometedores son los ciclotetrapéptidos LP150, LP 163 y C1. Con estos compuestos se observa además una reducción de la concentración de microcistinas en los medios de cultivo. Es de destacar el valor de reducción de microcistinas para el caso de LP150 (a 40 µg/mL) que es comparable al control positivo, colistina (a 30 µg/mL) y que parecería que produjo una reducción más pronunciada que la que realizaron LP163 y C1, indicando la posibilidad de que LP150 tenga efecto en la inhibición de la producción de microcistinas por la cianobacteria.

Por lo anterior, pudimos verificar que nuestra hipótesis es válida y un número interesante de ciclopéptidos obtenidos como análogos a productos naturales son activos como herbicidas y/o inhibidores de cianobacterias convirtiéndolos en excelentes candidatos para un desarrollo posterior. Probablemente, el potencial uso de ciclopéptidos podría tener beneficios comparado con el de los herbicidas utilizados actualmente, dado que la presencia de los mismos podría inhibir las floraciones de cianobacterias.

Referencias bibliográficas

- 1 <http://www.mgap.gub.uy/noticia/unidad-organizativa/direccion-general-de-servicios-agricolas/07-02-2018/importaciones-de>
- 2 Aubriot, L., Delbene, L., Haakonsson, S., Somma, A., Hirsch, F., Bonilla, S., 2017. Evolución de la eutrofización en el Río Santa Lucía: influencia de la intensificación productiva y perspectivas. En: INNOTECH, pp.07-16.
- 3 Bonilla, S., Haakonsson, S., Somma, A., Gravier, A., Britos, A., Vidal, L., De León, L., Brena, B., Pirez, M., Piccini, C., Martínez De La Escalera, M., Chalar, G., González-Piana, G., Martigani, F., & Aubriot, L. 2015. Cianobacterias y cianotoxinas en ecosistemas límnicos de Uruguay. INNOTECH, 10: 9 - 22.
- 4 Dayan, F.E. and S.O. Duke. Natural compounds as next generation herbicides. *Plant Physiology* 2014, 166, 1090.
- 5 a) Pimentel, D.; Zuniga, R.; Morrison, D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States. *Ecol. Econom.* 2005, 52, 273. b) Stokstad, E. Pesticide planet. *Science* 2013, 341, 730.
- 6 Lamberth, C. Naturally occurring amino acid derivatives with herbicidal, fungicidal or insecticidal activity. *Amino Acids* 2016. DOI 10.1007/s00726-016-2176-5
- 7 a) Duke, S. O. ; Dayan, F. E. Modes of action of microbially-produced phytotoxins. *Toxins* 2011, 3, 1038. b) Lax, A. R.; Shepherd, H. S.; Edwards, J. V. Tentoxin, a chlorosisinducing toxin from *Alternaria* as a potential herbicide. *Weed Technol.* 1988, 2, 540.
- 8 I. Koodkaew, S.; Matsuyama, Y.; Sunohara, H.; Matsumoto, H. Hapalocyclamide: a novel hexapeptide of the cyanobacterium *Hapalosiphon* sp. *Tetrahedron Lett.* 2012, 53, 977.
- 9 Portmann, C., Blom, J. F., Kaiser, M., Brun, R., Jüttner, F., Gademann, K. J. *Nat. Prod.* 2008, 71, 1891.
- 10 Raveh, A.; Moshe, S.; Evron, Z.; Flescher, E.; Carmeli, S. *Tetrahedron* 2010, 66, 2705.
- 11 Harada, K. I.; Fujii, K.; Shimada, T.; Suzuki, M.; Sano, H.; Adachi, K.; Carmichael, W. W. Two cyclic peptides, anabaenopeptins, a third group of bioactive compounds from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Tetrahedron Lett.* 1995, 36, 1511.
- 12 a) Sedmak, B.; Carmeli, S.; Eleršek, T. "Non-toxic" cyclic peptides induce lysis of cyanobacteria—An effective cell population density control mechanism in cyanobacterial blooms. *Microbial Ecology*, 2008, 56, 201-209. b) Ozaki, K., Ohta, A., Iwata, C., Horikawa, A., Tsuji, K., Ito, E., Ikai, Y., & Harada, K.-i. Lysis of cyanobacteria with volatile organic compounds. *Chemosphere*, 2008, 71, 1531-1538.
- 13 a) Posada, L.; Davyt, D.; Serra, G. First total synthesis of versicotide A, B and C. *RSC Adv.* 2020, 10, 43653. b) Serra, G.; Posada, L.; Hojo, H. *Chem. Commun.* 2020, 56, 956. c) Posada, L.; Serra, G. *Tetrahedron Lett.* 2019, 60, 151281. d) Fagundez, C.; Sellanes, D.; Peña, S.; Scarone, L.; Aguiar, A. C. C.; de Souza, J.; Guido, R. V. C.; Stewart, L.; Yardley, V.; Otilie, S.; Winzeler, E. A.; Gamo, F.-J.; Sanz, L. M.; Serra, G. L. *ACS Med. Chem. Lett.* 2019, 10, 137. e) Fagundez, C.; Sellanes, D.; Serra, G. *ACS Comb. Sci.* 2018, 20, 212.
- 14 a) White, T.R.; Renzelman, C. M., Rand, A. C.; Rezai, T.; McEwen, C. M.; Gelev, V. M.; Turner, R. A.; Linington, R. G.; Leung, S. S.; Kalgutkar, A. S.; Bauman, J. N.; Zhang, Y.; Liras, S.; Price, D. A.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. *Nat. Chem. Biol.* 2011, 7, 810-7. b) Rand, A. C.; Leung, S. S. F.; Eng, H.; Rotter, C. J.; Sharma, R.; Kalgutkar, A. S.; Zhang, Y.; Varma, M. V.; Farley, K. A.; Khunte, B.; Limberakis, C.; Price, D. A.; Liras, S.; Mathiowetz, A. M.; Jacobson, M. P.; Lokey, R. S. *Med. Chem. Commun.* 2012, 3, 1282-1289.
- 15 M. Pírez-Schirmer, M. Rossotti, N. Badagain, C. Leizagoyen, B.M. Brena, G. González-Sapienza. *Anal. Chem.* 2017, 89 (12), 6800-6806.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional. (CC BY-NC)