

Microcistinas: risco de contaminação em águas eutróficas

Marcia Kamogae e Elisa Yoko Hirooka*

Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, C.P. 6001, 86051-970, Londrina-Paraná, Brazil. *Author for correspondence. e-mail: hirooka@uel.br

RESUMO. O aumento populacional, aliado à modernização da sociedade, incrementou o consumo de água, tornando o represamento recurso imprescindível para atender à demanda. Inúmeros fatores inter-relacionados contribuem para agravar o risco da deterioração da água, dentre os quais se destacam as microcistinas. Estas hepatotoxinas, produzidas por cianobactérias dos gêneros *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc* e *Oscillatorias*, consistem de heptapeptídeo de estrutura monocíclica cujo risco iminente da constante ingestão se deve ao efeito de potente promotor de tumor. A produção de microcistinas é favorecida por fatores ambientais onde existe elevada concentração de nutrientes e luminosidade, fatores estes que se tornaram inevitáveis no atual ecossistema. A crescente eutroficação de água ocorre em ritmo acelerado, decorrente da poluição pela industrialização, lixo doméstico, práticas agrícolas, além da espoliação de recursos naturais. Com a finalidade de alertar a comunidade e despertar seu interesse, este trabalho discorre sobre microcistinas e fatores de risco - perspectivas de sua contaminação, objetivando ainda estabelecer medidas preventivas que minimizem a deterioração das águas.

Palavras-chave: microcistinas, cianobactéria, produção, atividade tóxica, detoxicação.

ABSTRACT. Microcystins: contamination risks in eutrophic waters. Population growth allied with the modernization of society has increased water consumption and transformed reservoirs into indispensable sources of water supply. Several interrelated factors, conspicuously microcystins, have contributed to aggravate the risk of water deterioration. These hepatotoxins, produced by cyanobacteria of the *Anabaena*, *Microcystis*, *Nostoc* and *Oscillatoria* geni, consist of heptapeptides with monocyclic structures. The risk of constant ingestion is due to their powerful tumor promoter effect. The microcystin production is favored by environmental factors, such as high concentration of nutrients and light, inevitable in the current ecosystem. The eutrophication of water occurs in an accelerated rhythm due to industrial pollution coupled to domestic and agricultural waste. The aim of this paper is to develop community awareness, as well as to arouse an interest in microcystins and other risk factors of contamination so that preventive measures to minimize water deterioration could be established.

Key words: microcystins, cyanobacteria, production, toxic activity, detoxication.

As microcistinas consistem de heptapeptídeos cíclicos produzidos por cianobactérias tóxicas que compõem comunidades fitoplanctônicas, representadas por *Microcystis*, *Anabaena*, *Nostoc* e *Oscillatoria* (Sivonen *et al.* 1992 a,b), de ocorrência comum em reservatórios de água doce. A produção de toxinas ocorre em períodos de "bloom", e é caracterizada pela intensa proliferação de microalgas, durante os meses favorecidos pela temperatura da água em torno de 22°C.

Os poderes maléficos comprovados devem-se à capacidade hepatocarcinogênica, cuja base molecular

da toxicidade consiste na inibição de enzimas fosfatase 1 e 2 A do hepatócito. O risco de ingestão crônica se agrava, já que estudos recentes mostraram a persistência de microcistina residual intacta, em água submetida ao tratamento convencional de potabilidade.

Bishop *et al.* (1959) foram os primeiros a discorrer sobre hepatotoxicidade de substância produzida por *Microcystis aeruginosa* linhagem LRC - 1 (SS 17), que posteriormente Konst *et al.* (1965) denominaram de microcistina MCVYST. Embora as propriedades tóxicas sejam semelhantes, os

hidrolisados de MCYST apresentavam composições de aminoácidos substancialmente diferentes, sendo que uma única linhagem era capaz de produzir mais do que uma toxina (Eloff *et al.*, 1982).

No Brasil, a importância de microcistina tornou-se pública devido a um grave acidente ocorrido em Caruaru - Pernambuco, onde renais crônicos foram intoxicados durante sessão de hemodiálise, o que culminou em dezenas de óbitos. O caso, exposto na mídia internacional, despertou a atenção para o efeito drástico de microcistina no sangue humano, incentivando a comunidade científica brasileira para o estudo de seu impacto no meio ambiente, ecologia e saúde.

Salienta-se que a água é fonte de alimentos insubstituível, cuja qualidade interfere diretamente na sobrevivência do ser humano. É fonte de vida esgotável e elemento primário da cadeia alimentar, que merece atenção especial por ser assunto crítico e primordial para a humanidade neste milênio.

Ecologia/taxonomia

Os fitoplânctons de água doce ocorrem em lagos temperados e a presença de cianobactérias se deve, provavelmente, ao aumento da luminosidade e da temperatura no fim da primavera (Reynolds *et al.* 1981). Em climas tropicais, onde a temperatura e a intensidade de luz são intensas, “blooms” de cianobactérias persistem durante o ano todo, favorecidos pela riqueza de nutrientes. A intensidade e duração dos “blooms” aumentam em águas eutróficas ou hipereutróficas, estimuladas principalmente pelo lixo doméstico, industrial e agrícola (Carmichael, 1996).

Recentemente DeMott *et al.* (1991) demonstraram toxicidade de microcistinas para zooplânctons, indicando que as toxinas de cianobactérias sejam produzidas para conferir vantagem competitiva (Sivonen *et al.*, 1992d).

Skulberg *et al.* (1994) descreveram a taxonomia de cianobactérias tóxicas baseada na morfologia e documentaram cerca de 40 espécies. Diversas espécies toxigênicas pertenceram aos gêneros filamentosos e multicelulares do gênero *Anabaena*, *Nostoc* e *Oscillatoria*, conhecidos pela produção de potente biotoxina. As outras espécies produzem citotoxinas de menor potencialidade para os mamíferos, pássaros e peixes, mas afetam algas, bactérias, vírus ou células tumorais de mamíferos, abrindo perspectivas de aplicação sob forma de antibióticos ou antitumorais. Entre as cianobactérias toxigênicas unicelulares destaca-se a *Microcystis* spp.,

a mais problemática devido à ocorrência universal (Azevedo *et al.*, 1994; Reynolds *et al.*, 1981).

Microcystis spp. não produz as células acessórias denominadas de aquinetes e heterocitos, sendo a identificação de espécie baseada na variabilidade do tamanho, formato e arranjo das colônias definida pelo sistema taxonômico descrito por Kondrat'eva (1968) e Komárek e Anagnostidis (1986). Destas espécies, *Microcystis aeruginosa*, *M. viridis*, *M. wasembergii* e *M. flos-aquae* são comumente encontradas em “blooms”, com destaque a linhagens tóxicas.

M. aeruginosa é a espécie predominante, além de a primeira a ser isolada, cultivada e estudada (Bishop *et al.*, 1959), constituindo-se em fonte primária universal de microcistinas utilizadas em estudos químicos, toxicológicos e genéticos.

Análises filogenéticas baseadas na sequência 16S rDNA têm sido úteis no delineamento de linhagens de *Microcystis* spp. tóxicas e não tóxicas (Neilan *et al.*, 1997). Não obstante, Otsuka *et al.* (1999) descreveram cinco morfoespécies de *Microcystis* spp. intimamente relacionadas em termos de sequência de 16S rDNA, isto é, poderiam ser integradas numa única espécie. O fato indicou que análise filogenética baseada unicamente na sequência 16S rDNA seria insuficiente para diferenciar estes organismos em nível de espécie.

A taxonomia de *Microcystis*, bem como de outras cianobactérias ainda está sujeita a debates e investigação científica (Komárek e Anagnostidis 1986).

Produção de microcistinas

Kotak *et al.* (1995), analisando a ocorrência de microcistina-LR nos lagos hipereutróficos no Canadá, observaram correlação positiva entre concentração de microcistina-LR, abundância e biomassa de *M. aeruginosa*, concentração de fósforo total (TP) e de fósforo dissolvido (TDP), pH e clorofila “a”; entretanto, não detectaram correlação entre concentração de microcistina-LR e temperatura da água (7°C - 24°C), havendo correlação negativa com a concentração de nitratos. Wicks e Thiel (1990) investigaram a variação na produção de microcistina nas águas eutróficas da África do Sul e verificaram correlação positiva entre produção de toxinas e produção primária, radiação solar, temperatura da água, % de oxigênio saturado na água; porém houve correlação negativa com clorofila “a” e concentração de fósforo solúvel.

Na tentativa de elucidar os efeitos de fatores ambientais constituídos de luz, temperatura e

nutrientes na produção de toxinas de cianobactérias, os estudos relataram resultados conflitantes, porém isto pode dever-se a diferenças nas linhagens de cianobactérias utilizadas. Gorhan (1964), Runnegar *et al.* (1983) e van der Westhuizen e Eloff (1985) demonstraram efeito marcante de temperatura entre 18 a 32°C na produção de toxina por *M. aeruginosa*, porém Watanabe e Oishi (1985) e Ohtake *et al.* (1989) relataram nenhum ou pouco efeito no mesmo intervalo.

Os resultados sobre o efeito de irradiação na produção de toxina por *M. aeruginosa* (van der Westhuizen e Eloff, 1985; Watanabe *et al.*, 1989), por outro lado, contrastam com pequenas mudanças na toxicidade, em caso de manipulação de fósforo e nitrogênio (Watanabe *et al.*, 1989). Contudo, existe consenso quanto à associação íntima entre a produção de microcistinas e ciclo celular do organismo (van der Westhuizen e Eloff, 1985; Watanabe *et al.*, 1989), com produtividade máxima no final da fase log, embora condições ótimas para crescimento possam não se repetir para a produção de toxinas (van der Westhuizen e Eloff, 1985).

As variações na toxicidade de “blooms” se devem, em parte, a mudanças na proporção relativa de linhagem tóxicas e atóxicas (Carmichael e Gorhan, 1977; 1981), já que evidências indicaram a coexistência de ambas as linhagens no mesmo nicho ecológico (Gorham *et al.*, 1964; Shirai *et al.*, 1991; Watanabe *et al.*, 1991). Não obstante, segundo Meißner *et al.* (1996) e Dittmann *et al.* (1997), a biossíntese de microcistinas ocorre pela rota não ribossômica, estando a diferença básica entre *M. aeruginosa* tóxicas e atóxicas, a presença de um ou mais genes codificadores de microcistina sintetases (Meriluoto *et al.*, 1998). Os autores alegaram o envolvimento de genes específicos nas linhagens hepatotóxicas, descrevendo o *mapep-1* (fragmento de DNA de 2982bp) contendo um grupo de genes peptídio sintetase na produção destas hepatotoxinas. Os resultados demonstraram que a diferença básica entre as *M. aeruginosa* tóxicas e atóxicas consiste no conteúdo de genes codificadores de peptídio sintetase (Dittmann *et al.*, 1997).

Produção “in vitro”. O estudo de cianobactérias tóxicas requer seu isolamento a partir de lagos, rios ou reservatórios, porém a dificuldade consiste na coexistência de bactérias e microalgas em fina mucilagem.

O cultivo em massa de cianobactérias depende da escolha de meio adequado. O meio MA (Ichimura, 1978) destina-se a esta finalidade em *M. aeruginosa* e

M. viridis (Watanabe *et al.*, 1988), porém promove simultaneamente o crescimento bacteriano, já que contém β -glicerofosfato e bicine. O meio CB (Ichimura e Ito, 1977), inicialmente desenvolvido para cultivo de alga verde *Closterium*, tem sido utilizado também para o cultivo de *M. aeruginosa* (Ohtake *et al.*, 1989), mas contém vitaminas desnecessárias para cianobactérias. Cite-se ainda o meio Z8 utilizado por Hughes *et al.* (1958) para cultivar *M. aeruginosa* tóxica, posteriormente modificado por Kotai (1972). O meio BG 11 (Stanier *et al.*, 1971) utilizado para o cultivo de *M. aeruginosa* (Codd e Poon, 1988) favorece o desenvolvimento destas linhagens por conter alto teor de nitrato de sódio, correspondente a 247mg de nitrogênio por litro.

Entretanto, Carmichael *et al.* (1988) notaram redução drástica na toxicidade de *Anabaena flos-aquae* e *M. aeruginosa*, se transferidas do meio ASM-1 (Carmichael e Gorhan, 1977) para o meio BG 11, recuperando-se a habilidade de produção quando foram novamente inoculadas no meio ASM-1.

Fatores que afetam a produção. Os fatores que afetam a produção de microcistinas foram estudados baseados principalmente em relação a *M. aeruginosa*, devido à ocorrência cosmopolita de “blooms” destas espécies. A produção de toxinas, bem como fisiologia de fitoplânctons, são afetadas por fatores ambientais. Sendo cianobactérias organismos autotrópicos, sintetizam material orgânico a partir de energia da luz solar, que também desempenha papel importante na produção de toxinas. Utkilen e Gjølme (1992) comprovaram a relação entre intensidade da luz e produção de toxinas em cultivo contínuo de *M. aeruginosa*. A quantidade de toxina aumentou com a intensidade de luz acima de 40 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$, embora reduzisse a produtividade. A quantidade de toxina por unidade de peso de proteína foi constante em elevadas intensidades de luz, indicando que a produção de toxinas seja primariamente controlada pelos produtos fotossintéticos.

A toxicidade máxima de *M. aeruginosa* M228 ocorreu a 18°C, embora maiores taxas de crescimento sejam medidas a temperaturas mais altas (Codd e Poon, 1988; van der Westhuizen e Eloff 1985). Segundo van der Westhuizen e Eloff (1985), a maior toxicidade de *M. aeruginosa* a 20°C do que a 15, 28 e 38°C, indica que condição favorável para produção de toxina situa-se a temperaturas subótimas de crescimento.

Investigando-se o efeito de pH na taxa de crescimento e na toxicidade de *M. aeruginosa*, Eloff e van der Westhuizen (1983) estimaram menor toxicidade em pH 9,0, onde ocorreu maior taxa de crescimento; maior produção ocorreu em pH superior ou inferior a 9,0.

Watanabe e Oishi (1985) descreveram considerável diminuição na toxicidade causada pela redução da concentração de nitrogênio no meio MA para 1/10 e 1/20 em relação a níveis originais. Redução ainda menor ocorreu removendo-se fósforo no mesmo fator. Codd e Poon (1988) também obtiveram resultados semelhantes, removendo nitrogênio e carbono do meio BG 11.

Lukac e Angerter (1993) analisaram o efeito de metais na taxa de crescimento e produção de toxina por *M. aeruginosa* em meio BG 11. As concentrações atóxicas de íons Al^{3+} , Cd^{1+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{1+} e Sn^{1+} não afetaram o crescimento e produção de toxinas, não ocorrendo o mesmo com Zn^{2+} e Fe^{2+} , obtendo-se efeito mais pronunciado com Fe^{2+} . Salienta-se que a despeito da diminuição da taxa de crescimento para 0,68, a produção de toxina aumentou 138% em relação à produção em condições normais a baixas concentrações de Fe^{2+} (0,1mM), indicando o envolvimento de Fe^{2+} em importantes funções fisiológicas relacionadas com fotossíntese e síntese de clorofila.

Estrutura de microcistinas

Botes e colaboradores, citados por Bouaicha *et al.* (1997), em 1984 isolaram toxinas de *M. aeruginosa* coletadas na África do Sul e determinaram a estrutura de uma das toxinas denominadas de "Cyanoginosin".

A estrutura de microcistinas constitui-se de heptapeptídeo monocíclico, composto de 3 D-aminoácidos que compõem a porção invariável e constante nas moléculas, 2 L-aminoácidos e 2 aminoácidos raros. Os D-aminoácidos são constituídos de alanina, ligação β eritro- β metil-ácido aspártico; ligação γ ácido glutâmico (Ala - β -Me-Asp - Glu). Os 2 aminoácidos raros correspondem a N-metildehidroalanina (Mdha) e 3-amino-9-metoxi-10-fenil-2,6,8-trimetildeca-4,6-ácido dienóico (Adda). A estereoquímica de Adda tem sido recentemente determinada e designada como 2S, 3S, 8S, 9S, completando a estrutura absoluta de microcistinas (Rinehart *et al.*, 1988). Os 2 L-aminoácidos variáveis com combinações conhecidas incluem, por exemplo, leucina e alanina (LA), leucina e arginina (LR), tirosina e arginina (YR), tirosina e alanina (YA), e tirosina e metionina (YM).

As diferenças estruturais entre microcistinas dependem principalmente de 2 aminoácidos variáveis, e secundariamente, da presença ou ausência de grupamentos metil no β -Me-Asp e/ou Mdha (Carmichael, 1996).

A diversidade é conferida pela modificação em determinados grupamentos estruturais, como, por exemplo: um 9-O-acetil-Adda (Namikoshi *et al.*, 1990) ou 9-O-desmetil-Adda (Namikoshi *et al.*, 1992b); C_3H_7O (Namikoshi *et al.*, 1992b) ou monoéster CH_3O (Sivonen *et al.*, 1992c), grupo α -carboxila no resíduo Glu; N-metil serina (Namikoshi *et al.*, 1992b) ou serina (Namikoshi *et al.*, 1992d) em vez de Mdha. A figura 1 sumariza as variações estruturais entre microcistinas (Rinehart *et al.*, 1994).

A determinação desta estrutura básica de microcistinas acelerou os trabalhos subseqüentes, seguindo-se a detecção e caracterização de mais de 50 microcistinas (Gathercole e Thiel, 1987; Gorham *et al.*, 1964; Harada *et al.*, 1988, 1990 a,b, 1991 a,b, Kiviranta *et al.*, 1992, Krishnamurth *et al.*, 1986, 1989, Kusumi *et al.*, 1987, Lam *et al.*, 1995, Meriluoto *et al.*, 1989, Namikoshi *et al.*, 1990, 1992 a,b,c,d, Stoner *et al.*, 1989, Watanabe *et al.*, 1988).

Patogenia animal

Mortes e doenças severas de animais domésticos e selvagens, incluindo bovinos, pássaros e peixes, devidas ao desenvolvimento denso de "blooms", são universalmente comuns (Frazier *et al.*, 1998).

Os envenenamentos de animais terrestres resultaram da ingestão de águas infestadas por algas (Carmichael, 1977), sendo que morte por microcistinas decorreram de hemorragia intra-hepática e choque hipovolêmico. O sintoma caracteriza-se pelo aumento exagerado do volume hepático causado pelo refluxo sangüíneo, liberação de hemoglobina, em contraste com a perda sangüínea em outros órgãos, induzindo a um choque irreversível (Beasley *et al.*, 1989).

Takahashi e Kaya (1993) investigaram microcistina RR em codornas e determinaram a LD_{50} em 256 $\mu g/kg$, porém foram surpreendidos pela toxicidade bastante diferente, já que, além de causar morte entre 14 e 18 horas após a injeção - quando para ratos e camundongos este tempo variou entre 1 e 3 horas - observou-se aumento do baço para o dobro do tamanho, porém sem alterar o fígado. Verificou-se leve necrose hemorrágica na moela, fígado, intestino e tecido subcutâneo. Estas necroses, exceto as que afetaram o fígado, não foram encontradas nos ratos tratados com microcistinas.

Efeito tóxico de microcistinas foram também observados em peixes (Matsushima *et al.*, 1990; Philips *et al.*, 1985) com LD₅₀ de 550 µg/kg em carpas e de 2.6 mg/kg em “gold fish” (Sugaya *et al.*, 1990). O impacto econômico causado pela morte de peixes é alarmante, já que a piscicultura vem ocupando uma posição de destaque cada vez maior e o conseqüente consumo de peixes contaminados pode oferecer perigo à saúde humana.

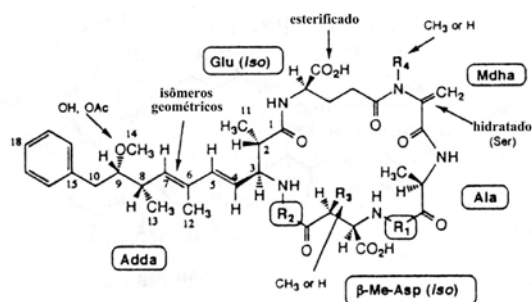


Figura 1. Variações estruturais e pesos moleculares de microcistinas

	R1	R2	R3	R4	PM
Microcistina - LA	Leu	Ala	CH ₃	CH ₃	909
Microcistina - LR	Leu	Arg	CH ₃	CH ₃	994
Microcistina - YR	Tyr	Arg	CH ₃	CH ₃	1044
Microcistina - RR	Arg	Arg	CH ₃	CH ₃	1037
Microcistina - YM	Tyr	Met	CH ₃	CH ₃	1019
Microcistina - YA	Tyr	Ala	CH ₃	CH ₃	959
Microcistina - LY	Leu	Tyr	CH ₃	CH ₃	1001
Microcistina - FR	Phe	Arg	CH ₃	CH ₃	1028
Microcistina - Laba	Leu	Aba	CH ₃	CH ₃	923
Microcistina - HtyR	Hty	Arg	CH ₃	CH ₃	1058
Microcistina - AR	Ala	Arg	CH ₃	CH ₃	953
Microcistina - M(O)R	Met(O)	Arg	CH ₃	CH ₃	1028
Microcistina - WR	Tyr	Arg	CH ₃	CH ₃	1067
3 - Desmetilmicrocistina LR	Leu	Arg	H	CH ₃	980
7 - Desmetilmicrocistina LR	Leu	Arg	CH ₃	H	980
3,7 - Desmetilmicrocistina LR	Leu	Arg	H	H	966
3 - Desmetilmicrocistina YR	Tyr	Arg	H	CH ₃	1030
7 - Desmetilmicrocistina YR	Tyr	Arg	CH ₃	H	1030
3 - Desmetilmicrocistina RR	Arg	Arg	H	CH ₃	1023
7 - Desmetilmicrocistina RR	Arg	Arg	CH ₃	H	1023
3,7 - Desmetilmicrocistina RR	Arg	Arg	H	H	1009
3 - Desmetilmicrocistina HtyR	Hty	Arg	H	CH ₃	1044
7 - Desmetilmicrocistina HtyR	Hty	Arg	CH ₃	H	1044
3,7 - Desmetilmicrocistina HtyR	Hty	Arg	H	H	1030
7 - Desmetilmicrocistina HphR	Hph	Arg	CH ₃	H	1028
[Mser ⁷] microcistina LR	Leu	Arg	CH ₃	CH ₃	1012
[Ser ⁷] microcistina LR	Leu	Arg	CH ₃	H	998
[Ser ⁷] microcistina RR	Arg	Arg	CH ₃	H	1041
[Ser ⁷] microcistina HtyR	Hty	Arg	CH ₃	H	1062
[Ser ⁷] 3 desmetilmicrocistina XR	X	Arg	H	H	998
[DMAdda] microcistina LR	Leu	Arg	CH ₃	CH ₃	980
[ADMAdda] microcistina LR	Leu	Arg	CH ₃	CH ₃	1022
[ADMAdda]3-desmetilmicrocistina LR	Leu	Arg	H	CH ₃	1008
[ADMAdda] microcistina LHar	Leu	Har	CH ₃	CH ₃	1036
[ADMAdda, Mser ⁷] microcistina LR	Leu	Arg	CH ₃	CH ₃	1040
D-Glu(CH ₃ O)ester microcistina LR	Leu	Arg	CH ₃	CH ₃	1008
D-Glu(CH ₃ O)ester 3-desmetilmicrocistina LR	Leu	Arg	H	CH ₃	994
D-Glu(C ₃ H ₇ O ₂)ester microcistina LR	Leu	Arg	CH ₃	CH ₃	1052
Toxina #3					1014
[D-Ser ¹ , ADMAdda]microcistina LR	Leu	Arg	CH ₃	CH ₃	1038

Fonte: Harada, K.I. (1996)

Atividade tóxica

Um das características mais marcantes em microcistinas é a presença de β-aminoácido Adda, também presente em nodularinas. Considerando-se que um isômero geométrico de C-7 no grupamento Adda com configuração 4(E), 6(Z) (abreviado como 6(Z)-Adda microcistina) não apresentou toxicidade, a geometria 4(E) e 6(E) é essencial para a atividade biológica (CHOI *et al.*, 1993; Harada *et al.*, 1990 a,b). Este aminoácido aumenta a hidrofobicidade geral da molécula de microcistina, sendo que um outro aminoácido insaturado raro, Mdha, age como um receptor adicional (Kondo *et al.*, 1992b).

Adda parece desempenhar papel de destaque na hepatotoxicidade, já que a remoção ou saturação de Adda reduzem drasticamente a toxicidade de microcistina-LR. Além disto, isômeros geométricos no C-7 de Adda em microcistinas -LR e RR foram essencialmente atóxicos (Harada *et al.*, 1990 a,b), porém a substituição de grupo metoxi no C-9 de Adda por grupos acetoxi ou hidroxí não reduziu a toxicidade (Namikoshi *et al.*, 1992c). Embora a estrutura tenha se mantido indeterminada (Namikoshi *et al.*, 1993), a toxicidade da microcistina LR foi substancialmente reduzida pela unidade (C₃H₇O₂) no resíduo Glu, sugerindo que o ácido carboxílico livre na unidade Glu seja importante na toxicidade. A redução da ligação dupla e adição de glutatona em Mdha não reduziu significativamente a toxicidade de microcistina LR (Kondo *et al.*, 1992b, Meriluoto *et al.*, 1990b, Namikoshi *et al.*, 1993). Os resultados sugeriram que os resíduos Adda e Glu da molécula de microcistina sejam essenciais para a hepatotoxicidade (Stotts *et al.*, 1993).

A hepatotoxicidade foi estabelecida em experimentos com ratos, onde refluxo de sangue causou acentuado intumescimento do fígado (Hooser *et al.*, 1990). As microcistinas apresentam organotropia única pelo fígado, com administração intraperitoneal e oral letal para ratos e camundongos, devido a hemorragia intra-hepática massiva e necrose celular dentro de poucas horas (Beasley *et al.*, 1989; Dawson, 1998; Tencalla e Dietrich, 1997). Em contraste com outras formas de envenenamento por algas, este tipo de intoxicação é caracterizada pelo aparecimento de pintas escuras e dilatação hepática, cujo acúmulo sanguíneo conduz a um volume duas vezes maior que o normal (Hooser *et al.*, 1990).

A letalidade da toxina se atribui a choque hipovolêmico, resultante do seqüestro de sangue pelo fígado (Levine *et al.*, 1998). Dosagens agudas causaram morte do rato entre 30 minutos e 3 horas,

com LD₅₀ via intraperitoneal de 40-800 µg/kg (ITO *et al.*, 1997 a,b; Levine *et al.*, 1998), conforme ilustrado na Tabela 1.

A pequena variabilidade na LD₅₀ indica que variações estruturais não causaram efeito significativo na toxicidade de microcistinas. Conseqüentemente, variação marcante nos aminoácidos 2 e 4 não reduziu substancialmente a hepatotoxicidade, a despeito de menor toxicidade de microcistina RR. A posição crítica parece ser a unidade de ácido glutâmico, já que a esterificação de grupamentos carboxilas livres conduziu a compostos essencialmente inativos.

Além de toxicidades agudas semelhante ao ácido okadáico, as microcistinas exerceram atividade promotora de tumor (Frazier *et al.*, 1998; Harada *et al.*, 1988; Nasseen *et al.*, 1990). As bases enzimáticas estabeleceram a atividade inibidora de proteína fosfatase 1 e 2 A, sendo que exerce a hepatotoxicidade presumivelmente através desse mecanismo (Macias-Silva e Garcia-Sainz, 1994; Meißner *et al.*, 1996; Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992; Yoshizawa *et al.*, 1990).

Tabela 1. Relação entre estrutura e hepatotoxicidade das microcistinas

L-aminoácidos (R ₁ , R ₂)	LD ₅₀ (µg/kg, i.p.* em rato)
Microcistina LR, YR, LA	<100
Microcistina WR	100-400
Microcistina RR, M(O)R	400-800
Grupamento metil em Mdha e/ou β-Me-Asp	
3 - desmetilmicrocistina LR	100-400
7 - desmetilmicrocistina LR	100-400
3,7 - didesmetilmicrocistina LR	100-400
Adda	
O-dimetil-Adda-microcistina LR	<100
O-acetil-O-dimetil-Adda-microcistina LR	<100
6(Z)-Adda microcistina LR (RR)	>800
Éster	
D-Glu(C3H7O) éster microcistina LR	>800
D-Glu(CH3O) éster microcistina LR	>800
Mdha	
Dihidromicrocistina	100-400
Microcistina-LR-GSH adduct	400-800

* i.p. significa intra peritoneal; Fonte: Harada (1996)

Nishiwaki-Matsushima *et al.* (1992) demonstraram que microcistinas LR, YR, e RR inibiram a atividade das proteínas fosfatase 1 e 2 presentes na membrana e nas frações citosólicas de hepatócitos, tão intensa quanto a do ácido okadáico (Falconer, 1991; Fujiki *et al.*, 1992, Pouchus *et al.*, 1997, Yoshizawa *et al.*, 1990). Os modelos moleculares sugeriram ligação de microcistinas ao mesmo receptor de ácido okadaico, devido à similaridade no tamanho e na disposição de grupamentos químicos (Nishiwaki *et al.*, 1990; Rudolf-Bohner *et al.*, 1994).

A inibição da atividade de fosfatase aumenta a fosforilação de proteínas nos hepatócitos, interferindo na expressão do gene envolvido no crescimento celular (Yoshizawa *et al.*, 1990). Dentro do hepatócito, a toxina induz alteração dos microfilamentos, agregando-os na proximidade do centro celular, o que resulta na perda de suporte celular. Os hepatócitos tornam-se circulares, resultando na distribuição do endotélio sinusóide (Malyaveuskaya, 1983; Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992).

Em comparação com o fenobarbital e outros promotores de tumor hepático, como hexaclorociclohexano, acetato de ciproterona e ácido chenodeoxicólico (Blair *et al.*, 1991; Schulte-Hermann *et al.*, 1982), as microcistinas exerceram atividade promotora do câncer hepático mais potente conhecido na atualidade (Malyaveuskaya, 1983; Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992).

Um estudo epidemiológico realizado em Qidong County, norte de Shanghai, abastecida com água de valas e açudes com alto índice de contaminação por cianobactérias, detectou incidência de câncer primário hepático 8 vezes maior, em relação à população que ingere água de boa qualidade (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992).

A constatação sobre indução de câncer hepático em humanos que consomem água contaminada com microcistina é reforçada por Williams *et al.* (1997), que, administrando microcistina LR em salmão, detectaram a toxina no fígado. A correlação com o desenvolvimento de câncer requer adoção de medidas preventivas, em vista da ocorrência cosmopolita de "blooms" de cianobactérias tóxicas, as quais implicam em questões de saúde, através do suprimento de água tanto para humanos quanto para animais.

Estudos realizados evidenciam que o mecanismo tóxico de microcistinas compromete hepatócitos e macrófagos (Kaya, 1996).

Nos hepatócitos, a toxina inibe a proteína fosfatase mas ativa fosfolipase A₂ e ciclooxigenase, enquanto que nos macrófagos, induz a produção de TNF-α (tumor necrosis factor α) e interleucina-1 (IL-1). Estas citocinas induzem a produção de fator ativador de plaquetas (PAF) e ativam a de ciclooxigenase, que elicitam a produção de mediadores químicos da inflamação, as tromboxanas e prostaglandinas (Kaya, 1996).

A fosforilação de proteína depende de atividade relativa de proteína quinase e proteína fosfatase, distribuídas na fração citosólica de hepatócitos. As microcistinas são potentes inibidores (Konst *et al.*,

1965; Macias-Silva e Garcia-Sainz, 1994), sendo que a microcistina-LR atua especificamente sobre a proteína fosfatase 1 e 2A.

A inibição de proteína fosfatase conduz ao aumento de fosfoproteínas em culturas primárias de hepatócitos de ratos e subsequente mudança morfológica (Fledmark *et al.*, 1998; Toivola *et al.*, 1998). Microcistina-LR (1µM) induziu a fosforilação de várias proteínas dos hepatócitos de ratos, principalmente de citoqueratins 8 (55 kDa) e 18 (49 kDa), que numa proporção 3 vezes superior a outras proteínas induziram subsequente alteração na morfologia celular, com rearranjo de redes intermediárias de filamentos citoplasmáticos (Ohta *et al.*, 1992).

Os estudos mitóticos em células renais de hamster mostraram fosforilação concomitante de proteínas de filamentos intermediários e dissociação nos agregados citoplasmáticos (Chou *et al.*, 1989). O fenômeno também é sustentado pela evidência de que a administração de microcistinas em ratos resultou na perda de citoqueratins de uma fração da membrana plasmática hepática (Miura *et al.*, 1989). A perda de citoqueratins de filamentos intermediários, associada com fosforilação, poderia provocar o surgimento de tumor durante a mitose (Ohta *et al.*, 1992).

Os hepatócitos metabolizam ácido araquidônico (Lukac e Angerter, 1993), enquanto que microcistinas estimulam a via da ciclooxigenase desta via metabólica (Nasseem *et al.*, 1990).

Embora ainda se desconheça o mecanismo de liberação de metabólitos do ácido araquidônico, as microcistinas podem reagir com o grupamento tiol (Kondo *et al.*, 1992) da coenzima A (CoA) e/ou inibir acil-CoA-aciltransferase e acil-CoA-acilsintetase, bloqueando a reabsorção de ácido araquidônico livre em grupos de lipídios, causando subsequente aumento na síntese de prostaglandinas. Postula-se que a reacilação de ácido araquidônico seja fator de controle do balanço de ácido araquidônico livre e produção de seus metabólitos, sendo que microcistinas atuariam alterando a reacilação de fosfolipídios (Nasseem *et al.*, 1990).

Remoção de microcistinas por processos de tratamento de água

Os processos de potabilização da água são classificados em 3 tipos: coagulação-filtração, oxidação com agentes oxidantes derivados de cloro e ozônio e adsorção com carvão ativado, sendo comum o emprego de procedimentos combinados.

A cloração é ineficaz na remoção de algas (Himberg *et al.*, 1989; Hoffman, 1976; Keijola *et al.*, 1988; Tsuji *et al.*, 1994, 1997), porém o cloro, hipoclorito de cálcio e hipoclorito de sódio rapidamente destroem microcistinas e nodularinas, sendo que o tratamento com cloro e hipocloritos ativos em doses superiores a 1mg/L remove 95% de toxinas em 30 minutos. Hipoclorito de sódio ativo removeu cerca de 40% a 1mg/L e 70-80% em doses superiores a 5 mg/L (Nicholson *et al.*, 1989).

O ozônio consiste de poderoso oxidante utilizado efetivamente na desinfecção e oxidação de uma vasta variedade de compostos durante tratamento de água. A preozonização com 1mg/L removeu completamente a toxicidade das hepatotoxinas e anatoxin-a (Keijola *et al.*, 1988). Himberg *et al.* (1989); posteriormente observaram que a remoção era dependente da dose de ozônio.) Embora a ozonólise de microcistina-LR e nodularinas não proporcionem a obtenção de produtos de degradação (Namikoshi *et al.*, 1989), é necessário estimar se subprodutos nocivos são formados durante estes processos.

Carbono ativado é bastante efetivo na remoção de poluentes, incluindo toxinas de algas na água (Falconer *et al.*, 1989; Himberg *et al.*, 1989; Hoffman, 1976; Keijola *et al.*, 1988). Contudo, a *performance* depende de fatores que necessitam ser considerados quando se escolhem ambos os tipos de carbono (pulverizado ou granular) e o método de adição do carbono.

Recentemente, o tratamento de oxidação biológica utilizando micro-animais foi conduzido em águas contendo alta densidade de algas. *Aelosomona hemprichi* e *Philodina erythrophthalma* formaram um biofilme e predaram efetivamente *Microcystis* spp. tóxico, utilizando-os como fonte alimentar (Sugiura *et al.*, 1994).

Inamori *et al.* (1998) utilizaram a combinação de *Aelosomona hemprichi* e *Philodina erythrophthalma* associada com bactérias aeróbias, conseguindo reduzir a concentração de toxina em até 94% em menos de 12 horas. Bourne *et al.* (1996) utilizaram *Sphingomonas* spp., que apresenta uma via enzimática (microcistinase) que reduziu a atividade de microcistina-LR num fator de 160 vezes (Lam *et al.*, 1995).

Situação no Brasil

A investigação da presença de microcistina no Brasil é recente. O Brasil incorporou-se à comunidade científica internacional devido à intoxicação ocorrida por microcistinas durante

sessão de hemodiálise em Caruaru - Pernambuco (Jochimsen *et al.*, 1998; Pouria *et al.*, 1998). A presença de outras cianotoxinas, como a cilindrospermopsina, vem sendo relatada (Molica *et al.*, 1998). Microcistinas foram detectadas em águas do Estado do Rio de Janeiro (Domingos *et al.*, 1998) bem como em águas do Estado do Paraná (Hirooka *et al.*, 1999). A investigação das várias regiões do país se faz necessária, já que o clima tropical brasileiro propicia o desenvolvimento de "blooms" potencialmente tóxicos, oferecendo perigo à saúde humana e animal.

Referências bibliográficas

- Azevedo, S.M.F.O.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W.; Namikoshi, M. First report of microcystins from a Brazilian isolates of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Appl. Phycol.*, 6:261-265, 1994.
- Beasley, V.R.; Cook, W.O.; Dahlem, A.M.; Hooser, S.B.; Lovell, R.A.; Valentine, W.M. Algae intoxication in livestock and waterfowl. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.*, 5:345-361, 1989.
- Bishop, C.T.; Anet, E.F.L.J.; Gorham, P.R. Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37:453-471, 1959.
- Blair, P.C.; Popp, J.A.; Bryant-Varela, B.J.; Thompson M.B. Promotion of hepatocellular foci in female rats by chenodeoxycholic acid. *Carcinogenesis*, 12:59-63, 1991.
- Bouaicha, N.; Hennion, M.; Sandra, P. Determination of okadaic acid by micellar electrokinetic chromatography with ultraviolet detection. *Toxicol.*, 35:2:273-281, 1997.
- Bourne, D.G.; Jones, G.B.; Bakleley, R.L.; Jones, A.; Negri, A.; Riddles, P. Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(11):4086-4094, 1996.
- Carmichael, W.W. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.*, 72:445-459, 1992.
- Carmichael, W. W. Toxic Microcystis and environment. In: Watanabe, M.; Harada, K-I.; Carmichael, W.W.; Fujiki, H. (Ed.). *Toxic Microcystis*, CRC Press, 1996. p. 1-11. Fl
- Carmichael, W.W.; Eschedor, J.T.; Patterson, G.M.L.; Moore, R.E. Toxicity and partial structure of a hepatotoxicity peptide produced by the cyanobacterium *Nodularia spumigena* Mertens emend L575 from New Zealand. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:2257-2263, 1988.
- Carmichael, W.W.; Gorhan P.R. Factors influencing the toxicity and animal susceptibility of *Anabaena flos-aquae* (cyanophyta blooms). *J. Physiol.*, 13:97-101, 1977.
- Carmichael, W.W.; Gorhan P.R. The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. In: Carmichael, W.W. (Ed). *The water environment: algal toxins and health*. New York: Plenum Press, 1981. p. 161-172.
- Choi, B.W.; Namikoshi, M.; Sun, F.; Rinehart, K.L.; Carmichael, W.W.; Kaup, A.M.; Evans, W.R.; Beasley, V.R. Isolation of linear peptides related to the hepatotoxins nodularin and microcystins. *Tetrahedron Lett.*, 34:7881-7884, 1993.
- Chou, Y.H.; Rosevear, E.; Goldman R.D. Phosphorylation and disassembly of intermediate filaments in mitotic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:1085-1089, 1989.
- Codd, G.A.; Poon, G.K. Cyanobacterial toxins in biochemistry of the algae and cyanobacteria. Oxford: Clarendon Press, 1988. p.283-296.
- Dawson, R. M. The toxicology of microcystins. *Toxicol.*, 36(7):953-962, 1998.
- De'Mott, W.R.; Zhang, Q.-X.; Carmichael, W.W. Effects of toxic cyanobacterial and purified toxins on the survival and feeding a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnol. Oceanogr.*, 36:346-357, 1991.
- Dittmann, E.; Neilan, A.; Erhard, M.; Döhren, H. von; Börner, T. Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. *Mol. Microbiol.*, 26(4):779-787, 1997.
- Domingos, P.; Ferrão-Filho, A.S.; Azevedo, S.M.F.O. Cyanobacterial bloom in a tropical lagoon (Brazil) and its relation with some environmental conditions. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON TOXIC CYANOBACTERIA, 4., 1998. Beaufort, 1998. p.68.
- Ellof, J.N.; Siegelman, H.W.; Kycia, H. Comparative study on the toxins from several *Microcystis aeruginosa* isolates. *S. Afr. J. Sci.*, 78:377, 1982.
- Ellof, J.N.; Van der Westhuizen, A.J. Toxicological studies on Microcystis, Carmichael, W.W. (Ed.). In: _____. *The water environment: algal toxins and health*. New York: Plenum Press, 1983. p.343.
- Falconer, I.R. Tumour promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environ. Toxicol. Water Quality*, 6:177-184, 1991.
- Falconer, I.R.; Runnegar, M.T.C.; Buckley, T.; Huyn, V.L.; Bradshaw, P. Using activated carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacterial blooms. *J. Am. Water Works Assoc.*, 81:102-105, 1989.
- Fledmark, F.E.; Serres, M.H.; Larsen, N.L.; Yasumoto T.; Aune, T.; Doskeland S.O. Sensitive detection of apoptogenic toxins in suspension cultures of rat na salmon hepatocytes. *Toxicol.*, 36(8):1101-1114, 1998.
- Frazier K.; Colvin, B.; Styer E.; Hullinger G.; Garcia R. Microcystin toxicosis in cattle due to overgrowth of blue-green algae. *Vet. Hum. Toxicol.*, 40(1):23-24, 1998.
- Fujiki, H.; Suganuma, M.; Nishiwaki, S.; Yoshizawa S. Yatsunami, J.; Matsushima, R.; Furuya, H.; Okabe, S. Matsunaga, S.; Sugimura, T.; Specific mechanistic aspects of animal tumor promoters: the okadaic acid pathway. In: D'Amato R.; Slaga, T.J.; Farland, W.; Henry, C. (Ed.). *Relevance of animal studies to the*

- evaluation of human cancer risk. New York: Wiley 1992. p.337-350.
- Gathercole, P.S.; Thiel, P.G. Liquid chromatographic determination of the cyanoginosins, toxins produced by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *J. Chromatogr.*, 408:435-440, 1987.
- Gorham, P.R.; McLachlan, J.; Hammer, U.T.; Kim, W.K. Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (lyng) de Breb. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 15:796-804, 1964.
- Harada, K.; Suzuki, M.; Dahlem, A.M.; Beasley, V.R.; Carmichael, W.W.; Rinehart, K. L. JR. Improved methods for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. *Toxicon*, 26:433-439, 1988.
- Harada, K.; Matsuura, K.; Suzuki, M.; Watanabe, M.F.; Oishi, S.; Dahlem, A.M.; Beasley, V.R.; Carmichael, W.W. Isolation and characterization of the minor componentes associated with microcystin LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon*, 28:55-64, 1990a.
- Harada, K.; Ogawa, K.; Matsuura, K.; Murata, H.; Suzuki, M.; Watanabe, M.F.; Itezono, Y.; Nakayama, N. Structural determination of geometrical isomers of microcystins-LR and RR from cyanobacteria by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chem. Res. Toxicol.*, 3:473-481, 1990b.
- Harada, K.; Ogawa, K.; Matsuura, K.; Nagai, H.; Murata, H.; Suzuki, M.; Itezono, Y.; Nakayama, N.; Shirai, M.; Nakano, M. Isolation of two toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa* K-139. *Toxicon*, 29:479-489, 1991a.
- Harada, K.; Ogawa, K.; Kimura, K.; Nagai, H.; Murata, H.; Suzuki, M.; Thorn, P.M.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W. Microcystin from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Chem. Res. Toxicol.*, 4:535-540, 1991b.
- Harada, K.; Murata, H.; Qiang, Z.; Suzuki, M.; Kondo, F. Mass spectrometric screening method for microcystins in cyanobacteria. *Toxicon*, 34(6):701-710, 1996a.
- Harada, K.I.; Oshikata, M.; Uchida, H.; Suzuki, M.; Kondo F.; Sato, K.; Ueno, Y.; Yu, S.Z.; Chen, G.; Chen, G.C. Detection and identification of microcystins in the drinking water of Haimen City. *Natural toxins*, 4(6):277-283, 1996b.
- Harada, K.I. Chemistry and Detection of Microcystins. In: Watanabe, M.; Harada, K-I.; Carmichael, W.W.; Fujiki, H. (Ed.). *Toxic Microcystis*. Boca Raton: CRC Press 1996. p.106-108.
- Hirooka, E.Y.; Pinotti, M.H.; Tsutsumi, T.; Yoshida, F.; Ueno, Y. Survey of microcystins in water between 1995 and 1996 in Parana, Brazil using ELISA. *Nat Toxins*, 7(3):103-109, 1999.
- Himberg, K.; Keijola, A.M.; Hiisvirta, L.; Pysalo, H.C.; Sivonen, K. The effect of water treatment process on the removal of hepatotoxins from microcystis and *Oscillatoria* cyanobacteria. A Laboratory study. *Water Res.*, 23:979-984, 1989.
- Hoffman, J.R.H. Removal of microcystis toxins in water purification process. *Water S.A.* 2:58-60, 1976.
- Hooser S.B.; Beasley V.R.; Basgall, E.J.; Carmichael, W.W.; Haschek W.M. Microcystin-LR - induced ultrastructural changes in rats. *Vet. Pathol.*, 27:9-15, 1990.
- Hughes, E.O.; Gorham, P.R.; Zehender, A. Toxicity of a unialgal culture of *Microcystis aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, 4:225, 1958.
- Ichimura, T. Media for blue-green algae. In: Nishizawa, K.; Chihara, M. (Ed.). *Methods in Algalogical Studies*. Kyoritsu, Tokyo: [s.n.], 1978. p.294-305.
- Ichimura, T.; Ito, T. Methods of preservation of microalgae I. In: Nei, T. (Ed.). *Methods of preservation of microorganism*. Tokyo: University Press, 1977. 355 p.
- Inamori, Y.; Sugiura, N.; Iwami, N.; Matsumura, M.; Hiroki, M.; Watanabe, M. M. Degradation of the toxic cyanobacterium *Microcystis viridis* using predaceous micro-animals combined with bacteria. *Phycological Research*, 46:37-44, 1998.
- Jochimsen, E.M.; Carmichael, W.W.; Na, J.S.; Cardo, D.M.; Cookson, S.T.; Holmes, C.E.; Antunes, M.B.; de Mello Filho, D.A; Lyra, T.M.; Barreto, V.S.; Azevedo, S.M.; Jarvis, W.R. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.*, 338(13):873-879, 1998.
- Kaya, K. Tocology of Microcystins. In: Watanabe, M.; Harada, K-I.; Carmichael, W.W.; Fujiki, H. (Ed.). *Toxic Microcystis*. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 1-11. F1.
- Keijola, A.M.; Himberg, K.; Esala, A.L.; Sivonen, K.; Hiisvirta, L. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment process: laboratory and pilot-scale experiments. *Toxic. Assess.*, 3:643-656, 1988.
- Kiviranta, J.; Namikoshi, M.; Sivonen, K.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W.; Rinehart, K. Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205, *Toxicon*, 26:1017-1098, 1992.
- Komárek, J.; Anagnostidis, K. Modern approach to the classification system of cyanophytes 2 - Chroococcus. *Arch. Hydrobiol.*, 43(73):157-226, 1986.
- Kondo, F.; Ikai, Y.; Oka, H.; Okamura, M.; Ishikawa N.; Harada, K.I.; Matsuura, K.; Murata, H.; Suzuki, M. Formation, characterization and toxicity of the glutathione and cystine conjugates of toxic heptapeptide microcystins. *Chem. Res. Toxicol.*, 5:591-596, 1992.
- Kondrat'Eva, N.V. Problems of morphology and taxonomy of *Microcystis aeruginosa* Kütz-emend, Elenkin and its related species in Russian. In: Tsvetenie, Vody, Topachuskii, A. V. Bragniskii, I.p.; Kondrat'Eva, N.V.; Kut'skii, L. A. Sirenko, L.A. Kiev 13, 1968.
- Konst, H.; Mckercher, P.D.; Gorham, P.R. Robertson, A. Howell, J. Symptoms and pathology produced by *Microcystis aeruginosa* NRC-1 in laboratory and domestic animals. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, 29:221-228, 1965.

- Kotai, J. Instruction for preparation of modified 28 for algae, B11/69. Norwegian Institute for Water Research Publications. Oslo: Blinderan, 1972.
- Kotak, B.G.; Lam, A. K.Y.; Prepas, E. E.; Kenefick, S.L.; Hrudehy, S.E. Variability of the hepatotoxin microcystin-LR in hipereutrophic drinking water lakes. *J. Phycol.*, 31(2):248-263, 1995.
- Krishnamurthy, T.; Carmichael, W.W.; Sarver, E.W. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation and purification of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon*, 24:865-873, 1986.
- Krishnamurthy, T.; Szafraniec, L.; Hunt, D.F.; Shabanawitz, J.; Yates., J.R. III; Carmichael, W.W.; Skulberg, O.; Codd, G.A. Missler S. Structured characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86:770-774, 1989.
- Kusumi, T.; Ooi, T.; Watanabe, M.; Takahashi, H.; Kakizawa, H. Cyanoviridin-RR a toxin from the cyanobacterium (blue-green algae) *M. viridis*. *Tetrahedron. Lett.*, 28:4695-4698, 1987.
- Lam, A.K.Y.; Fedorak, P.M.; Prepas, E.E. Biotransformation of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR, as determined by HPLC and protein phosphatase bioassay. *Environ. Sci. Technol.*, 29:242-246, 1995.
- Levine, L.; Xiao, D.M. Fujiki, H. Combinations of palytoxin or 12 - tetradecanoyl phorbol-13-acetate and recombinant human insulin, growth factor - 1 or insulin synergistically stimulate prostaglandin production cells. *Prostaglandins*, 31:669, 1998.
- Lukac, M.; Angerter, R. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon*, 31:293-305, 1993.
- Macias-Silva, M.; Garcia-Sainz, J. A. Inhibition of hormone -stimulated inositol phosphate production and disruption of cytoskeletal structure. Effects of okadaic acid, microcystin, chlorpromazine, W7 and nystatin. *Toxicon*, 32(1):105-112, 1994.
- Malyaveuskaya, A.Y. Influence of anthropogenic eutrophication: effects on fish in the form of blue-green algae mass development. *Arch Hydrobiol.*, 97:412-418, 1983.
- Matsushima, R.; Yoshizawa, S.; Watanabe, M.F.; Harada, K-I.; Furusawa, M.; Carmichael, W.W.; Fujiki, H. In vitro and in vivo effects of protein phosphatase inhibitors, microcystins and nodularin, on mouse skin and fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 171:867-874, 1990.
- Meißner, K.; Dittmann, E.; Börner, T. Toxic and non-toxic strains of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 135:295-303, 1996.
- Meriluoto, J.; Kinkaid, B.; Smithy, M. R.; Wasberg, W. Electrochemical detection of microcystins, cyanobacterial peptide hepatotoxins, following high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.*, 810(1/2):226-230, 1998.
- Meriluoto, J.; Sandstrom, A.; Eriksson, J. E.; Remaud, G.; Grey Craig, A; Chattopadhyaya, J. Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. *Toxicon*, 27:1021-1024, 1989.
- Meriluoto, J.A.O.; Eriksson, J.E.; Harada, K-I.; Dahlem, A.M.; Sivonem, K.; Carmichael, W.W. Internal surface reverse-phase high performance liquid chromatographic separation of the cyanobacterial peptide toxins microcystin -LA, -LR, YR, -RR and nodularin. *J. Chromatogr.*, 509:390-395, 1990.
- Meriluoto, J.A.O.; Nygard, S.E.; Dahlen, A.M.; Eriksson, J. E. Synthesis, organotropism, and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydro microcystin-LR, a cyanobacterial peptide toxin analog. *Toxicon*, 28:1439-1446, 1990b.
- Miura, G.A.; Robinson, N. A.; Geisberg, T.W.; Bostian, K. A.; White, J.P.; Pace, J.G. Comparison of in vivo and in vitro toxic effects of microcystin-LR. Fasted rats. *Toxicon*, 27:1229 -1240, 1989.
- Molica, R.J.R.; Nascimento, S.M.; Bouvy, M.; Silva, N.R.R. Neurotoxic *Cylindrospermopsis* sp. Blooms in Brazilian waterbodies. INTERNATIONAL CONFERENCE ON TOXIC CYANOBACTERIA, 4., 1998, North Carolina: Beaufort, 1998, p.69.
- Namikoshi, M.; Sivonen, K.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W.; Rouhianen, L.L.; Luukainen, R.; Rinehart, K.L. Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. *Toxicon*, 30:1093, 1992a.
- Namikoshi, M.; Rinehart, K.L.; Sakai, R.; Stotts, R.R.; Dahlen, A.M.; Beasley, V.R.; Carmichael, W.W.; Evans, W.R. Identification of 12 hepatotoxins from Homer lake bloom of cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis viridis*, and *Microcystis wesenbergii*: nine new microcystins. *J. Org. Chem.*, 57:866-872, 1992b.
- Namikoshi, M.; Sivonen, K.; Evans, W.R.; Sun F.; Carmichael, W.W.; Rinehart, K.L. Isolation and structure of microcystin from cyanobacterial water bloom (Finland). *Toxicon*, 30(11):1473-1479, 1992c.
- Namikoshi, M.; Sivonen, K.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W.; Sun, F.; Rouhianen, L.L.; Luukainen, R.; Rinehart, K.L. Two new L-serine variants of microcystin-LR and -RR from *Anabaena* sp strain 202 A₁ and 202 A₂. *Toxicon*, 30:1457-1464, 1992d.
- Namikoshi, M.; Choi, B.; Sun F.; Rinehart, K.L.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W.; Chemical characterization and toxicity of dehydro derivatives of nodularin and microcystin-LR potent cyanobacterial cyclic peptide hepatotoxins. *Chem. Res. Toxicol.*, 6:151-158, 1993.
- Namikoshi, M. Rinehart, K.L.; Sakai, R.; Sivonen. K.; Carmichael, W.W. Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green algae) *Nostoc* sp strain 152. *J. Org. Chem.*, 55:6135-6139, 1990.

- Namikoshi, M.; Rinehart, K.L.; Dahlen, A.M.; Beasley, V.R.; Carmichael, W.W. Total synthesis of Adda, the unique c20 aminoacid of cyanobacterial hepatotoxins. *Tetrahedron Lett.*, 30:4349-4352, 1989.
- Nasseem, S.M.; Hines, H.B.; Creasia, D.A. Inhibition of microcystin-induced release of cyclooxygenase products from rat hepatocytes by anti-inflammatory steroids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 195:345-399, 1990.
- Neilan, B.A.; Stuart, J.L.; Goodman, A.E.; Cox, P.T.; Hawkins, P.R. Specific amplification and restriction polymorphism of the cyanobacterial rRNA operon spacer region. *Syst. Appl. Microbiol.*, 20:612-621, 1997.
- Nicholson, B.C.; Rositano, J.; Burch, M.; Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. *Water Res.*, 28:1297-1303, 1989.
- Nishiwaki-Matsushima, R. Ohta, T.; Nishiwaki, S.; Suganuma, M.; Kohyama, K.; Ishikawa, T.; Carmichael, W.W.; Fujiki, H. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 118:420-424, 1992.
- Nishiwaki, S.; Fujiki, H.; Suganuma, M.; Furuya-Suguri, H.; Matsushima, R.; Iida, Y.; Ojika, M.; Yamada, K.; Uemura, D.; Yasumoto, T.; Schimitz, F.J.; Sugimura, T. Structure-activity relationship within a series of okadaic acid derivatives. *Carcinogenesis*, 11:1837-1841, 1990.
- Ohta, T.; Nishiwaki, R.; Yatsunami, J.; Komori, A.; Suganuma, M.; Fujiki, H. Hyperphosphorylation of cyokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis*, 13:2443-2447, 1992.
- Ohtake, A.; Shirai, M.; Ainda, T.; Mori, N.; Harada, K-I.; Matsuura, K.; Suzuki, M.; Nakano, M. Toxicity of *Microcystis* species isolated from natural blooms and purification of the toxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55:3202-3207, 1989.
- Otsuka, S.; Suda, S.; Li, R.; Watanabe, M.; Oyaizu, H.; Matsumoto, S.; Watanabe, M.M. Phylogenetic relationship between toxic and non-toxic strains of the genus *Microcystis* based on 16S to 23S internal transcribed spacer sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 172:15-21, 1999.
- Philips, M.J.; Roberts, R.J.; Stewart, J.A.; Codd, G.A. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout, Saomogairderi Richardson. *J. Fish. Dis.*, 8:339-344, 1985.
- Pouchus, Y.F. Amzil, Z. Baut, C.M.; James K.J.; Verbist, J.F. Specificity of the test based on modification of cell morphology for detection of lipophilic inhibitors of protein phosphatases. *Toxicon*, 35(7):1137-1142, 1997.
- Pouria, S.; de Andrade, A.; Barbosa, J.; Cavalcanti, R.I.; Barreto, V.T.; Ward, C.J.; Preiser, W.; Poon, G.K.; Neild, G.H.; Codd, G.A. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*, 4(9121):21-26, 1998.
- Reynolds, C.S.; Jaworski, G.H.M.; Cmiech, H.A.; Leedale, G.F. On the annual cycle of the blue-green algae *Microcystis aeruginosa* Kütz emend. *Elekin. Philos Trans R Soc Biol Sci*, London, v.293, no.1068, p.419-477, 1981.
- Rinehart, K.L.; Namikoshi, M.; Choi, B. W. Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.*, 6:159-176, 1994.
- Rinehart, K.L.; Harada, K-I.; Namikoshi, M.; Chen, C.; Harvis, C.A.; Munroe, M.H.G.; Blunt, J.W.; Mulligan, P.E.; Beasley, V.R.; Dahlen, A.M.; Carmichael, W.W. Nodularin, microcystin and the configuration of Adda. *J. Am. Chem. Soc.*, 110:8557-8558, 1988.
- Rudolf-Bohner, S.; Mierke, D.F.; Moroder, L. Molecular structure of the cyanobacterial tumour-promoting microcystins. *FEBS Lett*, 349:319-323, 1994.
- Runnegar, M.T.C.; Falconer, I.R.; Jackson, A.R.B.; McInnes, A. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* cultures. *Toxicon*, 3:377-380, 1983.
- Schulte-Hermann, R.; Schuppler, J.; Ohde, G.; Timmermann-Trosiener, I. Effect of tumour promoters on proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver. In: Hecker, E.; Fusening, N. E.; Kunz, W.; Mars, F.; Thielmann, H.W. (Ed.). *Carcinogenesis*, 7:99-104, 1982.
- Shirai, M.; Ohtake, A.; Sano, T.; Matsumoto, S.; Sakamoto, T.; Sato, A.; Ainda, T.; Harada, K-I.; Shimada, T.; Suzuki, M.; Nakano, M.; Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures. *Appl. Env. Microbiol.*, 57:1241-1245, 1991.
- Sivonen, K.; Namikoshi, M.; Evans, W.R.; Färdig, M.; Carmichael, W.W.; Rinehart, K.L. Three new microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins from *Nostoc* sp strain 152. *Chem. Res. Toxicol.*, 5:464-469, 1992a.
- Sivonen, K.; Namikoshi, M.; Evans, W.R.; Gromov, B.V.; Carmichael, W.W.; Rinehart, K.L. Isolation and structure of five microcystins from a Russian *Microcystis aeruginosa* strain CALU 972. *Toxicon*, 30(11):1481-1485, 1992b.
- Sivonen, K.; Skulberg, O. M.; Namikoshi, M.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W.; Rinehart, K.L. Two methyl ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1. *Toxicon*, 30:1465-1471, 1992c.
- Sivonen, K.; Namikoshi, M.; Evans, W.R.; Carmichael, W.W.; Sun, F.; Rouhianen, L.; Luukkainen, R.; Rinehart, K.L. Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:2495-2500, 1992d.
- Skulberg, O.M.; Carmichael, W.W.; Codd, G. A.; Skulberg, R. Taxonomy of toxic Cyanophyceae (cyanobacteria). In: Falconer I. R. (Ed.). *Algal Toxins in Seafood and Drinking Water*. Cambridge: Academic Press, 1994. p.177-184.

- Stanier, R.Y.; Kunisawa, R.; Mendel, M.; Cohen-Bazine, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bact.*, 35:171-205, 1971.
- Stoner, R.D.; Adams, W.H.; Slatkin, D.N.; Siegelman, H.W. The effects of single L-aminoacids substitutions on the lethal potencies of microcystins. *Toxicon*, 27:825-828, 1989.
- Stotts, R.R.; Namikoshi, M.; Haschek, W.M.; Rinehart, K.L.; Carmichael, W.W.; Dahlen, A.M.; Beasley, V.R. Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* spp. *Toxicon*, 31:783-793, 1993.
- Sugaya, Y.; Yasuno, M.; Yanai, T. Effect of toxic *Microcystis viridis* and isolated toxins on gold fish. *Jpn. J. Limnol.*, 5:149-153, 1990.
- Sugiura, N.; Inamori, Y.; Hosaka, Y.; Sudo, R. Degradation and removal of organics from algae using microorganism. *Jpn. J. Water Sewage*, 36:49-53, 1994.
- Takahashi, S.; Kaya, K. Quail spleen is enlarged by microcystin-RR as a blue-green algal hepatotoxin. *Natural Toxins*, 1:283-289, 1993.
- Tencalla, F.; Dietrich, D. Biochemical characterization of microcystin toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicon*, 35(4):583-595, 1997.
- Toivola, D. M.; Omary, M.B.; Ku, N.O.; Peltola, O.; Baribault, H.; Eriksson J. E. Protein phosphatase inhibition in normal and keratin 8/18 assembly-incompetent mouse strains supports a functional role of keratin intermediate filaments in preserving hepatocyte integrity. *Hepatology*, 28(1):116-128, 1998.
- Tsuji, K.; Naito, S.; Kondo, F.; Ishikawa, N. Watanabe, M.F.; Suzuki, M.; Harada, K.I. Stability of microcystins from cyanobacteria: Effect of light on decomposition and isomerization. *Environ. Sci. Technol.*, 28(1):173-177, 1994.
- Tsuji, K.; Watanuki, T.; Kondo, F.; Watanabe, M.F.; Nakazawa, H.; Suzuki, M.; Uchida, H.; Harada, K.I. Stability of *Microcystis* from Cyanobacteria-IV- Effect of Chlorination on decomposition. *Toxicon*, 35(7):1033-1041, 1997.
- Utkilen, H.; Gjølme, N. Toxin production by *Microcystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:1321-1325, 1992.
- Van der Westhuizen, A.J.; Ellof, J.N. Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta*, 163:55-59, 1985.
- Watanabe, M.F.; Watanabe, M.; Kato, T.; Harada, K-I.; Suzuki, M. Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa* (blue-green algae, cyanobacteria). *Bot. Mag.*, 104:49-57, 1991.
- Watanabe, M.F.; Harada, K-I.; Matsuura, K.; Watanabe, M.; Suzuki, M. Heptapeptide toxin production during the batch culture of two *Microcystis* species (cyanobacteria). *J. Appl. Phycol.*, 1:161-165, 1989.
- Watanabe, M. F.; Oishi, S.; Harada, K-I.; Matsuura, K.; Kawai, H.; Suzuki, M. Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon*, 26:1017-1025, 1988.
- Watanabe, M. F.; Oishi, S. Effect of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Appl. Environ. Microbiology*, 49:1342-1344, 1985.
- Wicks, R.I.; Thiel, P.G. Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in a hypertrophic african reservoir. *Environ. Sci. Technol.*, 24:1413-1418, 1990.
- Williams, D.E.; Craig, M.; Dawe, S.C.; Kent, M.L.; Andersen, R.J.; Holmes, C.F.B.; 14C labeled microcystin-LT administered to atlantic salmon via intraperitoneal injection provides in vivo evidence for covalent binding of microcystin-LR in salmon livers. *Toxicon*, 35(6):985-989, 1997.
- Yoshizawa, S.; Matsushima, R.; Watanabe, M. F.; Harada, K-I.; Ichihara, A.; Carmichael, W.W.; Fujiki, H. Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 116(6):609-614, 1990.

Received on April 06, 2000.

Accepted on October 03, 2000.