

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
NÚCLEO DE PESQUISAS DE PRODUTOS NATURAIS
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS

**ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROCYSTINAS (HEPTAPEPTÍDEOS CÍCLICOS) ENCONTRADAS EM
UMA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS OCORRIDA NO
RESERVATÓRIO DO FUNIL (RESENDE, RJ).**

CLAUDIO ROBERTO RIBEIRO BOBEDA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, junto ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RIO DE JANEIRO - RJ
1993

ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROCYSTINAS (HEPTAPEPTÍDEOS CÍCLICOS) ENCONTRADAS EM
UMA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS OCORRIDA NO
RESERVATÓRIO DO FUNIL (RESENDE, RJ).

CLAUDIO ROBERTO RIBEIRO BOBEDA

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências, junto ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

RIO DE JANEIRO - RJ
1993

FICHA CATALOGRÁFICA

BOBEDA, C.R.R.

Isolamento, purificação e caracterização de microcystinas (heptapeptídeos cíclicos) encontradas em uma floração de cianobactérias ocorrida no Reservatório do Funil (Resende - RJ).

Claudio Roberto Ribeiro Bobeda. Rio de Janeiro, UFRJ, 1993.

Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Palavras-Chave: 1. Reservatório do Funil; 2. Cianobactéria; 3. *Microcystis aeruginosa*; 4. Microcystina; 5. Hepatotoxina; 6. Heptapeptídeos cíclicos. I. Bobeda, C.R.R. II. Título.

Orientadora:

Sandra M.F.O. Azevedo
Profa. Dra. Sandra M.F.O. Azevedo

"Que provem glória
E felicidade
Doce como o mel,
Aqueles que ousam".

A você Eliana, meu amor

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Sandra M.F.O. Azevedo pela amizade, confiança, orientação e dedicação na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Alfredo M.O. Filho pela amizade e pelo uso das instalações de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Antônio Jorge R. Silva pela utilização dos equipamentos da Central Analítica.

Ao Prof. Dr. Walter B. Mors pela revisão deste trabalho.

À Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente (FEEMA), nas pessoas de Gisele Glaucia e José Roberto pela valorosa colaboração na realização das coletas dos dados físico-químicos e amostras do fitoplâncton.

À Débora, Ana Cláudia, Simone, Aline, Renato, Luciana, Raquel e Patricia pela paciência, auxílio e companheirismo nos bons e nos maus momentos.

Ao Luiz Otávio pela amizade e paciência dispensada durante as consultas nas áreas de informática e estatística.

À Marlí, Elza, Celso, Elizabete, Servaas, Joaquim e Cosme pela amizade e apoio dispensados.

À Maria Eliza pela amizade e carinho ao longo da realização de nossos trabalhos.

À Elimar e Cristina pela amizade e atenção dispensadas.

Ao CNPq e CAPES pelo suporte financeiro necessário ao desenvolvimento deste trabalho.

A meus pais e familiares pelo apoio e incentivo.

A Deus por me permitir a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

GLOSSÁRIO	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1) INTRODUÇÃO	1
1.1) CONSIDERAÇÕES GERAIS	1
1.2) TOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS	2
1.2.1) NEUROTOXINAS	5
1.2.2) HEPATOTOXINAS	8
1.3) TOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS - ASPECTOS ECOLÓGICOS	16
1.4) LOCAL DE ESTUDOS	19
2) OBJETIVOS	22
3) MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1) ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA ÁGUA	23
3.2) COLETA E ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DO FITOPLÂNCTON	26
3.3) TESTES DE TOXICIDADE	27
3.4) EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS HEPATOTOXINAS	28
3.5) CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS HEPATOTOXINAS	30
3.5.1) ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS	30
3.5.2) ESPECTROMETRIA DE MASSAS - FABMS E FABMS/MS	31
4) RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1) ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA ÁGUA	32
4.2) ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DO FITOPLÂNCTON	43
4.3) TESTES DE TOXICIDADE	47
4.4) ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS HEPATOTOXINAS	49
4.4.1) ISOLAMENTO DAS HEPATOTOXINAS	49
4.4.2) ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS	54
4.4.3) ESPECTROMETRIA DE MASSAS - FABMS E FABMS/MS	57
5) CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
6) CONCLUSÕES	61
7) PERSPECTIVAS FUTURAS	62
8) BIBLIOGRAFIA	63
ANEXOS	88

GLOSSÁRIO

Ala (A)	- D-ALANINA.
Arg (R)	- L-ARGININA.
Asp (D)	- D-ÁCIDO- β -METIL-ASPÁRTICO.
ATP	- TRIFOSFATO DE ADENOSINA.
C ₁₈	- OCTADECILSILANO.
CG	- CROMATOGRAFIA GASOSA.
DL _{MIN}	- DOSE LETAL MÍNIMA.
DL ₅₀	- DOSE LETAL MÉDIA.
FABMS	- ESPECTROMETRIA DE MASSAS UTILIZANDO TÉCNICA DE BOMBARDEAMENTO POR ÁTOMOS RÁPIDOS.
FABMS/MS	- ESPECTROMETRIA DE MASSAS UTILIZANDO TÉCNICA DE BOMBARDEAMENTO POR ÁTOMOS RÁPIDOS E COLISÃO INDUZIDA.
Glu (E)	- D-ÁCIDO GLUTÂMICO.
GTP	- TRIFOSFATO DE GUANIDINA.
HPLC	- CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).
HPTLC	- CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA.
HTyr	- L-HOMOTIROSINA.
i.p.	- INTRAPERITONIAL.
Leu (L)	- L-LEUCINA.
MCYST	- MICROCYSTINA.
MeNH ₂	- METILAMINA.
Met (M)	- METIONINA.
NODLN	- NODULARINA.

Phe (F) - FENILALANINA.
PITC - ISOTIOCIANATO DE FENILA.
P.M. - PESO MOLECULAR.
Trp (W) - L-TRIPTOFANO
Tyr (Y) - L-TIROSINA.
u.m. - UNIDADES DE MASSA.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	- PAÍSES NOS QUAIS JÁ FOI DETECTADA A OCORRÊNCIA DE INTENSAS FLORAÇÕES E CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS.	4
FIGURA 2	- ESTRUTURAS PLANAS DAS NEUROTOXINAS JÁ CARACTERIZADAS. (a) ANATOXINA-a, (b) HOMOANATOXINA-a, (c) ANATOXINA-a(S) (d) SAXITOXINA, (e) NEOSSAXITOXINA.	7
FIGURA 3	- ALGUMAS DAS 40 ESTRUTURAS DE MICROCYSTINAS (MCYST) JÁ CARACTERIZADAS.	10
FIGURA 4	- ESTRUTURA PLANA DA HEPATOTOXINA NODULARINA (NODLN), PRODUZIDA POR <i>Nodularia spumigena</i>	12
FIGURA 5	- ESTRUTURAS PLANA DE MICROCYSTINA-LR (a) E MICROCYSTINA -RR (c) E SEUS RESPECTIVOS ISÔMEROS GEOMÉTRICOS NATURAIS (b) E (d).	13
FIGURA 6	- LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO RESERVATÓRIO DO FUNIL E DO PONTO DE COLETA.	19
FIGURA 7	- VARIAÇÃO DA TEMPERATURA E DA PENETRAÇÃO DE LUZ NA COLUNA D'ÁGUA, NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.	33
FIGURA 8	- VARIAÇÃO DO pH E DA CONDUTIVIDADE, NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.	35
FIGURA 9	- VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO E CLOROFILA <u>a</u> , NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.	38

- FIGURA 10 - VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO TOTAL DISSOLVIDO E FÓSFORO DISSOLVIDO, NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS. 40
- FIGURA 11 - VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO ORGÂNICO, ÍONS AMÔNIO, NITRITO E NITRATO, NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS. 42
- FIGURA 12 - VARIAÇÃO DA PERCENTAGEM DAS DIFERENTES DIVISÕES ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS FITOPLANCTÔNICAS COLETADAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS. 45
- FIGURA 13 - VARIAÇÃO DA PERCENTAGEM DAS DIFERENTES ESPÉCIES DA DIVISÃO *CYANOPHYTA* ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS DO FITOPLANCTÔNICAS COLETADAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS. 46
- FIGURA 14 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO TÓXICA 1 EXTRAÍDA DA AMOSTRA FITOPLANCTÔNICA COLETADA EM OUTUBRO/91, OBTIDA APÓS A SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. 50
- FIGURA 15 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO TÓXICA 2 EXTRAÍDA DA AMOSTRA FITOPLANCTÔNICA COLETADA EM OUTUBRO/91, OBTIDA APÓS A SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. 51

- FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO TÓXICA 3 EXTRAÍDA DA AMOSTRA FITOPLANCTÔNICA COLETADA EM NOVEMBRO/91, OBTIDA APÓS A SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. 52
- FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO TÓXICA 3 EXTRAÍDA DA AMOSTRA FITOPLANCTÔNICA COLETADA EM DEZEMBRO/91, OBTIDA APÓS A SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA. 53
- FIGURA 18 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDOS DURANTE A ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DA SUBSTÂNCIA 1, APÓS A SEPARAÇÃO DOS TIOCARBAMILAMINOÁCIDOS. 55
- FIGURA 19 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDOS DURANTE A ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DA SUBSTÂNCIA 2, APÓS A SEPARAÇÃO DOS TIOCARBAMILAMINOÁCIDOS. 55
- FIGURA 20 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDOS DURANTE A ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DA SUBSTÂNCIA 3, APÓS A SEPARAÇÃO DOS TIOCARBAMILAMINOÁCIDOS. 56
- FIGURA 21 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDOS DURANTE A ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DA SUBSTÂNCIA 4, APÓS A SEPARAÇÃO DOS TIOCARBAMILAMINOÁCIDOS. 56

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA	I	- CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DO RESERVATÓRIO DO FUNIL.	20
TABELA	II	- VALORES DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA ÁGUA NO PERÍODO DA FLORAÇÃO DE CICIANOBACTÉRIAS.	32
TABELA	III	- ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS DO FITOPLÂNCTON COLETADAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL DURANTE A FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.	43
TABELA	IV	- PERCENTAGEM DAS DIFERENTES DIVISÕES ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS FITOPLANCTÔNICAS COLETADAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL DURANTE A FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.	44
TABELA	V	- PERCENTAGEM DAS DIFERENTES ESPÉCIES DA DIVISÃO <i>CYANOPHYTA</i> ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS DO FITOPLÂNCTON COLETADAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL DURANTE A FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.	44
TABELA	VI	- TOXICIDADE DAS AMOSTRAS FITOPLANCTÔNICAS LIOFILIZADAS, COLETADAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL DURANTE A FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.	48
TABELA	VII	- RESULTADOS DAS ANÁLISES DE AMINOÁCIDOS DOS HEPTAPEPTÍDEOS TÓXICOS SEPARADOS DAS FRAÇÕES 1, 2, 3 E 4.	54
TABELA	VIII	- RESULTADOS DA ANÁLISE DE FABMS PARA AS SUBSTÂNCIAS 1, 2, 3 E 4.	58
TABELA	IX	- RESULTADOS DA ANÁLISE DE FABMS/MS PARA AS SUBSTÂNCIAS 1, 2, 3 E 4.	59

RESUMO

Muitas espécies de cianobactérias (cianofíceas) que comumente desenvolvem florações em ambientes aquáticos de água doce ou salobra são responsáveis por envenenamento animal e humano em muitos países. Embora não se tenha conhecimento de casos de envenenamento animal ou humano no Brasil, o aumento da eutrofização dos nossos reservatórios de água para abastecimento tem permitido o crescimento intenso de espécies de cianofíceas que podem ser produtoras de toxinas, nesses ambientes. Neste trabalho estudou-se a produção de toxinas por uma floração de cianobactéria que ocorreu no Reservatório do Funil, Resende, RJ., onde a espécie dominante era *Microcystis aeruginosa*, abordando os seguintes aspectos: 1) Verificação da ocorrência de hepatotoxinas nas amostras fitoplanctônicas da floração; 2) Isolamento e caracterização das hepatotoxinas detectadas. Os testes de toxicidade foram realizados através de bioensaios em camundongos. O isolamento e a caracterização das hepatotoxinas foram realizados por HPLC isocrático sobre fase reversa e análises de FABMS e FABMS/MS. A hepatotoxicidade da floração de cianobactérias apresentou uma correlação linear positiva com o percentual de *M. aeruginosa*, nas amostras de fitoplâncton. Duas hepatotoxinas produzidas pela floração foram isoladas e caracterizadas como microcystina-LR e [D-Glu(OCH₃)⁶-microcystina-LR, sendo esta última estrutura a primeira citação para a espécie *Microcystis aeruginosa*.

ABSTRACT

Several cyanobacteria species (blue-green algae) that usually present mass development in fresh and brakish waters have been described as responsible for animal and human intoxication in many countries. Although there are no confirmed poisoning cases of animals or humans by cyanobacterial water blooms in Brazil, the increase of eutrofication in our drinking water supplies have permitted abundant growth of cyanobacterial toxic strains in these environments. This work studies the toxin production by a cyanobacterial water bloom which occurred at "Reservatório do Funil", Resende, Rio de Janeiro where *Microcystis aeruginosa* was the dominant specie. We Verified the occurrence of hepatotoxin in the phytoplanktonic samples and isolated and characterized the hepatotoxins detected. Toxicity tests were carried out in mouse bioassays. The isolation and characterization of hepatotoxins were performed by isochratic HPLC, FABMS and FABMS/MS analysis. The hepatotoxicity of a water bloom had a positive linear correlation with *M. aeruginosa* cell percentages. Two hepatotoxin were isolated and characterized as microcystin-LR and [D-Glu(OCH₃)⁶]-microcystin-LR. This is the first time that the latter structure was identified from *Microcystis aeruginosa*.

1) INTRODUÇÃO:

1.1) CONSIDERAÇÕES GERAIS:

As cianobactérias, também denominadas cianofíceas (algas azuis), ocorrem em ambientes aquáticos marinhos, salobros e de água doce, podendo ainda ser encontradas em ambientes terrestres como biossimbiontes. Estes microorganismos procarióticos são fotossintetizantes. Alguns grupos são capazes de regular sua flutuação através da produção de vacúolos gasosos, o que permite a estes organismos migrarem para regiões da coluna d'água que possuam as condições de luz e nutrientes adequadas à manutenção de seu metabolismo, possuindo assim, vantagens competitivas sobre outras algas planctônicas (SIVONEN, 1990a; CARMICHAEL, 1992).

As cianobactérias têm sido estudadas por suas características morfológicas, seus mecanismos fotossintéticos e de fixação de nitrogênio, como também por produzirem uma ampla variedade de metabólitos secundários que podem, por exemplo, atuar como antibióticos ou antineoplásicos. Dentre estes, podem ser citados: acutificina, indolcarbazóis, mirabilenos, isonitrilas, paraciclofanos, escitoficinas, tantazóis, tolytoxinas e tubercidina. Estas substâncias têm sido identificados principalmente em gêneros das ordens *Nostocales* e *Stigonematales* (PATTERSON et al., 1991; FRANKMÖLLE et al., 1992; PATTERSON & CARMELI, 1992; HENNING et al., 1992).

Além destas substâncias, as cianobactérias podem produzir biotoxinas. Estas biotoxinas são a maior fonte de produtos naturais tóxicos encontrados em corpos d'água (CARMICHAEL, 1992), sendo que a ocorrência destas toxinas, relacionada com o florescimento intenso de cianobactérias, já é conhecida há mais de 100 anos (FRANCIS, 1878 - citado em MOORE, 1977).

1.2) TOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS:

Muitos gêneros de cianobactérias como *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria* e *Cylindrospermopsis*, que produzem toxinas, já tiveram seus produtos tóxicos estudados e caracterizados. Outros gêneros, como *Coelosphaerium*, *Fischerella*, *Gloeotrichia*, *Gomphosphaeria*, *Hapalosiphon*, *Microcoleus*, *Schizothrix*, *Scytonema*, *Symploca*, *Tolypothrix* e *Trichodesmium*, têm demonstrado toxicidade, porém não tiveram suas toxinas ainda caracterizadas (CARMICHAEL, 1992).

Todos estes gêneros, que apresentam um grande crescimento em ambientes de água doce ou salobra, têm sido responsáveis pelo aparecimento de intensas florações tóxicas, em corpos d'água eutrofizados ou hipereutrofizados, em muitos países (Figura 1), causando muitos casos de envenenamento animal e mesmo humano, ocorridos após a ingestão de água contendo células tóxicas de cianobactérias ou toxinas por elas

liberadas (GRANT & HUGHES, 1953; SIVONEN, 1990a; LAWTON & CODD, 1991; CARMICHAEL, 1992).

Diversos trabalhos têm sido realizados utilizando culturas de cianobactérias e bioensaios com animais de laboratório, objetivando elucidar o mecanismo de ação dessas biotoxinas, determinar sua estrutura química e possíveis aplicações farmacológicas (HUGHES et al., 1958; BISHOP et al., 1959; SHILO, 1967; MURTHY & CAPINDALE, 1970; DEVLIN et al., 1977; GORHAM & CARMICHAEL, 1979; SPIVAK et al., 1980; CARMICHAEL & BENT, 1981; RUNNEGAR et al., 1981; SLATIKIN et al., 1983; KRISHNAMURTHY et al., 1986; BROOK & CODD, 1987; HARADA et al., 1988a e b; MERILUOTO & ERICKSON, 1988; PAINULY et al., 1988; OOI et al., 1989; SIVONEN, 1989a, b e c; HARADA et al., 1990a e b; MERILUOTO et al., 1990a; SANDSTRON et al., 1990; SIVONEN et al., 1990b e c; FALCONER, 1991; HARADA et al., 1991; BRUNO et al., 1992; KIVIRANTA et al., 1992; NAMIKOSHI et al., 1992a, b e c; STTOTS et al., 1993).

Animais afetados com essas toxinas têm demonstrado indicações de envenenamento e lesão de tecidos nos sistemas gastrointestinal, hepático, neuromuscular, respiratório e cardiovascular (SCHWIMMER & SCHWIMMER, 1968; CARMICHAEL et al., 1975; KRISHNAMURTHY et al., 1986; SIVONEN, 1989a e b; FALCONER, 1991; LAWTON & CODD, 1991; CARMICHAEL, 1992).

- ÁFRICA
 - África do Sul
- AMÉRICA CENTRAL
 - Bermuda
- AMÉRICA DO NORTE
 - Canadá
 - Estados Unidos da América
- AMÉRICA DO SUL
 - Argentina
 - Brasil
 - Chile
- ÁSIA
 - Bangladesh
 - Índia
 - Israel
 - Japão
 - República Popular da China
 - Rússia
 - Tailândia
 - Ucrânia
- EUROPA
 - Alemanha
 - Dinamarca
 - Finlândia
 - França
 - Grécia
 - Holanda
 - Hungria
 - Itália
 - Noruega
 - Polônia
 - Portugal
 - Reino Unido
 - Suécia
 - Tchecoslováquia
- OCEANIA
 - Austrália
 - Nova Zelândia

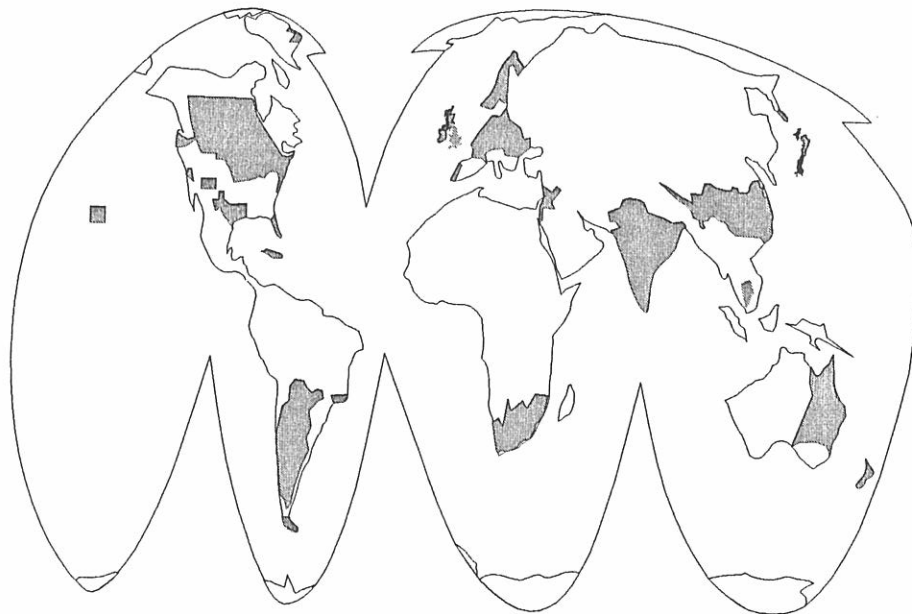


FIGURA 1 - PAÍSES NOS QUAIS JÁ FOI DETECTADA A OCORRÊNCIA DE INTENSAS FLORAÇÕES DE CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS (Baseada em GORHAM & CARMICHAEL, 1988).

Até agora, as biotoxinas podem ser separadas em dois grupos: aquelas que afetam o sistema nervoso, atuando como fatores de morte rápida, as **neurotoxinas**; e aquelas que afetam o sistema hepático, atuando como fatores de morte lenta, as **hepatotoxinas**.

1.2.1) NEUROTOXINAS:

As neurotoxinas já caracterizadas têm sido produzidas por espécies de cianobactérias incluídas nos gêneros *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria* e *Trichodesmium*, sendo conhecidas, até agora, cinco estruturas moleculares quimicamente definidas.

A primeira neurotoxina produzida por cianobactérias, quimicamente e funcionalmente definida, foi anatoxina-a, isolada de *Anabaena flos-aquae*. Esta biotoxina é uma amina secundária (Figura 2a), 2-acetil-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-eno, de massa molecular 165 daltons (HUBER, 1972; DEVLIN et al., 1977).

Este alcalóide neurotóxico atua fisiologicamente como um agente despolarizante neuromuscular, com efeito pós-sináptico sobre receptores nicotínicos, não sendo suscetível à hidrólise por acetilcolinesterase (CARMICHAEL et al., 1975, 1979; DEVLIN et al., 1977; COLLINS, 1978; CARMICHAEL & GORHAM, 1980; SPIVAK et al., 1980, 1983; CARMICHAEL & BENT, 1981; CARMICHAEL, 1992).

A produção de anatoxina-a também está associada com o crescimento intenso, em corpos d'água, de *Anabaena spiroides* ou *Anabaena circinalis*. Recentemente, SIVONEN et al. (1989a) demonstrou que *Oscillatoria* sp e *Aphanizomenon flos-aquae* também produzem anatoxina-a e SKULBERG et al. (1992) isolou um homólogo metilênico natural de anatoxina-a, denominado homoanatoxina-a (Figura 2b). Este homólogo possui uma toxicidade menor que anatoxina-a.

Outra neurotoxina produzida por espécies do gênero *Anabaena* foi definida estruturalmente por MATSUNAGA et al. (1989): Esta foi denominada anatoxina-a(s) (CARMICHAEL & GORHAM, 1978). Anatoxina-a(s) é um fosfato de N-hidroxiguanidina e metila, de massa molecular 252 (m/z daltons) (Figura 2c), que se decompõe rapidamente em soluções alcalinas e atua farmacologicamente como uma anticolinesterase irreversível (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986, 1987; MAHAMOOD et al., 1988; COOK et al., 1989; MATSUNAGA et al., 1989; CARMICHAEL, 1992).

Estudos comparativos entre anatoxina-a(s) e o fluorfosfato de diisopropila (DFP), um organofosforado sintético e inibidor potente de acetilcolinesterase, demonstraram ser aquela biotoxina 22 vezes mais potente que o DFP (CARMICHAEL et al., 1990; CARMICHAEL, 1992).

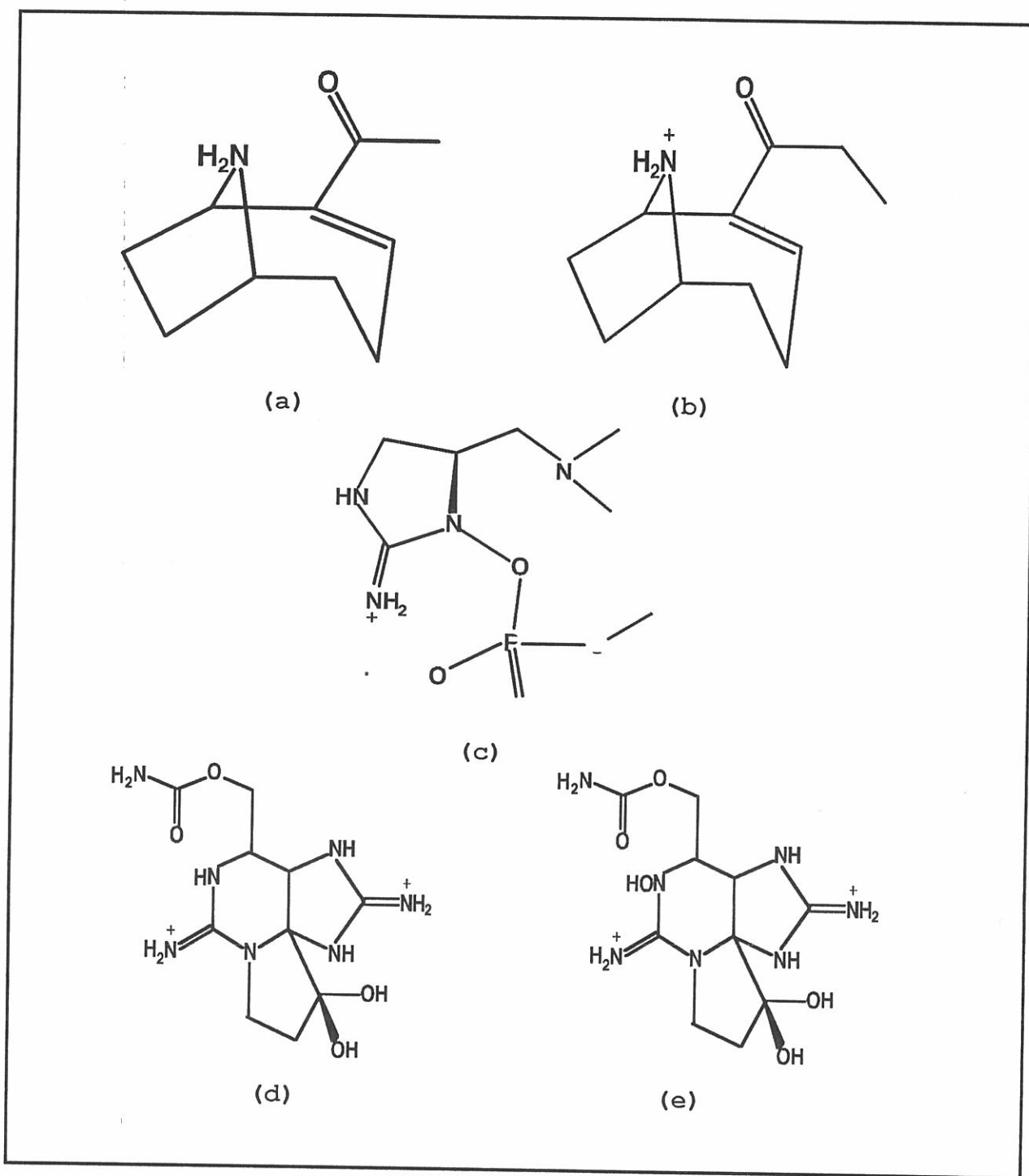


FIGURA 2 - ESTRUTURAS PLANAS DAS NEUROTOXINAS JÁ CARACTERIZADAS. (a) ANATOXINA-a, (b) HOMOANATOXINA-a, (c) ANATOXINA-a(S), (d) SAXITOXINA, (e) NEOSSAXITOXINA.

Este organofosforado natural possui propriedades semelhantes às das inseticidas organofosforados sintéticos; assim, é possível utilizar, terapêuticamente, atropina como antagonista de sua toxicidade (MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986; BEASLEY et al., 1989).

SAWYER et al. (1968) demonstrou que *Aphanizomenon flos-aquae* pode produzir duas outras neurotoxinas. Estas, posteriormente, foram identificadas estruturalmente como sendo saxitoxina e seu homólogo natural neossaxitoxina (Figuras 2d e 2e). Estas neurotoxinas foram encontradas, primeiramente, sendo produzidas por microalgas marinhas da divisão *Dinophyta*, os dinoflagelados (SASNER et al., 1984; MAHMOOD & CARMICHAEL, 1986; CARMICHAEL, 1992).

Saxitoxina e neossaxitoxina são neurotoxinas que inibem a condução nervosa, bloqueando os canais de sódio sem afetar a permeabilidade para o potássio, o potencial transmembrana ou a resistência da mesma (ADELMAN et al., 1982; CARMICHAEL, 1992).

1.2.2) HEPATOTOXINAS:

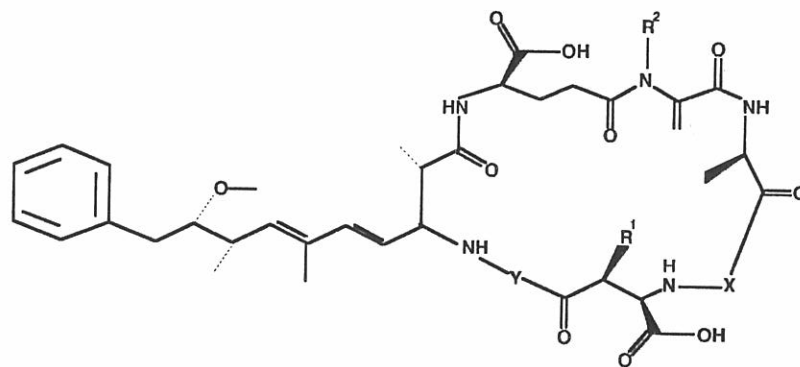
Hepatotoxicoses produzidas por hepatotoxinas são o tipo mais comum de toxicoses envolvendo cianobactérias. Estas toxinas são produzidas por várias espécies incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis*. Hepatotoxinas, quimicamente ainda não

definidas, são produzidas pelos gêneros *Aphanizomenon*, *Gloeotrichia* e *Coelosphaerium* (CARMICHAEL, 1992).

A primeira hepatotoxina a ser identificada como um peptídeo foi a biotoxina isolada de *Microcystis aeruginosa* (BISHOP et al., 1959). Esta toxina foi posteriormente denominada microcystina (MCYST) por KONST et al. (1965) e CARMICHAEL (1988).

Vários isolamentos de microcystinas foram realizados posteriormente (MURTHY & CAPINDALE, 1970; RABIN & DARBRE, 1975; TOERIEN et al., 1976; ELLEMAN et al., 1978; RUNNEGAR & FALCONER, 1981; SIVONEN et al., 1990b, 1992a e b; NAMIKOSHI et al. 1992a, b e c; STOTTS et al., 1993), demonstrando a existência de diferentes microcystinas e que cepas diferentes de uma mesma espécie seriam capazes de produzir tipos diferentes de microcystinas (BOTES et al., 1982a, b e c; ELLOF et al., 1982; SANTKARN et al., 1983; CARMICHAEL, 1992).

Microcystinas (Figura 3) são heptapeptídeos monocíclicos formados por D e L aminoácidos, que possuem a estrutura geral ciclo-D-Ala-L-X-éritro- β -metilisoAsp-L-Y-ADDA-D-isoGlu-N-metildesidroAla. Dois dos D aminoácidos são os inéditos N-metildesidroalanina (Mdha) e uma cadeia não polar de 20 átomos de carbono, com massa molecular 313 daltons, denominado ADDA (ácido 3-amino-9-metoxi-2,6,8-trimetil-10-fenil-deca-4,6-dienóico), um β -aminoácido. Os dois L aminoácidos, representados na estrutura geral por X e Y, diferem entre as diferentes microcystinas, sendo assim conhecidas, até agora, 40 estruturas químicas desse



		P.M.
MYCST-LA:	X = Leu; R ¹ = CH ₃ ; Y = Ala; R ² = CH ₃	909
MYCST-M(O)R	X = Met(O); R ¹ = CH ₃ ; Y = Arg; R ² = CH ₃	1028
MYCST-YA:	X = Tyr; R ¹ = CH ₃ ; Y = Ala; R ² = CH ₃	959
MYCST-LR:	X = Leu; R ¹ = CH ₃ ; Y = Arg; R ² = CH ₃	994
MYCST-FR:	X = Phe; R ¹ = CH ₃ ; Y = Arg; R ² = CH ₃	1028
MYCST-AR:	X = Ala; R ¹ = CH ₃ ; Y = Arg; R ² = CH ₃	952
MYCST-YM:	X = Tyr; R ¹ = CH ₃ ; Y = Met; R ² = CH ₃	1018
MYCST-RR:	X = Arg; R ¹ = CH ₃ ; Y = Arg; R ² = CH ₃	1037
[D-Asp ³] MYCST-RR:	X = Arg; R ¹ = H; Y = Arg; R ² = CH ₃	1023
[D-Asp ³ , Dha ⁷] MYCST-RR:	X = Arg; R ¹ = H; Y = Arg; R ² = H	1009
MYCST-YR:	X = Tyr; R ¹ = CH ₃ ; Y = Arg; R ² = CH ₃	1044
MYCST-HtyrR:	X = Htyr; R ¹ = CH ₃ ; Y = Arg; R ² = CH ₃	1055
[D-Asp ³] MYCST-HtyrR:	X = Htyr; R ¹ = H; Y = Arg; R ² = CH ₃	1044
MYCST-WR:	X = Trp; R ¹ = CH ₃ ; Y = Arg; R ² = CH ₃	1067

FIGURA 3 - ALGUMAS DAS 40 ESTRUTURAS QUÍMICAS DE MICROCYSTINAS (MCOYST) JÁ CARACTERIZADAS (De acordo com CARMICHAEL, 1992).

heptapeptídeo, diferenciadas pela variação de seus L aminoácidos, com dose letal média (DL₅₀) variando de 50-250 µg/Kg, (i.p.) em camundongos (BOTES et al., 1985; KRISHNAMURTHY et al., 1986; HARADA et al., 1988a; MERILUOTO & ERICKSON, 1988; PAINULY et al., 1988; RINEHART et al., 1988; OOI et al., 1989; HARADA et al., 1990a e b; MERILUOTO et al., 1990a; SIVONEN et al., 1990a e b; HARADA et al., 1991; CARMICHAEL, 1992; SIVONEN et al., 1992a e b).

Uma variação estrutural destes peptídeos hepatotóxicos é produzida pela cianobactéria *Nodularia spumigena*. A estrutura da toxina produzida por *N. spumigena* foi estabelecida como sendo um pentapeptídeo cíclico, de massa molecular 824 daltons, cuja estrutura química é ciclo D-éritro-β-metilAsp-L-Arg-ADDA-D-Glu-ácido-N-metil-desidro-aminobutírico, denominado nodularina (NODLN) (Figura 4), que possui propriedades toxicológicas semelhantes àquelas de microcystinas e DL₅₀ de 50 µg/Kg, (i.p.) em camundongos (SANDSTRÖM et al., 1990; SIVONEN et al., 1989b e c).

A síntese química do componente ADDA de microcystina LR mostrou ser este o responsável pela atividade biológica das hepatotoxinas. Ozonólise das ligações duplas de ADDA produziu este aminoácido livre mais o correspondente peptídeo cíclico e os bioensaios com esta última estrutura, em animais de laboratório, não demonstraram toxicidade alguma (NAMIKOSHI et al., 1989).

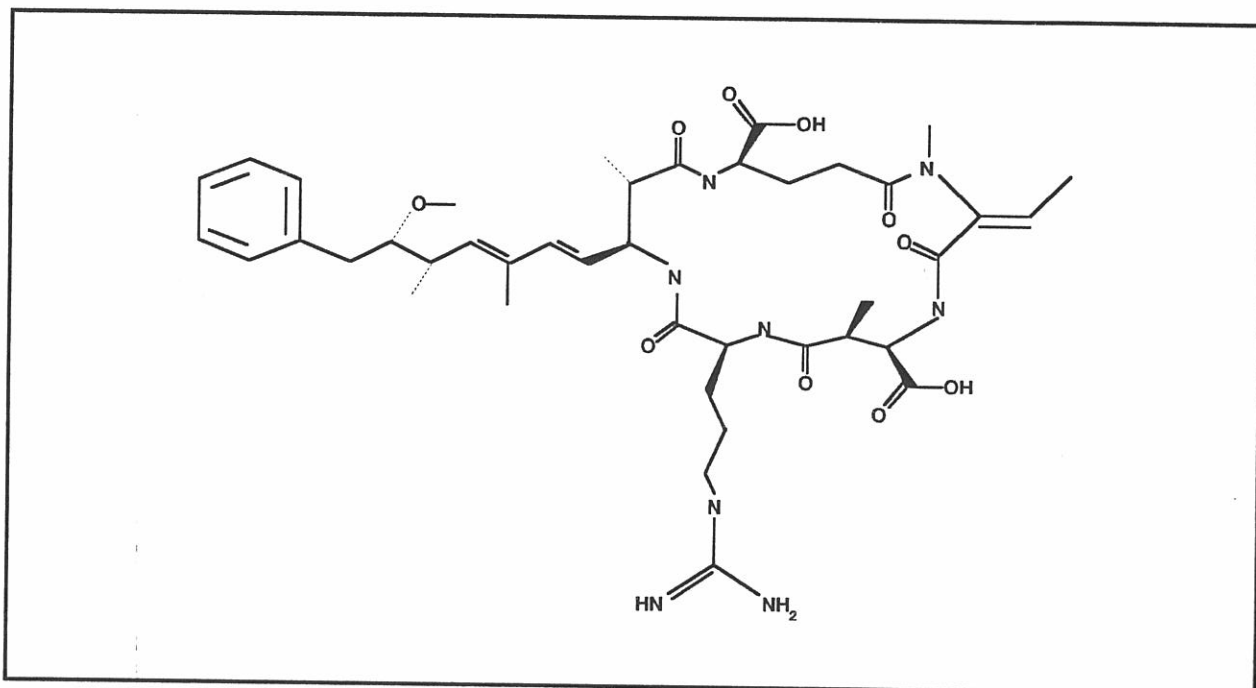


FIGURA 4 - ESTRUTURA PLANA DA HEPATOTOXINA **NODULARINA** (NODLN), PRODUZIDA POR *Nodularia spumigena* (De acordo com CARMICHAEL, 1992).

Outros estudos da relação estrutura/função de ADDA demonstraram a importância deste β -aminoácido na atividade biológica de microcystinas. Durante a purificação de microcystina LR e RR, por HPLC, foram isolados seus isômeros geométricos naturais; a isomerização estava localizada na posição C-8 de ADDA (Figura 5). Estes isômeros não demonstraram toxicidade, quando administrados (i.p.) em camundongos (HARADA et al., 1990a e b).

Estudos biossintéticos (MOORE et al., 1991), realizados com precursores marcados, indicam que o esqueleto carbônico de ADDA resulta da condensação de fenilacetato com 4 acetatos e metilação C₁ da cadeia policetíidica nas posições C-2, C-6 e C-8, mostrando também que a unidade ácido

metilaspártico é formada a partir de acetato e piruvato, similar à biossíntese da leucina.

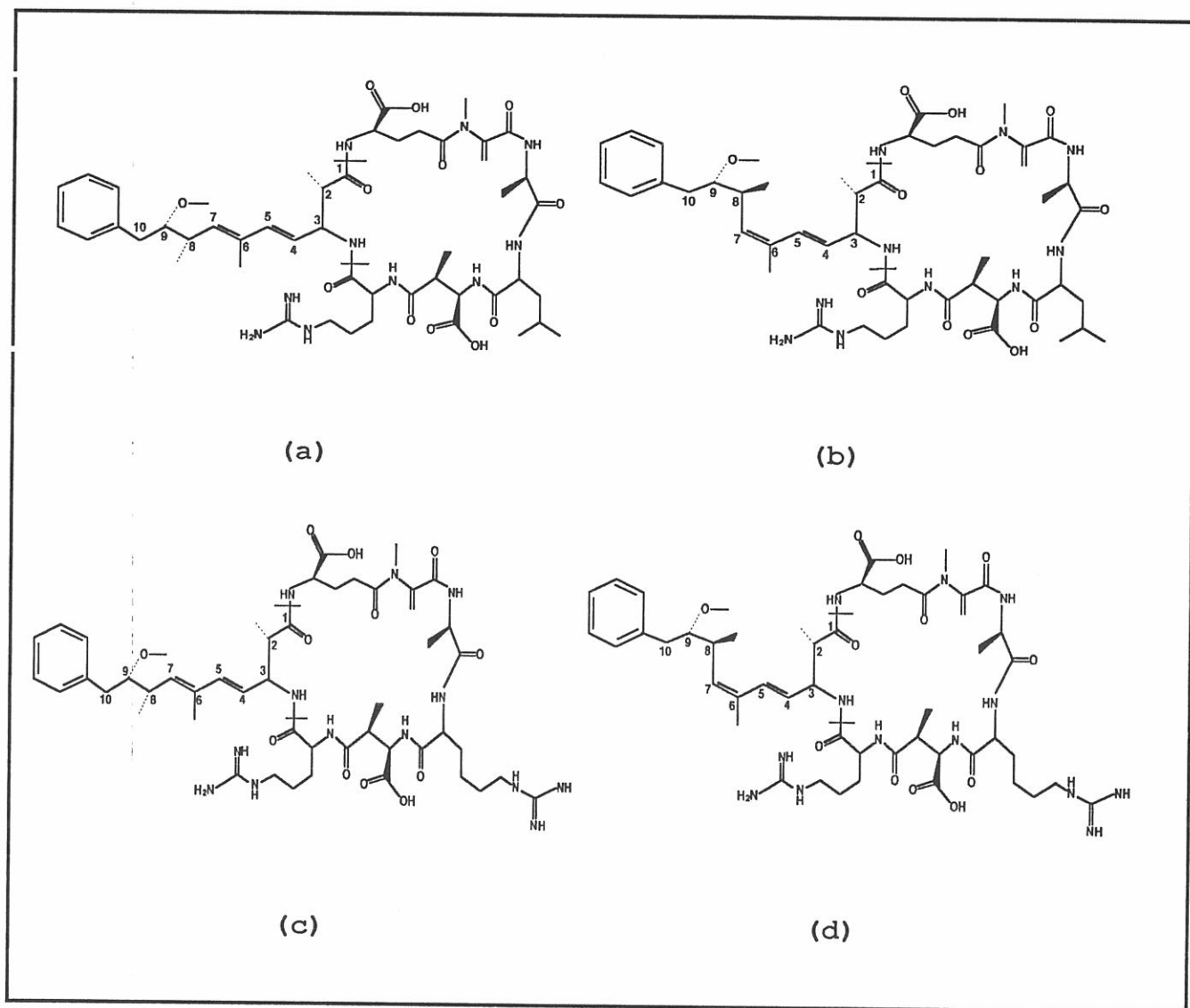


FIGURA 5 - ESTRUTURAS PLANAS DE MICROCYSTINA LR (a) E MICROCYSTINA RR (c) E SEUS RESPECTIVOS ISÔMEROS GEOMÉTRICOS NATURAIS NÃO TÓXICOS (b) E (d) (De acordo com CARMICHAEL, 1992).

Os sinais clínicos de hepatotoxicoses que têm sido observados em animais domésticos e selvagens incluem fraqueza, anorexia, palidez, vômito, resfriamento das extremidades e diarreia. A morte ocorre poucas horas ou poucos dias após a exposição inicial às hepatotoxinas e resulta de hemorragia intrahepática e choque hipovolêmico (BERG & SOLI, 1985a e b; CARMICHAEL & SCHWARTZ, 1984; THEISS et al., 1988; BEASLEY et al., 1989, CARMICHAEL, 1992), que fica evidenciado por um aumento de 100% do peso do fígado, verificado em testes com animais de laboratório.

O mecanismo de ação destas hepatotoxinas tem sido objeto de estudo em muitos laboratórios, porém baseado em BEASLEY et al. (1989) é possível sumariar uma seqüência de eventos que nos permita uma compreensão inicial do mesmo:

- 1º - A hepatotoxina seria absorvida para o sangue do íleo, já que nesta região do intestino existe grande atividade de ácidos biliares que transportariam a hepatotoxina através da mucosa intestinal (DAHLEM et al., 1988).
- 2º - Evidências demonstram que a toxina é transportada, preferencialmente, para os hepatócitos (RUNNEGAR et al., 1981; DABHOLKAR & CARMICHAEL, 1987; MERILUOTO et al., 1990b), acreditando-se que a absorção pelos hepatócitos seja feita com o auxílio dos ácidos biliares (RUNNEGAR et al., 1981; ERIKSSON et al., 1990).

- 3^o - A hepatotoxina induz mudanças nos microfilamentos de actina, um dos componentes do citoesqueleto celular, levando a uma desagregação destes próximo ao centro da célula (RUNNEGAR & FALCONER, 1986; ERICKSON et al., 1989; HOOSER et al., 1991). Este processo leva à perda de suporte celular pela destruição do sinusóide endotelial da célula. Com a destruição do parênquima e sinusóide celulares do fígado, ocorre hemorragia intra-hepática e/ou insuficiência hepática.
- 4^o - Diversos trabalhos têm demonstrado que microcystinas e nodularina são inibidores potentes e específicos de proteína fosfatases dos tipos 1 e 2A (PP1 e PP2A) (FALCONER & BUCLEY, 1989; ERICKSON et al., 1990; HONKANEN et al., 1990; MACKNITOSH et al., 1990).

Assim, microcystinas e nodularina podem atuar como aceleradoras do crescimento de tumores hepáticos e epiteliais, já que PP1 e PP2A são, provavelmente, as enzimas chaves na reversão de proteína quinases C (FALCONER, 1991; CARMICHAEL, 1992; NISHIWAKI-MATSUSHIMA, 1992).

Certos fármacos têm sido usados experimentalmente como antagonistas de hepatotoxicoses provocadas por microcystinas e nodularina, em animais de laboratório, como ciclosporina-A (HERMANSKEY et al., 1990a, 1991), rifampina (HERMANSKEY et al., 1990b, 1991) e silymarina (MEREISH et al., 1991). Estes antagonistas têm sido utilizados com sucesso quando administrados antes ou co-administrados com a

hepatotoxina, desconhecendo-se, até agora, como estes fármacos atuam sobre o mecanismo de ação tóxica das mesmas.

1.3) TOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS - ASPECTOS ECOLÓGICOS:

Poucos estudos têm sido realizados sobre os fatores que influenciam a produção de biotoxinas por cianobactérias, bem como sua função ecológica.

Até agora, a maioria dos estudos realizados objetivaram monitorar o nível de toxicidade dos vários gêneros através de bioensaios com animais de laboratório ou separação por cromatografia líquida ou gasosa (HPLC ou CG), além da identificação e quantificação das toxinas.

Os estudos focalizando a influência de fatores ambientais sobre a produção de toxinas por cianobactérias, em culturas de laboratório, incluem os efeitos de temperatura (GORHAM, 1964; RUNNEGAR et al., 1983; VAN DER WESTHUIZEN & ELOFF, 1985; WATANABE & OISHI, 1985; VAN DER WESTHUIZEN et al., 1986; CODD et al., 1989; SIVONEN, 1990d); luz (WATANABE & OISHI, 1985; CARMICHAEL et al., 1988; CODD & POON, 1988; SIVONEN, 1990d) e nutrientes, principalmente as diversas formas de nitrogênio e fósforo (AGUIAR et al., 1990; AGUIAR & AZEVEDO, 1991; SIVONEN, 1990d), pois a produção destas biotoxinas pode ser influenciada por fatores ambientais (nutrientes, luz, temperatura ou pH), como demonstrado pelo estudo de um monitoramento anual, feito por WICKS & THEIL (1990), em um reservatório hipereutrófico subtropical, durante o qual o nível

de produção de toxinas em uma floração de *Microcystis aeruginosa* variou de concentrações máximas no verão à baixíssimas concentrações no inverno. Estas variações correlacionaram-se com a produção primária por unidade de clorofila a, a intensidade luminosa, a temperatura da água, pH e percentagem de saturação de oxigênio na coluna d'água.

Todos estes estudos indicaram que as biotoxinas permanecem no interior das células (endotoxinas), só sendo liberadas quando ocorre lise celular, além de haver aumento de sua produção durante a fase logarítmica de crescimento celular e uma correlação positiva com a biomassa.

Alguns estudos ainda demonstraram que as condições de luz e temperatura ótimas para a produção destas biotoxinas variam de acordo com a cepa e a espécie de cianobactéria utilizada nas experiências.

Já foi observado também que numa mesma floração de cianobactérias coexistem variedades tóxicas e não tóxicas da mesma espécie. Isto poderia ser explicado como variações genéticas de uma mesma espécie coexistindo numa mesma floração (CARMICHAEL & GORHAM, 1981; REPAVICH et al., 1990; SIVONEN et al., 1990c; WATANABE et al., 1991).

Outro aspecto importante destas biotoxinas é sua importância ecológica. Alguns autores sugerem que estas toxinas sejam metabólitos protetores (CARMICHAEL, 1986). Outros demonstraram que microcystinas e nodularina são potentes agentes anti-herbivoria de invertebrados, em ambientes aquáticos (DEMOTT et al., 1991). GILBERT (1990) ainda

demonstrou o efeito diferencial de toxicidade de *Anabaena affinis* sobre cladóceros e rotíferos, que implicariam num padrão genético e evolucionário de desenvolvimento entre biotoxinas produzidas por cianobactérias e invertebrados aquáticos.

Embora ainda não tenhamos no Brasil relatos confirmados de envenenamento animal ou humano por florações de cianobactérias, o aumento da eutrofização de nossas águas de abastecimento, principalmente nos grandes centros urbanos, tem permitido o rápido crescimento de espécies desses organismos, que estão se tornando cada vez mais comuns em nossos corpos d'água (TUNDISI & MATSUMARA-TUNDISI, 1992). Além disso, todos os reservatórios que têm sido construídos nos últimos anos, apresentam as características ambientais necessárias ao desenvolvimento de florações de cianobactérias: alta intensidade luminosa, alta concentração de nutrientes, temperatura da água entre 15 e 30 °C e pouco movimento da coluna d'água.

Os estudos que vêm sendo realizados no Laboratório de Cultivo e Fisiologia de Microalgas do NPPN têm demonstrado a ocorrência de crescimento intenso de células tóxicas de *Microcystis aeruginosa* em corpos d'água do Estado do Rio de Janeiro. Estes organismos apresentaram dose letal mínima (DL_{MIN}) de 9-83 mg/Kg, quando testados através de injeção intraperitonal em camundongos (AGUIAR et al., 1993).

1.4) LOCAL DE ESTUDO:

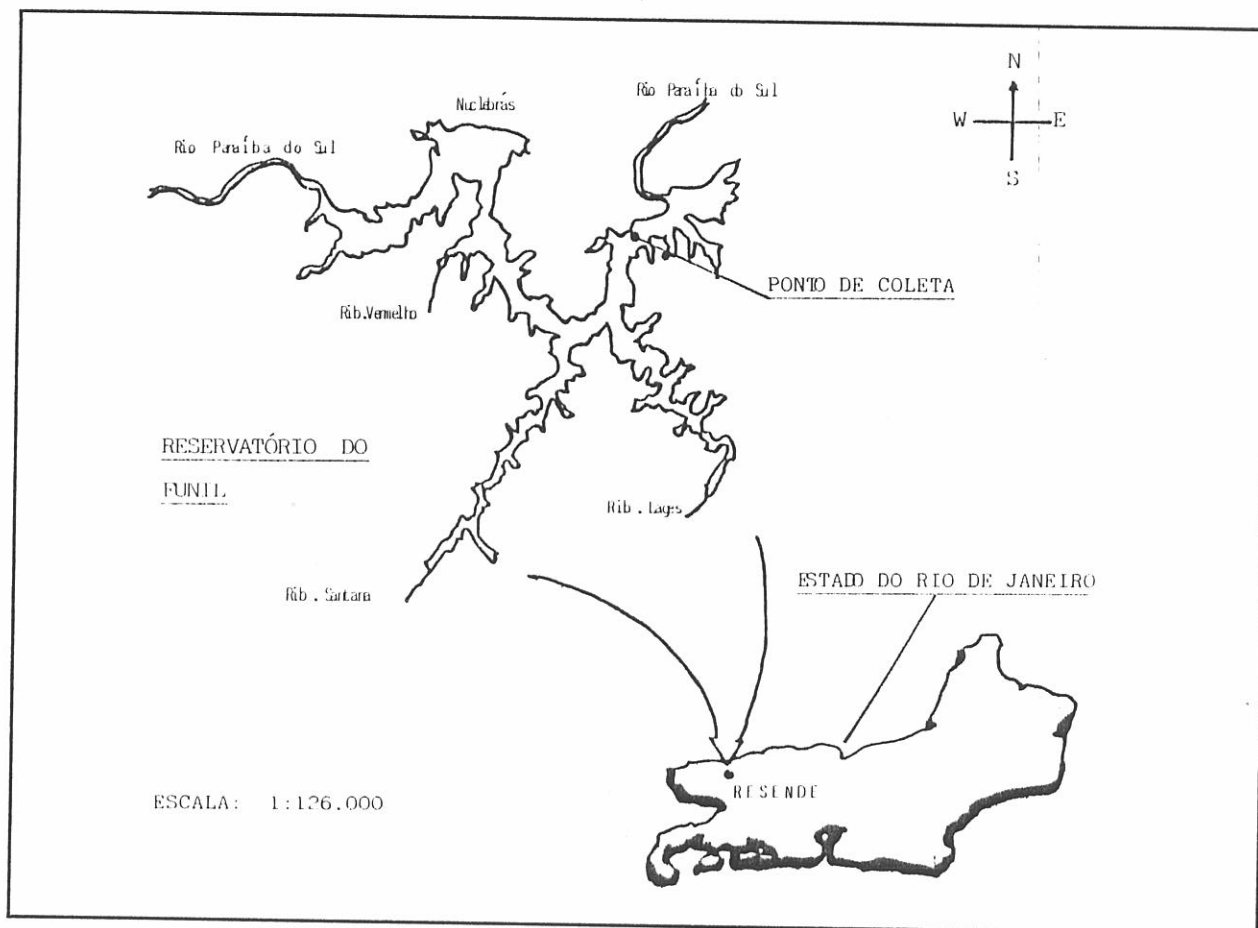


FIGURA 6 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DO RESERVATÓRIO DO FUNIL E DO PONTO DE COLETA.

O Reservatório do Funil situa-se no Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro ($22^{\circ}30'S$ de latitude; $44^{\circ}45'W$ de longitude), a uma altitude de 440 m (Figura 6). É um lago artificial construído com a finalidade direta de gerar energia elétrica, através da Usina Hidrelétrica de Funil, operada por Furnas Centrais Elétricas e integrar o Sistema Guandu de abastecimento de água do Município do Rio de Janeiro. As

características morfométricas do Reservatório do Funil são apresentadas na Tabela I.

TABELA I - CARACTERÍSTICAS MORFOMÉTRICAS DO RESERVATÓRIO DO FUNIL
(Feema, 1988).

ÁREA SUPERFICIAL	40 Km ²
ÁREA DA BACIA DE DRENAGEM	16800 Km ²
VOLUME TOTAL	890 · 10 ⁶ m ³
VOLUME ÚTIL	620 · 10 ⁶ m ³
PROFUNDIDADE MÉDIA	22 m
LARGURA MÁXIMA	2 Km
COMPRIMENTO MÁXIMO	25 Km
PERÍMETRO	320 Km

A bacia drenante ao Reservatório do Funil, formada pelo Rio Paraíba do Sul e inúmeros ribeirões, está em sua quase totalidade situada no Estado de São Paulo e é cerca de 400 vezes a área do Reservatório.

As atividades desenvolvidas à montante e o tipo de ocupação do solo exercem extrema influência sobre a qualidade da água no lago. No trecho paulista há um dos maiores parques industriais do país e seu conglomerado urbano. Grande parte dos seus efluentes industriais e domésticos atingem as águas do Rio Paraíba do Sul, que são represadas em Queluz, formando o Reservatório do Funil, que em virtude de mudanças no regime

hidrodinâmico neste trecho, acompanhado por um alto tempo de retenção hidráulica do lago, faz com que o Reservatório funcione como um sistema decantador de sólidos e nutrientes, retendo parcialmente as cargas provenientes do território paulista.

A importância deste Reservatório para o Estado do Rio de Janeiro é imensa, uma vez que ele controla a qualidade da água do Rio Paraíba do Sul, em território fluminense. Assim, a degradação ambiental vem gerando um intenso e gradativo fenômeno de eutrofização do lago, o que tem propiciado o desenvolvimento de intensas florações de cianobactérias, como aquela ocorrida de outubro a dezembro de 1991, na qual houve crescimento intenso de células de *Microcystis aeruginosa*, e que poderia ainda comprometer o abastecimento de água aos Municípios do médio Paraíba e de todas as cidades supridas pelo Sistema Guandu.

Em vista de tais fatos, acreditamos ser de fundamental importância a realização de um estudo que verifique a produção de hepatotoxinas pelas florações de cianobactérias que vêm ocorrendo regularmente nesse ambiente, bem como a extração, purificação e caracterização dessas biotoxinas.

Tal estudo certamente trará subsídios para a implantação, em nosso país, de uma metodologia que permita, de forma rápida e eficaz, identificar a presença destas biotoxinas em mananciais de abastecimento.

2) OBJETIVOS:

Este trabalho, que faz parte de um projeto amplo de detecção de espécies de cianobactérias tóxicas e monitoramento da produção de toxinas nos corpos d'água do Estado do Rio de Janeiro, teve por objetivos:

- 2.1) Verificar a ocorrência de hepatotoxina(s) nas amostras coletadas, no Reservatório do Funil, durante o período de floração de cianobactérias;
- 2.2) Isolar a(s) hepatotoxina(s) produzida(s) pela floração de cianobactérias;
- 2.3) Caracterizar a(s) hepatotoxina(s) produzida(s) pela floração de cianobactérias;

3) MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1) ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA ÁGUA:

As análises físico-químicas da água do Reservatório do Funil foram realizadas por técnicos da Divisão de Análises Biológicas da Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente (Feema).

Amostras de 10 l de água da camada subsuperficial (0 - 0,10 m) foram coletadas mensalmente, em frascos de polipropileno, no ponto de coleta indicado na Figura 6.

As análises das concentrações de nutrientes foram realizadas por espectrofotometria (espectrofotômetro Bausch & Lomb modelo 88) a partir de alíquotas retiradas de cada uma das amostras mensais previamente filtradas através de filtros de fibra de vidro 0,45 μm (Millipore), seguindo os procedimentos descritos no Standard Methods for the Examination of water and wastewater (APHA, 1985).

3.1.1) POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (pH):

As medidas de pH foram realizadas "in situ" com auxílio de potenciômetro Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (WTW), modelo pH 191.

3.1.6) CONCENTRAÇÃO DE FÓSFORO TOTAL DISSOLVIDO E FÓSFORO DISSOLVIDO ($\mu\text{g}/\text{l}$):

A concentração de fósforo total dissolvido foi determinada de acordo com o método de digestão com persulfato de amônio e reação com molibdato de amônio e ácido ascórbico (reagente misto) (APHA, 1985).

Para a determinação da concentração de fósforo dissolvido utilizou-se diretamente a reação com o reagente misto (APHA, 1985).

3.1.7) CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO ORGÂNICO ($\mu\text{g}/\text{l}$):

As determinações das concentrações de nitrogênio orgânico foram realizadas através do método de Kjeldahl (APHA, 1985).

3.1.8) CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO AMONIAL ($\mu\text{g}/\text{l}$):

Na determinação dos valores das concentrações de nitrogênio amoniacal foi utilizado o método do fenato (APHA, 1985).

3.1.2) CONDUTIVIDADE ($\mu\text{S}/\text{cm}$):

Os valores de condutividade foram medidos "in situ" com condutivímetro WTW, modelo LF 191.

3.1.3) CONCENTRAÇÃO DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO (mg/l) E TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$):

As concentrações de oxigênio dissolvido e as medidas de temperatura foram realizadas "in situ" por meio de um oxímetro WTW, modelo OXI 191.

3.1.4) PENETRAÇÃO DE LUZ NA COLUNA D'ÁGUA (m):

As medidas de penetração de luz na água foram realizadas "in situ", pela observação da profundidade na qual desaparece o disco de Secchi (um disco branco de 20 a 30 cm de diâmetro).

3.1.5) CONCENTRAÇÃO DE CLOROFILA a ($\mu\text{g}/\text{l}$):

A análise das concentrações de clorofila a foi realizada seguindo o procedimento descrito por STRICKLAND & PARSONS (1965), com leitura das absorvâncias a 666 nm corrigida para turbidez a 750 nm em espectrofotômetro Perkin Elmer modelo Coleman 55.

3.1.9) CONCENTRAÇÃO DE NITRATO ($\mu\text{g/l}$):

As concentrações de nitrato foram determinadas seguindo-se o procedimento do método do ácido fenildissulfônico (APHA, 1985).

3.1.10) CONCENTRAÇÃO DE NITRITO ($\mu\text{g/l}$):

As concentrações de nitrito foram obtidas seguindo-se o método de diazotação (APHA, 1985).

3.2) COLETA E ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DO FITOPLÂNCTON:

Amostras da população fitoplanctônica foram coletadas nos meses de outubro, novembro e dezembro de 1991, período de floração de cianobactérias no Reservatório do Funil.

O local de coleta foi o mesmo ponto de amostragem de água para as análises físico-químicas. As coletas foram feitas na camada subsuperficial (0 - 0,10 m), utilizando uma rede de fitoplâncton de 20 μm , por técnicos da Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente (Feema).

A análise qualitativa do fitoplâncton foi realizada em cada uma das amostras coletadas, por biólogos dessa mesma Fundação, com o auxílio de microscópio óptico Olympus modelo BH, sendo as espécies identificadas de acordo com BOURRELLY (1968, 1970 e 1972).

A análise quantitativa do fitoplâncton foi realizada utilizando o método de Utermöhl (UTHERMÖHL, 1958) com contagem em campos aleatórios, com auxílio de microscópio óptico invertido Wild modelo M-40.

O material fitoplanctônico de cada uma das amostras coletadas durante o período de floração das cianobactérias foi liofilizado e mantido a -18°C para posterior verificação da toxicidade, isolamento e caracterização das toxinas.

3.3) TESTES DE TOXICIDADE:

Os testes de toxicidade foram realizados através de bioensaios com camundongos Swiss, com pesos variando de 19 a 25 g, por injeção intraperitoneal (i.p.) do material coletado mensalmente, liofilizado e ressuspenso em solução de cloreto de sódio a 0,9%.

Foram feitas inoculações decrescentes até a observação da não ocorrência de morte, chegando-se à dose letal mínima (DL_{MIN}), confirmada com a inoculação em pelo menos três animais.

Todos os sintomas foram observados e o peso do fígado verificado logo após a morte do animal.

3.4) EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DAS HEPATOTOXINAS:

Hepatotoxinas produzidas por cianobactérias têm sido separadas através de métodos cromatográficos, os quais incluem cromatografia em camada fina de alta eficiência (HPTLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sendo em ambas as técnicas é utilizada a cromatografia com fase reversa, com octadecilsilano (C-18) como fase estacionária.

A extração das toxinas foi realizada pelo método de KRISHNAMURTHY et al. (1986), com modificações. Assim, 1,0 g do material coletado a cada mês sofreu extração com 100 ml de solução de MeOH/BuOH/H₂O (20:5:75 v/v), durante uma hora, à temperatura ambiente e com agitação.

Esta suspensão foi centrifugada por 30 minutos a 12.100 g, utilizando-se uma centrífuga SORVAL modelo RC2-B Super Speed com rotor SS-34, recolhendo-se o sobrenadante. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes com o precipitado.

Os sobrenadantes obtidos foram reunidos e tiveram seu volume reduzido à metade, por evaporação. Este extrato foi passado através de cartucho de octadecilsilano BOND ELUT C₁₈, sendo o material retido eluído com 50 ml de H₂O, seguida de 50 ml de soluções de 20% e 80% (v/v) de MetOH em água e por último com 50 ml de metanol 100%.

Cada uma dessas frações foi evaporada à secura e ressolubilizada em água desionizada para serem realizados os bioensaios, para a identificação da fração tóxica. Esses

bioensaios obedeceram à mesma metodologia descrita para o material celular liofilizado.

A separação das biotoxinas foi feita em duas etapas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em condições isocráticas e fase reversa (Bomba Waters modelo M-45, injetor U6K e registrador/ integrador Waters data module).

Na primeira etapa, foi utilizada uma coluna preparativa (BONDAPAK C₁₈, 125 Å, 15-20 µm, 19 mm x 30 cm - WATERS), com fase móvel de acetonitrila/acetato de amônio 20 mM (30:70 v/v) a pH 5, ajustado após a adição da acetonitrila, e fluxo de 4 ml/minuto.

Cada uma das frações obtidas foi testada para a verificação do efeito hepatotóxico, através de bioensaios, após serem evaporadas à secura e ressuspensas em 3 ml de água desionizada.

Numa segunda etapa, foi realizada a separação final das frações tóxicas em coluna analítica de octadecilsilano (ECONOSPHERE RP-18, 5 µm, 4,6 mm x 15 cm - MERCK), utilizando-se a mesma fase móvel com fluxo de 1 ml/ minuto.

A detecção das toxinas, em ambas as etapas, foi realizada com detector WATERS modelo 441 de comprimento de onda fixo a 254 nm.

As hepatotoxinas purificadas foram dessalinizadas passando-se as mesmas através de cartuchos de octadecilsilano BOND ELUT C₁₈. O material retido foi eluído com 100 ml de água desionizada e a toxina dessalinizada foi eluída com 50 ml de metanol 100%.

As toxinas foram secas por evaporação e guardadas a - 18 °C para posterior caracterização química.

3.5) CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS HEPATOTOXINAS:

3.5.1) ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS:

As análises de aminoácidos foram realizadas no laboratório do Prof. Wayne W. Carmichael - Departamento de Ciências Biológicas da Wright State University - Dayton - Ohio - E.U.A..

As hepatotoxinas purificadas foram hidrolisadas em HCl 6 N a 106 °C por 24 horas. Os aminoácidos obtidos foram derivatizados em uma pré-coluna de isotiocianato de fenila (PITC) e os fenilcarbamil-aminoácidos foram analisados por meio de um analisador Waters Pico-Tag/HPLC (KRISHNAMURTHY et al., 1986; CARMICHAEL .et al., 1988).

Os fenilcarbamil-aminoácidos foram separados através de coluna de octadecilsilano (4,6 mm x 15 cm) utilizando como eluente um gradiente de 0-60% de acetonitrila em solução aquosa 0,138 M de acetato de sódio, em 10 minutos. O fluxo utilizado foi de 1 ml/minuto e a detecção foi feita a 254 nm.

3.5.2) ESPECTROMETRIA DE MASSAS - FABMS E FABMS/MS:

As biotoxinas foram analisadas pelo Prof. Dr. Michio Namikoshi na Universidade de Illinois, Urbana - E.U.A..

A análise de FABMS foi realizada em espectrômetro de massas VG ZAB SE, utilizando como matriz "magic bullet" (ditiotreitól/ditioeritritól 1:3) (WHITTEN et al., 1984) e átomos de xenônio com 8KV de aceleração.

A análise de FABMS/MS foi obtida em espectrômetro de massas VG 70-SE4F utilizando hélio como gás de colisão com potencial de 4KV.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO:

4.1) ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA ÁGUA:

TABELA II - VALORES DAS ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA ÁGUA NO PERÍODO DE OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.

PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	MÊS DE COLETA		
	OUTUBRO/91	NOVEMBRO/91	DEZEMBRO/91
TEMPERATURA (°C)	26,0	29,0	29,6
pH	7,3	7,0	7,9
OXIGÊNIO DISSOLVIDO (mg/l)	7,8	11,1	9,0
PENETRAÇÃO DE LUZ NA COLUNA D'ÁGUA (m)	0,6	0,8	0,8
CONDUTIVIDADE (µS/cm)	73,0	48,0	40,7
CLOROFILA a (µg/l)	13,9	24,4	17,2
FÓSFORO TOTAL DISSOLVIDO (µg/l)	100	130	60
FÓSFORO DISSOLVIDO (µg/l)	40	60	20
NITROGÊNIO ORGÂNICO (µg/l)	600	1600	1400
NITROGÊNIO AMONÍACAL (µg/l)	9	50	60
NITRITO (µg/l)	20	10	10
NITRATO (µg/l)	700	40	110

4.1.1) TEMPERATURA E PENETRAÇÃO DE LUZ NA COLUNA D'ÁGUA:

Nas regiões tropicais, as variações sazonais de temperatura são reduzidas, principalmente porque há um período de iluminação aproximadamente constante de 12 horas por dia durante todo o ano.

No Reservatório do Funil, os valores de temperatura da água não sofreram variação acentuada, no período de estudo (Tabela II - Figura 7).

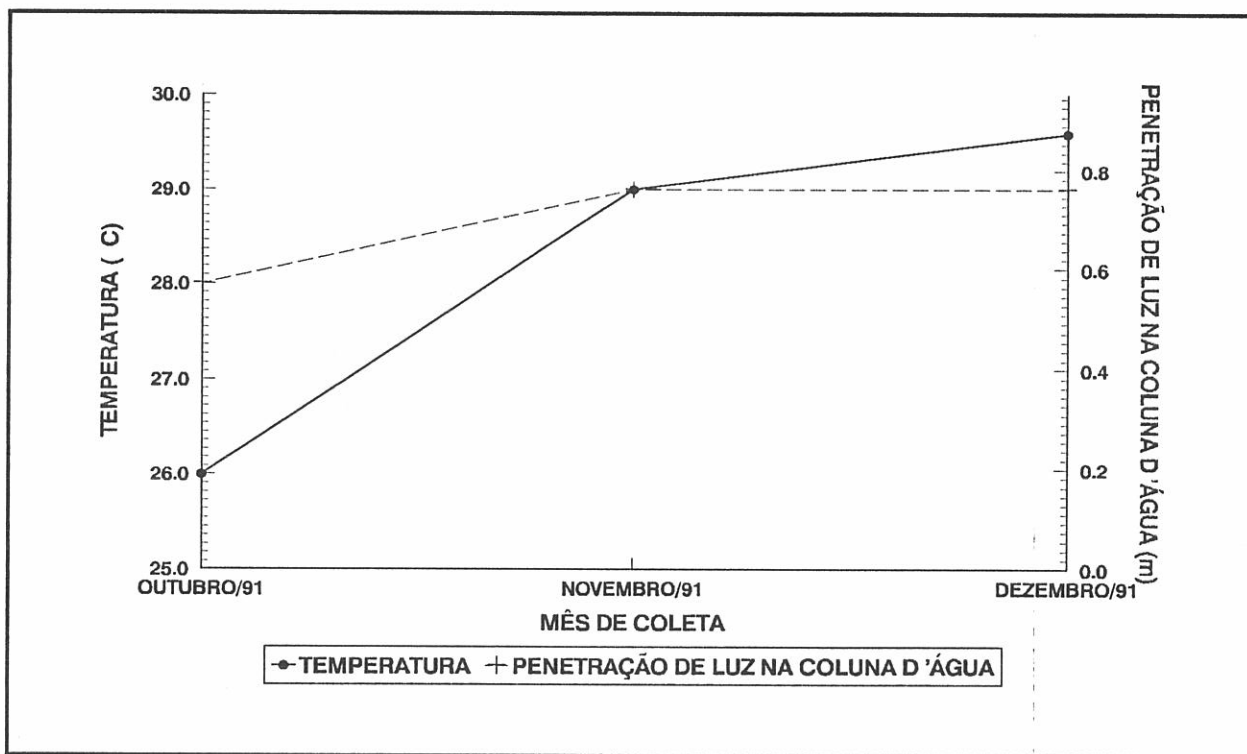


FIGURA 7 - VARIAÇÃO DA TEMPERATURA E DA PENETRAÇÃO DE LUZ DA COLUNA D'ÁGUA, NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.

A pequena variação observada ocorreu, possivelmente, devido a um aumento da intensidade luminosa que ocorre no final da primavera e início do verão, em regiões tropicais.

Este mesmo perfil térmico foi também observado, durante o mesmo período nos anos de 1989 e 1990.

Os valores obtidos para a transparência da água mostraram uma zona eufótica relativamente rasa, variando de 0,6 m em outubro a 0,8 m nos meses de novembro e dezembro (Tabela II; Figura 7), mantendo o mesmo perfil observado, de outubro a dezembro, nos dois anos anteriores.

A baixa penetração de luz nesse Reservatório pode ser atribuída possivelmente ao material alóctone carregado pelas chuvas e autóctone em suspensão, principalmente matéria orgânica particulada tanto na forma de detritos orgânicos e organismos planctônicos.

4.1.2) POTENCIAL HIDROGENIÔNICO E CONDUTIVIDADE:

O pH pode ser considerado como uma das variáveis ambientais mais importantes e ao mesmo tempo uma das mais difíceis de se interpretar. Esta complexidade na interpretação dos valores de pH se deve ao grande número de fatores que podem influenciá-lo.

Nos ambientes aquáticos, o pH pode ser influenciado, principalmente, pela dissociação do ácido carbônico, que gera

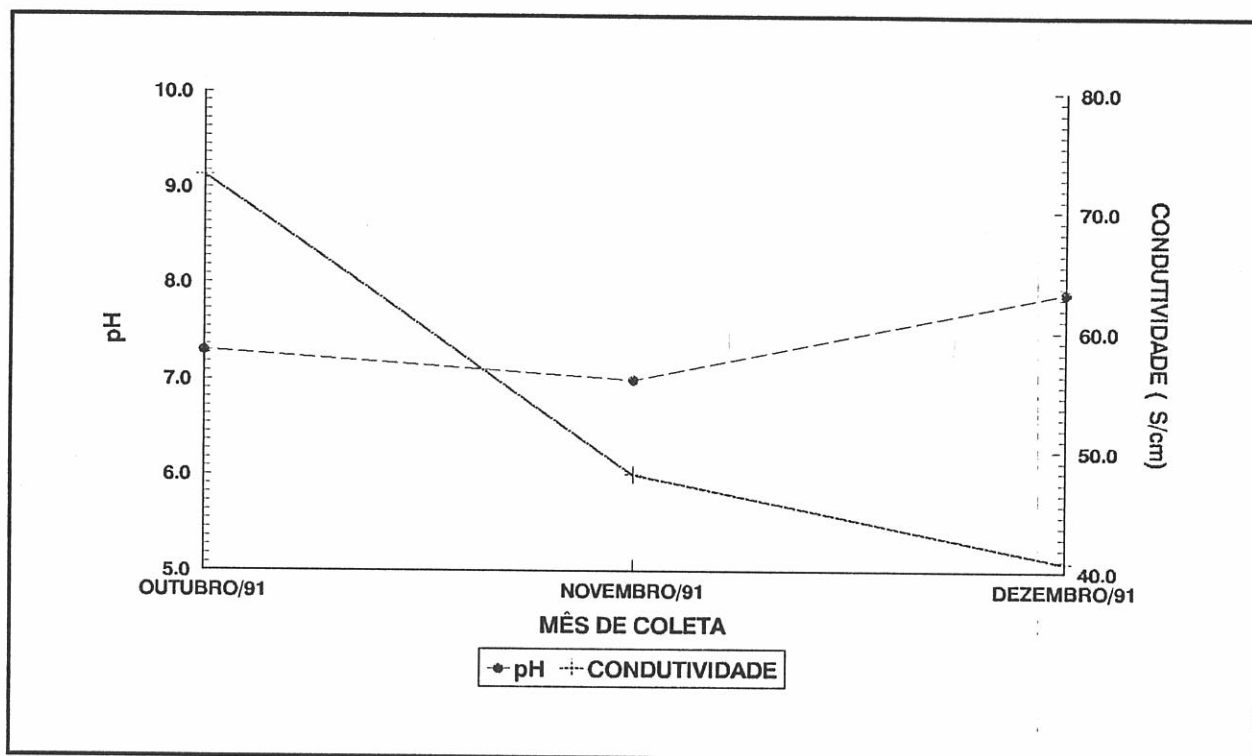


FIGURA 8 - VARIAÇÃO DO pH E DA CONDUTIVIDADE, NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.

valores baixos de pH e pelas reações dos íons carbonato e bicarbonato com a molécula de água, que elevam estes valores para a faixa alcalina (ESTEVES, 1988). A baixa variação dos valores de pH na faixa de 7 a 8, no período estudado (Tabela II - Figura 8), seguindo o mesmo perfil apresentado de outubro a dezembro dos anos de 1989 e 1990, indicam que o sistema aquático do Reservatório do Funil apresenta um mecanismo tamponante, onde o consumo de CO_2 por organismos fotossintetizantes deve ser compensado pela dissociação de bicarbonato de cálcio.

A condutividade da água reflete uma série de fatores relacionados ao ambiente aquático, entre os quais: sólidos em

suspensão e íons dissolvidos, sendo um índice básico utilizado na determinação ecológica de corpos d'água naturais e artificiais.

Os valores de condutividade de ambientes aquáticos de regiões temperadas são influenciados principalmente, pelo estado trófico do sistema aquático. Este parâmetro, entretanto, tem pouca influência sobre os valores da condutividade nos corpos d'água de regiões tropicais, os quais estão relacionados com as características geoquímicas e condições climáticas (estações seca e chuvosa) da região onde estão localizados esses ambientes (ESTEVES, 1988).

As medidas de condutividade demonstraram um perfil inverso daqueles observados durante o mesmo período nos anos de 1989 e 1990, com um valor em outubro de 73,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$, decrescendo para um valores de 48,0 $\mu\text{S}/\text{cm}$ em novembro e 40,7 $\mu\text{S}/\text{cm}$ em dezembro (Tabela II; Figura 8).

Embora neste período tenha ocorrido uma aumento da taxa pluviométrica, outros fatores não analisados podem ter sido preponderantes para o comportamento demonstrado pelos valores da condutividade, neste corpo d'água.

4.1.3) CLOROFILA a E OXIGÊNIO DISSOLVIDO:

Além de ser um dos principais pigmentos encontrados em organismos fotossintetizantes, sendo utilizada por estes para a captação de energia luminosa para o processo de fotossíntese, as análises de concentração de clorofila a podem

fornecer dados a respeito do estado metabólico desses organismos, além de ser muito utilizada na quantificação da biomassa fitoplanctônica de ambientes aquáticos.

Os valores da concentração de clorofila a obtidos no Reservatório do Funil apresentaram um perfil totalmente diferenciado (Tabela II; Figura 9), em relação ao mesmo período nos anos de 1989 e 1990, mostrando valor máximo de 24,4 $\mu\text{g/l}$ em novembro e valores inferiores de 13,9 e 17,2 $\mu\text{g/l}$, nos meses de outubro e dezembro, respectivamente. Estes valores são próximos aqueles apresentados durante o mesmo período do ano de 1990, porém são inferiores aqueles apresentados no ano de 1989, entretanto, segundo TUNDISI & MATSUMARA-TUNDISI (1992) indicam que o Reservatório do Funil é um ambiente aquático eutrofizado.

Dentre os gases dissolvidos na água, o oxigênio é um dos mais importantes na dinâmica e na caracterização de sistemas aquáticos. As principais fontes de oxigênio para a água são a atmosfera e o processo de fotossíntese.

Por outro lado, as perdas relacionadas a este gás são devidas ao consumo pela decomposição de matéria orgânica (oxidação), perdas para a atmosfera, respiração de organismos aquáticos e a oxidação de íons metálicos, como ferro e manganês.

Os níveis da concentração de oxigênio dissolvido encontrados no Reservatório do Funil foram 7,8, 11,1 e 9,0 mg/l , em outubro, novembro e dezembro de 1991, respectivamente (Tabela II - Figura 9). Estes valores estão próximos aos valores de concentração de oxigênio dissolvido encontrados em

outros sistemas aquáticos tropicais eutrofizados, como o Reservatório de Barra Bonita (SP) e Reservatório do Broa (SP) (TUNDISI, 1977, MATSUMARA-TUNDISI, 1992).

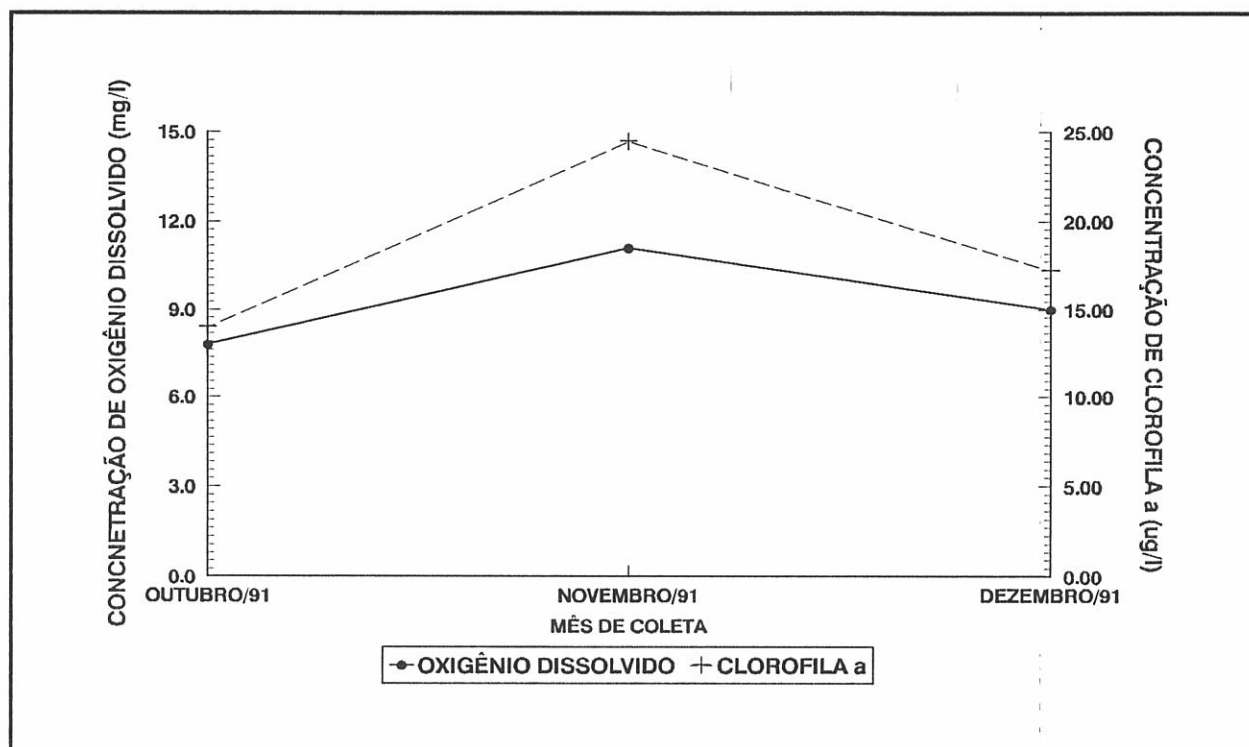


FIGURA 9 - VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO DISSOLVIDO E CLOROFILA a, NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.

Este perfil está claramente relacionado com o perfil encontrado para as medidas de concentração de clorofila a, mostrando uma correlação positiva das concentrações de oxigênio dissolvido com a atividade fotossintética da comunidade planctônica, no período estudado.

4.1.4) FÓSFORO DISSOLVIDO E FÓSFORO TOTAL DISSOLVIDO:

A importância do fósforo nos sistemas biológicos deve-se à participação desse elemento em processos fundamentais do metabolismo dos seres vivos, tais como o armazenamento de energia (ATP, GTP), bem como em funções estruturais, como por exemplo na membrana celular, através de fosfolipídios.

Na maioria das águas continentais, o fósforo, na forma de fosfato, é o principal fator limitante da produtividade, quer na forma de sal inorgânico ou na forma complexada, como éster.

No Reservatório do Funil, os valores das concentrações de fósforo dissolvido e fósforo total dissolvido foram respectivamente, 40,0; 60,0; 20,0 $\mu\text{g/l}$ e 100,0; 130,0; 60,0 $\mu\text{g/l}$, para fósforo dissolvido e fósforo total dissolvido, nos meses de outubro novembro e dezembro de 1991 (Tabela II), apresentando o mesmo perfil (Figura 10).

As concentrações relativamente baixas de íons fosfato podem ser conseqüência da oxigenação permanente da superfície deste corpo d'água e principalmente pela sua utilização pela comunidade fitoplanctônica principalmente cianobactérias, as quais desenvolveram-se intensamente durante o período estudado.

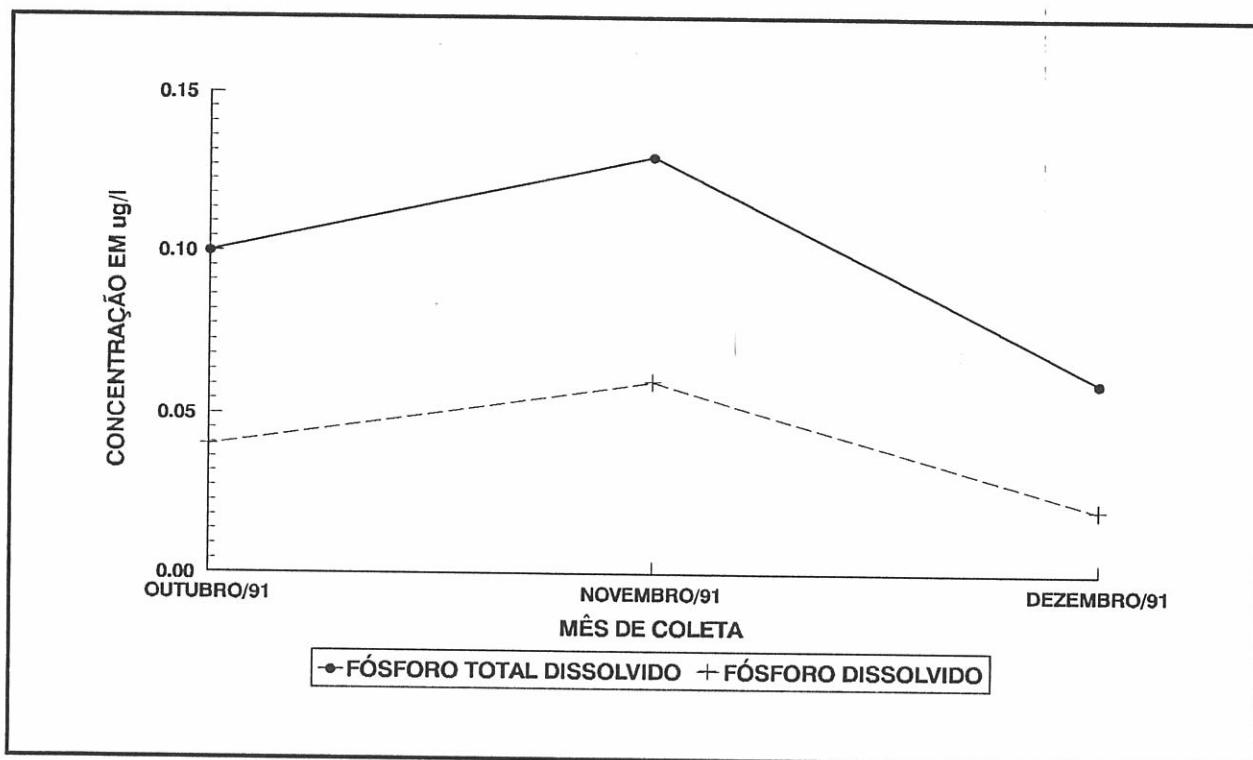


FIGURA 10 - VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FÓSFORO TOTAL DISSOLVIDO E FÓSFORO DISSOLVIDO, NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.

4.1.5) NITROGÊNIO AMONIACAL, NITRATO, NITRITO E NITROGÊNIO ORGÂNICO:

O nitrogênio é um dos elementos mais importantes para o metabolismo de ecossistemas aquáticos. Esta importância deve-se principalmente à sua participação na formação de proteínas, um dos componentes básicos da biomassa.

O nitrogênio está presente nos ambientes aquáticos sob diversas formas: nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), amônia (NH_3), íon amônio (NH_4^+), óxido nitroso (N_2O), nitrogênio molecular (N_2), nitrogênio orgânico dissolvido (peptídeos,

purinas, aminoácidos), nitrogênio orgânico particulado (bactérias, fitoplâncton, zooplâncton) (ESTEVEZ, 1988).

Os valores das concentrações de nitrito e nitrogênio amoniacal obtidos para os meses de outubro, novembro e dezembro foram 20,0; 10,0; 10,0 $\mu\text{g/l}$ e 9,0; 50,0; 60,0 $\mu\text{g/l}$, respectivamente (Tabela II). Estes dados demonstraram ser o sistema aquático do Reservatório do Funil um ambiente oxidante, pois o aumento da concentração de amônia é, provavelmente, decorrente da decomposição de matéria orgânica excretada ou liberada pela lise celular, uma vez que durante este período, observou-se também a diminuição do número de indivíduos na comunidade fitoplanctônica.

Os valores para as análises das concentrações de nitrato de outubro a dezembro de 1991 foram 700,0; 40,0 e 110,0 $\mu\text{g/l}$, respectivamente (Tabela II), observando-se portanto um decréscimo acentuado dessas concentrações de outubro para novembro e um aumento das mesmas em dezembro (Figura 11).

Isto se deve à utilização dessa forma nitrogenada pela comunidade fitoplanctônica, já que o crescimento intenso de cianobactérias estava ocorrendo no início do período estudado.

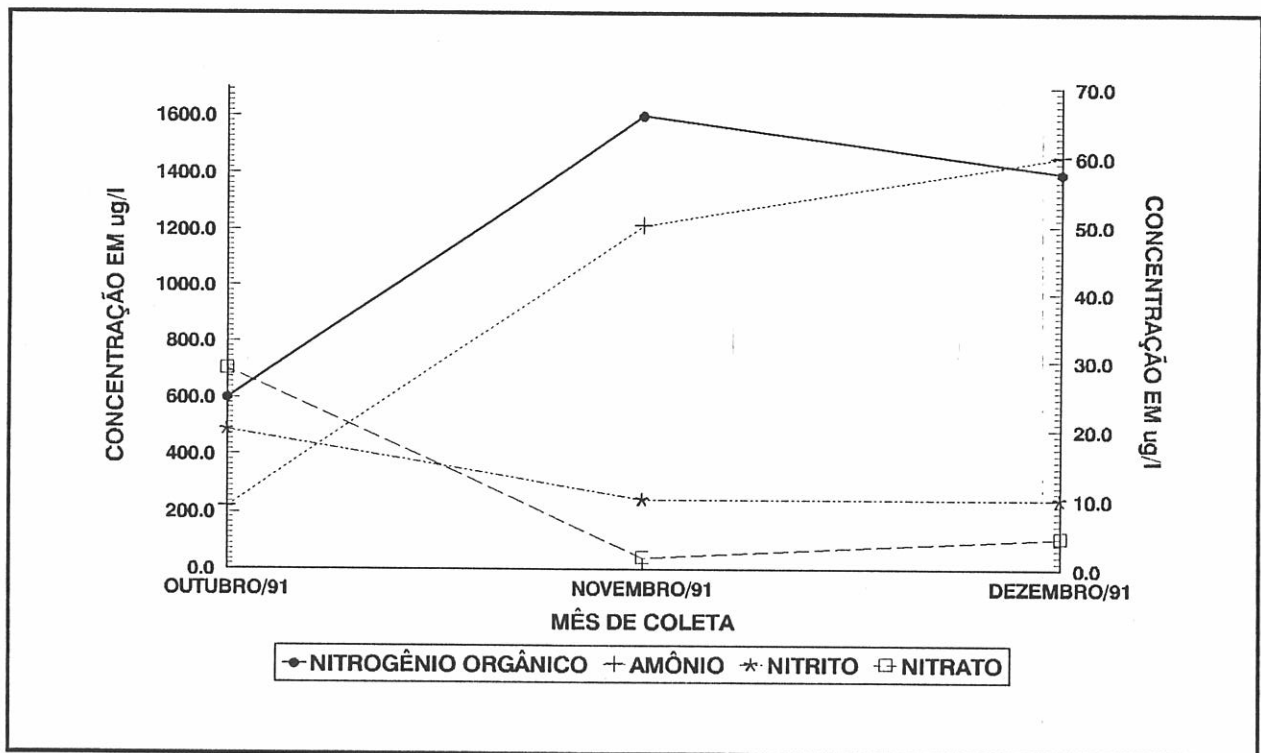


FIGURA 11 - VARIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE NITROGÊNIO ORGÂNICO, ÍONS AMÔNIO, NITRITO E NITRATO, NO RESERVATÓRIO DO FUNIL, DURANTE A OCORRÊNCIA DA FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.

Observa-se também que os valores da concentração de nitrogênio orgânico dissolvido crescem à medida que a concentração de íons nitrato decresce, como consequência do aumento do metabolismo da comunidade planctônica o que elevaria os níveis de excreção, decomposição e lise celular da mesma.

4.2) ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DO FITOPLÂNCTON:

TABELA III - ANÁLISE QUALI-QUANTITATIVA DAS AMOSTRAS DO FITOPLÂNCTON COLETADAS N
RESERVATÓRIO DO FUNIL DURANTE A FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.

DIVISÃO	NÚMERO DE ORGANISMOS/l		
	OUTUBRO/91	NOVEMBRO/91	DEZEMBRO/91
CYANOPHYTA			
<i>Microcystis aeruginosa</i> var. <i>flos-aquae</i>	4.377.464	214.400	50.250
<i>Merismopedia tenuissima</i>	22.334	26.800	351.750
<i>Microcystis</i> sp.		137.350	20.100
<i>Synechocystis</i> sp.			519.250
<i>Anabaena spiroides</i>	22.334	20.100	385.250
<i>Aphanizomenon</i> sp.		897.800	
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>		1.095.450	318.250
<i>Oscillatoria</i> sp.			33.500
CHLOROPHYTA			
Chlorococcales unicelular			16.750
Volvocalis		10.050	
<i>Closteriopsis longissima</i>		13.400	
<i>Monoraphidium contortum</i>	44.668	120.600	
<i>Monoraphidium</i> sp.			50.250
<i>Pyramimonas</i> sp.	44.668		
<i>Scenedesmus bijuga</i>			16.750
<i>Scenedesmus quadricauda</i>			16.750
<i>Scenedesmus</i> spp.			33.500
BACILLARIOPHYTA			
<i>Cyclotella stelligera</i>	44.668	6.700	
<i>Melosira distans</i>	22.334		
<i>Navicula</i> sp.	1.652.716	20.100	
<i>Synedra</i> sp.		10.050	
Não identificadas			16.750
CRYPTOPHYTA			
Cryptomonadales	111.670	16.750	251.250
NÚMERO TOTAL DE ORGANISMOS ANALISADOS	6.342.856	2.589.550	2.080.350

TABELA IV - PERCENTAGEM DAS DIFERENTES DIVISÕES ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS FITOPLANCTÔNICAS COLETADAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL DURANTE A FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS

DIVISÃO	PERCENTAGEM DE ORGANISMOS/l		
	OUTUBRO/91	NOVEMBRO/91	DEZEMBRO/91
CYANOPHYTA	70	92	81
CHLOROPHYTA	01	06	06
BACILLARIOPHYTA	27	01	01
CRYPTOPHYTA	02	01	12

TABELA V - PERCENTAGEM DAS DIFERENTES ESPÉCIES DA DIVISÃO CYANOPHYTA ENCONTRADA NAS AMOSTRAS DO FITOPLÂNCTON COLETADAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL DURANTE A FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.

DIVISÃO	PERCENTAGEM DE ORGANISMOS/l		
	OUTUBRO/91	NOVEMBRO/91	DEZEMBRO/91
CYANOPHYTA			
<i>Microcystis aeruginosa</i> var. <i>flos-aquae</i>	99	09	03
<i>Merismopedia tenuissima</i>	0,5	01	21
<i>Microcystis</i> sp.		06	01
<i>Synechocystis</i> sp.			31
<i>Anabaena spiroides</i>	0,5	01	23
<i>Aphanizomenon</i> sp.		37	
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>		46	19

A análise quali-quantitativa das amostras do fitoplâncton coletadas nos meses de outubro, novembro e

dezembro de 1991, demonstrou a presença de organismos das divisões *Cyanophyta*, *Chlorophyta*, *Bacillariophyta* e *Cryptophyta* (Tabela III).

Dentre essas, as cianofíceas (cianobactérias) mostraram ser predominantes durante todo o período estudado, com percentagens de 70, 92 e 81%, nos meses de outubro, novembro e dezembro, respectivamente (Tabela IV - Figura 13).

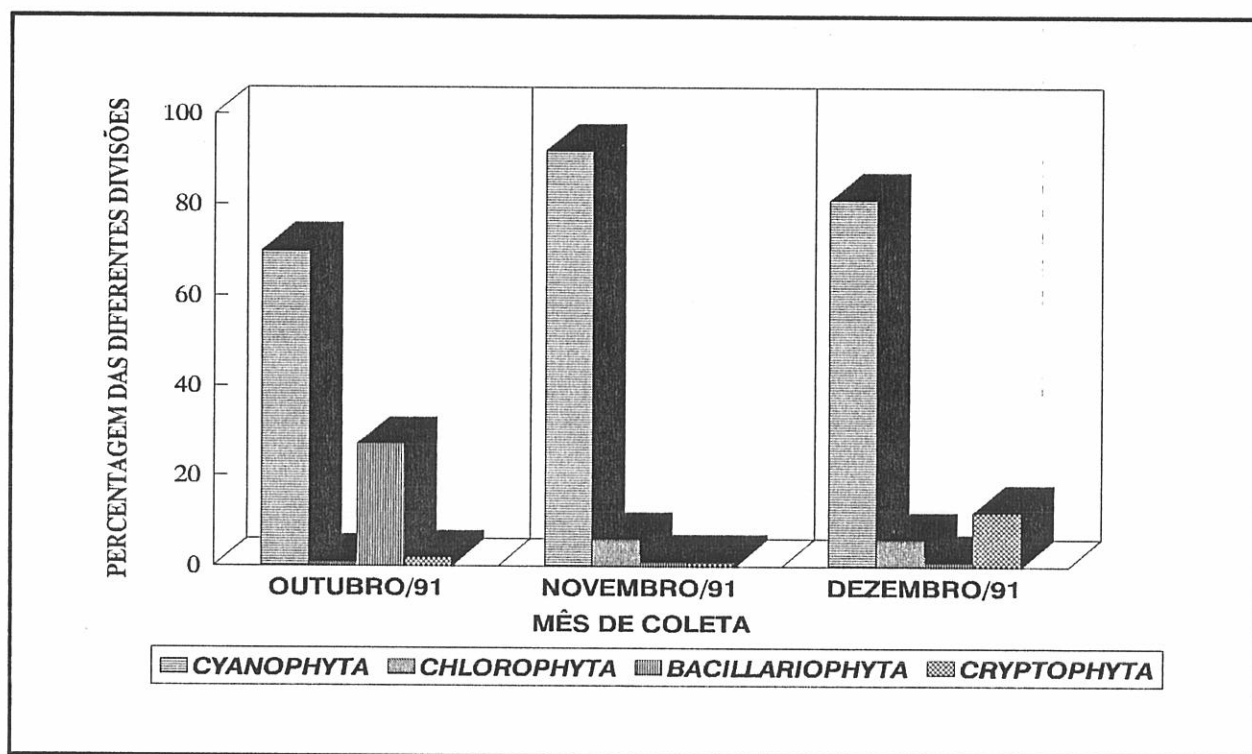


FIGURA 12 - VARIAÇÃO DA PERCENTAGEM DAS DIFERENTES DIVISÕES ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS FITOPLANCTÔNICAS COLETADAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL DURANTE A FLORAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.

Microcystis aeruginosa foi a espécie dominante na amostra do fitoplâncton coletada no mês de outubro/91, totalizando 99% dos organismos quantificados (Tabela V - Figura 14). Nas amostras coletadas nos meses de novembro/91 e dezembro/91 houve uma diversificação dos organismos da divisão Cyanophyta (Tabela VI - Figura 14).

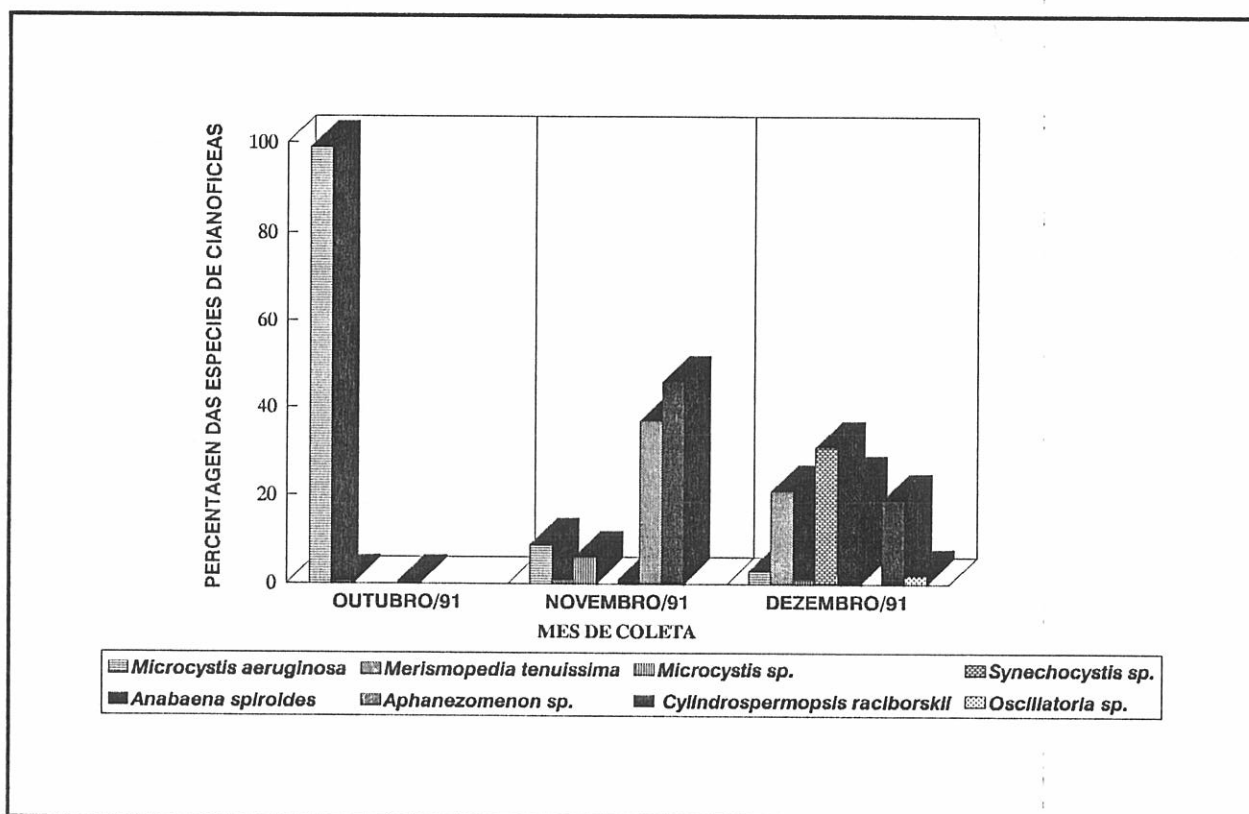


FIGURA 13 - VARIAÇÃO DA PERCENTAGEM DAS DIFERENTES ESPÉCIES DA DIVISÃO CYANOPHYTA ENCONTRADAS NAS AMOSTRAS DO FITOPLÂNCTON COLETADAS NO RESERVATÓRIO DO FUNIL DURANTE A FLORAÇÃO DE CIANOACTÉRIAS.

A predominância de cianofíceas deve ser consequência do grau de eutrofização adiantado no qual se encontra o Reservatório do Funil, que recebe elevado aporte de nutrientes, além de grande quantidade de material alóctone, os quais contribuem para diminuir a transparência da água, limitando a zona eufótica à uma camada de aproximadamente 1 metro da coluna d'água. Estes fatores contribuem para o crescimento de intensas florações de cianobactérias, que são microorganismos utilizados como indicação do nível trófico de ambientes aquáticos (ESTEVES, 1988; TUNDISI & MTSUMARA-TUNDISI, 1992).

4.3) TESTES DE TOXICIDADE:

Os bioensaios realizados com o material fitoplanctônico liofilizado, coletado nos meses de outubro, novembro e dezembro de 1991, demonstraram uma toxicidade decrescente no período estudado, apresentando respectivamente dose letal mínima (DL_{MIN}) de 26,47; 83,19 e 109,30 mg/Kg (Tabela VI).

Estes resultados apresentaram nenhuma correlação linear com o percentual de cianobactérias nesse período, porém, apresentaram correlação positiva com o percentual da espécie *Microcystis aeruginosa* ($r > 0,94$), que estava presente durante o período estudado.

TABELA VI - TOXICIDADE DAS AMOSTRAS FITOPLANCTÔNICAS LIOFILIZADAS COLETADAS
NO RESERVATÓRIO DO FUNIL DURANTE A FORMAÇÃO DE CIANOBACTÉRIAS.

INTERVALO DE DOSE INJETADA (mg/Kg)	DOSE INJETADA i.p. (mg/Kg)		
	OUTUBRO/91	NOVEMBRO/91	DEZEMBRO/91
400 - 500	487,80 (+)	452,48 (+)	497,50 (+)
201 - 300	232,50 (+)	235,84 (+)	251,20 (+)
101 - 200	-	-	109,30 (+)
91 - 100	98,52 (+)	91,00 (+)	93,00 (-)
81 - 90	-	83,19 (+)	89,00 (-)
71 - 80	-	75,80 (-)	77,00 (-)
51 - 70	52,08 (+)	51,00 (-)	55,50 (-)
41 - 50	-	43,10 (-)	-
31 - 40	32,67 (+)	-	-
25 - 30	26,47 (+)	-	-
21 - 24	21,00 (-)	-	-
10 - 20	16,09 (-)	-	-

(+) DOSE LETAL - OCORRÊNCIA DE MORTE

(-) DOSE SUB-LETAL - NÃO OCORRÊNCIA DE MORTE

Todos os animais utilizados no teste de toxicidade apresentaram os sintomas característicos de hepatotoxicoses

provocadas por microcystinas e nodularina, como: piloereção, irritabilidade, fraqueza, dificuldade de locomoção, prostração e palidez de orelhas, olhos e cauda, além de ocorrer o aumento de 100% do peso do fígado dos animais nos quais houve ocorrência de morte.

4.4) ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS HEPATOTOXINAS:

4.4.1) ISOLAMENTO DAS HEPATOTOXINAS:

As figuras 14, 15, 16 e 17 mostram os perfis cromatográficos obtidos após a separação das frações hepatotóxicas 1, 2, 3 e 4, em coluna preparativa (A) e em coluna analítica (B). As frações 1 e 2 foram extraídas da amostra fitoplanctônica coletada em outubro/91 e as frações 3 e 4 foram extraídas de amostras fitoplanctônicas de novembro/91 e dezembro/91, respectivamente.

As hepatotoxinas foram separadas nas frações 1, 2, 3 e 4, em coluna preparativa, com tempos de retenção de 30, 40, 40 e 40 minutos, respectivamente.

Em coluna analítica, as toxinas foram separadas com tempos de retenção de 2.5, 2.5, 2.5 e 5.5 minutos, respectivamente, nas frações 1, 2, 3 e 4.

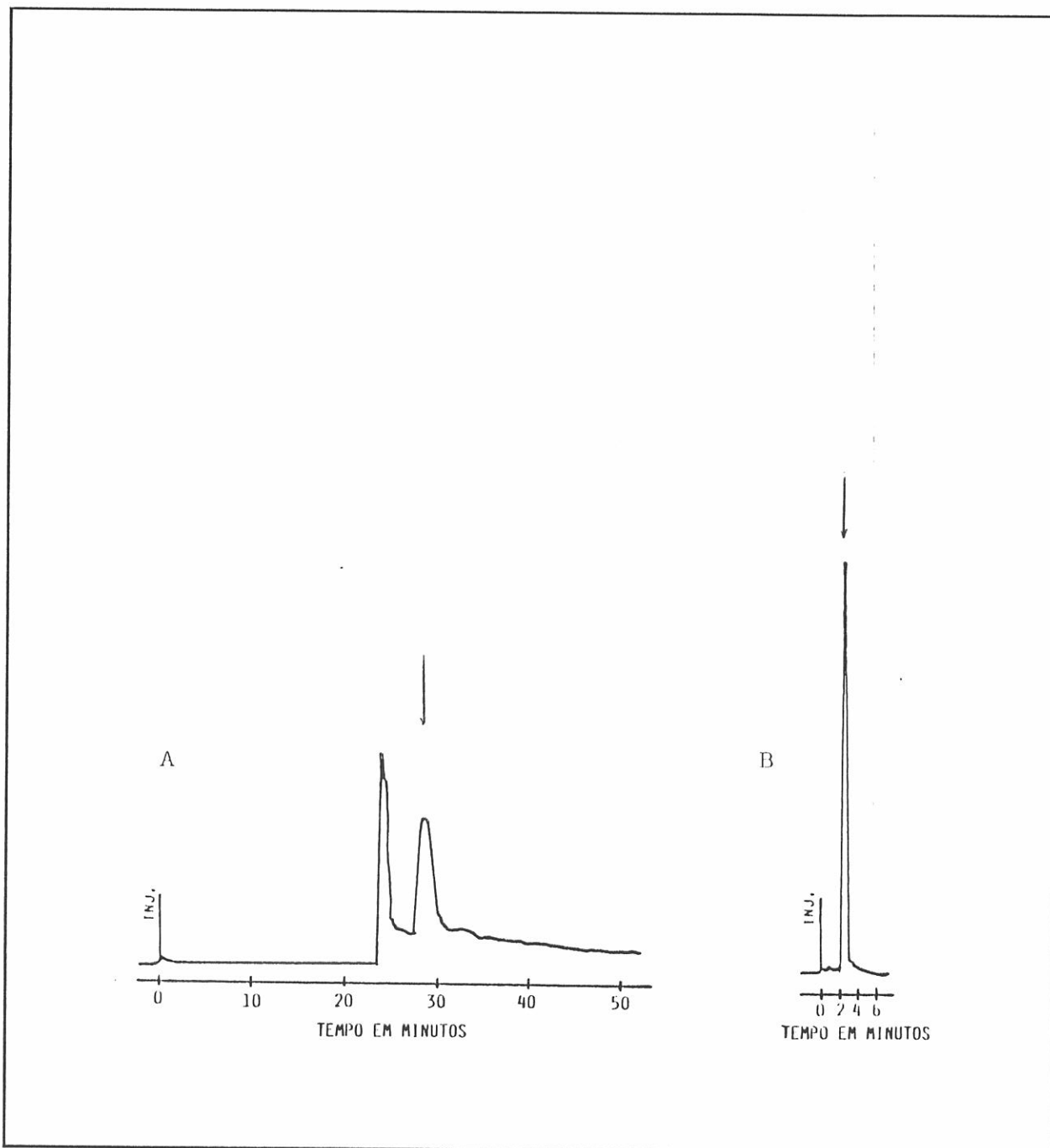


FIGURA 14 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO TÓXICA 1 EXTRAÍDA DA AMOSTRA FITOPLANCTÔNICA COLETADA EM OUTUBRO/91, OBTIDO APÓS SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).

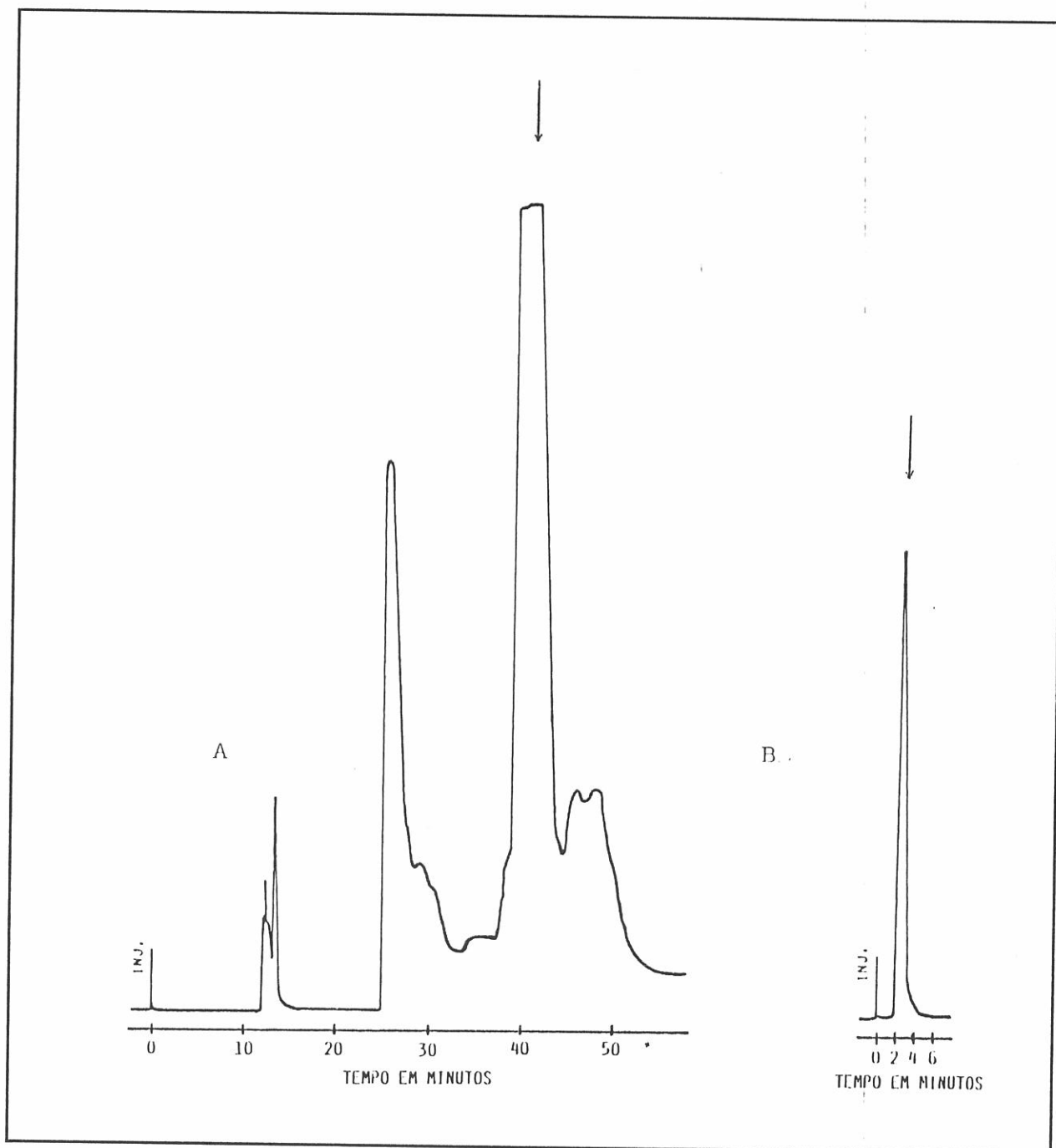


FIGURA 15 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO TÓXICA 2 EXTRAÍDA DA AMOSTRA FITOPLANCTÔNICA COLETADA EM OUTUBRO/91, OBTIDO APÓS SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).

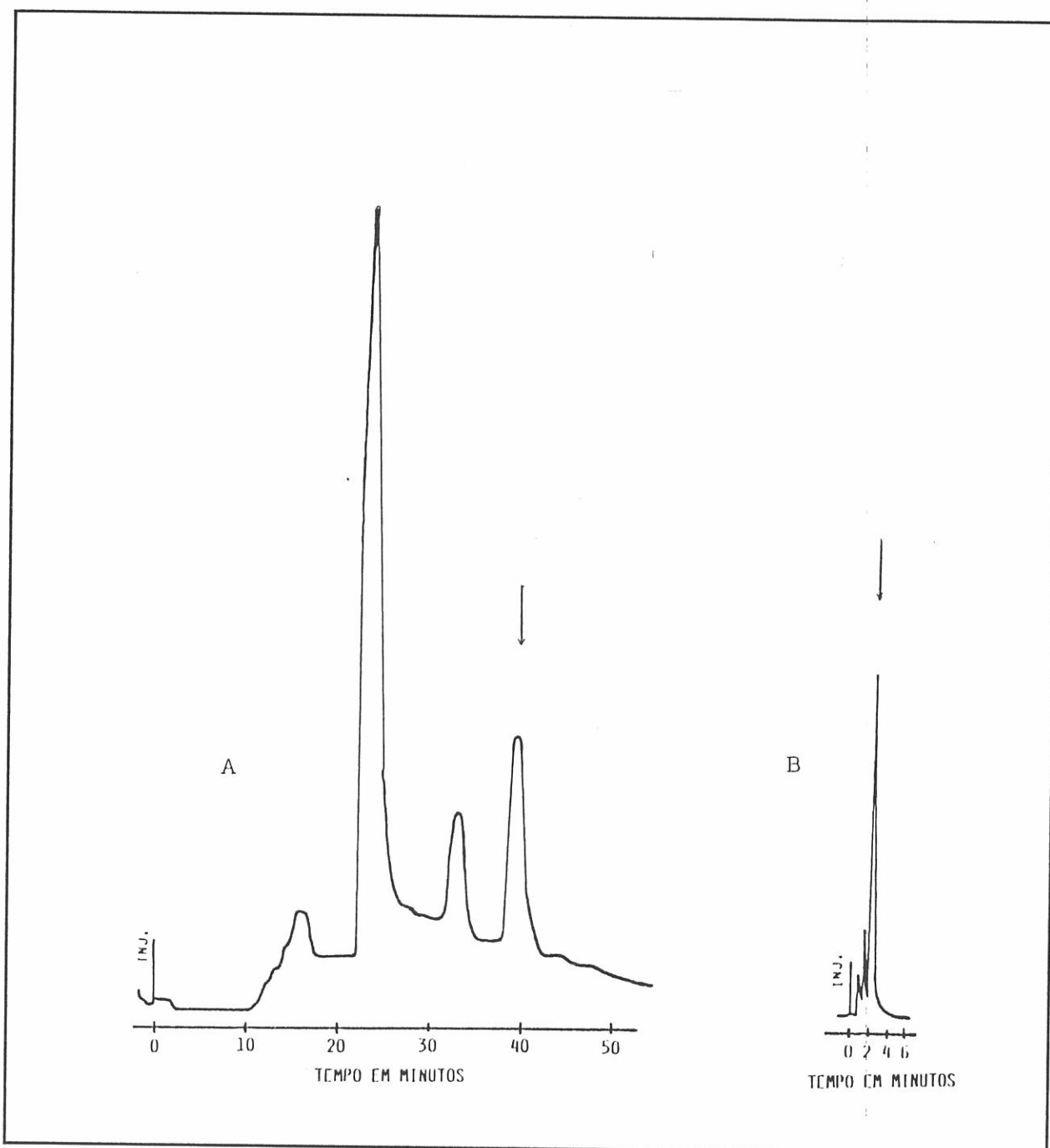


FIGURA 16 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO TÓXICA 3 EXTRAÍDA DA AMOSTRA FITOPLANCTÔNICA COLETADA EM NOVEMBRO/91, OBTIDO APÓS SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC):

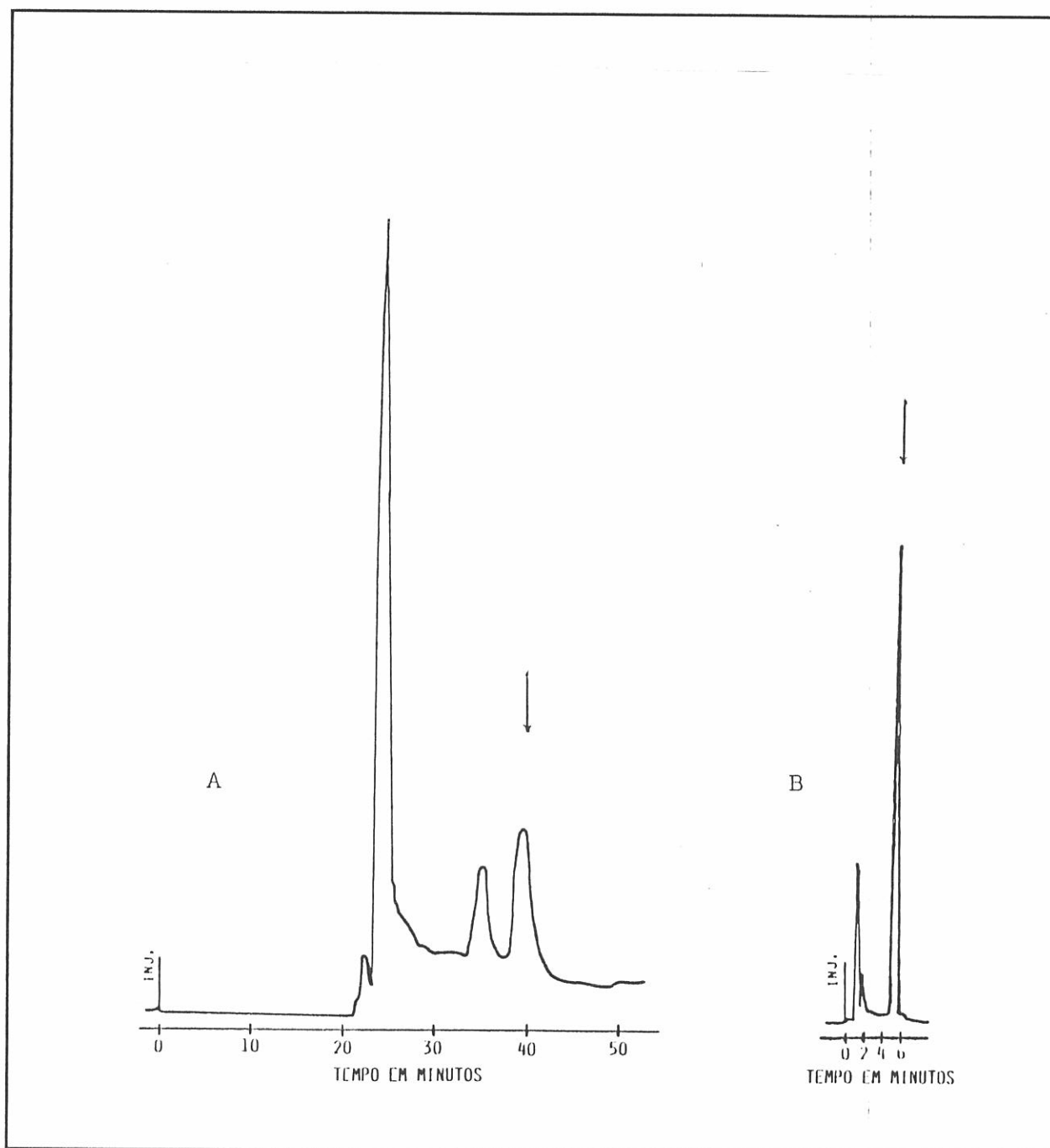


FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DA FRAÇÃO TÓXICA 4 EXTRAÍDA DA AMOSTRA FITOPLANCTÔNICA COLETADA EM DEZEMBRO/91, OBTIDO APÓS SEPARAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (HPLC).

4.4.2) ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS:

A tabela VII mostra os aminoácidos presentes nos heptapeptídeos tóxicos (substâncias 1, 2, 3 e 4) separados das frações 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

TABELA VII - RESULTADO DAS ANÁLISES DE AMINOÁCIDOS DOS HEPTAPEPTÍDEOS TÓXICOS SEPARADOS DAS FRAÇÕES 1, 2, 3 E 4.

SUBSTÂNCIA	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS ANALISADOS
1	D-Ala, L-Leu, D-MeAsp, L-Arg, D-Glu, MeNH ₂
2	D-Ala, L-Leu, D-MeAsp, L-Arg, D-Glu, MeNH ₂
3	D-Ala, L-Leu, D-MeAsp, L-Arg, D-Glu, MeNH ₂
4	D-Ala, L-Leu, D-MeAsp, L-Arg, D-Glu, MeNH ₂

As figuras 18, 19, 20 e 21 demonstram os perfis cromatográficos obtidos após a separação dos tiocarbamil-aminoácidos.

Estes dados mostram a presença dos mesmos aminoácidos (D-Ala, L-Leu, D-MeAsp, L-Arg, D-Glu e MeNH₂) na estrutura das quatro hepatotoxinas isoladas (substâncias 1, 2, 3 e 4).

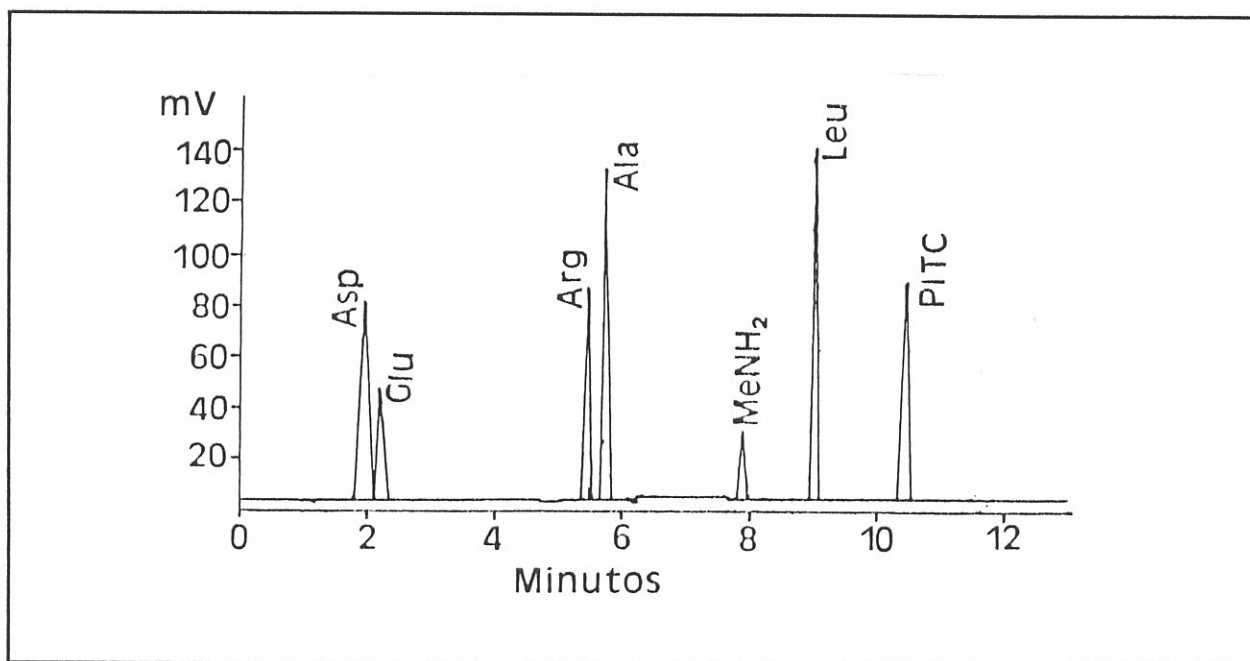


FIGURA 18 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO DURANTE A ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DA SUBSTÂNCIA 1, APÓS A SEPARAÇÃO DOS TIOCARBAMILAMINOÁCIDOS.

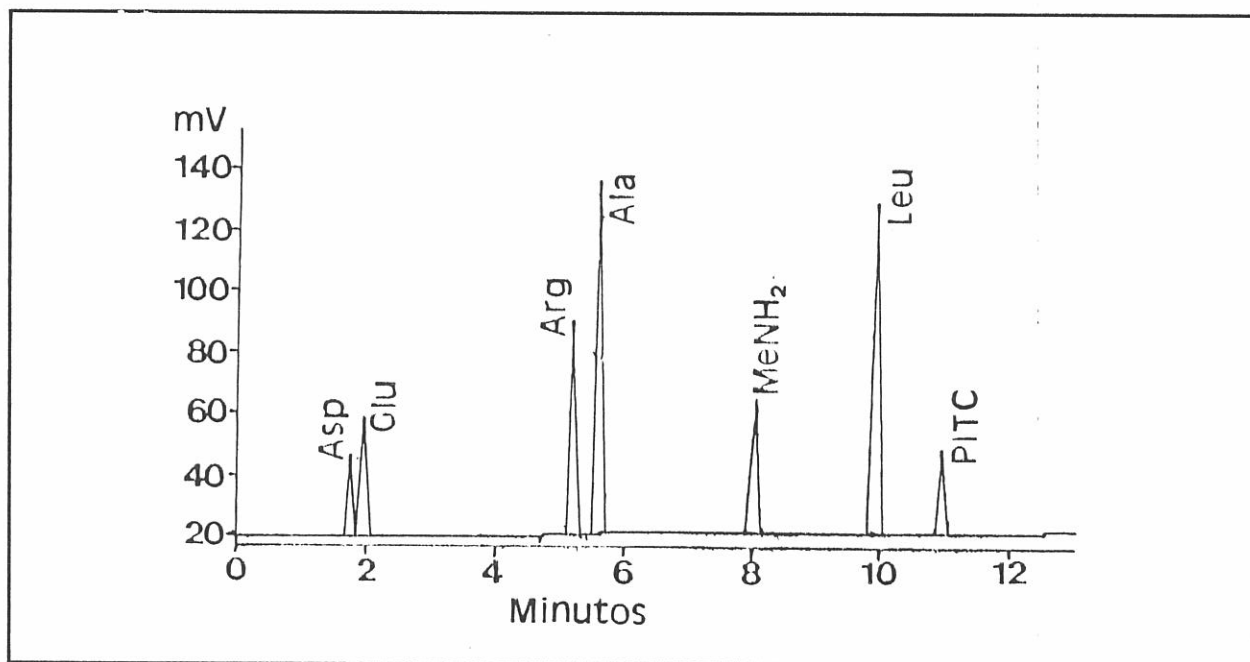


FIGURA 19 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO DURANTE A ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DA SUBSTÂNCIA 2, APÓS A SEPARAÇÃO DOS TIOCARBAMILAMINOÁCIDOS.

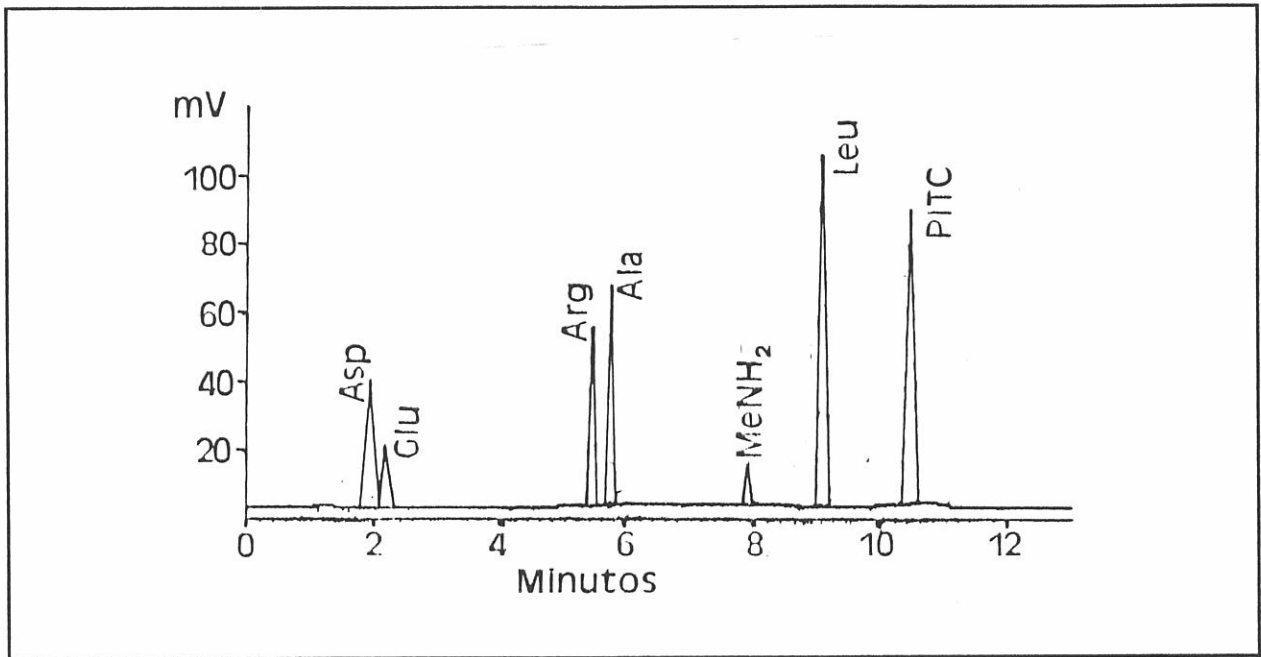


FIGURA 20 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO DURANTE A ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DA SUBSTÂNCIA 3, APÓS A SEPARAÇÃO DOS TIOCARBAMILAMINOÁCIDOS.

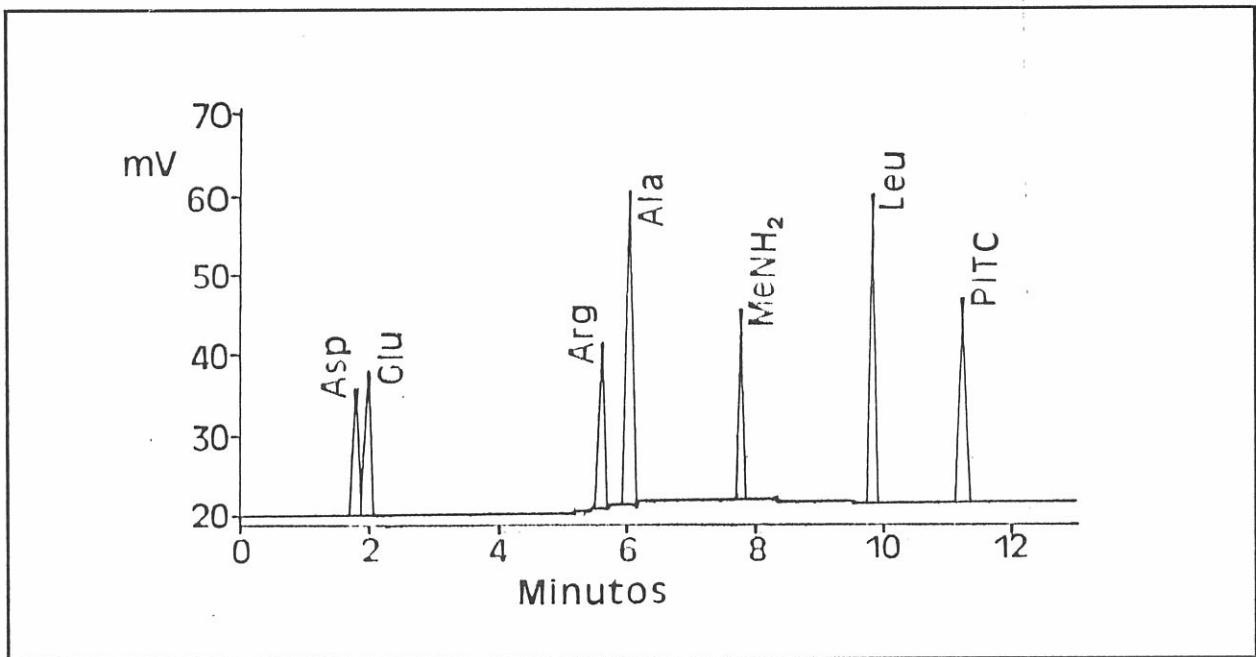


FIGURA 21 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO DURANTE A ANÁLISE DE AMINOÁCIDOS DA SUBSTÂNCIA 4, APÓS A SEPARAÇÃO DOS TIOCARBAMILAMINOÁCIDOS.

O aminoácido Adda não foi detectado na análise de aminoácidos por ser um ácido β -aminado e não sofrer derivatização com isotiocianato de fenila, enquanto metilamina é gerada da unidade metildesidroalanina (Mdha), na hidrólise ácida, como produto de degradação.

4.4.3) ESPECTROMETRIA DE MASSAS - FABMS E FABMS/MS:

Os dados dos pesos moleculares das hepatotoxinas isoladas das amostras fitoplanctônicas de outubro/91, novembro/91 e dezembro/91, obtidos por análise de FABMS, são mostrados na tabela VIII.

A substância 1 demonstrou ter um peso molecular de 1009,6 daltons, com 14 unidades de massa (u.m.) a mais que as substâncias 2, 3 e 4, que demonstraram possuir peso molecular de 995,6 daltons (Anexos 1, 2, 3, 4). Estes dados sugerem que a substância 1 seja um derivado metilado das substâncias 2, 3 e 4.

TABELA VIII - RESULTADOS DA ANÁLISE DE FABMS PARA AS SUBSTÂNCIAS 1, 2, 3 E 4.

SUBSTÂNCIA	PESO MOLECULAR (DALTONS)
1	1009,6
2	995,6
3	995,6
4	995,6

Como as quatro substâncias mostraram a presença dos mesmos aminoácidos em suas estruturas, pode-se supor que o grupo metila, na substância 1, poderia estar localizado na unidade D-Glu ou D-MeAsp, como um éster de metila (grupo metoxila) ou ainda na unidade Adda. Estes dados são concordantes com aqueles obtidos por SIVONEN et al. (1992b) para esta hepatotoxina, que foi isolada primeiramente de células de *Anabaena flos-aquae* CYA 83/1.

A Tabela IX mostra os produtos de fragmentação das substâncias 1, 2, 3 e 4, obtidos através de análise de FABMS/MS.

Os dados de FABMS/MS confirmam a presença da unidade Adda pelos produtos de fragmentação relacionados aos sinais correspondentes aos fragmentos de peso molecular 135 daltons

TABELA IX - RESULTADOS DA ANÁLISE DE FABMS/MS PARA AS SUBSTÂNCIAS 1, 2, 3 E 4.

COMPOSIÇÃO DO FRAGMENTO	PESO MOLECULAR (DALTONS)			
	SUBSTÂNCIA 1	SUBSTÂNCIA 2	SUBSTÂNCIA 3	SUBSTÂNCIA 4
$\text{OCH}_2\text{CH(OMe)}$	135	135	135	135
M-135	873	859	859	859
Mdha-Ala+H	155	155	155	155
Glu-Mdha+H	227	213	213	213
CO-Glu-Mdha-H	253	239	239	239
$\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O-Glu-Mdha}$	389	375	375	375

(OCH_2CHOMe), 873 e 859 daltons (M-135), nos espectros das substâncias 1, 2, 3 e 4 (Anexos 5, 6, 7, 8) (NAMIKOSHI et al., 1992c).

O fragmento de peso molecular 155 daltons (Mdha-Ala + H) foi observado com a mesma unidade de massa nas quatro substâncias (1, 2, 3 e 4). Entretanto, no espectro da substância 1, os fragmentos com peso molecular de 227, 253 e 389 daltons, os quais contendo a unidade D-Glu foram detectados com 14 u.m. maiores do que seus produtos de fragmentação correspondentes nas substâncias 2, 3 e 4 (Anexos 5, 6, 7, 8), revelando que o grupo metila está ligado à unidade D-Glu na forma de um éster [D-Glu(OCH₃)]. Esta é a primeira referência da produção desta hepatotoxina por células da espécie *Microcystis aeruginosa*.

5) CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Os dados das análises físico-químicas de água demonstraram que o Reservatório do Funil é um ambiente aquático eutrofizado e portanto possui as condições necessárias ao crescimento intenso de cianobactérias.

A ocorrência de uma floração de cianobactérias, com predominância da espécie *Microcystis aeruginosa* neste reservatório e a verificação da produção de hepatotoxinas nessa floração demonstram a necessidade de estudos mais abrangentes a respeito da produção de toxinas por espécies de cianobactérias isoladas de corpos d'água brasileiros.

Assim faz-se necessário a compreensão dos fatores que regulam a produção de toxinas por cianobactérias, bem como o desenvolvimento de métodos de análise que permitam um monitoramento rápido e eficiente dessas biotoxinas em nossos corpos d'água, pois todos os reservatórios construídos no Brasil nos últimos anos possuem as condições ambientais necessárias ao desenvolvimento de florações de cianobactérias, sendo muitos deles utilizados como mananciais de abastecimento.

6) CONCLUSÕES:

- 1 - O Reservatório do Funil possui as condições ambientais adequadas ao desenvolvimento de florações tóxicas de cianobactérias.
- 2 - O resultado dos testes de toxicidade demonstrou que a floração de cianobactérias coletada no Reservatório do Funil era produtora de hepatotoxinas.
- 3 - A hepatotoxicidade da floração teve correlação linear positiva com o percentual de células da espécie *Microcystis aeruginosa*, encontrado na floração.
- 4 - Duas estruturas de hepatotoxinas produzidas pela floração foram isoladas e caracterizadas: como microcystina-LR e [D-Glu(OCH₃)⁶]-microcystina-LR, sendo esta última a primeira citação para a espécie *Microcystis aeruginosa*.

7) PERSPECTIVAS FUTURAS:

Alguns aspectos deste trabalho deixam perspectivas para trabalhos futuros, tais como:

- 1 - Estudo da decomposição microbiológica de microcystinas, em condições de laboratório.
- 2 - Estudo da estabilidade de microcystinas nos ambientes aquáticos.
- 3 - Desenvolvimento ou otimização de metodologia que permita o monitoramento dessas hepatotoxinas nos ambientes aquáticos brasileiros.

8) BIBLIOGRAFIA:

- ADELMAN, W.J.Jr.; FOHLMEISTER, J.F.; SASNER, J.J.Jr. and IKAWA, M. (1982). Sodium channels blocked by aphantoxin obtained from the blue-green alga *Aphanizomena flos-aquae*. *Toxicon* 20, 513-516.
- AGUIAR, D.G. & AZEVEDO, S.M.F.O.. Produção de toxinas por *Microcystis aeruginosa* em diferentes fases de cultivo e concentrações de nitrogênio. V Reunião Brasileira de Ficologia; Teresópolis; 25 de fevereiro a 01 de março de 1991.
- AGUIAR, D.G.; BOBEDA, C.R.R. e AZEVEDO , S.M.F.O.. Efeitos de diferentes concentrações de nitrogênio no crescimento e produção de toxinas por *Microcystis aeruginosa*, em condições de cultivo. 3o Congresso Brasileiro de Limnologia; Porto Alegre; 22-26 de julho de 1990.
- AGUIAR, D.G.; BOBEDA, C.R.R. e AZEVEDO , S.M.F.O. (1993). Toxicity of *Microcystis aeruginosa* strains isolated from bodies of water in Rio de Janeiro. *Toxicon* 31, 107-108.
- APHA. (1985). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*; 1134p.; 16th edition; Washington; APHA-AWWA-WPCF.

- BEASLEY, V.R.; COOK, W.O.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; LOVELL, R.A. and VALENTINE, W.M. (1989). Intoxication in livestock and water fowl. Clinical toxicology - veterinary clinics of north america. *Food Animal Practice* 5. 345-361.
- BERG, K. & SØLI, N.E. (1985a). Effects of *Oscillatoria agardhii* toxins on blood pressure and isolated organ preparations. *Acta Veterinaria Scandinavia* 26, 374-384.
- BERG, K. & SØLI, N.E. (1985b). Toxicity study with the blue-green algae *Oscillatoria agardhii* from two eutrophic Norwegian lakes. *Acta Veterinaria Scandinavia* 26, 363-373.
- BISHOP, C.T.; ANET, E.F.L.J. and GORHAM, P.R. (1959). Isolation and identification of the fast-death factor in *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Canadian of Biochemistry and Physiology* 37, 453-471.
- BOTES, D.P.; KRUGER, H. and VILJOEN, C.C. (1982a). Isolation and characterization of four toxins from blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 20, 945-954.

- BOTES, D.P.; VILJOEN, C.C.; KRUGER, H.; WESSELS, P.L. and WILLIAMS, D.H. (1982b). Configuration assignments of the amino acid residues and the presence of N-methyldehydroalanine in toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Toxicon* 20, 1037-1042.
- BOTES, D.P.; VILJOEN, C.C.; KRUGER, H.; WESSELS, P.L. and WILLIAMS, D.H. (1982c). Structure of toxins of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *South African Journal of Science* 78, 378-379.
- BOTES, D.P.; WESSELS, P.L.; KRUGER, H.; RUNNEGAR, M.T.C.; SANTKARN, S.; SMITH, R.J.; BARNA, J.C.J. and WILLIAMS, D.H. (1985). Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. *Journal Chemical Society Perkin Transactions* 1, 2747-2748.
- BOURRELY, P.. Tomo I: Les algues vertes (1972); TomoII: Les algues jaunes et brunes (1968); Les algues bleues et rouges (1970). In: *Les Algues D'Eau Douce - Initiation à la systématique*; Boubée, N. & Cie (edit.); Paris.
- BROOK, W.P. & CODD, G.A. (1987). Distribution of *Microcystis aeruginosa* peptide toxin and interactions with hepatic microsomes in mice. *Pharmacology and Toxicology* 60, 187-191.

- BRUNO, M.; GUCCI, P.M.B.; PIERDIMINICI, E.; SESTILI, P.; IOPPOLO, A.; SECHI, N. and VOLTERRA, L. (1992). Microcystins-like toxins in different freshwater species of *Oscillatoria*. *Toxicon* 30, 1307-1311.
- CARMICHAEL W.W. (1986). Algal toxins. In *Advances in Botanical Research*; Callow, J.A. (edit.); 47-101 pp.; London; Academic Press.
- CARMICHAEL, W.W. (1988). Toxins of freshwater algae. In *handbook of Natural Toxins*, ed. Tu, A.T. pp. 121-147, New York, Marcel Dekker.
- CARMICHAEL, W.W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology* 72, 445-459.
- CARMICHAEL, W.W. & BENT, P.E. (1981). Hemoagglutination method of detection of freshwater cyanobacteria (blue-green algae) toxins. *Applied and Environmental Microbiology* 41(6):1383-1388.
- CARMICHAEL, W.W.; BIGGS, D.F. and GORHAM, P.R. (1975). Toxicology and pharmacology action of *Anabaena flos-aquae* toxin. *Science* 187, 542-544.

- CARMICHAEL, W.W.; BIGGS, D.F. and PETERSON, M.A. (1979).
Pharmacology of anatoxin-a produced by freshwater cyanophyte
Anabaena flos-aquae NRC-44-1. *Toxicon* 17, 229-236.
- CARMICHAEL, W.W.; ESCHEGOR, J.T.; PATTERSON, G.M.L. and MOORE,
R.E. (1988). Toxicity and partial structure for a
hepatotoxic peptide produced by *Nodularia spumigena* Mertens
emend. strain L-575 (cyanobacteria) from New Zealand.
Applied and Environmental Microbiology 54, 2257-2263.
- CARMICHAEL, W.W. & GORHAM, P.R. (1978). Anatoxins from clones
of *Anabaena flos-aquae* isolated from lakes of western
Canada. *Mitteilungen Internationale Vereinigung Limnologie*
21, 285-295.
- CARMICHAEL, W.W. & GORHAM, P.R. (1980). Freshwater cyanophyte
toxins: types and their effects of microalga biomass. In
Algal Biomass, Production and Use, SHELEFG & SOEDER, C.J.
(edit.). Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p. 437-448.
- CARMICHAEL & GORHAM, P.R. (1981). The mosaic nature of toxic
blooms of cyanobacteria. In *The Water Environment: Algal
Toxins and Healths*; Carmichael, W.W. (edit.); 161-172 pp.;
New York; Plenum Press.

- CARMICHAEL, W.W.; MAHMOOD, N.A. and HYDE, E.G. (1990). Natural toxins from cyanobacteria (blue-green algae) . In *Marine Toxins: Origin, Structure and Molecular Pharmacology*, HALL, S. & STRICHARTZ, G. (edit.), pp. 87-106, Washington D.C., American Chemical Society.
- CARMICHAEL, W.W. & SCHWARTZ, L.D. (1984) Preventing livestock deaths from blue-green algae poisoning. *Farmers Bulletin* 2275, Washington D.C., U.S. Dept. of Agriculture.
- CODD, G.A.; BELL, S.G. and BROOKS, W.P. (1989). Cyanobacterial toxins in water. *Water Sciences Technology* 23, 1-13.
- CODD, G.A. & POON, G.K. (1988). Cyanobacteria toxins. In *Biochemistry of the Algae and Cyanobacteria*; Rogers, L.J. & Gallon, J.G. (edit.); 283-296 pp.; Oxford; Oxford Science Publishers.
- COLLINS, M. (1978). Algal Toxins. *Microbiological Reviews* 42(4): 725-746.
- COOK, W.O.; BEASLEY, V.R.; LOVELL, R.A.; DAHLEM, A.M.; HOOSER, S.B.; MAHMOOD, N.A. and CARMICHAEL, W.W. (1989). Consistent inhibition of peripheral cholinesterases by neurotoxins from the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae*: studies of ducks, swine, mice and a steer. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 915-922.

- DAH BOLKAR, A.S. & CARMICHAEL, W.W. (1987). Ultrastructural changes in the mouse liver induced by hepatotoxin from the freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. *Toxicon* 25, 285-292.
- DAHLEM, A.M.; HASSAN, A.L.; SWANSON, S.P.; CARMICHAEL, W.W. and BEASLEY, V.R. (1988). A model system for studying the bioavailability of intestinally administered microcystin-LR, a hepatotoxic peptide from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in the rat. *Pharmacology Toxicology* 63, 1-5.
- DEMOTT, W.R.; ZHANG, Q-X. and CARMICHAEL, W.W. (1991). Effects of toxic cyanobacteria and purified toxins on the survival and feeding of a copepod and three species of *Daphnia*. *Limnology and Oceanography* 36, 1346-1357.
- DEVLIN, J.P.; EDWARDS, O.E.; GORHAM, P.R.; HUNTER, N.R.; PIKE, R.K. and STAVRIC, B. (1977). Anatoxin-a, toxic alkaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44h. *Canadian Journal of Chemistry* 55, 1367-1371.
- ELLEMAN, T.C.; FALCONER, I.R.; JACKSON, A.R.B. and RUNNEGAR, M.T.C. (1978). Isolation, characterization and pathology of the toxin from a *Microcystis aeruginosa* (*Anacystis cyanea*) bloom. *Australian Journal of Biological Sciences* 31, 209-218.

- ELLOF, J.N.; SIEGELMAN, H.W. and KYCIA, H. (1982). Comparative study on the toxins from several *Microcystis aeruginosa* isolates. *South African Journal of Science* 78, 377.
- ERIKSSON, J.E.; GRONBERG, L.; NYGARD, S.; SLOTTE, J.P. and MERILUOTO, J.A.O. (1990). Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1025, 6066.
- ERIKSSON, J.E.; PAATERO, G.I.L.; MERILUOTO, J.A.O.; CODD, G.A.; KASS, G.E.N.; NICOTERA, P. and ORRENIUS, S. (1989). Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Experimental Cell Research* 185, 86-100.
- ESTEVEZ, F.A. (1988). *Fundamentos de Limnologia*; Rio de Janeiro; Editora Interciência/FINEP.
- FALCONER, I.R. (1991). Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environmental Toxicology and Water Quality* 6, 177-184.
- FALCONER, I.R. & BUCKLEY, T.H. (1989). Tumor promotion by *Microcystis* s.p., a blue-green alga occurring in water supplies. *Medical Journal of Australia* 150, 351.

- FEEMA. (1988). *Reservatórios e Lagos do Estado do Rio de Janeiro*; 190p.; Rio de Janeiro.
- FRANKMÖLLE, W.P.; LARSEN, L.K.; CAPLAN, F.R.; PATTERSON, G.M.L.; KNÜBEL, G.; LEVINE, I.A. and MOORE, R.E. (1992). Antifungal cyclic peptides from the terrestrial blue-green alga *Anabaena laxa*. I. Isolation and biological properties. *The journal of Antibiotics* 45, 1451-1457.
- GILBERT, J.J. (1990). Differential effects of *Anabaena affinis* on cladocerans and rotifers: mechanisms and implications for zooplankton community structure. *Ecology* 71, 1727-1740.
- GORHAM, P.R. (1964). Toxic algae. In *Algae and Man*, Jackson, D.F. (edit.); 307-336 pp.; New York; Plenum Press.
- GORHAM, P.R. & CARMICHAEL, W.W. (1979). Phycotoxins from blue-green algae. *Peere and Applied Chemistry* 52, 165-174.
- GORHAM, P.R. & CARMICHAEL, W.W. (1988). Harzards of freshwater blue-green (cyanobacteria). In: *Algae and Human Affairs*; Lembi, C.A. & Waaland, J.R. (edit.); ch 16; 403-431 pp.; Cambridge; Cambridge University Press.
- GRANT, G.A. & HUGHES, E.O. (1953). Development of toxicity in the blue-green algae. *Canadian Journal of Public Health* 44, 334-339.

HARADA, K-I.; MATSUURA, K.; SUZUKI, M.; OKA, H.; WATANABE, M.F.; OISHI, S.; DAHLEN, A.M.; BEASLEY, V.R. and CARMICHAEL, W.W. (1988a). Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* 448, 275-283.

HARADA, K-I.; MATSUURA, J.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; OISHI, S.; DAHLEN, A.M.; BEASLEY, V.R. and CARMICHAEL, W.W. (1990a). Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacterium (blue-green algae). *Toxicon* 28(1): 55-64.

HARADA, K-I.; OGAWA, K.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; WATANABE, M.F.; ITEZONO, Y. and NAKAYAMA, N. (1990b). Structural determination of geometrical isomers of microcystins LR and RR from cyanobacterial by two-dimensional NMR spectroscopic techniques. *Chemical Research in Toxicology* 3(5): 473-481.

HARADA, K-I.; OGAWA, K.; MATSUURA, K.; NAGAI, H.; MURATA, H.; SUZUKI, M.; ITEZONO, Y.; NAKAYAMA, N.; SHIRA, M. and NAKANO, M. (1991). Isolation of two toxic heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa* K-139. *Toxicon* 29(4): 479-489.

- HARADA, K-I.; SUZUKI, M.; DAHLEN, A.M.; BEASLEY, V.R.; CARMICHAEL, W.W. and RINEHART, K.L.Jr. (1988b). Improved method for purification of toxic peptides produced by cyanobacteria. *Toxicon* 26(5): 433-439.
- HENNING, K.; MEYER, H.; KRAATZ-WADSACK, G. and CREMER, J. (1992). Detection of a cytotoxic substance produced by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* strain PCC 7806: isolation and differentiation from the peptide toxin microcystin-LR by cytotoxicity assays. *Current Microbiology* 25, 129-134.
- HERMANSKEY, S.J.; CASEY, P.J. and STOHS, S.J. (1990a). Cyclosporin-A, a chemoprotectant against microcystin-LR toxicity. *Toxicology Letters* 54, 279-285.
- HERMANSKEY, S.J.; WOLFF, S.N. and STOHS, S.J. (1990b). Use of rifampin as an effective chemoprotectant and antidote against microcystin-LR toxicity. *Pharmacology* 41, 231-236.
- HERMANSKEY, S.J.; STOHS, S.J.; ELDEEN, Z.M.; ROCHE, V.F. and MEREISH, K.A. (1991). Evaluation of potential chemoprotectants against microcystin-LR hepatotoxicity in mice. *Journal of Applied Toxicology* 11, 65-74.

- HONKANEN, R.E.; ZWILLER, J.; MOORE, R.E.; DAILY, S.L.; KHATRA, B.S.; DUKELOW, M. and BOYTON, A.L. (1990). Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. *Journal of Biological Chemistry* 265, 19401-19404.
- HOOSER, S.B.; BEASLEY, V.R.; WAITE, L.L.; KUKLENSCHMIDT, M.S.; CARMICHAEL, W.W and HASCHER, W.M. (1991). Actin filament alterations in rat hepatocytes induced *in vivo* and *in vitro* by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. *Veterinary Pathology* 28, 259-266.
- HUBER, C.S. (1972). The crystal structure and absolute configuration of 2,9-diacetyl-9-azabicyclo[4.2.1]non-2-ene. *Acta Crystallographica* 328, 2577-2582.
- HUGHES, E.O.; GORHAM, P.R. and ZHENDER, A. (1958). Toxicity of a unialgal culture of *Microcystia aeruginosa*. *Canadian Journal of Microbiology* 4, 225-236.
- KONST, H.; MCKERCHER, P.D.; GORHAM, P.R.; ROBERTSON, A. and HOWEL, J. (1965). Symptoms and pathology produced by toxic *Microcystis aeruginosa* NCR-1 in laboratory and domestic animals. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science* 29, 221-228.

- KRISHNAMURTHY, T.; CARMICHAEL, W.W. and SARVER, E.W. (1986). Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabaena flos-aquae*. *Toxicon* 24, 865-873.
- KVIRANTA, J.; NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. and RINEHART, K.L. (1992). Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. *Toxicon* 30, 1093-1098.
- LAWTON, L. & CODD, G.A. (1991). Cyanobacterial (blue-green algae) toxins and their significance in U.K. and european waters. *Journal IWEM* 5, 460-465.
- MACKINTOSH, C.; BEATTIE, K.A.; KLUMPP, S.; COHEN, P. and CODD, G.A. (1990). Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Letters* 264, 189-192.
- MAHMOOD, N.A. & CARMICHAEL, W.W. (1986). The pharmacology of anatoxin-a(S), a neurotoxin produced by the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 24, 425-434.

- MAHMOOD, N.A. & CARMICHAEL, W.W. (1987). Anatoxin-a(S), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 25, 1221-1227.
- MAHMOOD, N.A.; CARMICHAEL, W.W. and PFHALER, D. (1988). Anticholinesterase poisonings in dogs from a cyanobacterial (blue-green algae) bloom dominated by *Anabaena flos-aquae*. *American Journal of Veterinary Research* 49, 500-503.
- MATSUNAGA, S.; MOORE, R.E.; NIEMCZURA, W.P. and CARMICHAEL, W.W. (1989). Anatoxin-a(S), a potent anticholinesterase from *Anabaena flos-aquae*. *Journal of American Chemical Society* 111, 8021-8023.
- MEREISH, K.A.; BUNNER, D.L.; RAGLAND, D.R. and CREASIA, D.A. (1991). Protection against microcystin-LR-induced hepatotoxicity by silymarin: biochemistry, histopathology and lethality. *Pharmaceutical Research* 8, 273-277.
- MERILUOTO, J.A.O. & ERIKSSON, J.E. (1988). Rapid analysis of peptides toxins in cyanobacteria. *Journal of Chromatography* 438, 93-99.

- MERILUOTO, J.A.O.; ERIKSSON, J.E.; HARADA, K-I.; DAHLEM, A.M.; SIVONEN, K. and CARMICHAEL, W.W. (1990a). Internal surface reversed phase high-performance liquid chromatographic separation of the cyanobacterial peptide toxins microcystin-LA, -LR, -YR, -RR and nodularin. *Journal of Chromatography* 509, 390-395.
- MERILUOTO, J.A.O.; NYGARD, S.E.; DAHLEM, A.M. and ERIKSSON, J.E. (1990b). Synthesis, organotropism and hepatocellular uptake of two tritium-labeled epimers of dihydromicrocystin-LR, a cyanobacterium peptide toxin analog. *Toxicon* 28, 1439-1446.
- MOORE, R.E. (1977). Toxins from blue-green alga. *Bioscience* 27(12): 797-802.
- MOORE, R.E.; CHEN, J.L.; MOORE, B.S.; PATTERSON, G.M.L. and CARMICHAEL, W.W. (1991). Biosynthesis of microcystin-LR. Origin of the carbons in the ADDA and Masp units. *Journal of the American Chemical Society* 113, 5083-5084.
- MURTHY, J.R. & CAPINDALE, J.B. (1970). A new isolation and structure for the endotoxin from *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Canadian Journal of Biochemistry* 48, 508-510.

NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; DAHLEM, A.M.; BEASLEY, V.R. and CARMICHAEL, W.W. (1989). Total synthesis ADDA, the unique C20 aminoacid of cyanobacterial hepatotoxins. *Tetrahedron Letters* 30, 4349-4352.

NAMIKOSHI, M.; SIVINEN, K.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; SUN, F.; ROUHIAINEN, L.; LUUKKAINEN, R. and RINEHART, K.L. (1992a). Two new L-serine variants of microcystins-LR and -RR from *Anabaena* s.p. strains 202 A1 and 202 A2. *Toxicon* 30, 1457-1464.

NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; EVANS, W.R.; SUN, F.; CARMICHAEL, W.W. and RINEHART, K.L. (1992b). Isolation and structures of microcystins from a cyanobacterial water bloom (Finland). *Toxicon* 30, 1473-1479.

NAMIKOSHI, M.; SIVONEN, K.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W.; ROUHIAINEN, L.; LUUKKAINEN, R. and RINEHART, K.L. (1992c). Structure of three new homotyrosine-containing microcystins and a new homophenylalanine variant from *Anabaena* sp. strain 66. *Chemical Research in Toxicology* 5, 661-666.

NISHIWAKI-MATSUSHIMA, R.; OHTA, T.; NISHIWAKI, S.; SUGAWAMA, M.; KOHYAMA, K.; ISHIKAWA, T.; CARMICHAEL, W.W. and FUJIKI, H. (1992). Liver cancer promoted by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Journal Cancer Research and Clinical Oncology* 118, 420-424.

REPAVICH, W.M.; SONZOGNI, W.C.; STRANDRIGE, J.H.; WEDEPHOL, R.E. and MEISNER, L.F. (1990). Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. *Water Research* 24, 225-231.

RINEHART, K.L.; HARADA, K-I.; NAMIKOSHI, M.; CHEN, C.; HARVIS, C.; MUNRO, M.H.G.; BLUNT, J.W.; MULLIGAN, P.E. BEASLEY, V.R.; DAHLEM, A.M. and CARMICHAEL, W.W. (1988). Nodularin, microcystin and the configuration of ADDA. *Journal of the American Chemical Society* 110, 8557-8558.

RUNNEGAR, M.T.C. & FALCONER, I.R. (1981). Isolation, characterization and pathology of the toxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. In W.W. Carmichael (edit.) *The Water and Environment Algal Toxins and Health*; 325-342 pp.; New York: Plenum Press .

RUNNEGAR, M.T.C. & FALCONER, I.R. (1986). Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon* 24, 109-115.

RUNNEGAR, M.TC.; FALCONER, I.R.; JACKSON, A.R.B. and MCINNES, A. (1983). Toxin production of *M. aeruginosa* cultures. *Toxicon* (Suppl.) 3, 377-380.

- OOI, T.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H. and WATANABE, M.M. (1989). Structure of cyanoviridin-RR, a toxin from blue-green algae *Microcystis viridis*. *Journal of Applied Phycology* 1, 31-38.
- PAINULY, P.; PEREZ, R.; FUKAI, T. and SHIMIZU, Y. (1988). The structure of a cyclic toxin, cyanogenosin-RR from *Microcystis aeruginosa*. *Tetrahedron Letters* 29, 11-14.
- PATTERSON, G.M.L.; BALDWIN, C.L.; BOLIS, C.M.; CAPLIN, F.R.; KARUSO, H.; LARSEN, L.K.; LEVINE, I.A.; MOORE, R.E; NELSON, C.S.; TSCHAPPAT, K.D. and TUANG, G.D. (1991). Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (CYANOPHYTA). *Journal of Phycology* 27, 530-536.
- PATTERSON, G.M.L. & CARMELI, S. (1992). Biological effects of tolytoxin (6-hydroxi-7-O-methyl-scytopyhycin b), a potent bioactive metabolite from cyanobacteria. *Archives Microbiology* 157, 406-410.
- RABIN, P. & DARBRE, A. (1975). An improved extraction procedure for the endotoxin from *Microcystis aeruginosa* NRC-1. *Biochemical Society Transactions* 3, 428-430.

- RUNNEGAR, M.T.C.; FALCONER, I.R. and SILVER, J. (1981). Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Naunyn-Schmmedeberg's Archives of Pharmacology* 317, 268-272.
- SANDSTRÖM, A.; GLEMAREC, C.; MERILUOTO, J.A.O.; ERIKSSON, J.E. and CHATTOPADHYAYA, J. (1990). Structure of a hepatotoxic pentapeptide from the cyanobacteria *Nodularia spumigena*. *Toxicon* 28(5): 535-540.
- SASNER, J.J.Jr.; IKAWA, M. and FOXALL, T.L. (1984). Studies on *Aphanizomenon* and *Microcystis* toxins. In Ragelis E.P. (edit.) *Seafood Toxins*; 391-406 pp.; Chemical Society Symposium Series 262; Washington D.C..
- SANTKARN, S.; WILLIAMS, D.H.; SMITH, R.J.; HAMMOND, S.J.; BOTES, D.P.; TUINMAN, A.; WESSELS, P.L.; VILJOEN, C.C. and KRUGER, H. (1983). A partial structure for the toxin BE-4 from the blue-green algae *Microcystis aeruginosa*. *Journal of Chemical Society Communications* 12, 652-654.
- SAWYER, P.J.; GENTILE, J.H. and SASNER, J.J.Jr. (1968). Demonstration of a toxin from *Aphanizomenon flos-aquae* (L.) Ralfs. *Canadian Journal of Microbiology* 14, 1110-1204.

SCHWIMMER, D. & SCHWIMMER, M. (1968). Medicinal aspects of phycology. In D. Jackson (edit.) *Algae, Man and Environment*; 279-3358 pp.; Syracuse University Press; Syracuse; N.Y..

SHILO, M. (1967). Formation and mode of action algal toxins. *Bacteriological Reviews* 31(3): 180-193.

SIVONEN, K. (1990a). Toxic cyanobacteria in finnish freshwaters and Baltic sea. Academic Dissertation in Microbiology. Department of Microbiology. University of Helsinki.

SIVONEN, K. (1990d). Effect of temperature, light, nitrogen and phosphorus on hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii*. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2658-2666.

SIVONEN, K.; CARMICHAEL, W.W.; NAMIKOSHI, M.; RINEHART, K.L.; DAHLEM, A.M. and NIEMELÄ, S.I. (1990b). Isolation and characterization of hepatotoxin microcystin homologs from *Nostoc* sp. strain 152. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 2650-2657.

SIVONEN, K.; HIMBERG, K.; LUUKKAINEN, R.; NIEMELÄ, S.I.; POON, G.K. and CODD, G.A. (1989a). Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacterial blooms and strains from Finland. *Toxicity Assessment* 4, 339-352.

SIVONEN, K.; KONONEN, K.; CARMICHAEL, W.W.; DAHLEM, A.M.; RINEHART, K.L.; KIVIRANTA, J. and NIEMELÄ, S.I. (1989b). Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic sea and structure of the toxin. *Applied and Environmental Microbiology* 55(8): 1990-1995.

SIVONEN, K.; KONONEN, K.; ESALA, A-L. and NIEMELÄ, S.I. (1989c). Toxicity and isolation of the cyanobacteria *Nodularia spumigena* from the southern Baltic sea in 1986. *Hydrobiologia* 185, 3-8.

SIVONEN, K.; NAMIKOSHI, M.; EVANS, W.R.; GROMOV, B.V.; CARMICHAEL, W.W. and RINEHART, K.L. (1992a). Isolation and structures of five microcystins from a russian *Microcystis aeruginosa* strain calu 972. *Toxicon* 30, 1481-1485.

SIVONEN, K.; NIEMELÄ, S.I.; NIEMI, R.M.; LEPISTO, L. LUOMA, T.H. and RASAMEN, L.A. (1990c). Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia* 190, 267-275.

SIVONEN, K.; SKULBERG, O.M.; NAMIKOSHI, M.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. and RINEHART, K.L. (1992b). Two methyl ester derivatives of microcystins, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1. *Toxicon* 30, 1465-1471.

SKULBERG, O.M.; CARMICHAEL, W.W.; ANDERSON, R.A.; MATSUNAGA, S.; MOORE, R.E. and SKULBERG, R. (1992). Investigations of a neurotoxic oscillatoriacean strain (cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11, 321-329.

SLATIKIN, D.N.; STORNEN, R.D.; KYCIA, J.H. and SIEGELMEN, W.H. (1983). Typical pulmonary thrombosis caused by a toxin X cyanobacterial peptide. *Science* 20, 1383-1385.

SPIVAK, C.E.; WATERS, J.; WITKOP, B. and ALBUQUERQUE, E.X. (1983). Potencies and channel properties induced by semirigid agonist at frog nicotinic acetylcholine receptors. *Molecular Pharmacology* 23, 337-343.

SPIVAK, C.E.; WITKOP, B. and ALBUQUERQUE, E.X. (1980). Anatoxin-a: a novel potent agonist at the nicotinic receptor. *Molecular Pharmacology* 18, 384-394.

STRICKLAND, J.D.H. & PARSONS, T.R. (1965). *A Manual of Sea Water Analysis (With Special Reference to the More Common Micronutrients and to Particulate Organic Material)*; Bulletin no 125; Fisheries Research Board from Canada.

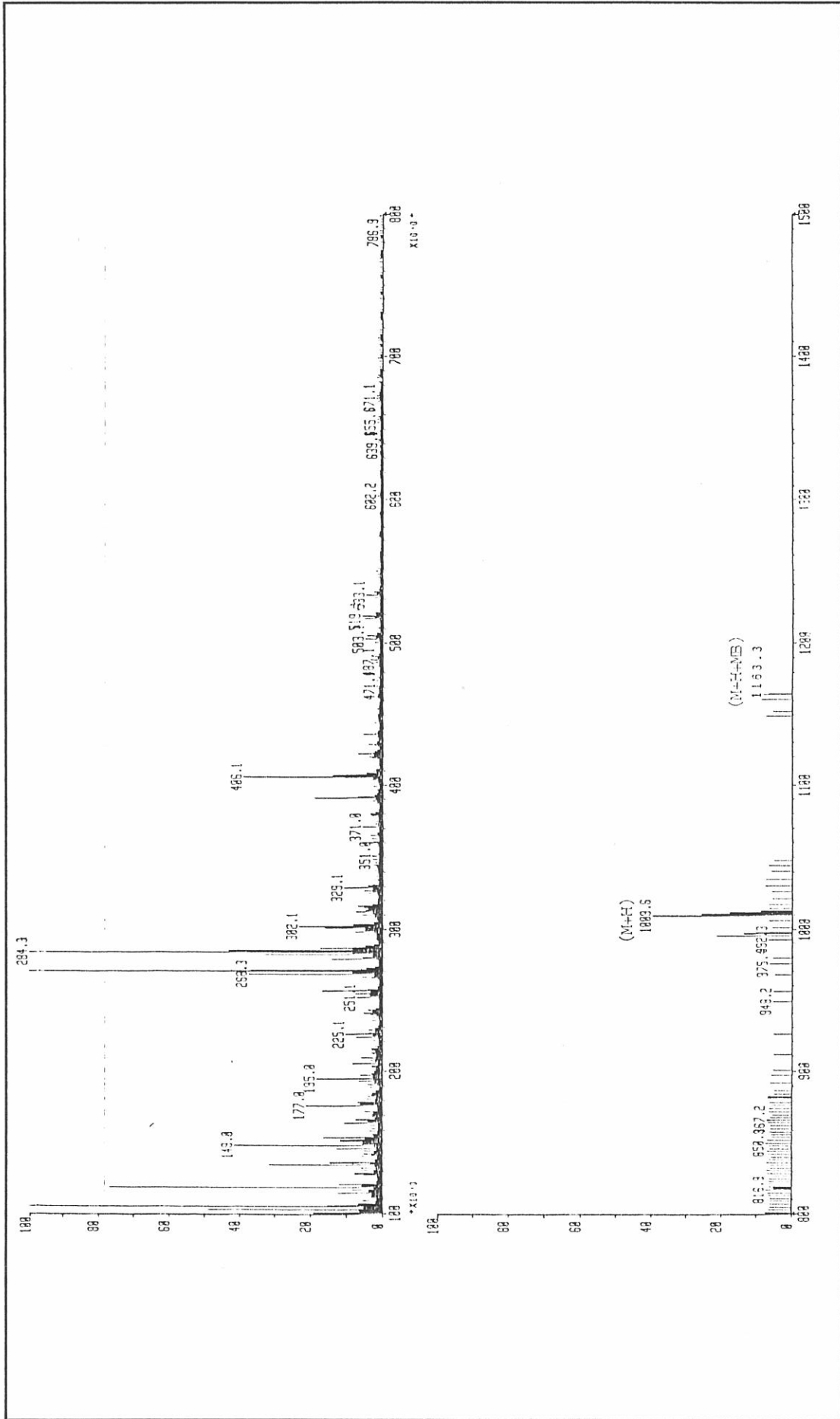
- STOTTS, R.R.; NAMIKOSHI, M.; HASCHEK, W.M.; RINEHART, K.L.; CARMICHAEL, W.W.; DAHLEM, A.M. and BEASLEY, V.R. (1993). Structural modifications imparting reduced toxicity in microcystins from *Microcystis* spp.. *Toxicon* 31, 783-789.
- THEISS, W.C.; CARMICHAEL, W.W.; WYMAN, J. and BRUNER, R. (1988). Blood pressure and hepatocelular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. *Toxicon* 26, 603-613.
- TOERIEN, D.F.; SCOTT, W.E. and PITOUT, M.J. (1976). *Microcystis* toxins' isolation, identification, implications. *Water South Africa (Pretoria)* 2, 160-162.
- TUNDISI, J.G. & MATSUMARA-TUNDISI, T. (1992). Eutrophication of lakes and reservoirs: a comparative analysis, case studies, perspectives. In *Algae and Environment: a General Approach*; Cordeiro-Marino, M.; Azevedo, M.T.P.; Sant'anna, C.L.; Tomita, N.Y. and Plastino, E.M. (edit.); 1-33 pp.; São Paulo; Sociedade Brasileira de Ficologia.
- TUNDISI, J.G.; MATSUMARA-TUNDISI, T.; ROCHA, O.; GENTIL, J.G. and NAKAMOTO, N. (1977). Primary production, standing-stock of phytoplankton and ecological factors in a shallow tropical reservoir (Represa do Broa, São Carlos, Brasil). *Seminario do Medio Ambiente y Represas* 1, 138-172.

- UTHERMÖHL, H. (1958). Perfeccionamiento del metodo cuantitativo del fitoplancton. Asociacion Internacional de Limnologia Teórica e Aplicada. Comitê de Métodos Limnológicos, comunicacion 9, 1-39.
- VAN DER WESTHIZEN, A.J. & ELOFF, J.N. (1985). Effect of temperature and light on the toxicity and growth of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Planta* 163, 55-59.
- VAN DER WESTHIZEN, A.J.; ELOFF, J.N. and KRUGGER, G.H.J. (1986). Effect of temperature and light (fluence rate) on the composition of the toxin of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* (UV-006). *Archives for Hydrologia* 108, 145-154.
- WATANABE, M.F. & OISHI, S. (1985). Effects of environmental factors on toxicity of cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 49, 1342-1344.
- WATANABE, M.F.; WATANABE, M.; KATO, T. HARADA, K-I. and SUZUKI, M. (1991). Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa* (blue-green alga, cyanobacteria). *Botanical Magazine Tokyo* 104, 49-57.

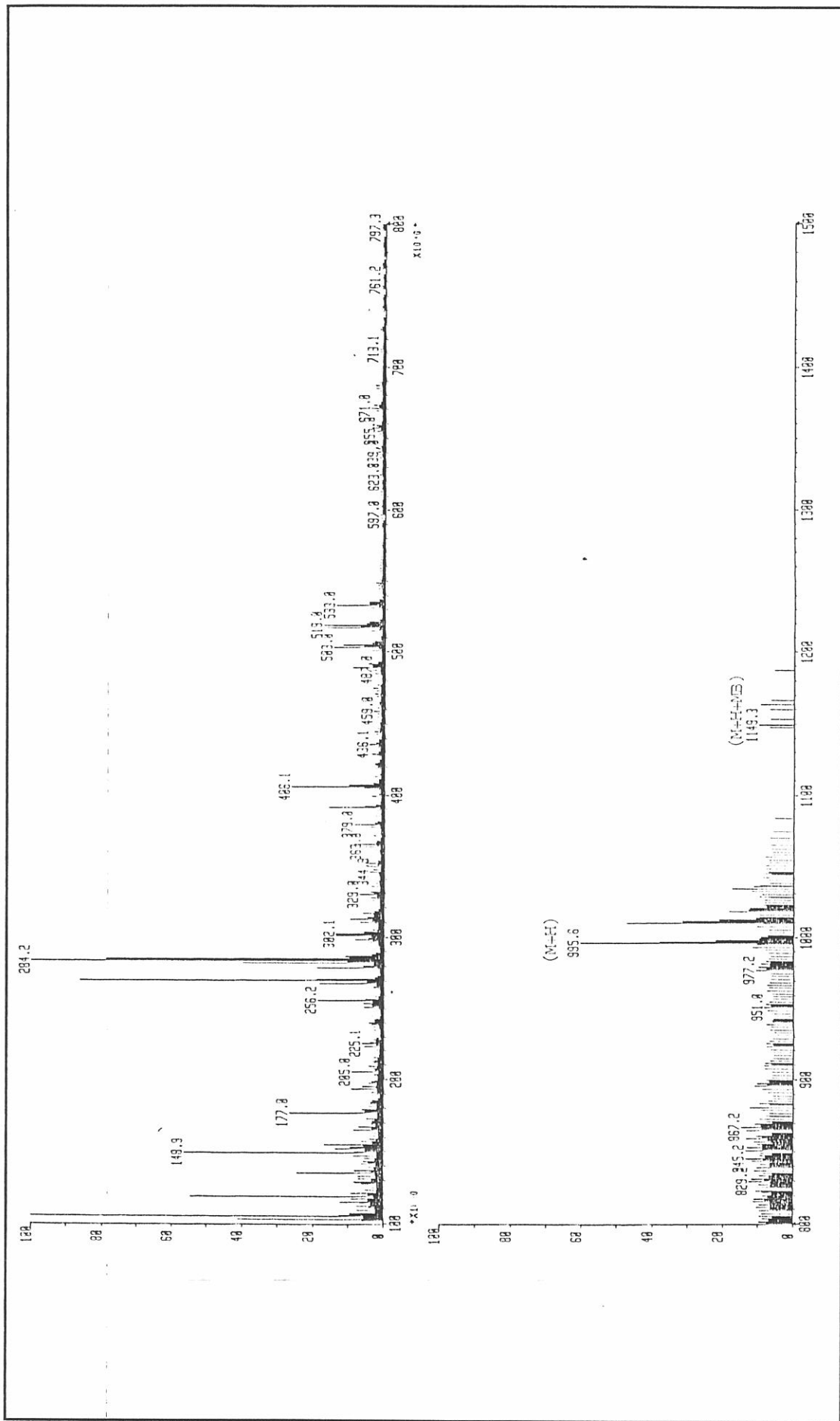
WICKS, R.J. & THEIL, P.G. (1990). Environmental factors affecting the production of peptide toxins in floating scums of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* in hypertrophic african reservoir. *Environmental Science and Technology* 24, 1413-1418.

WITTEN, J.L.; SCHAFFER, M.H.; O'SHEA, M.; COOK, J.C.; HEMLING, M. and RINEHART, K.L. (1984). Structure of two cockroach neuropeptides assigned by fast atom bombardment mass spectrometry. *Biochemistry and Biophysic Research Communications* 124, 350-358.

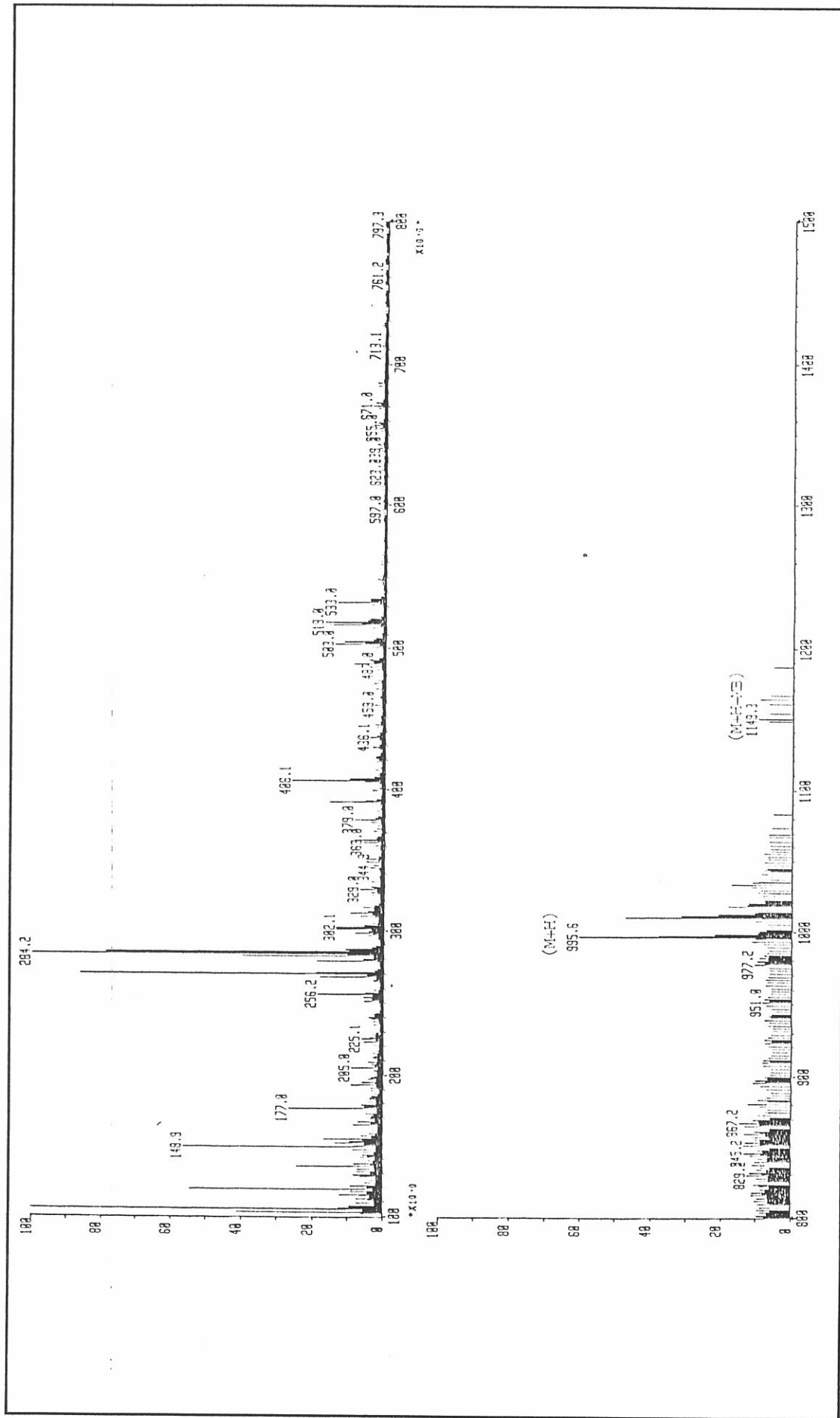
ANEXOS



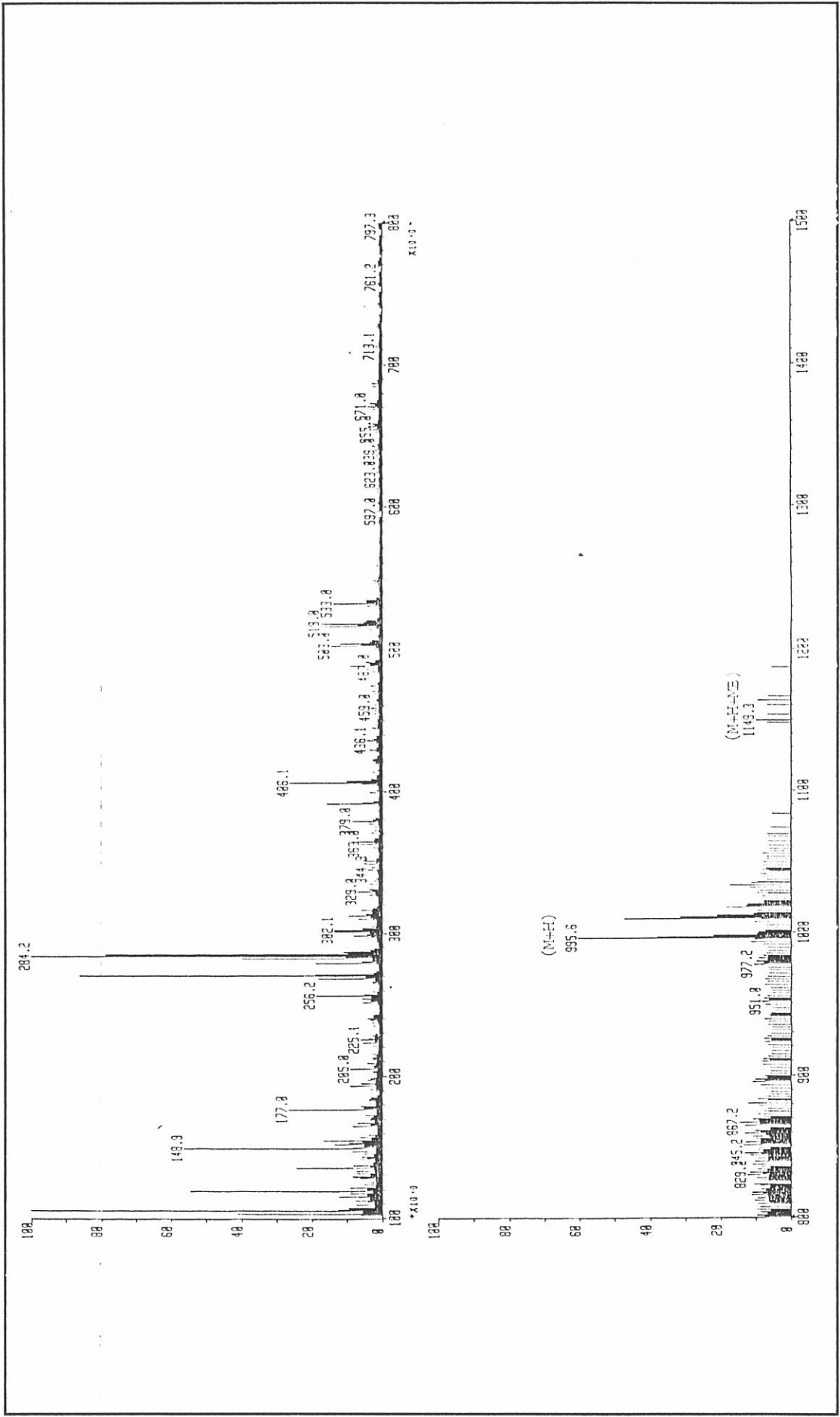
ANEXO 1 - ESPECTRO DE FABMS DA SUBSTÂNCIA 1.



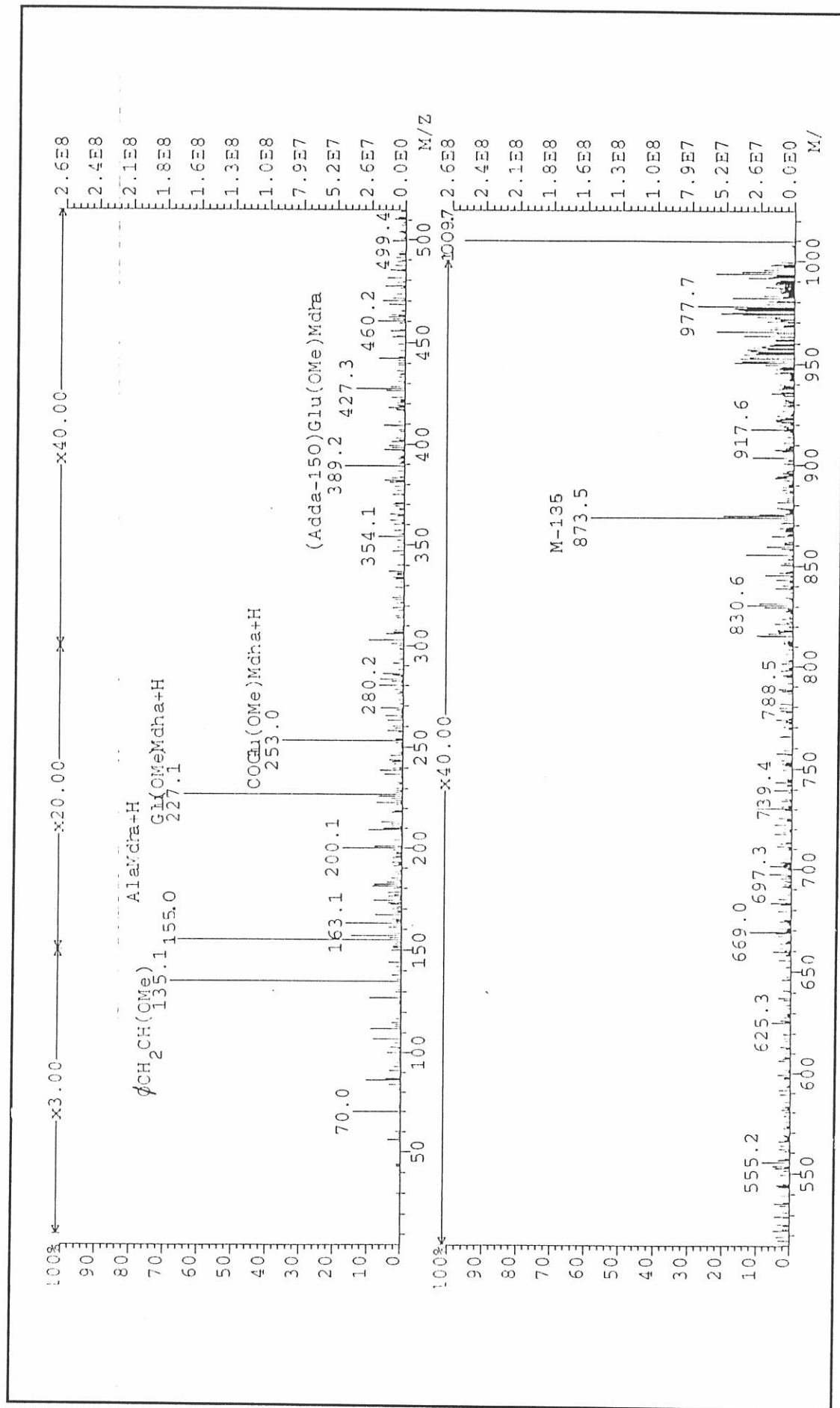
ANEXO 2 - ESPECTRO DE FARMOS DA SUBSTÂNCIA 2.



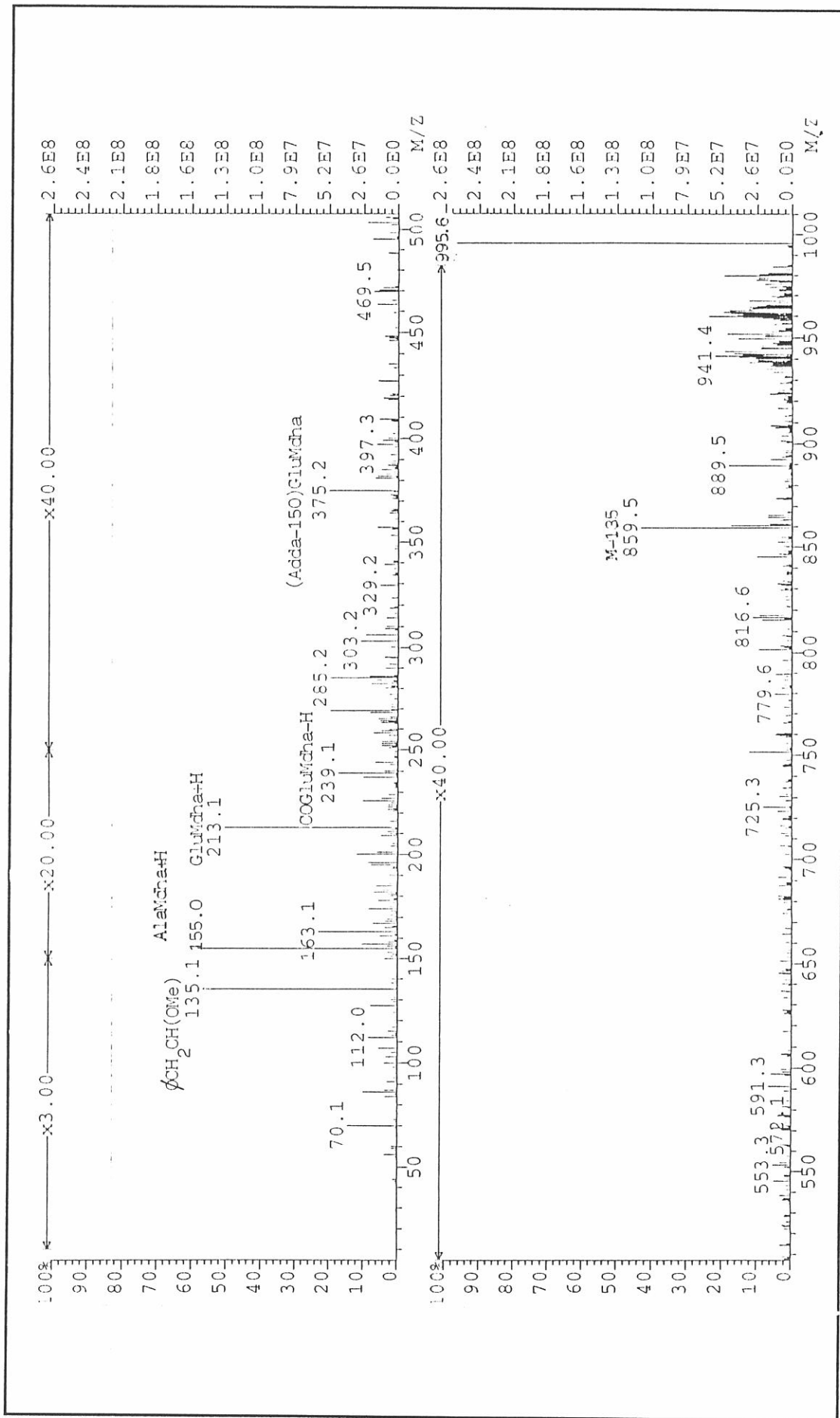
ANEXO 4 - ESPECTRO DE FABMS DA SUBSTÂNCIA 4.



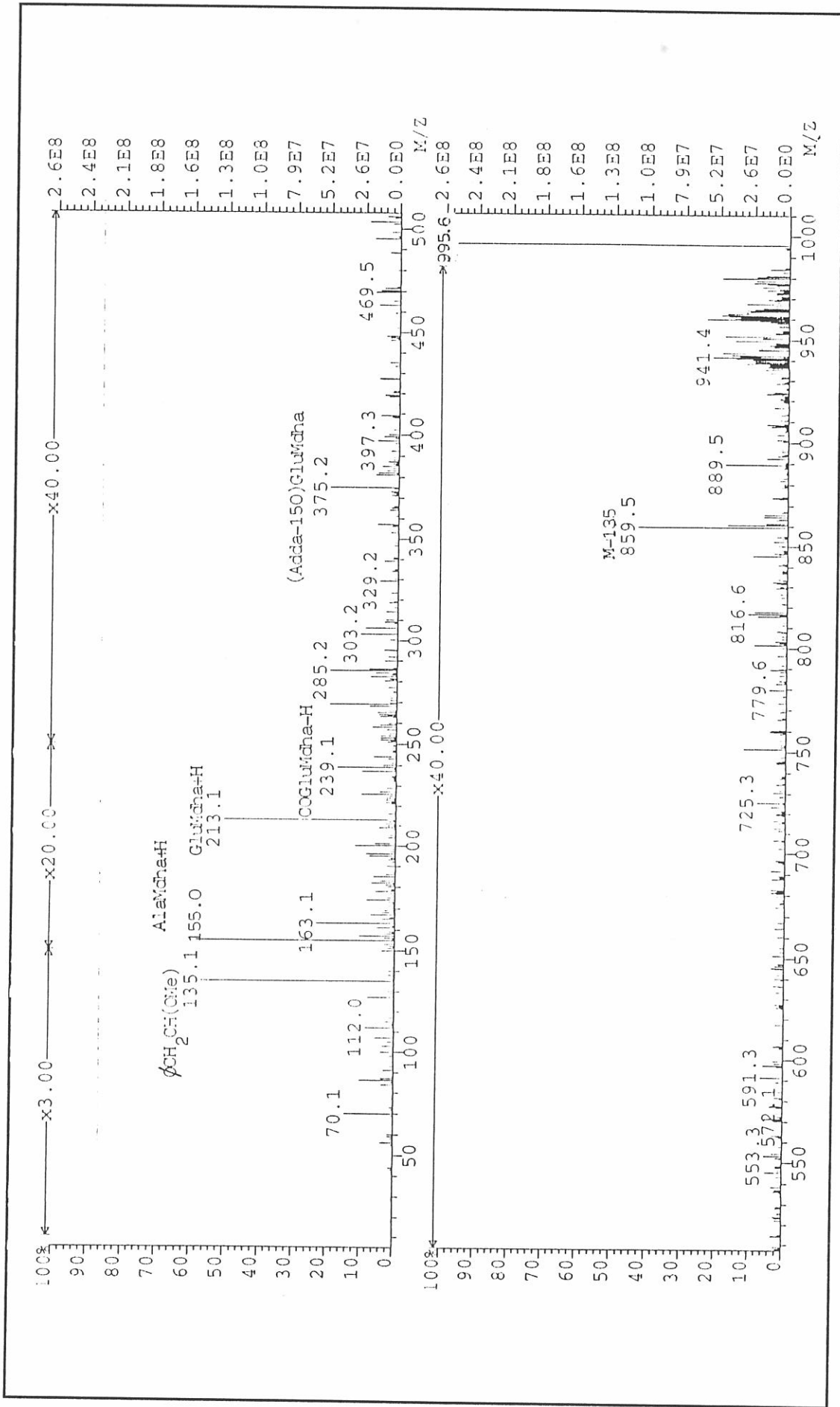
ANEXO 3 - ESPECTRO DE FARMAS DA SUBSTÂNCIA 3.



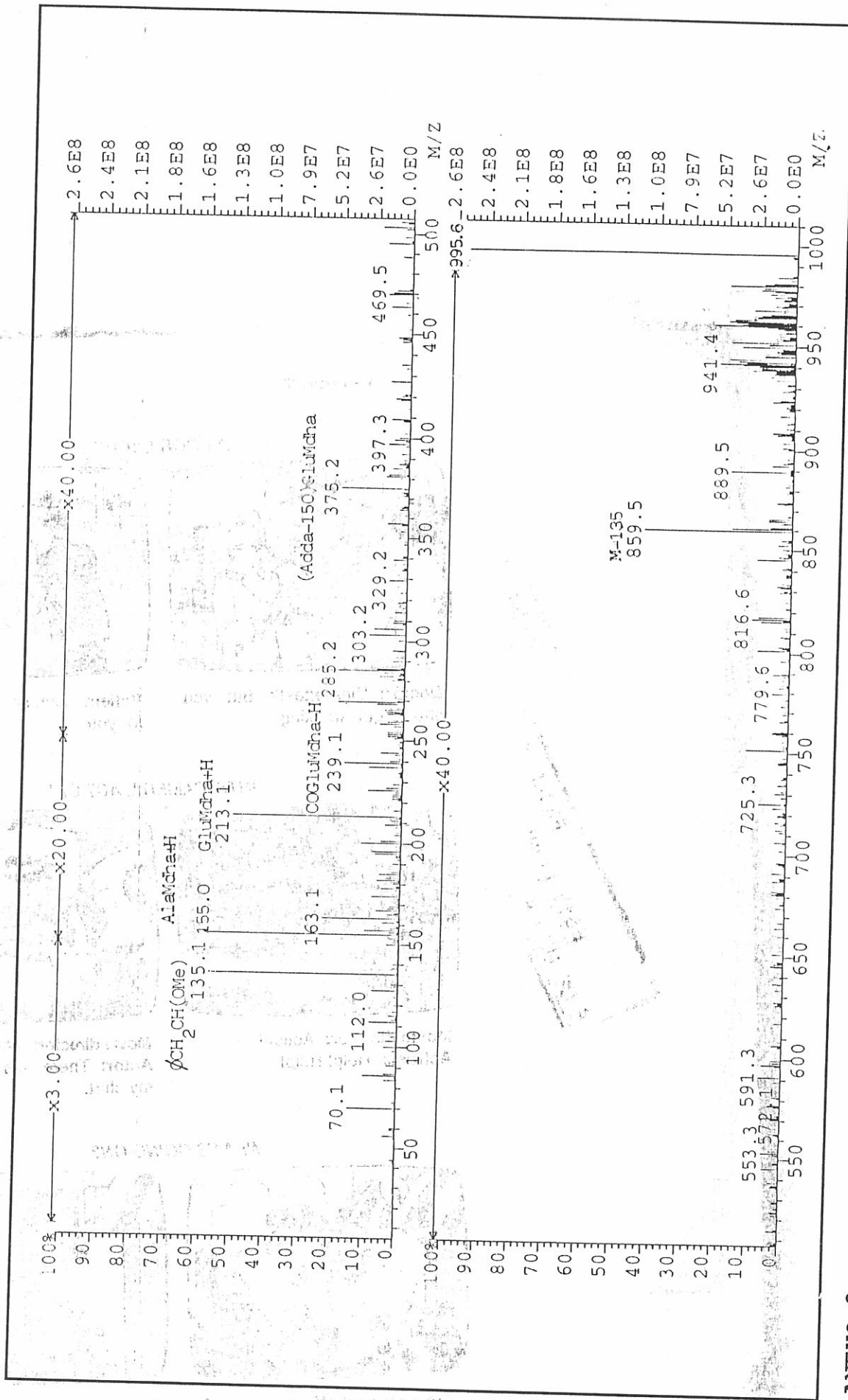
ANEXO 5 - ESPECTRO DE FABMS/MS DA SUBSTÂNCIA 1.



ANEXO 6 - ESPECTRO DE FABMS/MS DA SUBSTÂNCIA 2.



ANEXO 7 - ESPECTRO DE FABMS/MS DA SUBSTÂNCIA 3.



ANEXO 8 - ESPECTRO DE FABMS/MS DA SUBSTÂNCIA 4.