Vitor Manuel de Oliveira e Vasconcelos

TOXICOLOGIA DE CIANOBACTÉRIAS

Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves

Porto - 1995

Vitor Manuel de Oliveira e Vasconcelos

TOXICOLOGIA DE CIANOBACTÉRIAS

Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves

Dissertação para obtenção do grau de Doutor
em Ecologia Aplicada apresentada à Faculdade
de Ciências da Universidade do Porto

De acordo com o nº 2 do Artigo 8º do Decreto-Lei nº 388/70, foram utilizados, em parte, resultados contidos nos seguintes trabalhos já publicados ou em publicação, pessoais ou de colaboração:

VASCONCELOS, V.M., 1993. Toxicity of cyanobacteria of lakes of North and Central Portugal. Ecological implications. Verh.Internat. Verein. Limnol. 25: 694-697

VASCONCELOS, V.M., 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese freshwaters. Arch. Hydrobiol. 130(4):439-451

VASCONCELOS, V.M., 1994. Ocorrência de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em massas de água portuguesas utilizadas para consumo e recreio. Actas do 2º Congresso da Água. Vol. III:295-301

VASCONCELOS, V.M., 1994. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Portuguese freshwaters. In "Detection Methods for Cyanobacterial Toxins", G.A. Codd, T.M. Jefferies, C.W. Keevil e E. Potter (eds.). The Royal Society of Chemistry, Cambridge: 133-135

VASCONCELOS, V.M., 1995. A eutrofização de rios ibéricos. Propostas para a sua monitorização. Resumos do 1º Congresso Ibérico de Contaminação e Toxicologia Ambiental. Coimbra 5-8 Março 1995

VASCONCELOS, V.M.; EVANS, W.R.; CARMICHAEL, W.W. & M. NAMIKOSHI, 1993. Isolation of microcystin-LR from a *Microcystis* (Cyanobacteria) bloom collected in the drinking water reservoir for Porto, Portugal. J. Env. Sci. Health. 28(9): 2081-2094

VASCONCELOS, V.M., Uptake and depuration of the peptide toxin microcystin-LR in the mussel *Mytilus galloprovinciallis*. Aquatic Toxicology (em publicação)

VASCONCELOS, V.M., SIVONEN, K., EVANS, W.R., CARMICHAEL, W.W. & NAMIKOSHI, M., Isolation and characterization of microcystins (heptapeptide hepatotoxins) from Portuguese strains of *Microcystis aeruginosa* Kutz. emed Elekin. Arch. Hydrobiol. (em publicação)

VASCONCELOS, V.M., SIVONEN, K., EVANS, W.R., CARMICHAEL, W.W. & NAMIKOSHI, M., Hepatotoxic microcystin diversity in cyanobacterial blooms collected in Portuguese freshwaters. (submetido)

Em todos os trabalhos, o autor é responsável pelo projecto de investigação, tendo participado no isolamento de estirpes de cianobactérias, na avaliação da sua toxicidade, no isolamento e purificação das toxinas, e em todo o trabalho de acumulação e depuração de hepatotoxinas por mexilhões, bem como na interpretação, discussão e redacção dos resultados.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração e apoio de inúmeras pessoas e instituições, aos quais agradeço:

À Prof. Drª M. Leonor Fidalgo, minha orientadora, por todo o apoio e disponibilidade demonstrados ao longo deste trabalho. Agradeço ainda as sugestões e críticas com as quais este trabalho foi tomando forma.

Ao Prof. Dr. Wayne Carmichael, da Wright State University, meu co-orientador, por toda a amizade, apoio e incentivo desde os primeiros momentos de idealização deste trabalho. A sua disponibilidade e sugestões, quer nos meus períodos de estadia no seu laboratório, quer durante o restante tempo, foram inexcedíveis. Agradeço ainda o seu apoio que sempre me incentivou mesmo em períodos mais difíceis.

Aos Prof. Drª M. Helena Galhano e Jorge Eiras, anterior e actual Presidentes da Direcção do Instituto de Zoologia "Dr. Augusto Nobre", pelas disponibilidades de utilização de equipamento e instalações do IZAN e da Estação de Zoologia Marítima onde realizei parte deste trabalho.

À Drª Kaarina Sivonen, da Universidade de Helsínquia, pela amizade e empenho que colocou na orientação do meu trabalho aquando da minha visita ao seu laboratório, no Departamento de Química Aplicada e Microbiologia da Universidade de Helsínquia. Não posso esquecer a sua disponibilidade constante, o apoio e ensinamentos e o facto de me ter proporcionado condições de trabalho excepcionais. Tal passou, entre outros aspectos, também pelo apoio de alguns dos seus colaboradores, dos quais não quero deixar de mencionar o Leo, a Jaana, o Jarkko, o Micce e a Riitta, que me mostraram que também se pode estudar a toxicologia de cianobactérias na "Sauna", com uma "Olut", após o "Vappu".

Ao Conselho Científico da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, através da Comissão do Grupo de Zoologia/Antropologia pela possibilidade de concessão de equiparação a bolseiro, que me permitiu realizar parte do trabalho na Finlândia e nos EUA.

Durante as minhas visitas ao laboratório do Prof. Wayne Carmichael, não posso deixar de agradecer todo o apoio de alguns técnicos e estudantes entre os quais o Dr. Bill Evans, que com a sua paciência inesgotável nunca se enfureceu com as avarias nos HPLC. Agradeço-lhe ainda o facto de ter realizado as análises de aminoácidos às inúmeras amostras que lhe confiei. Também quero agradecer ao Tony e ao JiSi, por todo o apoio nas análises e purificação das toxinas. Não posso ainda esquecer a Sandra Azevedo, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que visitou este laboratório nas mesmas ocasiões que eu. O seu apoio, críticas e incentivos foram por demais importantes, fazendo que essas estadias fossem sentidas mais em português.

Ao Dr. Michio Namikoshi, na altura na Universidade de Illinois, USA, e agora na Tokyo University of Fisheries, no Japão, quero agradecer as inúmeras análises de FABMS que fez às minhas amostras, bem como todas as sugestões e críticas aos resultados.

À Drª Filomena O. Araújo, da Direcção Geral da Saúde quero agradecer o apoio resultante do seu interesse comum pelas cianobactérias que a ambos preocupa. Os seus conhecimentos de Saúde Pública, especialmente na área da qualidade da água, têm-me sido de uma enorme utilidade.

Aos Prof. Dr. Amadeu Soares, da Universidade de Coimbra e António M.F. Rodrigues da Universidade Nova de Lisboa, quero agradecer as oportunidades de "fertilização cruzada" possível graças aos projectos conjuntos, que, apesar de me terem dispersado um pouco para longe da minha tese, permitiram confirmar que a Ciência é algo de colectivo.

À Drª Rosário Norton, da DRARN Norte, agradeço a obtenção de algumas amostras de cianobactérias do rio Minho e a possibilidade de colaborarmos, em discussões e trabalhos, na área da qualidade da água.

À Engª Margarida Conte de Barros, do INAG, agradeço o interesse demonstrado neste assunto, e a sua preocupação em ajudar a sensibilizar os responsáveis pela água, que o fitoplâncton não deve ser esquecido. Agradeço ainda a ideia, o empenho e as críticas, na concretização da brochura sobre cianobactérias.

Às Drª Raquel Branco e Conceição Guimarães, do IZAN, agradeço a disponibilização de algumas amostras de fitoplâncton de albufeiras do Douro, que me permitiram o isolamento de algumas das estirpes de *Microcystis aeruginosa*.

Aos meus colegas Nuno Ferrand, Paulo Alexandrino, Paulo Célio, António Paulo, Tó Múrias e David Gonçalves, que apesar de leigos em questões de cianobactérias, conseguiram criar um óptimo ambiente de trabalho que ajudou a superar situações e períodos menos fáceis.

À Piedade, que além de partilhar o mesmo interesse científico por estes organismos letais, leu e criticou este trabalho. Ao Zé, que além de ter colaborado em algumas das "expedições", ficou capaz de distinguir a olho nú colónias de *Microcystis*. À Natividade, pela paciência e amizade com que suporta o meu bom e mau humor e pela leitura crítica deste trabalho. Ao Francisco, por todo o profissionalismo com que executou muitas das figuras deste trabalho, bem como por todo o apoio e amizade.

A antigos e actuais alunos que colaboraram na colheita, isolamento, cultura e avaliação de toxicidade de cianobactérias quero, também, expressar aqui o meu agradecimento e em especial a Álvaro Amorim, Teresa Campos, Sandra Oliveira, Vitor Lima, Osório Matias, Cristina Moutinho, Rosário Martins e Anabela Pereira.

Aos funcionários do Instituto de Zoologia e Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre", em especial ao Sr. Pedro Correia, por todo o apoio em partes experimentais deste trabalho.

Agradeço ainda às seguintes Instituições:

Ao Instituto Nacional de Investigação Científica - INIC - por ter financiado a minha deslocação ao XXV Congresso da SIL , Espanha em 1993.

À Fundação Calouste Gulbenkian pelo apoio às minhas deslocações para partcipar na Gordon Research Conference - GRC - on Mycotoxins and Phycotoxins, EUA em 1991 e ainda para realizar um estágio na Wright State University - WSU, EUA, em 1993.

À Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica - JNICT - por ter financiado um estágio na WSU, EUA em 1991 (INVOTAN) e subsidiado a minha deslocação à III European Conference on Ecotoxicology, Suiça, 1994.

À Fundação Luso-Americana para o Desenvolvimento - FLAD - por ter financiado a minha deslocação para participar na GRC on Mycotoxins and Phycotoxins, EUA em 1993.

À European Science Foundation - ESF - por ter financiado o estágio que realizei na Universidade de Helsínquia, Finlândia em 1993.

À minha família, em especial aos meus pais e aos tios Jorge e Natália, que tornaram possível este percurso que me conduziu até aqui. A eles, dedico todo este trabalho.

" ... Os peixes do rio morreram, as águas do rio ficaram infectadas e os egípcios não as podiam beber. E, em vez de água, só havia sangue por todo o Egipto..."

In "Livro do Êxodo"

" As albufeiras surgem ligadas à civilização e, como pecado original, levam consigo a tendência à eutrofização e à contaminação ..."

Ramón Margalef in "Limnologia"

" No ano 2000, todas as pessoas devem ter acesso a adequado fornecimento de água de consumo segura, e a poluição das águas subterrâneas, rios, lagos e mares não deve ser mais um risco para a Saúde "

In "META 20: Saúde para todos no ano 2000"

ÍNDICE PÁGINA

1 - INTRODUÇÃO 1

1.1. Generalidades 1
1.1.1. Causas de eutrofização 2
1.1.2. Consequências da eutrofização 3
1.1.3. Cianobactérias tóxicas e saúde humana 5

1.2. Ocorrência de cianobactérias em águas doces portuguesas 8
1.2.1. Principais espécies de cianobactérias tóxicas em Portugal 8
1.2.2. Classificação do estado trófico das massas de água portuguesas com base nas comunidades de cianobactérias 10

1.3. Toxinas produzidas por cianobactérias 13
1.3.1. Principais tipos de toxinas 13
1.3.2. Caracterização química e toxicológica 13
1.3.3. Técnicas de isolamento e de quantificação de toxinas 17

1.4. Bioacumulação de toxinas em bivalves 18
1.4.1. Utilização de bivalves para monitorização de biotoxinas 18
1.4.2. Principais biotoxinas marinhas 20
1.4.3. Bioacumulação e depuração de toxinas por bivalves 20

2 - MATERIAL E MÉTODOS 23

2.1. Ocorrência de cianobactérias em águas doces portuguesas e avaliação da sua toxicidade. Isolamento e toxicidade de estirpes de *Microcystis aeruginosa* 23
2.1.1. Colheita de florescências de cianobactérias 23
2.1.2. Quantificação das cianobactérias 23
2.1.3. Isolamento e cultura de estirpes de *Microcystis aeruginosa* 26
2.1.4. Bioensaios com murganhos. Determinação da DL_{50} 29

2.2. Extracção, isolamento, purificação e determinação da composição química e do peso molecular de microcistinas 29
2.2.1. Extracção das toxinas 29
2.2.2. Obtenção das fracções 30
2.2.3. Cromatografia Preparativa I (CPI) 31
2.2.4. Cromatografia Preparativa II (CPII) 32
2.2.5. Cromatografia Analítica com Detector de Díodos (CAD) 33
2.2.6. Cromatografia Analítica Final (CAII) 34
2.2.7. Dessalinização das toxinas 35
2.2.8. Determinação da composição aminoacídica 35
2.2.9. Determinação do peso molecular 35
2.2.10. Quantificação das microcistinas em estirpes de *M. aeruginosa* e nas florescências de cianobactérias 36

2.3. Avaliação da bioacumulação e da depuração de microcistina-LR por *Mytilus galloprovincialis* Lamarck 37

2.3.1. Colheita dos animais, aclimatação e condições dos ensaios 37
2.3.2. Experiência de bioacumulação 38
2.3.3. Experiência de depuração 39
2.3.4. Extracção das toxinas presentes em *M. aeruginosa* 39
2.3.5. Extracção das toxinas presentes nos mexilhões 39
2.3.6. Quantificação de MCYST-LR em *M. aeruginosa* e nos mexilhões 40

3 - RESULTADOS 43

3.1. Ocorrência de cianobactérias em águas doces portuguesas. Avaliação da sua toxicidade. Isolamento e toxicidade de estirpes de *Microcystis aeruginosa* 43
3.1.1. Estirpes de *M. aeruginosa* 50
3.1.2. Florescências de cianobactérias 53

3.2.Extracção, isolamento, purificação e determinação da composição química e do peso molecular de microcistinas 54
3.2.1. Estirpes de *M. aeruginosa* 54
3.2.2. Florescências de cianobactérias 58

3.3. Avaliação da bioacumulação e da depuração de microcistina-LR por *Mytilus galloprovinciallis* Lamarck 70

4 - DISCUSSÃO 81

4.1. Ocorrência de cianobactérias em águas doces portuguesas. Avaliação da sua toxicidade. Isolamento e toxicidade de estirpes de *Microcystis aeruginosa* 81
4.1.1. Florescências de cianobactérias. Espécies dominantes e toxicidade 81
4.1.2. Estirpes de *M. aeruginosa* 88

4.2.Extracção, isolamento, purificação e determinação da composição química e do peso molecular de microcistinas 90
4.2.1. Estirpes de *M. aeruginosa* 90
4.2.2. Florescências de cianobactérias 91

4.3. Avaliação da bioacumulação e da depuração de microcistina-LR por *Mytilus galloprovinciallis* Lamarck 95

5 - CONSIDERAÇÕES FINAIS 103

6 - CONCLUSÕES 109

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 113

8 - ANEXOS 137

1. INTRODUÇÃO

1.1. GENERALIDADES

As cianobactérias são organismos procarióticos fotossintéticos, que se podem desenvolver abundantemente em águas doces e salobras com elevadas cargas de nutrientes. Inicialmente, estes organismos foram classificados como algas, daí a designação de algas azuis, pertencentes à classe Cyanophyta. São organismos com uma grande diversidade de formas e funções, de origem bastante recuada, com fósseis desde há 3500 milhões de anos em rochas sedimentares (Schopf e Walter, 1983).

Toda a nomenclatura e sistemática das cianobactérias baseia-se no código de Nomenclatura Internacional de Botânica. O princípio do método da identificação inclui o uso de caracteres observáveis e quantificáveis ao microscópio óptico, tais como a forma da colónia, presença e qualidade de membranas extracelulares, forma, diferenciação e arranjo das células, côr das colónias, do conteúdo celular e dos invólucros e dimensões das células e filamentos (Wilmotte e Golubic, 1991). No entanto, muitas das características morfológicas utilizáveis na distinção de géneros ou espécies de cianobactérias podem variar, num mesmo clone, ao longo do tempo. Tal sucede em amostras de cianobactérias coloniais como *Microcystis* spp. que, quando mantidas em cultura ao longo de vários anos, podem perder o arranjo colonial, impossibilitando a identificação das espécies.

Estes problemas, associados às semelhanças existentes entre bactérias e cianobactérias, conduziram à utilização, nestes organismos, dos critérios usados para classificação das bactérias. No entanto, o sistema que permite classificar as bactérias com base em características bioquímicas e fisiológicas não permite ainda uma distinção das diferentes espécies de cianobactérias.

A possibilidade de estudar os genótipos das cianobactérias foi aberta com o isolamento de estirpes destes organismos. Pensa-se assim que os métodos de biologia molecular poderão, de futuro, ser aplicados para solucionar alguns destes problemas de classificação (Olsen, 1990; Kato *et al.*, 1991).

Neste trabalho será utilizada a classificação vegetal, pois é aquela que ainda hoje é mais vulgarmente utilizada e, além disso, de um ponto de vista funcional as cianobactérias assemelham-se às plantas dos ecossistemas aquáticos.

Apesar de serem considerados organismos típicos de águas eutróficas, e de ocorrerem especialmente em águas de temperatura elevada, podem ser encontrados em praticamente todos os ecossistemas aquáticos, desde nascentes termais com pH < 5 (Brock, 1973; Shapiro, 1984), lagos, lagoas, albufeiras, rios de caudal lento, arrozais, estuários, oceanos, vivendo também no solo em simbiose com plantas ou com fungos (Paerl, 1991).

As cianobactérias são organismos importantes na produção de oxigénio, tendo sido responsáveis pela criação de uma atmosfera respirável no nosso planeta, sendo ainda extremamente utilizadas em estudos de fisiologia (Roenneberg e Carpenter, 1993; Arieli *et al.*, 1994), de biologia molecular (Ueno *et al.*, 1993; Mulligan *et al.*, 1994; Sugita e Sugiura, 1994), de pesquisa de novos fármacos (Gromov *et al.*, 1991; Mundt *et al.*, 1991; Gerwick *et al.*, 1994; Patterson *et al.*, 1994; Rao, 1994), podendo certas espécies ser utilizadas como alimento, uma vez que são ricas em proteínas (Kay, 1991; Dillon e Phan, 1993; Durant-Chastel, 1993).

Por outro lado, quando se desenvolvem em grandes quantidades - florescências ou "blooms" - podem ter consequências negativas do ponto de vista biológico e estético, pois provocam anoxia aquando da sua decomposição, e alteração das características organolépticas da água, para além da produção de potentes toxinas.

A ocorrência destas florescências foi desde cedo associada a elevadas mortandades de peixes, aves aquáticas e gado (Francis, 1878; Bossenmaier *et al.*, 1954; Davidson, 1959; MacDonald, 1960; Main *et al.*, 1977; Reynolds, 1980; Edler *et al.*,1985), sendo também apontadas como responsáveis por intoxicações humanas agudas e crónicas (Falconer, 1989; Turner *et al.*, 1990; Oliveira, 1991).

A quase ausência de estudos sobre a distribuição de cianobactérias tóxicas em águas doces portuguesas e a importância de tais estudos no contexto da gestão da qualidade da água em Portugal motivou a realização deste trabalho.

No presente trabalho pretende-se identificar as principais espécies de cianobactérias tóxicas em águas doces portuguesas, bem como avaliar a sua toxicidade através da utilização de bioensaios com murganhos. É também um dos objectivos deste trabalho o isolamento e a cultura de estirpes de *Microcystis aeruginosa* de modo a se poder purificar e quantificar as suas toxinas, bem como dispôr de estirpes para utilizar em trabalhos futuros. Far-se-á ainda a purificação e caracterização química de microcistinas isoladas a partir de estirpes de *M. aeruginosa* bem como de florescências naturais de cianobactérias. Será ainda estudada a dinâmica de microcistina-LR em experiências de acumulação com mexilhões.

1.1.1. CAUSAS DA EUTROFIZAÇÃO

Os ecossistemas aquáticos lênticos, como os lagos ou as lagoas, cuja taxa de renovação da água é relativamente baixa, tendem a evoluir ao longo do tempo, aumentando a sua carga em nutrientes e acumulando matéria orgânica, diminuindo assim a sua profundidade. Na comunidade fitoplanctónica, ocorre a sucessão das espécies dominantes, bem como aumenta o desenvolvimento de macrófitas, até ao lago evoluir para lagoa, pântano, tornando-se por fim um ecossistema terrestre - prado. Este processo lento de eutrofização natural, que decorre em milhares de anos, pode ser acelerado através da destruição do equilíbrio natural por acção do

Homem. Tal ocorre pela introdução de elevadas quantidades de matéria orgânica ou nutrientes que promovem um desenvolvimento mais rápido do fitoplâncton.

As principais causas de eutrofização antropogénica são as descargas de efluentes domésticos, urbanos ou industriais, a escorrência de pesticidas e fertilizantes de terrenos agrícolas ou a incorrecta utilização da água das albufeiras.

O incremento da eutrofização leva geralmente ao desenvolvimento de florescências fitoplanctónicas, que não são totalmente utilizadas pelo zooplâncton uma vez que este, possuindo taxas de reprodução menos elevadas, não consegue atingir densidades suficientes para remover todo o fitoplâncton. Por outro lado, certos grupos fitoplanctónicos como as cianobactérias, os dinoflagelados e ainda certas diatomáceas e clorófitas, possuem dimensões demasiado grandes para poderem ser ingeridas pelo zooplâncton.

Durante a ocorrência das florescências fitoplanctónicas, o grupo com maior sucesso é, geralmente, o das cianobactérias. Estes organismos apresentam células de resistência a condições ambientais extremas - acinetos - (Rother e Fay, 1979; Nichols e Adams, 1982), possuem requisitos nutricionais relativamente simples, podendo algumas espécies assimilar compostos orgânicos (Saunders, 1972; Droop, 1974; Paerl, 1985). Algumas espécies são capazes de viver em meios completamente desprovidos de azoto (Healey e Heldzelk, 1972; Horne *et al.*, 1979; Gibson e Smith, 1982) e outras são capazes de armazenar fosfatos (Reynolds, 1972; Healey, 1973; Reynolds e Walsby, 1975; Grillo e Gibson, 1979; Istvánovics *et al.*, 1993). A existência de vacúolos gasosos permite-lhes efectuar migrações verticais e, assim, beneficiar de camadas ricas em nutrientes para depois migrar para zonas mais favoráveis do ponto de vista de radiação luminosa (Dinsdale e Walsby, 1972; Grant e Walsby, 1977; Van Liere e Walsby, 1982; Konopka, 1984). Podem ainda efectuar movimentos verticais autónomos e resistir a elevadas intensidades luminosas (Porter & Jost, 1976), podendo assim formar camadas superficiais espessas que constituem uma barreira à passagem de luz para as camadas inferiores da massa hídrica (Paerl, 1991).

1.1.2. CONSEQUÊNCIAS DA EUTROFIZAÇÃO

As florescências de cianobactérias podem ter essencialmente três tipos de distribuição na massa de água: superficial, profunda ou homogénea (Lindholm *et al.*, 1989). A maior parte das florescências de cianobactérias distribui-se homogeneamente durante a maior parte da sua existência, podendo em condições de pouca turbulência, tornar-se superficiais, sendo nesta fase que provocam os maiores problemas ambientais. No entanto, algumas espécies de *Oscillatoria*, desenvolvem florescências ao nível do termoclino, beneficiando de nutrientes do hipolimnion e compensando a baixa intensidade luminosa pelo aumento da produção de clorofila e de ficobilina por célula (Reynolds *et al.*, 1983; Lindholm & Meriluoto, 1991).

O rápido crescimento cianobacteriano leva geralmente à deplecção de nutrientes nas camadas superficiais da massa de água, bem como a uma sobressaturação de oxigénio durante o dia e à sua deplecção durante a noite. Quando as condições fisicas e químicas do meio não suportam mais crescimento destes organismos, ocorre o colapso de toda a biomassa cianobacteriana. A partir deste momento ocorre uma série de processos de decomposição que culmina com a deplecção de oxigénio na água e com a produção de substâncias como ácido sulfídrico, amónia e hidroxilamina. Torna-se assim, por vezes, difícil atribuir uma causa à morte de peixes sujeitos ao colapso de florescências fitoplanctónicas. Quer as toxinas quer as consequências da decomposição da matéria orgânica têm um papel importante nas mortandades de peixes (FAO, 1970; Barica, 1975; Ayles *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1982).

No entanto, não são apenas estes os problemas resultantes da decomposição das cianobactérias. A alteração das características organolépticas da água e de animais que nela vivam é um fenómeno geralmente associado com estes processos. As principais substâncias responsáveis por estas alterações são a geosmina e o 2-metil-isoborneol (Persson, 1983), podendo ainda ser detectados compostos voláteis de enxofre (Tsuchiya *et al.*, 1992). Todos estes compostos tornam a água imprópria para consumo, dado o intenso sabor e odor a ranço e lodo, podendo afectar de igual modo, peixes e outros animais aquáticos (Persson, 1978; 1980; Martin *et al.*, 1988; Kenefick *et al.*, 1992).

As principais espécies de cianobactérias produtoras destes compostos estão indicadas na tabela 1.1..

Tabela 1.1. - Principais espécies de cianobactérias produtoras de geosmina e 2-metil-isoborneol.

COMPOSTOS PRODUZIDOS	ESPÉCIES RESPONSÁVEIS	REFERÊNCIA
geosmina	*Anabaena circinalis*	Henley (1970)
	A. flos-aquae	Hayes e Burch (1989)
	A. Scheremetievi	Izaguirre *et al.* (1982)
	Aphanizomenon flos-aquae	Matsumoto e Tsuchiya (1988)
	Oscillatoria agardhii	Persson (1979)
	O. tenuis	Tabachek e Yurkowski (1976)
	O. variabilis	Tabachek e Yurkowski (1976)
	O. brevis	Utkilen e Frøshaug (1992)
	O. bornetti	Utkilen e Frøshaug (1992)
2-metil-isoborneol	*O. curviceps*	Izaguirre *et al.* (1982)
	O. tenuis	Izaguirre *et al.* (1982)
	Oscillatoria sp.	Martin *et al.* (1991)

Estas substâncias podem ser, hoje em dia, rotineiramente detectadas na água ou em animais por cromatografia gasosa - GC - (McGuirre *et al.*, 1981; Boren *et al.*, 1982) sendo, no entanto, mais comum, e por vezes com resultados mais satisfatórios, a utilização de painéis de testadores que, através do sabor e olfacto, analisam soluções diluídas da água a testar ou amostras de animais contaminados (Persson e York, 1978; Martin *et al.*, 1988). Tal procedimento é, hoje em dia, obrigatório na análise da qualidade de água destinada ao consumo humano, de acordo com o Decreto-Lei 74/90.

A acumulação de elevadas quantidades de cianobactérias junto às margens de rios, lagos e albufeiras, torna estes locais impróprios para serem utilizados do ponto de vista recreativo, uma vez que deve evitar-se qualquer contacto directo com as cianobactérias de modo a prevenir intoxicações humanas, agudas ou crónicas. Em países onde o número e a gravidade das intoxicações humanas foi suficiente para justificar um elevado interesse por parte das autoridades sanitárias sobre estes problemas, sempre que uma florescência é detectada, o local é fechado ao público e são feitas análises da toxicidade das cianobactérias. Se estas florescências ocorrem em estâncias turísticas, tal poderá significar perdas económicas importantes bem como uma desvalorização do local.

A libertação de toxinas para a água é talvez o efeito mais dramático resultante da decomposição das cianobactérias. Durante a maior parte da vida das células cianobacterianas, as toxinas são produzidas e mantêm-se dentro das mesmas, sendo apenas libertadas aquando da lise celular, quando estas são ingeridas pelo zooplâncton, peixes, ou se rebentadas durante o processamento da água em estações de tratamento de águas para consumo. Os casos mais dramáticos ocorrem quando as florescências são superficiais e, por acção do vento, se concentram em locais abrigados como pequenas enseadas ou baías. A decomposição destes organismos nesta fase, leva à libertação maciça de toxinas, com consequências letais para os organismos que as ingiram.

1.1.3. CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS E SAÚDE HUMANA

A constatação de que florescências de cianobactérias podiam provocar intoxicações humanas data do início do século, havendo registos de alterações gastrointestinais em populações humanas nos EUA ocorridas em 1930 (Tisdale, 1933). Por outro lado, o primeiro registo de intoxicações animais provocada por cianobactérias data do século passado, na Austrália (Francis, 1878).

Em Portugal, os registos de intoxicações humanas são escassos, não querendo tal significar a sua ausência, mas provavelmente o desconhecimento da existência destes agentes como potenciais causadores de intoxicações.

Não existem referências a intoxicações humanas letais devido ao facto de as cianobactérias, quando em elevadas densidades, conferirem à água um aspecto e odor desagradáveis que, geralmente, afastam potenciais utilizadores. Por outro lado, poucos organismos parecem poder acumular estas toxinas e transmiti-las a níveis tróficos superiores. O trabalho de Eriksson *et al.* (1989) demonstrou que as hepatotoxinas de *Oscillatoria agardhii* podiam ser acumuladas por um molusco de água doce, sem que este sofresse, pelo menos aparentemente efeitos negativos. Falconer *et al.* (1992) demonstraram que mexilhões de um estuário australiano podiam acumular grandes quantidades de hepatotoxinas de *Nodularia*.

As intoxicações humanas podem dividir-se, quanto ao modo e intensidade de exposição às cianobactérias, em agudas e crónicas.

As intoxicações agudas ocorrem por contacto, acidental ou não, com grandes massas de cianobactérias aquando de natação ou mergulho em águas com estes organismos, por inalação ou por ingestão de água contaminada com grandes quantidades de toxinas.

Inicialmente os sintomas decorrentes de intoxicações por contacto podem ser semelhantes aos obtidos com a "febre dos fenos", ocorrendo obstrução nasal, conjuntivite, asma, inflamação das pálpebras e urticária (Heise, 1949), podendo depois derivar para dermatites várias com lesões do tipo eritematoso-papulo-vesicular, até chegar à formação de crostas (Cohen e Reif, 1953). As dermatites de contacto podem ocorrer com espécies dos géneros *Anabaena*, *Oscillatoria*, *Microcystis*, *Aphanizomenon* e *Gloeotrichia* (Gorham & Carmichael, 1988).

As intoxicações por ingestão podem originar dores de cabeça, náuseas, perturbações gastrointestinais e diarreia (Dillenberg & Dehnel, 1960) e em casos mais graves, odinofagia, vesículas à volta da boca, toracalgias à esquerda, tosse seca, vómitos, dores abdominais, febre e consolidação da base à esquerda (Turner *et al.*, 1990).

As cianobactérias também podem entrar no nosso organismo por via nasal, uma vez que os seus esporos podem ser transportados pelo ar, ou podem ser inaladas aquando de natação, mergulho, windsurf, esqui-aquático ou outras actividades aquáticas. As alterações respiratórias daí decorrentes podem ser bronquite aguda, pleurite e edema pulmonar agudo (Schwimmer e Schwimmer, 1967). Num estudo realizado na Índia, Mittal *et al.* (1979) verificaram que 25% dos 4000 pacientes com alergias respiratórias mostraram respostas positivas a, pelo menos, uma das espécies de cianobactérias testadas. Parece, assim, que uma parte significativa das reacções alérgicas a partir de fontes aéreas poderá ser atribuída às cianobactérias, transportadas pelo ar como esporos.

Em Portugal, Oliveira (1991) refere um caso de intoxicações humanas em populações do Alentejo, que consumiram água do rio Guadiana que na altura apresentava uma florescência dominada por *Ap. flos-aquae*. Perturbações gastrointestinais com diarreia foram os sintomas mais frequentes, que como nos casos anteriormente citados, desapareceram após se ter evitado o contacto com as cianobactérias.

As intoxicações crónicas são mais difíceis de detectar, especialmente porque, também aqui, a sintomatologia não é típica deste tipo de intoxicações, resultando geralmente da ingestão repetida de pequenas doses de toxinas de cianobactérias. As hepatotoxinas - microcistinas e nodularina - são as toxinas mais comuns na produção de intoxicações crónicas. Uma vez que actuam a nível hepático através da alteração da forma dos hepatócitos e destruição da estrutura sinusoidal (Eriksson *et al.*, 1987; 1988a), regista-se geralmente um aumento da actividade de enzimas hepáticas no plasma de pacientes intoxicados.

Num estudo realizado na Austrália com uma população humana que consumia água de uma albufeira com uma florescência tóxica de *M. aeruginosa*, verificou-se que, durante o período de máxima densidade cianobacteriana, os níveis de actividade da γ-glutamiltranspeptidase (GGT) e da alanina aminotransferase (ALT) no plasma aumentaram significativamente (Falconer *et al.*, 1983a). Sugeriu-se, assim, que estes efeitos foram devidos às toxinas de *M. aeruginosa*. As mesmas conclusões foram obtidas em trabalhos laboratoriais com murganhos, tendo-se verificado um aumento nos níveis de actividade da desidrogenase láctica (LDH) e das enzimas anteriormente citadas em animais intoxicados experimentalmente (Falconer *et al.*, 1988).

Outro aspecto relativo à toxicidade crónica diz respeito à inibição das fosfatases proteicas por parte das microcistinas e das nodularinas. De facto, verificou-se que estas toxinas são potentes inibidores das fosfatases proteicas 1 e 2A, com uma potência semelhante à do ácido ocadaico (Eriksson *et al.*, 1990; Mackintosh *et al.*, 1990; Yoshizawa *et al.*, 1990). As hepatotoxinas aumentam os níveis básicos de fosforilação proteica nos hepatócitos, devido à inibição das fosfatases. O organotropismo e a especificidade celular das microcistinas são devidos aos mecanismos de tomada selectiva específica para o fígado, nomeadamente através do sistema de transporte dos ácidos biliares.

A nível celular, as hepatotoxinas conduzem a alterações profundas relacionadas com a reorganização do citoesqueleto, nomeadamente na organização dos microfilamentos e, consequentemente, na formação de uma estrutura globular. O aumento da fosforilação das proteínas ocorre rapidamente, podendo observar-se diferenças significativas após 5 minutos de exposição à toxina (Eriksson *et al.*, 1990; Carmichael, 1994).

Relacionado com este aspecto está o facto de as microcistinas poderem actuar como promotores de tumores. Experiências realizadas com murganhos aos quais foi aplicada uma substância cancerígena na pele e administrada oralmente água contendo microcistinas, demonstraram que estes animais desenvolveram tumores muito maiores do que os que consumiram água sem toxinas. (Falconer & Buckley, 1989; Falconer, 1991). Este efeito na promoção de tumores foi inicialmente descrito para o ácido ocadaico, substância que é também um potente inibidor das fosfatases proteicas, sendo produzido por alguns dinoflagelados marinhos causadores de Intoxicação Diarreica por Moluscos - DSP - (Luu *et al.*, 1993).

Apesar de não haver ainda dados que liguem com segurança a presença de cianobactérias tóxicas e cancro no fígado, um estudo realizado na China revelou que as causas de cancro

primário de fígado parecem estar relacionadas directamente com a água consumida (Yu, 1989; 1994). Neste estudo epidemiológico verificou-se que em regiões com elevados níveis de cancro de fígado as populações consumiam água de diques e pequenas lagoas, em vez de água de poços. Embora devamos ser prudentes ao fazer certo tipo de extrapolações não é de rejeitar a hipótese de que as toxinas cianobacterianas possam contribuir para o desenvolvimento de tumores hepáticos (Carmichael, 1994), já que as florescências tóxicas de *M. aeruginosa* são relativamente comuns nesse tipo de massas de água na China (Carmichael *et al.*, 1988).

1.2. OCORRÊNCIA DE CIANOBACTÉRIAS EM ÁGUAS DOCES PORTUGUESAS

1.2.1. PRINCIPAIS ESPÉCIES DE CIANOBACTÉRIAS TÓXICAS EM PORTUGAL

A ocorrência de cianobactérias em águas doces portuguesas tem vindo a ser referida desde os anos 30 (Sampaio, 1933a; 1933b; 1934; 1936; 1938; 1940; 1941a; 1941b; 1942; 1947; 1951), embora estes estudos visassem um melhor conhecimento da distribuição geográfica destes organismos no nosso país e a descrição de novas espécies. Trabalhos qualitativos como os de Frade (1951; 1954), Nauwerck (1959) e Oliveira e Caldas (1970), também não apresentam qualquer indicação de abundâncias relativas ou da variação sazonal das diferentes espécies observadas. Até aos anos 50 apenas algumas espécies potencialmente tóxicas tais como *Oscillatoria formosa, O. agardhii/rubescens, Lyngbya majuscula, Schizothrix calcicola* e *Scytonema Hofmanni* haviam sido descritas em águas portuguesas.

O primeiro trabalho comparativo, e, ao mesmo tempo, visando estimar o grau de eutrofização de diversas massas de água portuguesas é de Nauwerck (1962). Nele são referidas outras espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas, tais como *Microcystis viridis, M. flos-aquae, Coelospherium kutzingianum, Oscillatoria rubescens, O. agardhii, Pseudoanabaena catenata* e *Anabaena flos-aquae*.

Mais recentemente, diversos trabalhos de carácter sistemático e/ou ecológico, têm sido publicados, fazendo-se referência a listas de espécies de cianobactérias (Rodrigues, 1963; Santos, 1973; 1976; Oliveira, 1984a; Santos e Mesquita, 1986; Santos, 1988; Coutinho, 1990a, 1990b; Calado *et al.*, 1991), à sua flutuação sazonal (Oliveira 1984a; 1984b; 1984c; Branco e Guimarães, 1988; Galhano *et al.*, 1991; Rodrigues *et al.*, 1993), à distribuição vertical e horizontal (Vasconcelos, 1991), sendo também referidos aspectos de autoecologia das principais espécies de cianobactérias planctónicas (Oliveira, 1987) numa tentativa de explicar a sucessão dos diferentes grupos e espécies ao longo do ano. Nestes últimos trabalhos, espécies como *Anabaena affinis, A. circinalis, A. variabilis, Ap. flos-aquae, M. aeruginosa, Nostoc paludosum* e *O. acutissima* têm aumentado a lista de cianobactérias potencialmente tóxicas nas nossas águas doces.

As espécies de cianobactérias mais representativas e até agora registadas em águas doces do nosso país estão indicadas na tabela 1.2.

São escassas as referências directas à toxicidade de cianobactérias em Portugal. Nalguns trabalhos refere-se a ocorrência de mortandades de peixes devidas à decomposição de florescências de cianobactérias (Oliveira, 1984c; 1987), mas as causas de morte apontadas são principalmente a desoxigenação da água e a produção de elevados níveis de amónia, ou de outros produtos resultantes da decomposição de proteínas, como a hidroxilamina (Barica, 1975; Ayles *et al.*, 1976; Barica, 1978; Leeuwang *et al.*, 1983).

Oliveira (1991) ao referir a ocorrência de intoxicações humanas no Alentejo após o consumo de água com uma florescência de *Ap. flos-aquae*, registou grandes quantidades de peixes mortos nas margens do rio Guadiana. Apesar de não haver muitas vezes um diagnóstico completo em casos de mortandades de peixes em locais eutróficos, sabe-se que são afectados negativamente por toxinas cianobacterianas (Philips *et al.*, 1985; Toranzo *et al.*, 1990; Råberg *et al.*, 1991; Beveridge *et al.*, 1993; Rodger *et al.*, 1994).

Tabela 1.2. - Lista de espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas registadas em águas doces portuguesas.

ESPÉCIES	REFERÊNCIA
A. affinis Lemm.	Oliveira (1984b), Cabeçadas *et al.* (1986)
A. circinalis Rabenh.	Oliveira (1984c)
A. flos-aquae (Lyngb.) Breb.	Oliveira (1984a), Vasconcelos (1991)
A. variabilis Kutz.	Santos (1988)
Aphanizomenon flos-aquae (L.) Ralfs	Oliveira (1984a), Silva (1989)
Coelosphaerium kutzingianum Nag.	Oliveira (1984a), Silva (1989)
Gomphosphaeria lacustris Chod.	Nauwerck (1962), Oliveira (1984a)
Lyngbya majuscula Harvey	Sampaio (1933)
Microcystis aeruginosa Kutz.	Oliveira (1984a), Silva (1989)
M. viridis (A. Br.) Lemm.	Nauwerck (1962)
Nostoc paludosum Kutz.	Rodrigues (1963)
Nostoc sp. Vauch	Sampaio (1941)
Oscillatoria acutissima Kuff.	Rodrigues (1963)
O. agardhii/rubescens	Nauwerck (1962)
O. formosa Bory	Sampaio (1941), Oliveira (1984c)
Pseudoanabaena catenata Lauterb.	Nauwerck (1962), Oliveira (1984b,c)
Schizothrix calcicola (Ag.) Gom.	Sampaio (1933)
Scytonema Hofmanni Ag.	Sampaio (1947)

1.2.2. CLASSIFICAÇÃO DO ESTADO TRÓFICO DAS MASSAS DE ÁGUA PORTUGUESAS COM BASE NAS COMUNIDADES DE CIANOBACTÉRIAS.

De modo a obter-se uma ideia do estado trófico de diversas massas de água portuguesas, utilizamos referências sobre a ocorrência das principais espécies de cianobactérias produtoras de toxinas para a realização da figura 1.1, e utilizando dados quantitativos construiu-se a carta de qualidade que se apresenta na figura 1.2.. Para esta carta escolheu-se o valor máximo de densidade cianobacteriana ocorrido em cada um dos locais estudados. Esses valores de densidade máxima (nº cél/l) foram logaritmizados, tendo-se utilizado o valor inteiro do logaritmo para construir a carta. A cada valor foi depois atribuída uma cor, de forma a facilitar a leitura.

Embora o Decreto-Lei 74/90, conhecido como lei da água, refira que as águas de consumo " não devem conter algas...", a vigilância sanitária da água não passa geralmente por esta vertente. De facto, não é sequer referida qual a técnica a utilizar para efectuar a monitorização deste parâmetro, ao contrário dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos.

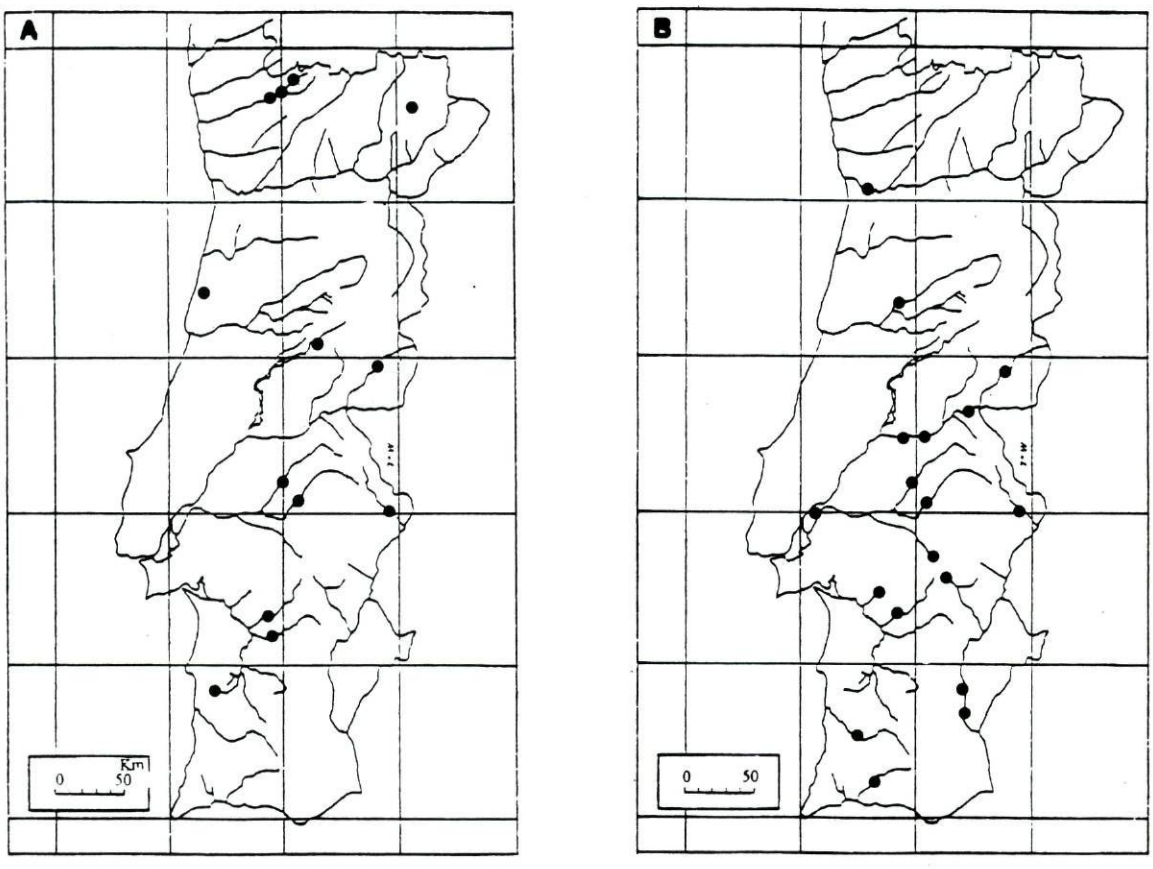


Fig. 1.1. - Distribuição geográfica das principais espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas em águas doces portuguesas (**A** - *An. flos-aquae* , **B** - *Ap. flos-aquae)*.

Fig. 1.1. (Continuação) - Distribuição geográfica das principais espécies de cianobactérias potencialmente tóxicas em águas doces portuguesas (**C-** *M. aeruginosa,* **D -** *P. catenata,* **E-** *C. kutzingianum* e **F-** *G.lacustris)*

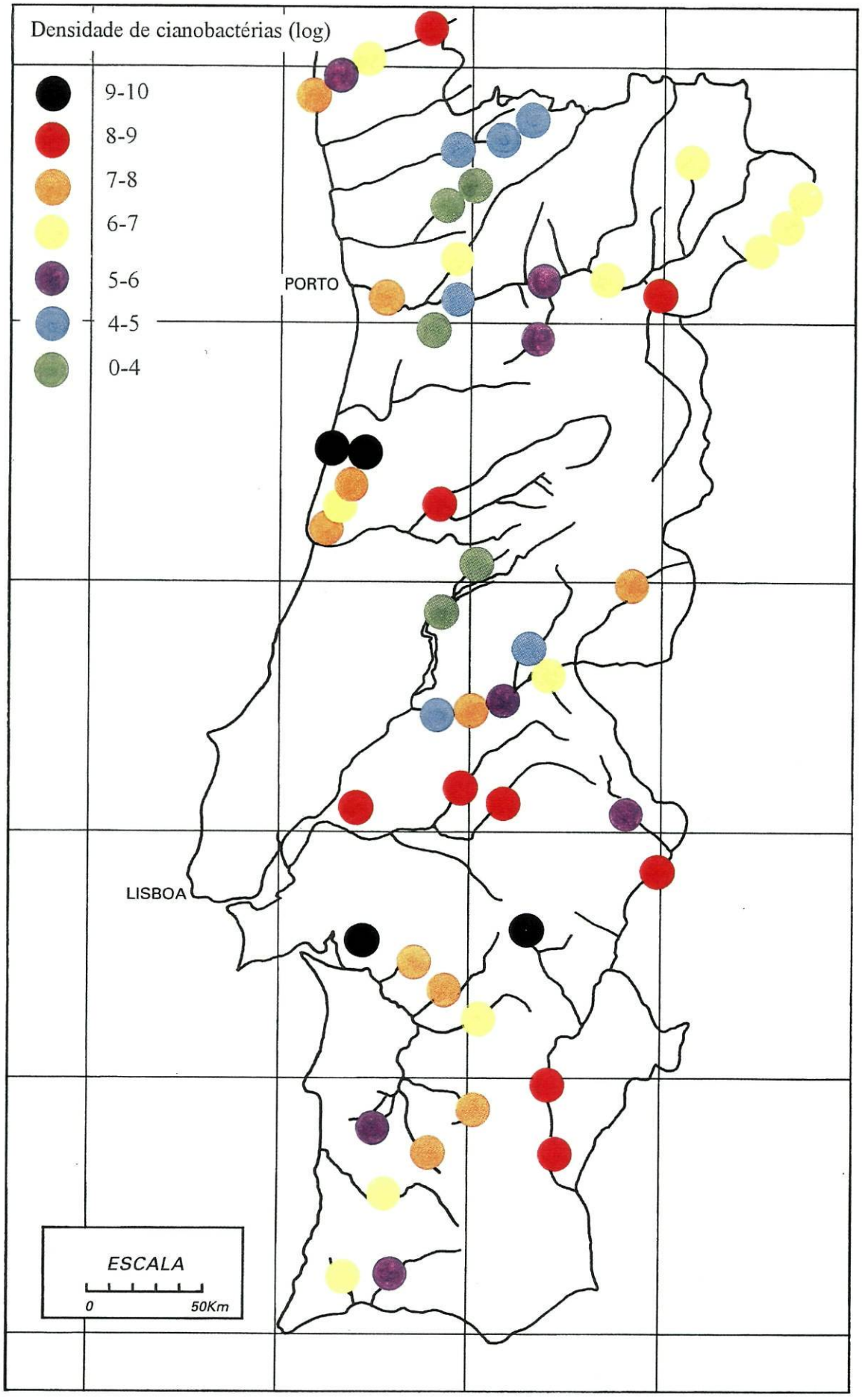


Figura 1.2- Carta de qualidade da água em função da abundância máxima de cianobactérias em águas doces portuguesas .

1.3.1. PRINCIPAIS TIPOS DE TOXINAS

As toxinas produzidas pelas cianobactérias podem ser divididas essencialmente em três tipos, de acordo com o tipo de intoxicações que provocam em mamíferos, irritantes ao contacto, hepatotoxinas e neurotoxinas.

As toxinas irritantes ao contacto são responsáveis por irritações cutâneas produzindo dermatites, que culminam com o aparecimento de vesículas nas regiões em que ocorreu o contacto directo. Os principais géneros envolvidos nestas intoxicações são *Lyngbya*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Gloeotrichia* e *Schizothrix* (Grauer e Arnold, 1961; Gorham e Carmichael, 1988; Soong *et al.*, 1992). No entanto, os sintomas desaparecem se o contacto for evitado. Em Portugal existe apenas um registo deste tipo de intoxicações, ocorrido no Alentejo, em 1987, devido a contacto directo com uma florescência essencialmente de *Aphanizomenon flos-aquae* (Oliveira, 1991).

As neurotoxinas são responsáveis por paralisias musculares, resultantes de interferência nas comunicações entre neurónios e células musculares. As cianobactérias são responsáveis pela produção de 5 tipos de neurotoxinas, anatoxina-a, anatoxina-a(s), homoanatoxina-a, saxitoxina e neosaxitoxina (Carmichael, 1994). Destas, as três primeiras são exclusivas das cianobactérias, enquanto que a saxitoxina e a neosaxitoxina foram descritas inicialmente para os dinoflagelados causadores da intoxicação paralisante por moluscos - PSP (Hall e Reichardt, 1984; Oshima *et al.*, 1984; Shimizu *et al.*, 1984).

As hepatotoxinas são responsáveis pela destruição da estrutura interna do fígado, resultando em choque hipovolémico e hepatomegalia, em casos de intoxicações animais letais (Falconer *et al.*, 1981; Theiss *et al.*, 1988; Beasley *et al.*, 1989). As hepatotoxinas dividem-se em microcistinas e nodularinas, possuindo estruturas químicas semelhantes com sete e cinco amino ácidos respectivamente. Recentemente, foi descrita outra hepatotoxina, a cilindrospermopsina (Ohtani *et al.*, 1992), que foi isolada a partir de *Cylindrospermopsis raciborskii*, na sequência de uma intoxicação de 140 pessoas na Austrália com sintomas de hepatoenterite (Bourke *et al.*, 1983; Hawkins *et al.*, 1985).

1.3.2. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E TOXICOLÓGICA

Do ponto de vista químico as toxinas irritantes ao contacto são ainda desconhecidas, excepto o caso das produzidas por espécies marinhas como *L. majuscula*, *S. calcicola* e *O. negroviridis*. Os agentes responsáveis são a lingbiatoxina e aplisiatoxinas, que são potentes agentes promotores de tumores (Moore *et al.*, 1986).

Os diferentes tipos de neurotoxinas têm actuações diversas do ponto de vista toxicológico. A anatoxina-a, a anatoxina-a(s) e a homonanatoxina-a causam paralisia muscular por sobreestimulação das células musculares, enquanto que a saxitoxina e a neosaxitoxina a provocam por bloqueio das transmissões entre os axónios e as células musculares.

A anatoxina-a consegue imitar a acetilcolina, não sendo contudo degradada pela acetilcolinesterase. Deste modo ocorre uma sobreestimulação do músculo, levando a uma situação de tétano e paralisia muscular (Devlin *et al.*, 1977; Carmichael, 1994). A anatoxina-a possui uma toxicidade (i.p. DL_{50}) de cerca de 200 μg/kg (Carmichael, 1992).

A anatoxina-a(s) actua inibindo a acetilcolinesterase, pelo que o efeito final é semelhante ao da anatoxina-a (Mahmood e Carmichael, 1987; Mahmood *et al.*, 1988; Cook *et al.*, 1989). É um composto organofosfatado produzido naturalmente com uma toxicidade elevada, atingindo uma DL_{50} de cerca de 20 μg/kg, embora seja bastante instável para temperaturas acima de 40 ° C e em condições alcalinas (Mahmood e Carmichael, 1987; Carmichael, 1992).

A homoanatoxina-a é uma neurotoxina produzida por *Oscillatoria rubescens* (Skulberg *et al.*, 1992). Este composto é ligeiramente menos tóxico que a anatoxina-a, sendo um seu homólogo metilado.

A saxitoxina e a neosaxitoxina são alcalóides que causam paralisia por bloqueio do fluxo de iões de sódio através das membranas dos axónios, impedindo a libertação de acetilcolina por parte dos neurónios (Carmichael, 1994). Possuem toxicidade muito elevada, atingindo uma DL_{50} de 10 μg/kg (Kao, 1993).

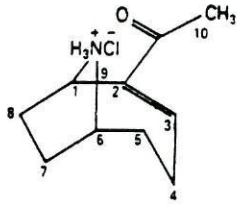
Os principais géneros produtores de toxinas neurotóxicas estão descritos na tabela 1.3.

Tabela 1.3. - Principais géneros de cianobactérias produtoras de neurotoxinas (modificado de Carmichael, 1994).

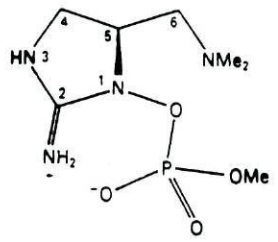
Neurotoxina	Género
anatoxina-a	*Anabaena, Oscillatoria*
anatoxina-a(s)	*Anabaena*
homoanatoxina-a	*Oscillatoria*
saxitoxina	*Anabaena, Aphanizomenon*
neosaxitoxina	*Anabaena, Aphanizomenon*

As estruturas das neurotoxinas acima descritas estão representadas na figura 1.3..

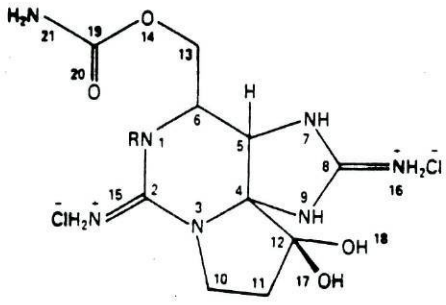
As hepatotoxinas são responsáveis pela destruição da estrutura interna do fígado (Runnegar e Falconer, 1982). Tal deve-se à acção específica destas toxinas sobre os hepatócitos, sendo levadas até estes pelo sistema de transporte dos sais biliares. Os filamentos



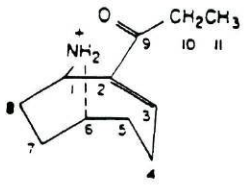
Anatoxina-a



Anatoxina-a(s)



saxitoxina e neosaxitoxina



homoanatoxina-a

Figura 1.3.- Estruturas das neurotoxinas até agora associadas às cianobactérias (modificado de Carmichael, 1992).

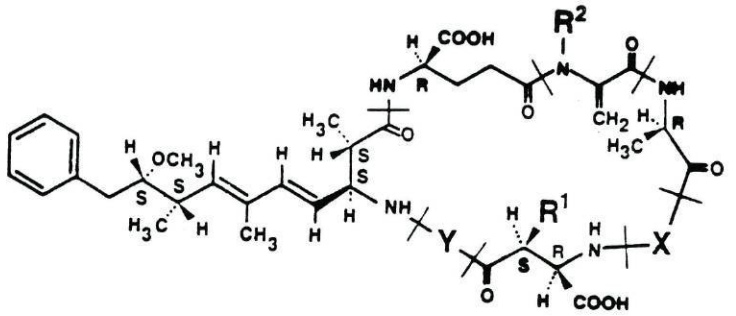
intermediários e os microfilamentos são polímeros proteicos responsáveis pela manutenção da forma dos hepatócitos. As hepatotoxinas levam à dissociação destes filamentos o que conduz a uma retracção das células, que se transmite às que formam os capilares levando a uma hemorragia intrahepática (Eriksson *et al.*, 1988a). O figado aumenta de volume, com o afluxo de sangue que não consegue libertar, atingindo geralmente o dobro do peso normal, constituindo, em animais intoxicados com doses letais, cerca de 10% do peso total do animal. Outro dos efeitos, e este talvez mais grave do ponto de vista de saúde humana, é o facto de as hepatotoxinas inibirem as fosfatases proteicas 1 e 2A (Mackintosh *et al.*, 1990; Eriksson *et al.*, 1990). Tal efeito identifica as hepatotoxinas como promotoras de tumores (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992).

Estruturalmente as hepatotoxinas dividem-se em dois grupos, as nodularinas e as microcistinas. As primeiras são pentapeptídeos cíclicos produzidos por espécies do género

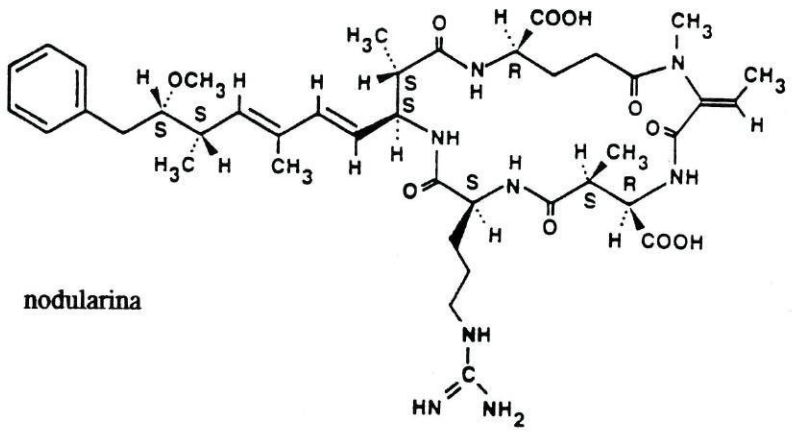
Nodularia (Eriksson *et al.*, 1988b; Sandström *et al.*, 1990; Namikoshi *et al.*, 1994). As microcistinas são heptapeptídeos cíclicos produzidos por espécies dos géneros *Microcystis*, *Oscillatoria*, *Anabaena* e *Nostoc*.

Quer as nodularinas quer as microcistinas possuem diversas variantes estruturais, 7 no primeiro caso e 47 no segundo (Carmichael, 1994; Rinehart *et al.*, 1994). A toxicidade destas diferentes moléculas é muito variável, sendo de 50 a 150 μg/kg para as nodularinas, e de 50 a 1000 μg/kg para as microcistinas, embora em ambos os casos estejam descritas variantes não tóxicas (Rinehart *et al.*, 1994). Na figura 1.4. apresenta-se as estruturas mais comuns de ambos os tipos de hepatotoxinas.

A identificação e quantificação das toxinas de cianobactérias pode ser feita recorrendo-se a métodos químicos, bioquímicos, biológicos ou imunológicos. No entanto, estes últimos estão ainda em fase de investigação não sendo possível realizá-los, na maior parte dos laboratórios, uma vez que os reagentes e o material biológico têm que ser produzidos *in situ*.



microcistina



nodularina

Figura 1.4. Estrutura geral de nodularinas e de microcistinas (modificado de Carmichael, 1992).

A cromatografia é a técnica mais utilizada, recorrendo-se à cromatografia em camada fina (TLC), cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) ou cromatografia gasosa (GC) dependendo do tipo de toxina. Associado a estas técnicas pode utilizar-se a espectrometria de

massa (MS) e a ressonância magnética nuclear (NMR), de modo a fazer-se a identificação dos compostos isolados.

1.3.3. TÉCNICAS DE ISOLAMENTO E DE QUANTIFICAÇÃO DE TOXINAS

No que diz respeito à utilização de HPLC, há necessidade de pré-purificar a amostra antes da sua injecção no sistema ou concentrá-la, especialmente no caso de amostras de água. A análise de florescências de cianobactérias pode fazer-se após extracção do material liofilizado com soluções de butanol/metanol/água (Krishnamurthy *et al.*, 1986) ou com ácido acético a 5% (Harada *et al.*, 1988). Estes extractos têm que ser evaporados e purificados num cartucho com um gel de sílica - ODS. A lavagem com água e metanol a 20%, permite obter uma fracção mais purificada que é recuperada com metanol a 80% ou 100%. Os solventes a usar no sistema de HPLC variam consoante o autor, mas são essencialmente combinações de acetonitrilo ou metanol em acetato de amónio ou sulfato de sódio (Brooks e Codd, 1986, Krishnamurthy *et al.*, 1986). A detecção das toxinas é feita por espectrofotometria a 238 nm (microcistinas) ou a 227 nm (anatoxina-a), enquanto que outras neurotoxinas como a saxitoxina e neosaxitoxina são detectadas por fluorometria (Falconer, 1993).

Os ensaios imunológicos, nomeadamente o teste ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), têm sido utilizados com alguma persistência, no sentido de se poder dispor de um teste rápido, eficaz e sensível para detecção de hepatotoxinas em amostras de águas ou em organismos. No entanto, os resultados não são ainda completamente satisfatórios, uma vez que há resultados negativos por exemplo com microcistinas de *Oscillatoria* e de *Anabaena* (Brooks e Codd, 1988). Todavia, outros autores têm demonstrado que os anticorpos contra MCYST-LR utilizados no teste reagem cruzadamente com uma grande variedade de microcistinas (Chu *et al.*, 1989). Estes ensaios permitiram detectar concentrações da ordem de 0,20 ng/ml em amostras de água e 0,25 μg/g em células cianobacterianas (Chu *et al.*, 1990). Novamente foi referido que para certas variantes como MCYST-LA e MCYST-LY a detecção com anticorpos da MCYST-LR é apenas de 2 a 4% da obtida com MCYST-LR pelo que o ensaio não é eficaz na análise destas variantes. Kfir *et al.* (1986) demonstraram a existência de um anticorpo específico para MCYST-LA, mas não definiram a sua reactividade cruzada face a outras variantes. O facto de existirem, até à data, mais de 47 variantes de MCYST torna este tipo de ensaio difícil de poder vir a ser utilizado no futuro de uma forma rotineira. Uma outra desvantagem reside no facto de os anticorpos utilizados nestes ensaios terem que ser produzidos propositadamente para o ensaio, não estando disponíveis comercialmente.

A utilização da capacidade de a MCYST-LR inibir as fosfatases proteicas 1 e 2A (Mackintosh *et al.*, 1990) tem também vindo a ser utilizada de modo a obter-se um ensaio sensível. Lambert *et al.*, (1994) apresentaram um ensaio de quantificação de microcistinas em águas de consumo, cuja sensibilidade vai até 0,1 μg/l. Este ensaio utiliza fosforilase marcada

com ^{32}P. An e Carmichael (1994) apresentaram um ensaio colorimétrico de inibição de PP1 e PP2A. Este ensaio parece-nos de mais fácil execução, obtendo-se uma sensibilidade adequada, que permite detectar concentrações a partir de 1 ng/l, embora, tal como no caso anterior, exija a purificação das enzimas, o que não é exequível pela maior parte dos laboratórios de análises de águas.

Apesar de não existirem muitos estudos sistemáticos da distribuição de toxinas de cianobactérias nos vários países onde ocorrem, a microcistina-LR parece ser a mais comum, sendo, pelo menos, a mais referida em trabalhos publicados (Rinehart *et al.*, 1994).

1.4. BIOACUMULAÇÃO DE TOXINAS EM BIVALVES

1.4.1. UTILIZAÇÃO DE BIVALVES PARA MONITORIZAÇÃO DE BIOTOXINAS

Os moluscos, e em especial os mexilhões - *Mytilus* spp., são organismos vulgarmente utilizados em estudos de poluição aquática, possuindo enormes vantagens relativamente a outros invertebrados, porque:

- têm uma distribuição geográfica ubíqua, sendo, em muitas áreas, os componentes principais das comunidades bentónicas estuarinas e marinhas;

- são organismos sésseis e filtradores, amostrando o ambiente envolvente de uma forma bastante eficaz;

- acumulam rapidamente contaminantes químicos (pesticidas, hidrocarbonetos, metais, toxinas) nos seus órgãos com transformações metabólicas mínimas, reflectindo, por isso, de uma forma realista os níveis de contaminação ambiental;

- possuem muitas respostas fisiológicas subletais, sensíveis a poluentes a diferentes níveis (molecular, celular, individual, populacional, comunidades), reflectindo por isso grande parte dos mecanismos de toxicidade;

- as medições fisiológicas podem ser efectuadas no laboratório e no campo, podendo, por isso, utilizar-se as relações concentração-resposta, obtidas em laboratório, para interpretar as respostas medidas no meio natural (Widdows e Donkin, 1989; Viarengo e Canesi, 1991).

As características atrás mencionadas e o facto de serem vulgarmente consumidos por populações humanas torna-os também alvo de programas de monitorização por parte de instituições ligadas à vigilância sanitária, tendo em vista evitar situações que ponham em risco a Saúde Humana.

Mytilus sp. tem vindo a ser utilizado como organismo indicador de contaminação ambiental por poluentes com origem directa em actividades humanas tais como hidrocarbonetos (Fossato e Siviero, 1974; Fossato e Canzonier, 1976; Widdows *et al.*, 1982), metais pesados (Phillips, 1976a,b; Sturesson, 1984), bactérias fecais (Plusquellec *et al.*, 1983; 1990), bem como indicadores de contaminação por fitoplâncton tóxico (White e Maranda, 1978; Subba Rao *et al.*,

1988; Fattorusso *et al.*, 1992). Por todas estas razões foi proposta a utilização de mexilhões como um método eficaz de monitorizar a poluição marinha e estuarina - Mussel Watch - (Goldberg, 1975; Davies e Pirie, 1980).

Os mexilhões, sendo organismos resistentes a grandes amplitudes de variação de alguns parâmetros ambientais e nutricionais, suportando amplas variações de salinidade (Davenport, 1979; 1981), temperatura (Widdows, 1973; Schulte, 1975), prolongado jejum (Bayne, 1973) e baixos níveis de oxigénio (de Vooys, 1979, 1987), são ideais para estudos de bioacumulação, podendo facilmente ser mantidos em laboratório, além de resistirem a situações extremas, que muitas vezes ocorrem no ambiente natural.

A elevada resistência a valores extremos de parâmetros ambientais torna-os ainda muito importantes do ponto de vista da avaliação da toxicidade subletal. Tais ensaios passam pela medição das respostas às condições ambientais adversas, que podem ser quantificações directas de poluentes concentrados nos diferentes órgãos (Fossato e Siviero, 1974; Sturesson, 1984), ou medição de parâmetros biológicos tais como a carga energética adenílica (Skjoldal e Barkati, 1982; Zarrogian *et al.*, 1982), metalotioninas (Roesijadi *et al.*, 1982; Nolan *et al.*, 1984; Roesijadi *et al.*, 1988), concentração de ATP (Wijsman, 1976; Skjoldal e Barkati, 1982), taxas de respiração e de filtração (Manley, 1983; Visman, 1990), alterações nos micronúcleos de células branquiais (Brunetti *et al.*, 1992a,b), trocas de cromátides irmãs (Dixon, 1983; Moore *et al.*, 1986), danos a nível de DNA (Accomando *et al.*, 1989), proteínas de "stress" (Saunders e Martin, 1993), oxidades de função mista - MFO - (Ade *et al.*, 1984; Livingstone e Farrar, 1984), estabilidade de lisossomas (Moore, 1976; Harrison e Berger, 1982), taxas de assimilação de aminoácidos (Thompson, 1984) e balanço de crescimento - Scope for Growth - (Calabrese, 1984).

Os bivalves, sendo filtradores, captam as partículas que existem em suspensão na água por filtração a nível das brânquias. A eficiência de filtração depende essencialmente do tamanho das partículas e da sua densidade na água (Davids, 1964). Tammes e Dral (1955) referem que partículas de 7 a 8 μm de diâmetro são retidas com eficiências de 0 a 98% por *M. edulis*.

A água atravessa as lamelas branquiais, e as partículas com tamanho adequado passam através de espaços entre os cílios vibráteis que revestem as brânquias - ostia, sendo transportadas através das lamelas branquiais, por movimentos ciliares, até aos palpos labiais e boca (Dral, 1967; Foster-Smith, 1975).

Ao mesmo tempo existe um mecanismo de limpeza, levado a cabo pelas brânquias, palpos labiais e outros órgãos, libertando a cavidade do manto de material em excesso sobre a forma de pseudo-fezes, que são expelidas periodicamente pela contracção cíclica dos músculos adutores (Jørgensen, 1981a,b). Este processo implica a formação de grandes quantidades de muco, o que poderia dificultar a alimentação normal dos animais, se as correntes alimentares e muco-ciliares não se desenvolvessem em faces separadas das brânquias (Jørgensen, 1981a).

1.4.2. PRINCIPAIS BIOTOXINAS MARINHAS

Certos grupos fitoplanctónicos marinhos tais como dinoflagelados e diatomáceas, produzem toxinas que podem ser acumuladas por moluscos, sendo transferidas ao longo da cadeia alimentar e causando, eventualmente, intoxicações humanas graves. Destas, salienta-se a Intoxicação Paralisante por Moluscos - PSP (Prakash *et al.*, 1971), a Intoxicação Diarreica por Moluscos - DSP - (Kat, 1979), a Intoxicação Amnésica por Moluscos - ASP - (Perl *et al.*, 1990) e a Intoxicação Neurotóxica por Moluscos - NSP - (Morris *et al.*, 1991).

No nosso país, os principais problemas parecem ser devidos aos dois primeiros tipos de intoxicação, existindo programas nacionais de monitorização destas toxinas em várias espécies de moluscos.

Neste plano nacional de vigilância, são analisadas amostras de bivalves de vários locais da costa portuguesa, tendo em vista detectar contaminação por dinoflagelados tóxicos produtores de PSP e de DSP, que são as toxinas mais comuns em Portugal (Silva, 1985; Sampayo, 1989; Coutinho, 1990c; Sampayo *et al.*, 1990; Moita, 1992; Sampayo, 1992).

1.4.3. BIOACUMULAÇÃO E DEPURAÇÃO DE TOXINAS POR BIVALVES

A bioacumulação de produtos químicos nos moluscos é função não só da taxa de filtração dos animais e da concentração desses produtos na água, como também da solubilidade dos mesmos em lípidos e da quantidade destes no organismo (Moriarty, 1990).

Geralmente, os tecidos adiposos servem de reservatório de substâncias hidrofóbicas, que podem ou não sofrer previamente alterações metabólicas em órgãos como o fígado. Vários parâmetros são importantes quando pretendemos estudar a bioacumulação tais como o coeficiente de partição octanol/água - Kow - o conteúdo em lípidos e a forma e o tamanho da molécula, entre outros (Moriarty, 1990; Manahan, 1993).

Por outro lado, a biodegradação pode envolver pequenas alterações na molécula original tais como substituição ou modificação de um grupo funcional. Na maior parte dos casos, os compostos são completamente destruídos e os produtos finais resultantes são compostos simples como dióxido de carbono, água ou sais inorgânicos. A biodegradação pode ser vista como uma transformação que acontece quando a substância é metabolizada por processos bioquímicos dos organismos, sendo alterada. Os processos geralmente utilizados podem ser oxidações, descarboxilações, hidrólise, redução, dehalogenização, desmetilação ou reacções de conjugação (Manahan, 1993).

No que diz respeito à possibilidade de acumulação de toxinas de cianobactérias por moluscos de água doce, poucos trabalhos foram realizados até ao momento, especialmente porque estes moluscos não são vulgarmente consumidos por populações humanas. No entanto,

Eriksson *et al.* (1989) mostraram que o mexilhão-de-água-doce - *Anodonta cygnea*, pode acumular elevados níveis de microcistinas de *Oscillatoria agardhii*, não sofrendo, pelo menos aparentemente, quaisquer efeitos adversos. Lindholm *et al.* (1989) também mostraram a acumulação de péptidos hepatotóxicos em *Anodonta* a partir de amostras de água de um lago contendo *O. agardhii.* Recentemente, Falconer *et al.*, (1992) estudando mexilhões da espécie *M. edulis,* mostraram que estes podem acumular o péptido hepatotóxico nodularina, durante florescências de *Nodularia spumigena* em estuários australianos.

Em Portugal, o contacto de cianobactérias com moluscos pode acontecer em estuários dos grandes rios ibéricos, onde ocorrem vulgarmente florescências de cianobactérias tóxicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OCORRÊNCIA DE CIANOBACTÉRIAS EM ÁGUAS DOCES PORTUGUESAS E AVALIAÇÃO DA SUA TOXICIDADE. ISOLAMENTO E TOXICIDADE DE ESTIRPES DE *Microcystis aeruginosa*.

2.1.1. COLHEITA DE FLORESCÊNCIAS DE CIANOBACTÉRIAS

Durante o presente trabalho, foram amostrados 28 locais, compreendendo lagoas naturais, albufeiras e rios de grande caudal, durante os períodos de verão de 1989-1992 (Tabela 2.1 e Figura 2.1). Alguns destes locais foram amostrados várias vezes durante este período. Pretendeu-se essencialmente colher amostras em locais de grau trófico elevado, tendo-se obtido esta informação a partir de artigos, relatórios e comunicações pessoais. Foi ainda um objectivo importante abranger ao máximo todo o território continental, e analisar massas de água utilizadas essencialmente para consumo humano e/ou recreio.

Em todos os locais recolheu-se uma amostra subsuperficial de água que foi fixada com lugol para posterior identificação e quantificação das principais espécies de cianobactérias. No caso de ocorrência de florescências, as cianobactérias foram concentradas através de vários arrastos efectuados com uma rede de plâncton com 50 μm de malha. Este material foi transportado em malas térmicas e congelado, no máximo, no prazo de 48 horas.

Para concentrar melhor as cianobactérias, as amostras foram colocadas em funis de decantação, deixando flutuar ou depositar estes organismos, removendo-se posteriormente o excesso de água.

O material congelado foi liofilizado e conservado a -20 °C até posterior utilização.

2.1.2. QUANTIFICAÇÃO DAS CIANOBACTÉRIAS

Alíquotas das amostras obtidas em 2.1.1. foram fixadas com uma solução de lugol (1 ml lugol/100 ml de amostra) e conservadas ao abrigo da luz até à sua quantificação.

Para a contagem e identificação das formas fitoplanctónicas dominantes, especialmente as cianobactérias, utilizou-se câmaras de sedimentação de Utermohl de 2,5 ml a 25,0 ml, consoante a densidade de cianobactérias. As câmaras foram cheias com a amostra e deixadas a sedimentar durante a noite.

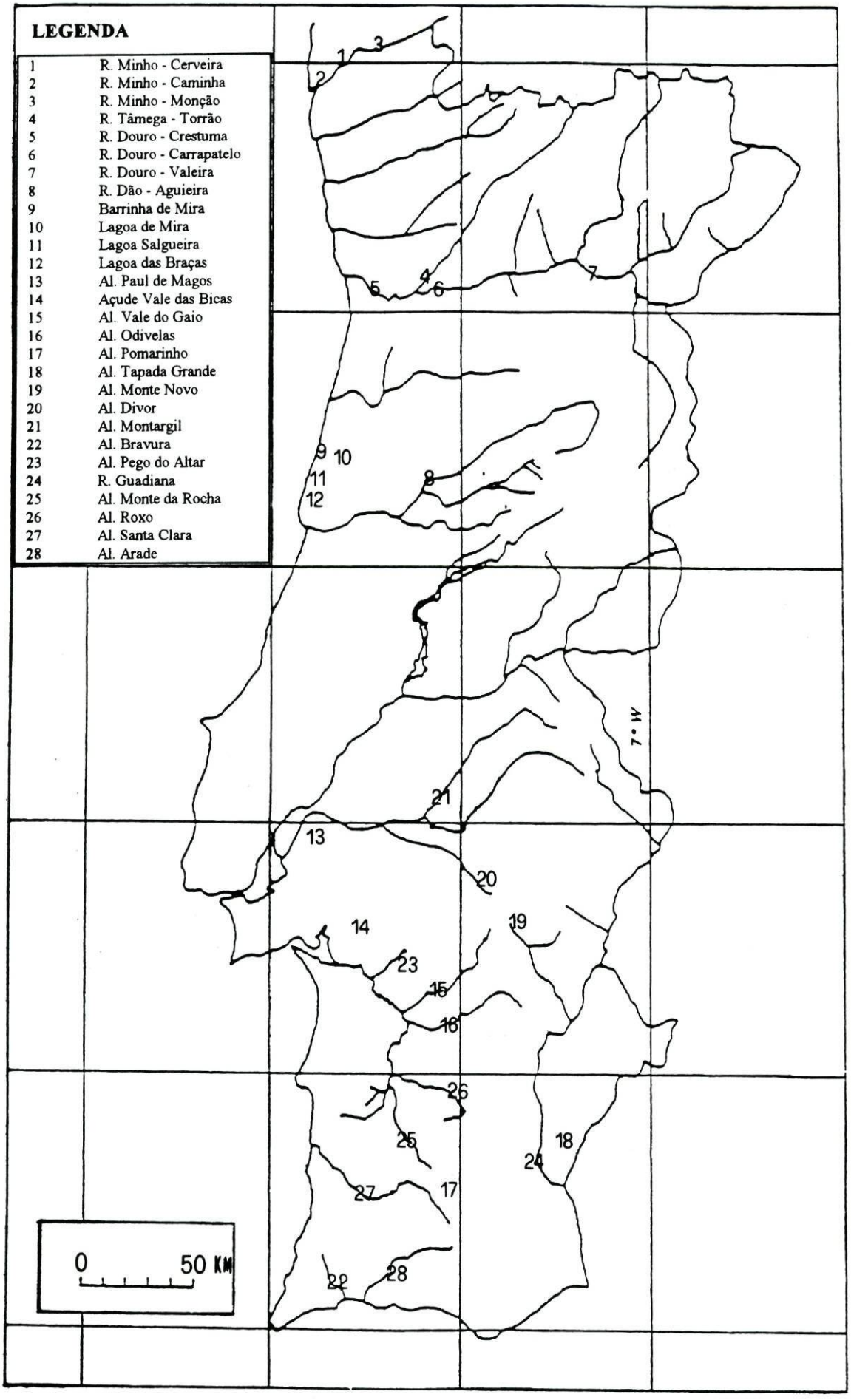


Figura 2.1 - Locais de colheita de cianobactérias em massas de água portuguesas de 1989 a 1992.

Tabela 2.1 - Locais, designação e datas de colheita das amostras de cianobactérias obtidas no periodo 1989-1992 em massas de água doce portuguesas (as amostras indicadas na coluna DESIGNAÇÃO foram as estudadas no capítulo 2.2.).

RIO/LAGOA	LOCAL/ALBUFEIRA	DESIGNAÇÃO	DATA DE COLHEITA
MINHO	V. N. Cerveira		30/08/90
			31/08/90
	Caminha		26/08/91
	Monção	MI	03/09/92
TÂMEGA	Al.Torrão	TO	05/09/92
DOURO	Al.Crestuma	CR	02/08/89
	Al.Carrapatelo	CA	05/09/92
	Al.Valeira		06/06/92
DÃO	Al. Aguieira (Stª Comba)	AG	19/09/92
			04/10/92
Barrinha de Mira		BM	13/04/91
			28/05/91
			11/06/92
			09/07/92
Lagoa de Mira		M10	27/05/91
		M11	26/09/91
		M12	05/06/92
		M13	11/06/92
			7/10/92
			11/11/92
Lagoa Salgueira			27/05/91
Lagoa das Braças			17/07/89
	Al. Paul de Magos		01/10/92
	Açude de Vale das Bicas	VB	01/10/92
XARRAMA	Al. Vale do Gaio		02/10/92
Rib. ODIVELAS	Al. Odivelas		02/10/92
	Al. Pomarinho		03/10/92
	Al. Tapada Grande		03/10/92
DEGEBE	Al. Monte Novo		03/10/92
Rib. DIVOR	Al. Divor		04/10/92
			04/10/92
Rib. de SÔR	Al. Montargil		04/10/92
	Al. Bravura		02/10/92
Rib. Alcáçovas	Al. Pego do Altar		02/10/92
GUADIANA	Mértola	ME	03/10/92
MIRA	Al. Santa Clara		02/10/92
SADO	Al. Monte da Rocha		02/10/92
Rib. Arade	Al. Arade		03/10/92
Rib. Roxo	Al. Roxo		02/10/92

A quantificação foi feita ao microscópio invertido (Leitz, Alemanha), utilizando-se uma ampliação de 400x. Utilizou-se o método dos transectos, pelo que eram identificadas e quantificadas todas as formas fitoplanctónicas em vários transectos de uma mesma câmara, de acordo com Lund *et al.* (1958).

Os valores apresentados correspondem ao número médio de células por mililitro (nº cél/ml). Nalguns locais não foi possível quantificar as cianobactérias, uma vez que as amostras não foram obtidas directamente.

2.1.3. ISOLAMENTO E CULTURA DE ESTIRPES DE *Microcystis aeruginosa*

As estirpes de *M. aeruginosa* estudadas foram isoladas durante 1991 a partir de amostras colhidas em sete lagoas naturais da região centro (Aveiro-Figueira da Foz) e em nove albufeiras da bacia hidrográfica do rio Douro (Fig. 2.2 e tabelas 2.2 e 2.3).

Algumas lagoas foram amostradas mensalmente de Abril a Novembro. As amostras obtiveram-se por concentração do fitoplâncton, utilizando-se uma rede de plancton de 50 μm de malha. A designação dada às diferentes estirpes inclui as iniciais **IZAN** (Instituto de Zoologia "Dr. Augusto Nobre"), **CYA** (cianobactéria) e um número de registo no laboratório.

Tabela 2.2 - Locais, datas de colheita e designação das estirpes de *M. aeruginosa* isoladas a partir de albufeiras da região norte de Portugal

DESIGNAÇÃO	LOCAL DE COLHEITA	DATA DE COLHEITA
IZANCYA25	B. Torrão	09/91
IZANCYA 26	B. Régua	09/91
IZANCYA27	B. Esteveinha	09/91
IZANCYA28	B. Crestuma	09/91
IZANCYA39	B. Crestuma	30/10/91
IZANCYA29	B. Carrapatelo	09/91
IZANCYA30	B. Vilar	09/91
IZANCYA31	B. Bemposta	09/91
IZANCYA32	B. Valeira	09/91
IZANCYA33	B. Picote	09/91

As amostras foram colhidas a partir da margem, através da realização de vários arrastos e transportadas para o laboratório em malas térmicas.

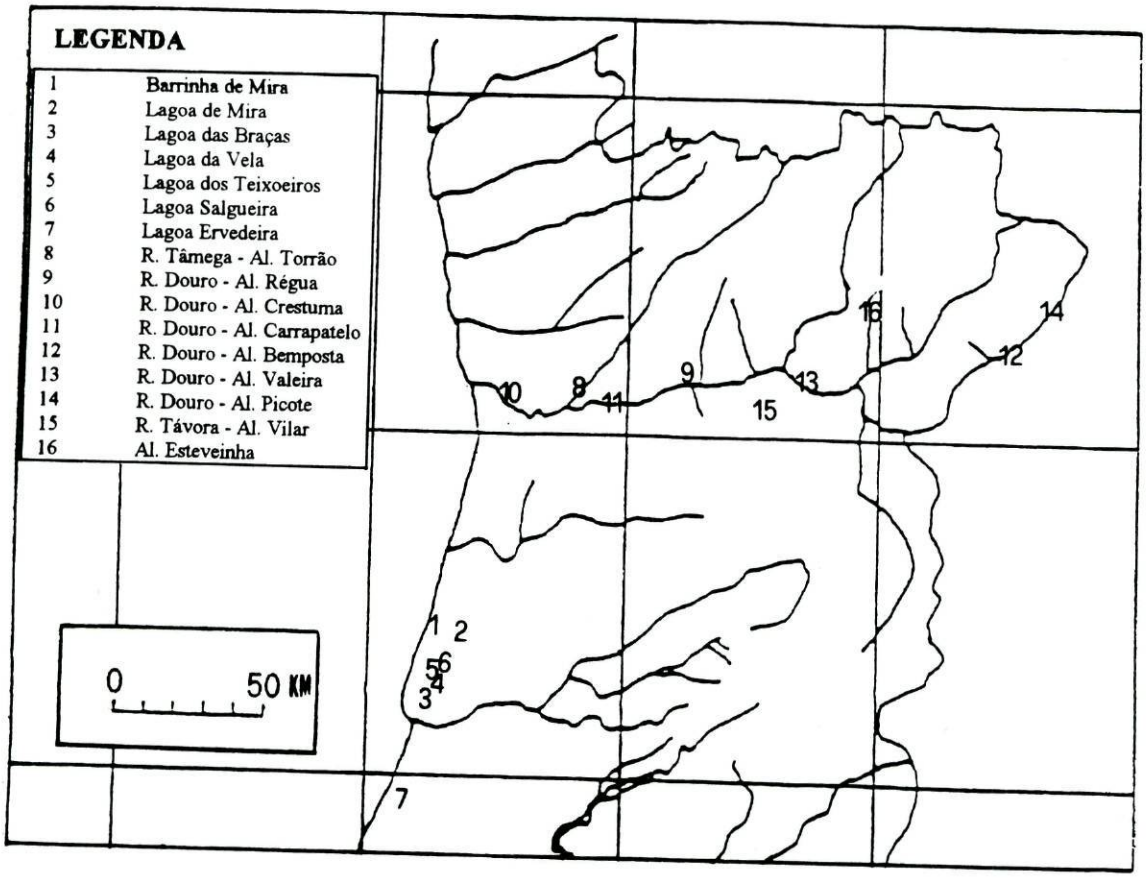


Figura 2.2 - Locais de colheita das estirpes de *M. aeruginosa* durante 1991.

Tabela 2.3 - Locais, datas de colheita e designação das estirpes de *M. aeruginosa* isoladas a partir de lagoas naturais da região centro de Portugal

DESIGNAÇÃO	LOCAL DE COLHEITA	DATA DE COLHEITA
IZANCYA1	Barrinha de Mira	13/04/91
IZANCYA3		13/04/91
IZANCYA37		23/10/91
IZANCYA2	Lagoa de Mira	13/04/91
IZANCYA5		10/06/91
IZANCYA17		26/09/91
IZANCYA23		26/09/91
IZANCYA36		23/10/91
IZANCYA40		15/11/91
IZANCYA4	Lagoa das Braças	10/06/91
IZANCYA6		10/06/91
IZANCYA12		28/07/91
IZANCYA19		26/09/91
IZANCYA41		15/11/91
IZANCYA42		30/11/91
IZANCYA43		30/11/91
IZANCYA7	Lagoa da Vela	10/06/91
IZANCYA44		30/11/91
IZANCYA22	Lagoa das Teixoeiras	26/09/91
IZANCYA38	Lagoa Salgueira	23/10/91
IZANCYA8	Lagoa da Ervedeira	10/06/91

O isolamento das estirpes de cianobactérias foi realizado, sempre que possível, nas 24 horas seguintes à sua recolha. De cada amostra retiraram-se várias colónias de *Microcystis*, utilizando-se um microscópio óptico com uma ampliação de 40x e pipetas Pasteur estiradas ao fogo. As colónias foram lavadas em várias gotas de água destilada para remoção da maior parte dos contaminantes e depois ressuspendidas em tubos de ensaio esterilizados, com rolhas de algodão contendo meio Z8 (Kotai, 1972). Estes tubos foram colocados sob uma fonte luminosa (lâmpadas fluorescentes Philips, 40 W) a 20±1 °C, deixando-se as colónias crescer durante uma semana. Após este período de tempo, as colónias que apresentavam maior crescimento foram removidas e colocadas em placas de Petri com meio Z8 solidificado com agar (0,75%). As cianobactérias foram espalhadas com auxílio de uma ansa esterilizada ao rubro, colocando-se as placas em prateleiras sob luz branca fluorescente. Cada placa foi analisada regularmente quanto ao desenvolvimento de novas colónias e, após repicagens sucessivas, foi possível purificar as cianobactérias obtendo-se culturas uniespecíficas, mas não axénicas.

Nos casos em que a eliminação de contaminantes foi especialmente difícil, recorreu-se à utilização alternada de meio líquido e meio sólido para isolamento das cianobactérias, obtendo-se resultados positivos ao fim de alguns meses. Uma vez obtida uma cultura uniespecífica, esta foi conservada num armário iluminado, à temperatura de 20±1 °C, em meio líquido e em meio sólido.

Para a obtenção de material em quantidade suficiente para a realização dos bioensaios com murganhos e para posterior extracção de toxinas iniciou-se cada cultura a partir dos stocks em matrazes de 50 ml ou 100 ml, com 25 ml ou 50 ml de meio Z8, respectivamente, até se atingir a fase exponencial (cerca de uma semana). Após esta fase as culturas foram transferidas para matrazes de 1 litro com 800 ml de meio e com arejamento. Atingindo-se um desenvolvimento suficiente (1 a 2 semanas) as culturas foram transferidas para balões de 6 l com 4 l de meio Z8 e arejamento até se atingir o fim da fase exponencial. Nesta fase, as cianobactérias foram concentradas por centrifugação a 6000 rpm durante 15-30 minutos, por flutuação ou por sedimentação, colocando as culturas em funis de decantação. Nestas condições, as cianobactérias ascendiam à superfície, ou depositavam-se no fundo, e ao fim de 24 horas era possível separar o meio de cultura das cianobactérias. O material foi congelado a -70 °C, liofilizado e conservado a -20 °C até posterior utilização.

A determinação do diâmetro celular médio foi realizada por medição ao microscópio óptico (Leitz, Alemanha) de 20-30 células para cada estirpe. Os diâmetros médios celulares das estirpes isoladas a partir das lagoas e os das estirpes das albufeiras foram comparados estatisticamente utilizando-se o teste t de Student.

2.1.4 - BIOENSAIOS COM MURGANHOS. DETERMINAÇÃO DA DL_{50}

Para a determinação da toxicidade das florescências de cianobactérias e das estirpes de *M. aeruginosa* utilizaram-se murganhos macho de 20 a 30 g da estirpe Charles River (Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras). A avaliação da toxicidade (positiva ou negativa) foi feita para todas as estirpes isoladas e florescências colhidas. A determinação da dose letal para 50% dos indivíduos injectados - DL_{50} - foi realizada em todas as florescências naturais de cianobactérias e em apenas 11 estirpes de *M. aeruginosa* de modo a se evitar o sacrifício desnecessário de muitos animais.

As amostras foram preparadas por suspensão de 10 a 50 mg do material liofilizado (florescências e estirpes) em solução salina (NaCl 0,9%).

As injecções foram administradas preferencialmente 24 horas após a preparação dos extractos, de modo a haver tempo suficiente para que as toxinas se dissolvessem no meio.

Os volumes injectados variaram entre 0,2 ml e 1,0 ml dependendo da dose e do peso do animal. As injecções foram administradas intraperitonealmente - i.p. - tendo-se injectado animais com a solução salina como controlo.

Para cada dose utilizaram-se dois animais. As doses foram determinadas de acordo com uma injecção preliminar que correspondia a uma dose de 1500 mg/kg no caso das florescências e de 250-300 mg/kg no caso das estirpes. Após esta primeira injecção foram administradas três doses segundo uma escala logarítmica. No caso de os resultados não serem satisfatórios novas doses foram administradas. Após a injecção, os animais foram observados continuamente durante 2 a 3 horas para registo dos sintomas e depois de hora a hora durante as 3 a 6 horas seguintes.

Em caso de morte, os animais foram autopsiados, os órgãos inspeccionados e o fígado removido e pesado.

Valores de peso do fígado superiores a 7% do peso total do animal foram considerados como indicadores de hepatotoxicidade. A dose letal para 50% dos animais intoxicados - DL_{50} - foi considerada como a dose intermédia entre as doses que registaram 0% e 100% de mortalidade.

2.2. EXTRACÇÃO, ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DO PESO MOLECULAR DE MICROCISTINAS

2.2.1. EXTRACÇÃO DAS TOXINAS

Apenas algumas das amostras cuja DL_{50} foi determinada foram analizadas quanto à sua composição de toxinas, tendo-se analisado as 11 estirpes de *M. aeruginosa* e as 12 amostras de florescências que apresentaram maior toxicidade. As cianobactérias liofilizadas foram colocadas

numa solução de extracção de Butanol/Metanol/Água (5/20/75, v/v/v) conforme as tabelas 2.4 e 2.5 e as toxinas foram extraídas, numa primeira fase durante 3 horas com agitador magnético.

Após esse período, os extractos foram centrifugados durante 20 minutos a 9000-12000 r.p.m. a 18 °C e o sobrenadante retirado. As pellets foram novamente extraídas, com o mesmo volume da solução Bu/Me/H2O usado na primeira extracção, durante 6 a 12 horas. As soluções foram novamente centrifugadas e os sobrenadantes combinados.

Os solventes orgânicos foram seguidamente evaporados com auxílio de um fluxo de ar filtrado, à temperatura ambiente (22±2 °C), sendo depois filtrados através de um filtro GF/C (Whatman, International Ltd, Maidstone, England) para remover restos de células ou de outro material.

A estirpe IZANCYA7 teve que ser tratada de uma outra forma dado possuir grande quantidade de substâncias mucilaginosas. Esta nova extracção fez-se juntando metanol até este perfazer 80% do volume total, deixou-se a extrair durante 6-8 horas no frigorífico e depois centrifugou-se. Novamente o solvente orgânico foi evaporado e a solução final aplicada a uma coluna de cromatografia contendo 1 g de gel de sílica octadesyl- ODS (Chromatorex, Fuji-Davidson Chemical -Ltd, Japão).

Tabela 2.4 - Peso seco das cianobactérias e volume de solução de extracção de cada amostra de florescência de cianobactérias para análise das toxinas.

DESIGNAÇÃO DA AMOSTRA	PESO DA AMOSTRA (g)	VOLUME DE SOLUÇÃO (ml)
AG	27,0	1500
CA	23,7	1500
ME	5,8	350
VB	6,2	400
MI	2,3	230
TO	1,3	130
CR	13,0	800
BM	1,6	160
M10	1,0	100
M11	2,3	230
M12	0,8	100
M13	4,4	440

2.2.2. OBTENÇÃO DAS FRACÇÕES

Para esta primeira purificação utilizou-se uma coluna de cromatografia da Pharmacia e uma bomba peristáltica MasterFlex (Cole-Parmer Instruments Co., U.S.A.). Para cada amostra, a coluna foi preenchida com 5,0 g de ODS previamente activado com 100 ml de metanol. A

Tabela 2.5 - Peso seco das cianobactérias e volume da solução de extracção utilizados para a análise das toxinas das estirpes isoladas de *M. aeruginosa*.

DESIGNAÇÃO DA AMOSTRA	PESO DA AMOSTRA (g)	VOLUME DA SOLUÇÃO (ml)
IZANCYA 1	0,8	150
IZANCYA 2	6,0	600
IZANCYA 3	6,0	600
IZANCYA 5	2,3	250
IZANCYA 7	5,8	600
IZANCYA 25	1,0	100
IZANCYA 30	1,9	200
IZANCYA 31	0,9	100
IZANCYA 33	0,5	100
IZANCYA 34	1,4	200
IZANCYA 44	0,9	150

coluna foi completada com uma camada de cerca de 1 cm de areia calcinada, de modo a permitir uma certa estabilidade da camada do gel durante a passagem das amostras. Após remoção de todo o metanol, a coluna foi lavada com 200 ml de água nanopura.

Após a passagem da água, o extracto filtrado obtido em 2.2.1. foi passado pela coluna. Seguidamente foram passados 100 ml de MeOH a 20%, obtendo-se a fracção de 20% e por fim 100 ml de metanol a 100% , obtendo-se a fracção de 100%. A coluna foi lavada novamente com 200 ml de água nanopura e o extracto ODS foi passado pela coluna, obtendo-se, de seguida, novas fracções a 20% e a 100%. As fracções respectivas foram combinadas e todas foram evaporadas totalmente sob fluxo de ar.

As fracções evaporadas foram ressuspendidas em 5 ml de uma solução de acetonitrilo/água (50/50, v/v) e agitadas num Vortex durante 1 minuto. Antes de serem utilizadas foram filtradas por um filtro de 0,45 μm (Acrodisc, 0,45 μm, nylon, Gelman Sciences Inc., Ann Arbor, MI, U.S.A.).

2.2.3. CROMATOGRAFIA PREPARATIVA I (CP I)

A fase móvel foi sempre constituída por uma solução tampão e por um solvente orgânico. Como soluções tampão utilizou-se acetato de amónio 0,01M e sulfato de sódio 0,05M. Ambas as soluções foram preparadas com água nanopura ou tridestilada e filtradas por um filtro de 0,45 μ m antes da utilização. Os solventes utilizados foram acetonitrilo (com o acetato de amónio) e metanol (com o sulfato de sódio), ambos HPLC grade. Todas as soluções, solventes e tampões, foram desgasificadas durante 30 minutos num banho de ultrasons.

Durante as cromatografias as soluções mantiveram-se desgasificadas utilizando-se um fluxo de 25 ml/min de Hélio.

Para a obtenção da primeira separação das fracções utilizou-se o sistema de HPLC descrito na tabela 2.6 e as condições descritas na tabela 2.7.

Tabela 2.6 - Descrição dos componentes do sistema de HPLC Waters Delta Prep 3000 utilizado na CP I.

COMPONENTE	DESIGNAÇÃO
DETECTOR	Waters Model 484 UV
BOMBAS	Waters
INTEGRADOR	Varian
COLUNA	µBondaPack Waters (19 x 150 mm) semipreparativa
LOOP	5 ml

Tabela 2.7 - Condições utilizadas na primeira cromatografia preparativa.

PARÂMETRO	CONDIÇÃO
FLUXO (ml/min)	4,0
DETECÇÃO (nm)	238
VEL. PAPEL (cm/min)	0,5
FASE MÓVEL	Acetato Amónio/Acetonitrilo 0,01 M (24/76, v/v)

O volume injectado variou entre 0,6 ml e 5,0 ml e o número de injecções entre 2 e 16, consoante a biomassa de cianobactérias utilizada na extracção e a toxicidade da amostra.

Todas as fracções registadas foram recolhidas em tubos de ensaio separadamente, e no fim de cada amostra cromatografada, as fracções correspondentes foram combinadas.

As fracções foram evaporadas sob fluxo de ar à temperatura ambiente e armazenadas a -20 °C até posterior utilização.

2.2.4. CROMATOGRAFIA PREPARATIVA II (CP II)

A segunda purificação de todas as fracções (450) obtidas em 2.2.3. foi realizada no mesmo sistema de cromatografia (Tab. 2.6), utilizando-se as mesmas condições de cromatografia (Tab. 2.7), excepto a fase móvel. Esta foi constituída por metanol/sulfato de sódio 0,05 M (60/40, v/v).

As fracções obtidas foram novamente recolhidas em tubos de ensaio. No caso de, a partir de uma dada fracção, se terem obtido várias novas fracções, estas eram designadas por YA, YB, YC,.., sendo Y a designação da fracção original. Todas estas fracções foram novamente evaporadas e conservadas a -20 °C para posterior purificação.

Nos casos em que a concentração das fracções foi demasiado elevada, dividiu-se o volume por várias injecções (2 a 3) e, no final, recombinou-se as fracções correspondentes.

2.2.5. CROMATOGRAFIA ANALÍTICA (I) COM DETECTOR DE DÍODOS - CAD

Para esta cromatografia utilizou-se um sistema de HPLC descrito na tabela 2.8 e as condições descritas na tabela 2.9.

Tabela 2.8 - Componentes do sistema de HPLC Hewlett-Packard 1090M utilizado para a purificação das fracções CAD.

COMPONENTE	DESIGNAÇÃO
DETECTOR	Hewlett-Packard Diode Array Detector
BOMBAS	Hewlett-Packard
INTEGRADOR	Hewlett-Packard
COLUNA	µBondaPack Waters (4,5 x 150 mm) Analítica
LOOP	100 µl

Tabela 2.9 - Condições da cromatografia analítica no sistema de detecção de díodos.

PARÂMETRO	CONDIÇÃO
FLUXO (ml/min)	1,0
DETECÇÃO (nm)	238
VEL. PAPEL (cm/min)	0,5
FASE MÓVEL	Acetonitrilo/Acetato de amónio 0,01 M (26:74, V/V)

Com este sistema pretendeu-se detectar as fracções tóxicas através da análise do seu espectro de UV, bem como ter uma ideia da pureza da fracção.

Para a preparação das amostras, dissolveu-se cada fracção em 2 a 5 ml de uma solução de água/metanol (50/50, v/v), consoante a quantidade de substância presente, excepto nos casos em que a quantidade de sulfato de sódio era muito elevada. Nestes casos, dissolveu-se a fracção

em 10 ml de água nanopura, passou-se a amostra por um cartucho BondElut (3 ml), dessalinizou-se com 30 ml de água e recuperou-se o material com 5 ml de metanol.

De todas as fracções retirou-se 100 µl, filtrou-se por um filtro de 0,22 µm (Acrodisc, nylon, Gelman Sciences Inc, Ann Arbor, MI, USA) e colocou-se cada fracção num frasco, que se introduziu num carreto para o injector automático do sistema de HPLC.

De cada fracção foram injectados 25 µl separadamente e cada corrida durou 10 minutos com 0,5 minutos de intervalo.

Posteriormente os cromatogramas obtidos foram observados e foi analisado o espectro de cada fracção entre 200 e 500 nm. Todas as fracções foram evaporadas completamente. Fracções possuindo um espectro típico com absorção máxima a 238 nm foram consideradas como toxinas.

2.2.6. CROMATOGRAFIA ANALÍTICA FINAL (CAII)

Após identificação das fracções tóxicas de cada amostra, fez-se a purificação final das toxinas, utilizando-se um sistema de HLPC Beckman descrito na tabela 2.10 e as condições descritas na tabela 2.11.

Tabela 2.10 - Componentes do sistema de HPLC Beckman utilizado na cromatografia analítica final.

COMPONENTE	DESIGNAÇÃO
DETECTOR	Gold Scanning Detector Module 167
BOMBAS	110B Solvent Delivery Module
INTEGRADOR	Kipp & Zonen BD 41 Recorder
COLUNA	BondaPack C18 (4,5 x 150 mm) Analítica
LOOP	100 µl

Tabela 2.11 - Condições utilizadas na cromatografia analítica final.

PARÂMETRO	CONDIÇÃO
FLUXO (ml/min)	0,7 a 1,0
DETECÇÃO (nm)	238
VEL. PAPEL (mm/min)	2,0
RANGE	0,25 a 0,50
FASE MÓVEL	Acetonitrilo/Acetato de amónio 0,01 M (24 a 30/76 a 70, v/v)

Após prévia filtração da amostra por um filtro de 0,22μm de poro, o volume injectado foi geralmente 100 μl.

Os cromatogramas obtidos foram comparados com os registados em 2.2.5. e as toxinas purificadas foram colectadas em tubos de ensaio. Estas foram evaporadas completamente, ressuspendidas em água e dessalinizadas.

2.2.7. DESSALINIZAÇÃO DAS TOXINAS.

Para a dessalinização das toxinas usaram-se colunas descartáveis BondElut. As colunas foram previamente activadas com 5 ml de metanol e depois lavadas com 20 ml de água desionizada.

As toxinas obtidas pelo processo referido em 2.2.6. foram ressuspendidas em 10-20 ml de água e passadas pela coluna. Seguidamente a coluna foi lavada com 60 ml de água desionizada e a toxina recuperada com 5 ml de metanol. Finalmente, o solvente foi evaporado completamente e as toxinas conservadas a -70 °C até posterior utilização.

2.2.8. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO AMINOACÍDICA

A análise qualitativa dos aminoácidos componentes de cada toxina purificada em 2.2.6. foi feita por HPLC num sistema Waters PicoTag após hidrólise dos péptidos com HCl 6N durante 24 horas a 105 °C. Seguiu-se a derivatização dos aminoácidos obtidos com fenilisotiocianato - PICT, produzindo-se aminoácidos feniltiicarbamil - PTC. Estes aminoácidos foram cromatografados num sistema de HPLC Waters Pico Tag utilizando-se uma coluna de ODS (3,9 x 150 mm) e uma fase móvel constituída pelos reagentes Pico Tag A e B. A detecção dos aminoácidos foi feita espectrofotometricamente a 254 nm, por comparação com os tempos de retenção de uma mistura padrão de aminoácidos.

2.2.9. DETERMINAÇÃO DO PESO MOLECULAR

A determinação do peso molecular foi feita nas amostras que deram resultado positivo na análise aminoacídica, tendo-se utilizado os péptidos intactos. A análise era considerada positiva quando eram detectados o ácido glutâmico e o β-metilaspartato (ou aspartato) bem como a metilamina, sendo este um resíduo da metildehidroalanina. Os espectros de massa dos péptidos intactos foram obtidos por espectrometria de massa de baixa resolução por

bombardeamento rápido por átomos (FAB-MS) usando como matriz a bala mágica (dithiothreitol-dithioerytriol, 1:3; *m/z*=155) segundo a técnica descrita por Witten *et al.* (1984).

2.2.10. QUANTIFICAÇÃO DAS MICROCISTINAS EM ESTIRPES DE *M. aeruginosa* E NAS FLORESCÊNCIAS DE CIANOBACTÉRIAS.

A quantificação das microcistinas nas amostras de estirpes de *Microcystis* e nas de florescências analisadas foi feita através de nova extracção segundo o método definido em 2.2.1. tendo-se utilizado 40-170 mg de material liofilizado por amostra. Os extractos obtidos foram purificados passando-se por um cartucho Bond Elut (6 ml) previamente activado. Após lavagem do cartucho com água tridestilada e metanol a 20%, recuperou-se a fracção tóxica com metanol a 80%. A fracção foi completamente evaporada sob fluxo de ar e ressuspendida em 1 ml de água tridestilada. A amostra foi filtrada por um filtro de 0,2 µm antes da injecção no sistema de HPLC. Utilizou-se um sistema Gilson descrito na tabela 2.12 e as condições indicadas na tabela 2.13.

Tabela 2.12 - Componentes do sistema de HPLC Gilson utilizado para a quantificação de MCYST-LR extraída das cianobactérias.

COMPONENTE	**DESIGNAÇÃO**
DETECTOR	Gilson HM Holochrome
BOMBAS	Gilson 302
INTEGRADOR	Data Master Model 621
COLUNA	Spherisorb S10 ODS2 (0,5 x 250 mm) Analítica
LOOP	100 µl

Tabela 2.13 - Condições utilizadas na Cromatografia para quantificação de MCYST-LR.

PARÂMETRO	**CONDIÇÃO**
FLUXO (ml/min)	1,0
DETECÇÃO (nm)	238
VEL. PAPEL (mm/min)	10,0
RANGE	0,2
FASE MÓVEL	Acetonitrilo/Acetato de amónio 0,01M (26/74, v/v)

A detecção da MCYST-LR foi feita por comparação com os cromatogramas obtidos anteriormente e com o tempo de retenção de um padrão de MCYST-LR. A quantificação total de microcistinas por amostra foi conseguida sabendo-se a percentagem correspondente à MCYST-LR, apresentando-se os valores em micrograma de microcistinas por miligrama de peso seco de cianobactérias (μg/mg).

2.3. AVALIAÇÃO DA BIOACUMULAÇÃO E DA DEPURAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR *Mytilus galloprovincialis* LAMARCK

2.3.1. COLHEITA DOS ANIMAIS, ACLIMATAÇÃO E CONDIÇÕES DOS ENSAIOS

Colheram-se cerca de 500 exemplares de *Mytilus galloprovinciallis* Lamarck, na praia rochosa defronte da Estação de Zoologia Marítima "Dr. Augusto Nobre" na Foz do Douro (Porto). Os mexilhões foram limpos, através da remoção de outros animais aderentes ou algas, e transportados para o laboratório. Aqui, foram cuidadosamente lavados com água do mar e colocados em quatro tanques de PVC de 60x40x40 cm previamente preparados com areão grosso (0,5 cm de diâmetro médio), colhido na praia próxima do local de colheita dos animais. Este foi abundantemente lavado com água do mar, constituindo uma camada de cerca de 3 cm de espessura. Estes mexilhões possuíam um comprimento médio de 3,46±0,12 cm.

Cada tanque foi cheio com 18 litros de água do mar, previamente filtrada e esterilizada por passagem sob UV, e foi colocado um sistema de arejamento por fluxo de ar. Estes tanques foram preparados seis dias antes da introdução dos mexilhões e colocados numa sala climatizada.

Em cada tanque foram colocados cerca de 120 animais, escolhidos aleatoriamente, tendo-se estabelecido um período de aclimatação de 4 semanas. Durante este período a temperatura da água manteve-se a 16±1 °C, sendo a água dos tanques renovada cada três dias, e os animais alimentados diariamente com uma mistura de algas marinhas das espécies *Tetraselmis suecica* e *Nitzschia* sp. (10^5 cél/ml). Os animais mortos foram sendo retirados, e no final do período experimental foi calculada a respectiva taxa de mortalidade.

As microalgas marinhas foram cultivadas num meio descrito por Fabregas *et al.* (1984), preparado com água do mar filtrada e esterilizada. O crescimento foi feito com luz de lâmpadas flurorescentes (Philips, 50W) a 16 °C com arejamento contínuo por fluxo de ar.

A estirpe tóxica de *Microcystis aeruginosa* - IZANCYA2 - foi cultivada em meio Z8 (Kotai, 1972) usando as condições anteriormente descritas para as algas marinhas.

2.3.2. EXPERIÊNCIA DE BIOACUMULAÇÃO

No primeiro dia deste trabalho, um dos tanques onde se realizou a aclimatação dos animais foi dividido em dois, funcionando ambos como controlo. Num desses tanques controlo, os animais foram mantidos em jejum e no outro continuaram a ser alimentados com uma mistura de *T. suecica* + *Nitzschia*. Os outros três tanques foram usados para os ensaios em que o alimento fornecido aos mexilhões era constituído exclusivamente por células de uma estirpe tóxica de *M. aeruginosa* - IZANCYA2 - produtora essencialmente de microcistina-LR - MCYST-LR. Diariamente foram adicionadas 1 x 10^5 cél/ml a cada um dos três tanques, sendo toda a água renovada dia sim dia não.

Diariamente retiraram-se 20 ml da cultura de *M. aeruginosa*, que foram congelados e liofilizados para posterior quantificação da MCYST-LR.

A colheita de mexilhões foi feita segundo o esquema apresentado na tabela 2.14, sendo retirados aleatoriamente indivíduos dos três tanques, excepto no dia 1 -M1 - em que foram retirados mexilhões dos cinco tanques, isto é, dos tanques experimentais e também dos dois tanques controlo.

Tabela 2.14 - Estratégia de amostragem de *Mytilus galloprovincialis* nas experiências de bioacumulação e de depuração de MCYST-LR.

BIOACUMULAÇÃO	
DIA	AMOSTRA
1	M1
2	M2
3	-
4	M3
5	-
6	M4
7	-
8	M5
9	-
10	M6
11	-
12	M7
13	-
14	M8
15	-
16	M9, M10

DEPURAÇÃO	
DIA	AMOSTRA
1	M9
2	-
3	M11
4	-
5	M12
6	-
7	M13
8	-
9	M14
10	-
11	M15
12	-
13	-
14	M16
15	M17, M18, M19

Sempre que se retiravam os mexilhões procedia-se à determinação do seu comprimento máximo e do seu peso fresco com casca e sem casca. Seguidamente foram congelados, liofilizados e pesados novamente.

No dia 16, além de se retirarem 20 animais para o doseamento de MCYST-LR (M9), retiraram-se mais 30 para se quantificar a distribuição desta toxina nos diferentes órgãos (M10).

Estes animais foram dissecados individualmente e foi feita a separação do pé, dos músculos, das brânquias, da glândula digestiva e do estômago, e dos restantes órgãos. Todas estas amostras foram pesadas individualmente e liofilizadas.

2.3.3. EXPERIÊNCIA DE DEPURAÇÃO

Após a experiência de acumulação da toxina, os animais sobreviventes foram alimentados diariamente com a mistura de *Tetraselmis* e *Nitzschia* (1 x 10^5 cél/ml) durante 15 dias. Toda a água dos tanques foi mudada dia sim dia não, altura em que eram colhidos 20 animais para análise das toxinas. Estes animais foram tratados como os da experiência de acumulação.

No dia 15 da experiência de depuração, além de se colherem 20 animais dos tanques em que se forneceu *M. aeruginosa* como alimento (M17), colheram-se ainda 20 animais do tanque alimentado desde o início da experiência com a mistura de *Nitzschia* e *T. suecica* (M18) e 20 animais do tanque sem alimento (M19) (Tabela 13).

2.3.4. EXTRACÇÃO DAS TOXINAS PRESENTES EM *M. aeruginosa*

As amostras de *M. aeruginosa* liofilizadas (T1 a T15) correspondentes aos quinze dias da experiência de bioacumulação foram extraídas com 10 ml de uma solução de butanol:metanol:água (5:20:75) de acordo com o método de Eriksson *et al.* (1989). Estas soluções foram sonicadas durante 30 minutos em banho-maria (40 °C), centrifugadas durante 15 minutos a 4000 rpm e reextraídas nas mesmas condições. O extracto obtido foi evaporado até cerca de 1/3 do volume original e seguidamente foi passado por uma coluna Bond Elut® previamente activada com metanol e água tridestilada. A coluna foi lavada com água tridestilada, metanol a 20% e as toxinas recuperadas com metanol a 80%. A solução foi evaporada completamente e as toxinas conservadas no congelador a -20 °C.

2.3.5. EXTRACÇÃO DAS TOXINAS PRESENTES NOS MEXILHÕES

As amostras de mexilhões liofilizados (M1 a M18) foram extraídas com uma solução de butanol:metanol:água (5:20:75) utilizando-se 50 ml de solução por cada g de molusco (Eriksson *et al.*, 1989). Previamente, os tecidos liofilizados foram triturados num almofariz de modo a

optimizar a extracção das toxinas. Esta decorreu durante 30 minutos num banho-maria a 40 °C, sendo sonicadas durante este período. Depois foram centrifugadas durante 30 minutos a 4000 rpm, sendo o resíduo reextraído nas mesmas condições. As soluções resultantes foram evaporadas até cerca de 1/3 do volume original, filtradas com um filtro de 0,45 µm e aplicadas num cartucho Bond Elut® com 1 g de ODS (YMC-Gel, YMC CO. Ldt., Kyoto-Fu, Japan) previamente activado com metanol e água tridestilada. Os cartuchos foram seguidamente lavados com água tridestilada, metanol a 20% e a fracção tóxica recuperada com metanol a 80%. Esta foi evaporada totalmente e o resíduo conservado no congelador a -20 °C.

2.3.6. QUANTIFICAÇÃO DE MCYST-LR EM *M. aeruginosa* E NOS MEXILHÕES

Os extractos obtidos em 2.3.4. e em 2.3.5. foram ressuspendidos numa solução de água/acetonitrilo (40/69, v/v) e filtrados em filtros de 0,2 µm antes de injectados no sistema de HPLC Gilson descrito na tabela 2.15 e segundo as condições descritas na tabela 2.16. O acetato de amónio, acetonitrilo, metanol e butanol foram reagentes Merck®, sendo os solventes orgânicos de qualidade para cromatografia (HPLC).

A detecção de MCYST-LR foi feita por comparação dos tempos de retenção das diferentes fracções obtidas em cada cromatograma, com o tempo de retenção da toxina pura (99% de pureza), fornecida pelo Prof. W. Carmichael. Além disso, as fracções com o tempo de retenção semelhante ao da toxina pura, foram analisadas num espectrofotómetro Hitachi 150-20, equipado com um registador Hitachi 150-20 Data Processor. Para tal, registou-se o espectro de absorção de ultravioleta (200 a 400 nm) dessas fracções e comparou-se com o espectro típico da toxina pura.

Tabela 2.15 - Componentes do sistema de HPLC Gilson utilizado para a quantificação de MCYST-LR extraída de *M. aeruginosa* e dos mexilhões

COMPONENTE	DESIGNAÇÃO
DETECTOR	Gilson HM Holochrome
BOMBAS	Gilson 302
INTEGRADOR	Data Master Model 621
COLUNA	Spherisorb S10 ODS2 (10 x 250 mm) Semi-Preparativa
LOOP	1000 µl

A quantificação de MCYST-LR foi feita a partir de uma curva de calibração realizada com a toxina pura, no mesmo sistema de HPLC e nas mesmas condições das cromatografias precedentes.

Tabela 2.16 - Condições utilizadas na Cromatografia para quantificação de MCYST-LR.

PARÂMETRO	CONDIÇÃO
FLUXO (ml/min)	2,0
DETECÇÃO (nm)	238
VEL. PAPEL (mm/min)	10,0
RANGE	0,1 a 0,2
FASE MÓVEL	Acetonitrilo/Acetato de amónio 0,01M (26/74, v/v)

Nalguns casos, o sistema de integração do HPLC não integrou determinadas fracções, por serem demasiado pequenas ou por outros motivos, fez-se por isso uma extrapolação de modo a determinar a área da fracção e convertê-la posteriormente em concentração de toxina.

3. RESULTADOS

3.1. OCORRÊNCIA DE CIANOBACTÉRIAS EM ÁGUAS DOCES PORTUGUESAS. AVALIAÇÃO DA SUA TOXICIDADE. ISOLAMENTO E TOXICIDADE DE ESTIRPES DE *MICROCYSTIS AERUGINOSA*

Do presente trabalho resultou a identificação de 28 espécies de cianobactérias pertencentes a 13 géneros diferentes e algumas CHROOCOCALES não identificadas.

Nas tabelas 3.1 a 3.9 apresentam-se os resultados relativos à determinação da densidade das amostras de fitoplâncton colhidas nos diferentes locais estudados.

A espécie de cianobactéria mais comum nas amostras analisadas foi *M. aeruginosa* seguindo-se por ordem decrescente CHROOCOCALES não identificadas, *An. Scheremetievi*, *An. flos-aquae*, *Ap. flos-aquae* e *An. spiroides*. De referir ainda que *M. wesenbergii*, uma espécie pouco referida para Portugal, mas comum noutros países como fazendo parte de florescências tóxicas, foi também relativamente abundante com densidades que variaram entre 2 x 10 cél/ml na albufeira de Bravura e 1,2 x 10^4 cél/ml no rio Guadiana. .

A densidade máxima de cianobactérias totais variou entre 5,0 x 10^2 cél/ml na albufeira de Arade e 6,9 x 10^7 cél/ml no Açude de Vale de Bicas. É de salientar, no entanto, que estas densidades representam, por vezes, os valores encontrados para as florescências concentradas nas margens, pelo que não podem ser considerados como valores médios para as massas de água.

Tabela 3.1 - Densidade (nº cél/ml) das diferentes espécies de cianobactérias, total de cianobactérias e total de fitoplâncton, no rio Minho (Monção).

DATA	26/08/91
ESPÉCIES	
M. aeruginosa	27480
Outras espécies fitoplanctónicas	1540
Total cianobactérias	27480
TOTAL DE FITOPLÂNCTON	29020

Tabela 3.2 - Densidade (nº cél/ml) das diferentes espécies de cianobactérias, total de cianobactérias e total de fitoplâncton, na albufeira de Crestuma-Lever (Rio Douro).

DATA	02/09/89
ESPÉCIES	
M. aeruginosa	237820
Outras espécies fitoplanctónicas	12520
Total cianobactérias	237820
TOTAL DE FITOPLÂNCTON	250340

Tabela 3.3 - Densidade (nº cél/ml) das diferentes espécies de cianobactérias, total de cianobactérias e total de fitoplâncton, no rio Dão -Santa Comba Dão (Aguieira).

DATA	04/10/92
ESPÉCIES	
An. cylindrica	8630
An. spiroides	4660
Ap. flos-aquae	16150
Microcystis aeruginosa	497020
M. pulverea	61700
Outras espécies fitoplanctónicas	17900
Total cianobactérias	711600
TOTAL DE FITOPLÂNCTON	729500

Tabela 3.4 - Densidade (nº cél/ml) das diferentes espécies de cianobactérias, total de cianobactérias e total de fitoplâncton, na Barrinha de Mira.

DATA	28/05/91	11/06/92	09/07/92
ESPÉCIES			
An. flos-aquae	7350	12770	19320
An. Scheremetievi	280	-	-
An. spiroides	730	-	-
C. limneticus	-	-	2730
C. turgidus	-	-	270
CHROOCOCALES	131660	9540	22450
M. aeruginosa	163200	1320	22730
Outras espécies fitoplanctónicas	1930	8640	10730
Total cianobactérias	303220	24050	67510
TOTAL DE FITOPLÂNCTON	305160	32600	78240

Tabela 3.5 - Densidade (nº cél/ml) das diferentes espécies de cianobactérias, total de cianobactérias e total de fitoplâncton, na lagoa de Mira.

DATA	26/09/91	11/06/92	07/10/92	11/11/92
ESPÉCIES				
An. flos-aquae	6360	141500	175640	1087730
An. Scheremetievi	-	-	270	22560
C. dispersus	-	-	13550	-
Chroococcus sp.	-	-	180	-
CHROOCOCALES	13260	34860	-	-
M. aeruginosa	60920	28280	3773450	156000
M. wesenbergii	-	1140	-	-
Outras espécis fitoplanctónicas	2070	17450	43270	2500
Total cianobactérias	80540	205780	3963090	1266290
TOTAL DE FITOPLÂNCTON	82610	213230	4006360	1268790

Tabela 3.6 - Densidade (n° cél/ml) das diferentes espécies de cianobactérias, total de cianobactérias e total de fitoplâncton, nas albufeiras de Paul de Magos, Vale das Bicas, Vale do Gaio e Odivelas.

ESPÉCIES / DATA	Paul de Magos 01/10/92	Vale das Bicas 01/10/92	Vale do Gaio 01/10/92	Odivelas 01/10/92
An. aphanizomenoides	55090	-	-	-
Anabaena sp.	-	272730	4450	230
Ap. flos-aquae	-	-	-	500
Ap. gracile	590	-	-	-
C. dispersus	-	-	360	-
Chroococus sp.	1450	-	-	-
CHROOCOCALES	140	418180	-	360
Dactylococcopsis sp.	-	-	540	-
G. lacustris	43640	11360	-	-
M. aeruginosa	-	2220000	-	-
Merismopedia sp.	-	-	730	-
Nostoc sp.	-	66595450	-	-
Outras espécies fitoplanctónicas	21320	11360	80360	5540
Total cianobactérias	100910	69517720	6080	1090
TOTAL DE FITOPLÂNCTON	121230	69529090	86450	6630

Tabela 3.7 - Densidade (n° cél/ml) das diferentes espécies de cianobactérias, total de cianobactérias e total de fitoplâncton, nas albufeiras de Roxo, Bravura, Monte da Rocha e Santa Clara.

ESPÉCIES / DATA	Roxo 02/10/92	Bravura 02/10/92	Monte da Rocha 02/10/92	Santa Clara 02/10/92
An. Scheremetievi	-	-	96100	1360
An. spiroides	-	280	300	-
Anabaena sp.	-	-	-	540
Aphanothece sp.	-	-	-	40
C. dispersus	2000	-	-	-
C. limneticus	910	-	-	-
CHROOCOCALES	410	730	59010	40
G. lacustris	6500	-	-	-
Merismopedia sp.	2360	-	-	-
M. aeruginosa	100	8310	400	-
M. wesenbergii	-	20	-	-
O. tenuis	-	-	100	-
Oscillatoria sp.	90	-	-	180
Outras espécies fitoplanctónicas	9590	1860	5550	13450
Total cianobactérias	12370	9340	155910	2160
TOTAL DE FITOPLÂNCTON	21870	11200	161460	15630

Tabela 3.8 - Densidade (nº cél/ml) das diferentes espécies de cianobactérias, total de cianobactérias e total de fitoplâncton, nas albufeiras de Arade, Pomarinho, Tapada Grande e no rio Guadiana (Mértola).

ESPÉCIES	Arade	R. Guadiana	Pomarinho	Tapada Grande
DATA	03/10/92	03/10/92	03/10/92	03/10/92
Anabaena sp.	500	540	4730	-
Ap. flos-aquae	-	-	-	2630
CHROOCOCALES	-	11180	-	-
G. lacustris	-	-	-	184090
M. aeruginosa	-	75200	-	197240
M. wesenbergii	-	12320	-	-
O. planctonica	-	-	-	205130
Oscilatoria sp.	-	-	-	660
Outras espécies fitoplanctónicas	6000	18450	1640	182770
Total cianobactérias	500	99240	4730	589750
TOTAL DE FITOPLÂNCTON	6500	117700	6360	772520

Tabela 3.9 - Densidade (nº cél/ml) das diferentes espécies de cianobactérias, total de cianobactérias e total de fitoplâncton, nas albufeiras de Divor, Montargil, Pego do Altar e Monte Novo.

ESPÉCIES	Divor	Montargil	Pego do Altar	Monte Novo
DATA	04/10/92	04/10/92	04/10/92	04/10/92
An. aphanizomenoides	-	-	540	-
An. flos-aquae	-	-	79140	-
An. Scheremetievi	5250	-	1590	23270
An. spiroides	-	2200	-	15710
Ap. flos-aquae	-	21490	1180	47200
C. dispersus	-	-	140	-
C. naegelianum	-	-	90	-
CHROOCOCALES	-	-	140	-
G. lacustris	-	-	40	-
M. aeruginosa	4286650	59520	-	20410
O. planctonica	-	-	-	50
Oscillatoria sp.1	-	180	-	-
Oscillatoria sp.2	-	60	-	-
P. catenata	3940	5000	-	-
Outras espécies fitoplanctónicas	2408940	82860	18320	15830
Total cianobactérias	4295840	88450	82860	106640
TOTAL DE FITOPLÂNCTON	6704780	171310	100180	122420

Na figura 3.1 apresenta-se as espécies que ocorreram em mais de 10% das amostras estudadas.

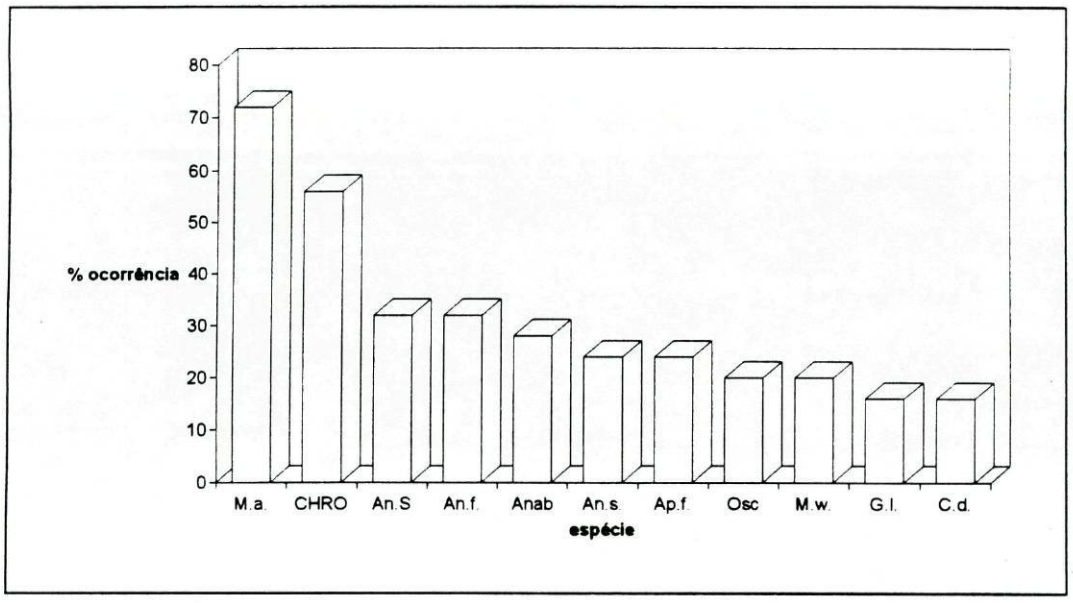


Figura 3.1 - Percentagens de ocorrência de algumas espécies de cianobactérias em amostras de fitoplâncton de águas doces portuguesas (M.a. - *M. aeruginosa*, CHRO - CHROOCOCALES, An.S. - *A. Scheremetievi*, An.f. - *An. flos-aquae*, Anab - *Anabaena* spp., An.s. - *An. spiroides*, Ap.f. - *Ap. flos-aquae*, Osc. - *Oscillatoria* spp., M.w.- *M. wesenbergii*, G.l. - *Gloeotrichia* sp., C.d. - *C. dispersus*).

A variação da percentagem das cianobactérias relativamente ao total do fitoplâncton em termos de densidade apresenta-se na figura 3.2. Esses valores foram quase sempre elevados e, em muitos casos, superiores a 80%. Apenas quatro locais, as albufeiras de Vale do Gaio, Odivelas, Santa Clara e Arade, apresentaram uma percentagem de cianobactérias inferior a 20%.

No que diz respeito à ocorrência de florescências, obtiveram-se 30 amostras, correspondentes a 18 locais diferentes (Tabela 3.10).

Os ensaios de toxicidade efectuados com murganhos revelaram apenas existência de hepatotoxicidade em 60% das amostras analisadas. Na tabela 3.10 apresentam-se os resultados relativos a esses ensaios de toxicidade, indicando-se as espécies dominantes e os valores de toxicidade - DL_{50} face a murganhos.

Os valores de toxicidade (DL_{50}) variaram entre 20,0 e 700,0 mg/kg, não considerando tóxicas todas as amostras em que não fosse registada qualquer alteração nos murganhos injectados com extractos de florescências até 1500 mg/kg.

Considerando as espécies mais importantes nas florescências analisadas, pode constatar-se que *M. aeruginosa* esteve presente em todas as amostras, embora nem sempre fosse a espécie dominante. Na tabela 3.11 regista-se a ocorrência das espécies de cianobactérias dominantes nas florescências tóxicas e não tóxicas. *An. flos-aquae* é a segunda espécie mais abundante nas florescências tóxicas e não tóxicas, embora não se tenha registado neurotoxicidade em nenhuma das amostras analisadas.

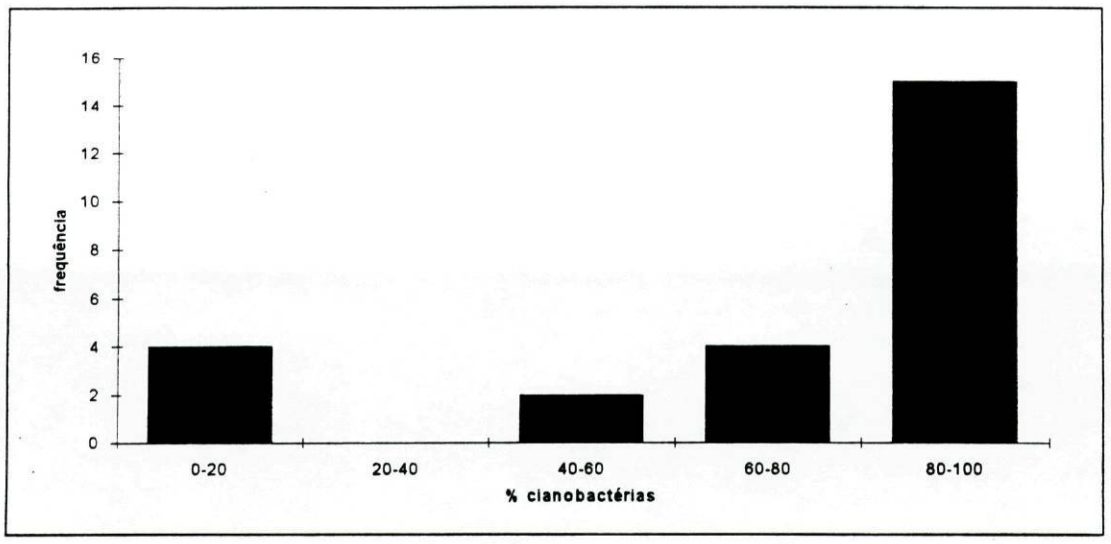


Figura 3.2 - Distribuição de frequência das percentagens de cianobactérias relativamente ao total do fitoplâncton nas massas de água prospectadas.

Tabela 3.10 - Local e data de colheita, espécies dominantes e codominantes de cianobactérias e toxicidade - DL_{50} (mg/kg) - das florescências de cianobactérias analisadas.

NÚMERO	ESPÉCIES DOMINANTES	LOCAL DE COLHEITA	DATA DE COLHEITA	TOXICIDADE	DL50 (mg/kg)
B1	*M. aeruginosa*	R. Minho (Cerveira)	30/08/90	NÃO	-
B2	*M. aeruginosa*	R. Minho (Cerveira)	31/08/90	NÃO	-
B3	*M. aeruginosa*	R. Minho (Caminha)	26/08/91	NÃO	-
B4	*M. aeruginosa*	R. Minho (Monção)	03/09/92	SIM	32,5
B5	*M. aeruginosa*	R. Douro (Crestuma)	02/09/89	SIM	33,0
B6	*M. aeruginosa* *M. wesenbergii*	R. Douro (Carrapatelo)	05/09/92	SIM	125,0
B7	*M. aeruginosa*	R. Douro (Valeira)	02/06/92	NÃO	-
B8	*M. aeruginosa* *M. wesenbergii*	R. Tâmega (Torrão)	05/09/92	SIM	150,0
B9	*M. aeruginosa*	Lagoa das Braças	17/07/89	NÃO	-
B10	*M. aeruginosa* *An. flos-aquae*	Lagoa de Mira	27/05/91	SIM	31,0
B11	*M. aeruginosa* *An. flos-aquae*	Lagoa de Mira	26/09/91	SIM	100,0
B12	*An. flos-aquae* *M. aeruginosa*	Lagoa de Mira	05/06/92	SIM	37,5
B13	*An. flos-aquae* *M. aeruginosa*	Lagoa de Mira	11/06/92	SIM	400,0
B14	*M. aeruginosa* *An. flos-aquae*	Lagoa de Mira	07/10/92	NÃO	-
B15	*An. flos-aquae* *M. aeruginosa*	Lagoa de Mira	11/11/92	NÃO	-

Tabela 3.10 - Local e data de colheita, espécies dominantes e codominantes de cianobactérias e toxicidade - DL_{50} (mg/kg) - das florescências de cianobactérias analisadas (continuação).

NÚMERO	ESPÉCIES DOMINANTES	LOCAL DE COLHEITA	DATA DE COLHEITA	TOXICIDADE	DL50 (mg/kg)
B16	*M. aeruginosa* *An. flos-aquae*	Barrinha de Mira	13/04/91	SIM	125,0
B17	*M. aeruginosa* *An. flos-aquae*	Barrinha de Mira	28/05/91	SIM	60,0
B18	*An. flos-aquae* *M. aeruginosa* *M. wesenbergii*	Barrinha de Mira	11/06/92	SIM	33,0
B19	*An. flos-aquae* *M. aeruginosa*	Barrinha de Mira	09/07/92	SIM	200,0
B20	*An. flos-aquae* *M. aeruginosa*	Lagoa Salgueira	27/05/91	NÃO	-
B21	*M. aeruginosa*	R. Dão (B. Aguieira)	19/09/92	SIM	31,0
B22	*M. aeruginosa*	R. Dão (B. Aguieira)	04/10/92	SIM	35,0
B23	*Nostoc sp.* *M. aeruginosa*	Açude de Vale das Bicas	01/10/92	SIM	300,0
B24	*An. Scheremetievi*	B. Monte da Rocha	02/10/92	NÃO	-
B25	*Anabaena sp.* *M. aeruginosa*	B. Monte Novo	03/10/92	SIM	700,0
B26	*M. aeruginosa*	B. Divor (água)	04/10/92	NÃO	-
B27	*M. aeruginosa*	B. Divor (margens)	04/10/92	NÃO	-
B28	*M. aeruginosa* *Ap. flos-aquae*	B. Montargil	04/10/92	NÃO	-
B29	*M. aeruginosa* *M. wesenbergii*	R. Guadiana (Mértola)	03/10/92	SIM	35,0
B30	*M. aeruginosa* *An. spiroides*	B. Bravura	02/10/92	SIM	20,0

Embora os objectivos deste trabalho não visassem o estudo da evolução das massas de água analisadas foi possível, através da análise das amostras da lagoa de Mira, verificar que a toxicidade e as espécies dominantes, podem variar bastante, mesmo num curto intervalo de tempo (tabela 3.12).

Tabela 3.11 - Ocorrência das espécies dominantes de cianobactérias nas florescências tóxicas e não tóxicas (número de florescências dominadas por uma determinada espécie/nº total de florescências).

ESPÉCIE	FLORESCÊNCIA TÓXICA	FLORESCÊNCIA NÃO TÓXICA
M. aeruginosa	13/18	9/12
M. wesenbergii	1/18	0/12
An. flos-aquae	5/18	2/12
An. Scheremetievi	0/18	1/12
Ap. flos-aquae	0/18	1/12
Nostoc sp.	1/18	0/12

Tabela 3.12 - Toxicidade (DL_{50}) e espécies de cianobactérias dominantes nas florescências colhidas na lagoa de Mira em 1991-1992 (M.a. - *M. aeruginosa*, A.f. - *An. flos-aquae*).

DATA	27/07/91	26/09/91	05/06/92	11/06/92	07/10/92	11/11/92
DL_{50} (mg/kg)	31,0	100,0	37,5	400,0	não tóxica	não tóxica
ESPÉCIES DOMINANTES	M.a. A.f.	M.a. A.f.	A.f. M.a.	A.f. M.a.	M.a. A.f.	A.f. M.a.

3.1.1. ESTIRPES DE *M. aeruginosa*

No que diz respeito às estirpes de *M. aeruginosa* isoladas, apresenta-se os resultados da toxicidade -DL_{50}- e do tamanho celular médio na tabela 3.13.

Comparativamente, o valor médio do diâmetro celular das estirpes isoladas a partir das lagoas (4,4±0,9 μm) é significativamente menor ($p<0,05$) do que o das estirpes isoladas das albufeiras (6,0±3,0 μm). No entanto, os valores médios do diâmetro das estirpes tóxicas (5,3±1,9 μm) não são significativamente diferentes dos das estirpes não tóxicas (3,9±0,8 μm).

A quantificação da toxicidade através da determinação da DL_{50} foi efectuada apenas numa amostra das estirpes de *M. aeruginosa* isoladas em laboratório. Na figura 3.13 apresenta-se a distribuição de frequências desses valores. O máximo obtido foi 75,0 mg/kg e o mínimo foi 7,5 mg/kg.

A avaliação da hepatotoxicidade, além de ter sido estimada pela análise dos sintomas dos animais intoxicados e dos tempos de sobrevivência, foi detectada, após autópsia, pelo aumento do peso do fígado relativamente ao peso total do corpo. Na figura 3.4. encontram-se representados esses valores relativos aos ensaios com as florescências e com as estirpes.

Tabela 3.13 - Dimensões médias celulares (média±s.d.) e toxicidade das estirpes de *M. aeruginosa* isoladas.

ESTIRPE	DIMENSÕES MÉDIAS (MÉDIA±S.D.) µm	TOXICIDADE
IZANCYA1	4,8±0,6	+
IZANCYA2	4,3±0,5	+
IZANCYA3	4,7±0,6	+
IZANCYA4	3,5±0,3	-
IZANCYA5	4,8±0,5	+
IZANCYA6	5,5±0,7	-
IZANCYA7	6,3±0,6	+
IZANCYA8	3,3±0,4	-
IZANCYA9	4,8±0,5	+
IZANCYA12	4,6±0,5	+
IZANCYA15	3,7±0,3	+
IZANCYA17	3,9±0,5	+
IZANCYA19	3,3±0,3	-
IZANCYA22	3,3±0,4	-
IZANCYA24	4,9±0,6	-
IZANCYA25	6,3±0,8	+
IZANCYA26	3,2±0,4	+
IZANCYA27	3,3±0,4	+
IZANCYA28	3,3±0,4	-
IZANCYA29	7,5±1,1	+
IZANCYA30	13,6±1,3	+
IZANCYA31	8,4±0,9	+
IZANCYA32	3,2±0,4	-
IZANCYA33	9,4±1,7	+
IZANCYA34	5,0±0,6	+
IZANCYA36	3,2±0,5	-
IZANCYA38	5,9±0,9	+
IZANCYA39	9,7±1,6	+
IZANCYA40	4,4±0,5	-
IZANCYA41	3,2±0,4	-
IZANCYA42	4,6±0,9	-
IZANCYA43	3,9±0,4	-
IZANCYA44	5,3±0,6	+

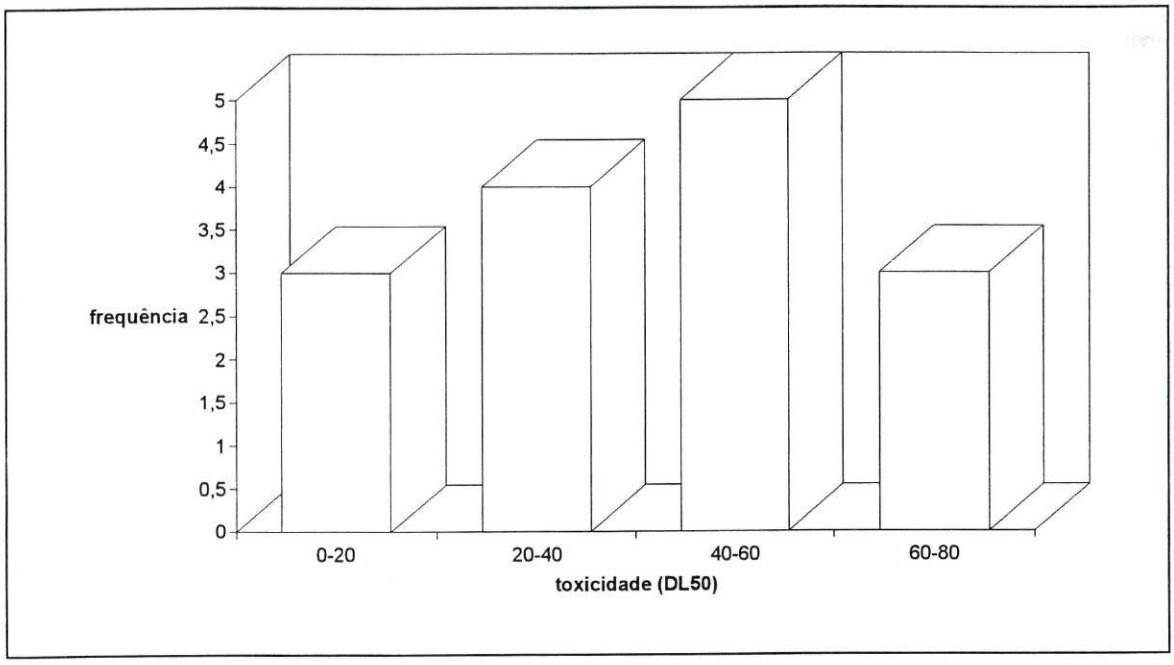


Figura 3.3 - Distribuição de frequências dos valores de toxicidade (DL_{50}) das estirpes de *M. aeruginosa* isoladas em laboratório.

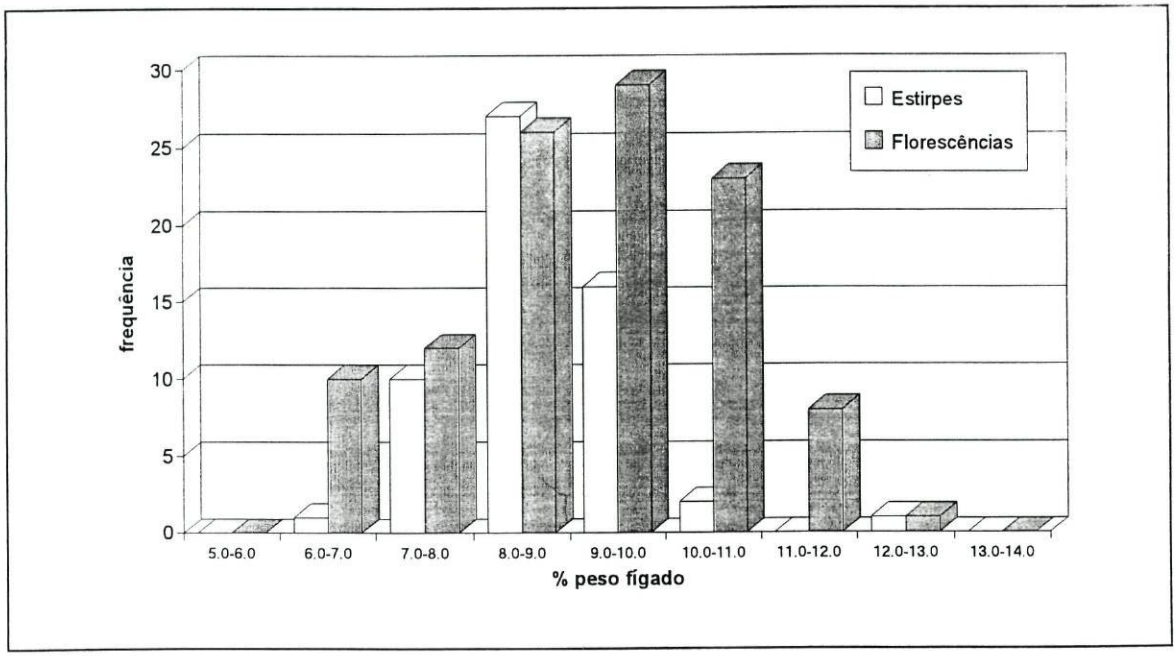


Figura 3.4 - Distribuição de frequências dos valores percentuais do peso do fígado relativamente ao peso total do corpo relativo às estirpes de *M. aeruginosa* isoladas em laboratório e às florescências de cianobactérias analisadas.

3.1.2. FLORESCÊNCIAS DE CIANOBACTÉRIAS

Para as florescências os valores de percentagem do peso do fígado relativamente ao peso total dos murganhos variou entre 6 e 13 %, enquanto que para as estirpes de *M. aeruginosa* esses valores variaram entre 6 e 12 %.

Na tabela 3.14 apresenta-se os resultados relativos ao valores médios dos tempos de sobrevivência e da percentagem do peso do fígado relativamente ao peso total de murganhos injectados com extractos de estirpes de *M. aeruginosa* e de florescências de cianobactérias. O valor médio da percentagem do peso do fígado para o caso das estirpes de *M. aeruginosa* foi significativamente inferior ao obtido com as florescências. Relação semelhante foi obtida com os valores dos tempos médios de sobrevivência dos murganhos injectados com doses letais de estirpes de *M. aeruginosa* e de florescências.

Tabela 3.14 - Valor médio (x), desvio padrão (sd) e número de observações (N) dos valores dos tempos de sobrevivência e da percentagem do peso do fígado relativamente ao peso total de murganhos injectados com doses letais de extractos de estirpes de *M. aeruginosa* e de florescências tóxicas de cianobactérias.

PARÂMETRO	ESTIRPES (x±sd)	N	FLORESCÊNCIAS (x±sd)	N	NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA
% PESO DO FÍGADO	8,75±0,87	55	9,22±1,29	42	$P < 0,05$
TEMPO DE SOBREVIVÊNCIA (MIN)	58±28	114	97±67	76	$P < 0,001$

Na figura 3.5 apresenta-se os resultados relativos aos valores dos tempos de sobrevivência dos animais injectados com doses letais, no caso das estirpes e das florescências.

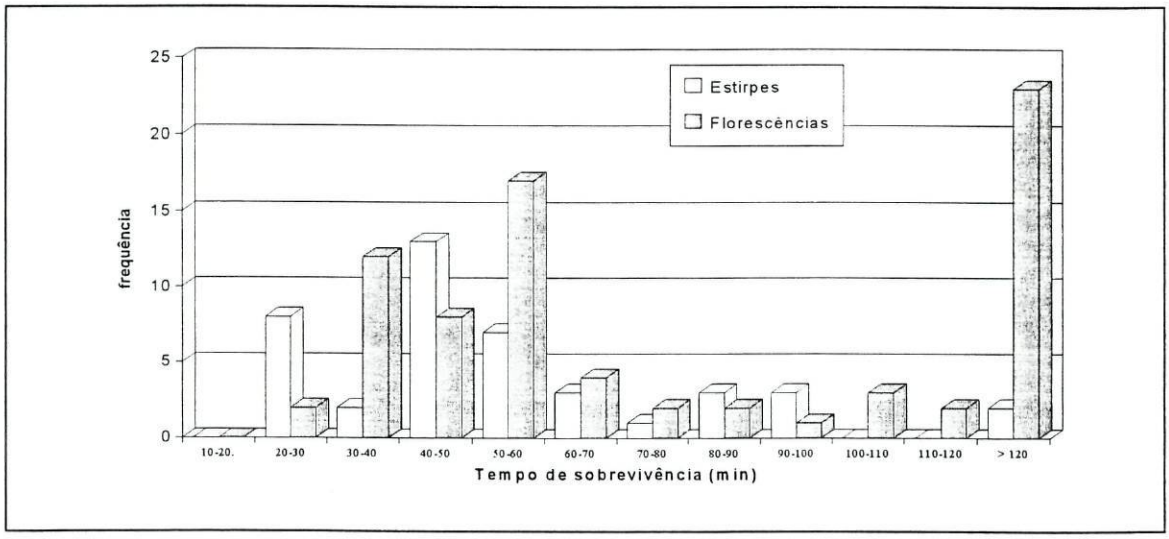


Figura 3.5 - Distribuição de frequências relativa aos tempos de sobrevivência de animais injectados com doses letais de estirpes de *M. aeruginosa* e de florescências de cianobactérias.

3.2. EXTRACÇÃO, ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DO PESO MOLECULAR DE MICROCISTINAS

3.2.1. ESTIRPES DE *M. aeruginosa*

Os resultados relativos às fracções obtidas na primeira e segunda cromatografias preparativas encontram-se na tabela 3.15. Do total das 11 estirpes de *M. aeruginosa* extraídas obtiveram-se 463 fracções na primeira cromatografia preparativa - CPI, que foram combinadas dentro de cada estirpe de acordo com os tempos de retenção e forma dos picos. O número de injecções utilizado para cada estirpe foi estabelecido de acordo com a quantidade de biomassa extraída e com a toxicidade da amostra, realizando-se uma injecção preliminar de modo a optimizar a quantidade a injectar. Nos casos em que a quantidade era demasiada, havia coalescência de algumas fracções, pelo que houve necessidade de diminuir o volume de extracto por injecção.

Tabela 3.15 - Número de injecções por amostra, número máximo de fracções e número total de fracções da 1ª Cromatografia preparativa - CP I - e número de fracções da CP II.

ESTIRPE	Nº INJECÇÕES CPI	Nº MÁXIMO DE FRACÇÕES CPI	TOTAL FRACÇÕES CPI	Nº FRACÇÕES CPII
IZANCYA1	3	15	42	11
IZANCYA2	5	13	53	18
IZANCYA3	4	17	53	20
IZANCYA5	3	24	54	24
IZANCYA7	4	13	48	17
IZANCYA25	3	19	42	18
IZANCYA30	3	21	45	19
IZANCYA31	2	16	31	10
IZANCYA33	2	12	24	9
IZANCYA34	3	19	52	20
IZANCYA44	2	11	19	13

Algumas das fracções obtidas nesta primeira cromatografia, nomeadamente as de tempo de retenção menor, não apresentavam um grau de pureza suficiente que possibilitasse a sua análise em cromatografia analítica com detector de díodos. Por isso houve necessidade de recorrer a uma segunda cromatografia preparativa - CPII, utilizando-se o mesmo sistema de HPLC mas com uma fase móvel diferente. Esta segunda cromatografia tornou-se vantajosa uma vez que permitiu obter, na maior parte dos casos, uma melhor separação de fracções com tempos de retenção muito semelhantes, sendo por vezes a única maneira de separar isómeros. Utilizou-se uma fase móvel composta por 60% de metanol e 40% de sulfato de sódio. Embora outros autores (Watanabe *et al.*, 1989; Namikoshi *et al.*, 1992b) indiquem percentagens de metanol entre 40-

60%, não foi possível trabalhar com percentagens de metanol inferiores a 60%, uma vez que ocorria floculação, e consequente entupimento do sistema de HPLC, além de provocar interferências ao nível da leitura de absorção no espectrofotómetro.

Nas figuras 1A a 11A, em anexo, apresenta-se os cromatogramas das 11 estirpes testadas, cromatogramas esses obtidos na 1ª cromatografia preparativa.

Verificou-se que, em grande parte dos casos, a separação era já suficiente para se passar à cromatografia analítica, mas nas estirpes 25 e 30, tal não foi suficiente, verificando-se mais tarde por análise de FABMS que um mesmo pico continha duas toxinas diferentes.

ESTIRPE IZANCYA1

A CPI deu origem a 15 fracções e destas a CPII originou 11. A utilização do metanol e sulfato de sódio como fase móvel na CPII separou bem as fracções 5 e 6, que com o acetonitrilo saíam coeluídas. Estas foram as únicas que deram um espectro de UV típico de microcistina (fig. 1A) A sua purificação em cromatografia analítica deu duas toxinas cujos resultados estão expressos na tabela 3.16. Esta estirpe produz quantidades muito semelhantes deMCYST-LR e de MCYST-LA.

ESTIRPE IZANCYA2

Devido a falhas nas bombas do sistema de cromatografia utilizado para a CPI e CPII as diferentes fracções resultantes das várias cromatografias obtidas com esta estirpe foram bastante difíceis de combinar. No entanto, após repetidas purificações, quer em CPII quer em CAI obtiveram-se três fracções tóxicas (Fig 2A). Tal como no caso da estirpe anterior, a utilização do metanol permitiu uma melhor separação de algumas fracções. Os resultados da análise estão expressos na tabela 3.16. A toxina dominante foi MCYST-LR.

ESTIRPE IZANCYA3

Através da CPI conseguiu-se separar bem as duas únicas fracções tóxicas identificadas (Fig. 3A). Duas outras, com tempo de retenção mais longo não foram purificadas em quantidade suficiente para serem identificadas. Os resultados obtidos com estas toxinas encontram-se na tabela 3.16.

Tabela 3.16 - Tempo de retenção (CDA), peso molecular e designação das fracções tóxicas isoladas a partir das estirpes IZANCYA1, IZANCYA2 e IZANCYA3.

ESTIRPE	FRACÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)	PESO MOLECULAR (M+H)	TOXINA
IZANCYA1	5	4,9	995	LR
	5	4,2	910	LA
IZANCYA2	5	4,0	910	LA
	5	4,5	995	LR
	8	5,9	981	[D-Asp^3]-LR
IZANCYA3	8	3,8	910	LA
	10	4,3	995	LR
	14	5,5	?	T1
	15	5,8	?	T2

ESTIRPE IZANCYA5

A CPI e a CPII permitiram obter três fracções tóxicas (fig. 4A) com muito boa separação. Os resultados estão na tabela 3.17, sendo novamente MCYST-LR a dominante. Além desta microcistina, isolou-se e identificou-se MCYST-LA e MCYST-AR.

ESTIRPE IZANCYA7

Apesar da abundante biomassa utilizada nesta extracção, só foi possível isolar uma microcistina (fig.5A). No entanto, o cromatograma da fracção tóxica obtido na CDA revelou que, de ambos os lados da fracção tóxica maior, ocorriam outras toxinas, mas em quantidades diminutas, pelo que não foi possível o seu isolamento e purificação. Os resultados desta análise encontram-se na tabela 3.17, sendo a MCYST-LR a toxina identificada.

ESTIRPE IZANCYA25

A partir desta estirpe obtiveram-se por CPI e CPII três fracções tóxicas (Fig 6A). No entanto só uma destas fracções, contendo duas toxinas foi identificada. A fracção com tempo de retenção 4,8 min revelou por análise de amino ácidos a existência de tirosina, além de arginina, alanina, leucina, β-metilaspartato e glutamato e só a análise de FABMS, com determinação do peso molecular revelou a existência de duas toxinas, com pesos moleculares de 995 e de 1045, que foram identificadas respectivamente como MCYST-LR e MCYST-YR. De salientar que nenhum dos sistemas utilizados i.e. CPI, CPII e CDA conseguiu separar estas duas toxinas. Os resultados das análises estão na tabela 3.17.

Tabela 3.17 - Tempo de retenção (CDA), peso molecular e designação das fracções tóxicas isoladas a partir das estirpes IZANCYA 5, IZANCYA 7 e IZANCYA 25.

Estirpe	Fracção	Tempo de retenção (min)	Peso molecular (M+H)	Toxina
IZANCYA5	11	3,8	910	LA
	12	4,4	995	LR
	20	9,7	953	AR
IZANCYA7	11	4,4	995	LR
IZANCYA25	13	4,8	995	LR
	13	4,8	1045	YR
	12	3,7	?	T1
	18	9,6	?	T2

ESTIRPE IZANCYA30

A CPI deu origem a três fracções tóxicas distintas, duas das quais foram completamente identificadas (Fig. 7A). Da fracção T5 com tempo de retenção de 3,7 min não se conseguiu isolar material suficiente para a análise de amino ácidos e de FABMS. Tal como na estirpe anterior, uma das fracções só foi correctamente identificada após a FABMS, possuindo duas toxinas numa fracção, que não foi possível isolar ou detectar por CPI ou CDA. As toxinas envolvidas foram novamente MCYST-LR e MCYST-YR (Tabela 3.18).

ESTIRPE IZANCYA31

Desta estirpe apenas se isolou uma fracção tóxica (fig 8A) mas, uma vez que a quantidade inicial de biomassa foi muito pequena, não foi possível purificar material suficiente para a análise de aminoácidos e de FABMS. O tempo de retenção sugere que se trata de MCYST-LR (tabela 3.18).

ESTIRPE IZANCYA33

Esta estirpe também só deu origem a uma fracção tóxica (fig 9A), cuja análise de amino ácidos revelou ser MCYST-LR (tabela 3.18).

ESTIRPE IZANCYA34

A extracção das toxinas desta estirpe deu origem a duas fracções tóxicas (fig 10A), com boa separação de ambas. A análise das toxinas purificadas deu os resultados expressos na tabela 3.18, sendo MCYST-LR a toxina dominante.

ESTIRPE IZANCYA44

Esta estirpe originou apenas uma fracção tóxica (fig 11A) cuja análise revelou ser MCYST-LR (tabela 3.18).

Tabela 3.18 - Tempo de retenção (CDA), peso molecular e designação das fracções tóxicas isoladas a partir das estirpes IZANCYA 30, IZANCYA 31, IZANCYA 33, IZANCYA 34 e IZANCYA 44.

Estirpe	Fracção	Tempo de retenção (min)	Peso molecular (M+H)	Toxina
IZANCYA30	12-14	4,4	995	LR
	12-14	4,4	1045	YR
	21	9,5	1038	RR
	6	3,7	?	T1
IZANCYA31	12	4,4	?	T1
IZANCYA33	10	4,5	995	LR
IZANCYA34	8	3,8	910	LA
	10	4,4	995	LR
IZANCYA44	10	4,4	995	LR

3.2.2. FLORESCÊNCIAS DE CIANOBACTÉRIAS

Os resultados relativos às CPI e CPII encontram-se na tabela 3.19. Do total de 12 amostras de florescências de cianobactérias analisadas, das 18 colhidas em várias massas de água do país, obtiveram-se 845 fracções na CPI, que foram combinadas dentro de cada amostra, de acordo com os tempos de retenção e forma dos picos. O número de injecções utilizado para cada amostra foi idealizado do mesmo modo que o indicado no caso das estirpes.

Como se observa pela análise dos valores, existem, de um modo geral, mais fracções por amostra no caso das florescências que nas estirpes, devendo salientar-se todavia que a biomassa utilizada foi diferente nos dois casos.

Tabela 3.19 - Número de injecções por amostra, número máximo de fracções e número total de fracções da CPI e número de fracções da CPII.

AMOSTRA	Nº INJECÇÕES CPI	Nº MÁXIMO DE FRACÇÕES CPI	TOTAL FRACÇÕES CPI	Nº FRACÇÕES CPII
AG	7	27	139	22
CA	6	22	119	25
ME	4	28	82	24
VB	4	21	72	21
MI	3	21	42	26
TO	2	19	25	20
CR	16	22	202	25
BM	2	21	33	13
M10	3	19	36	20
M11	3	21	45	16
M12	2	19	30	17
M13	2	12	20	10

A purificação foi feita, tal como para as estirpes, utilizando-se a cromatografia com detector de díodos para avaliar o grau de pureza das fracções e a presença de toxinas.

Nas figuras 12A a 23A, em anexo, encontram-se os cromatogramas obtidos na CPI, indicando-se os picos tóxicos identificados pela CDA. Na análise de aminoácidos conjuntamente com a determinação do peso molecular por FABMS identificaram-se 7 microcistinas diferentes (Tabela 3.27).

Amostra AG - Albufeira da Aguieira

A análise do material desta florescência permitiu a obtenção de 7 fracções tóxicas, seis das quais foram identificadas (Fig. 12A). Algumas das microcistinas só foram identificadas após FABMS, uma vez que coeluíam em todos os sistemas de solventes utilizados. Tais foram a MCYST-LR, MCYST-HilR e [Dha^7]MCYST-LR, por um lado, e a [$MeSer^7$]MCYST-LR e a [$D\text{-}Asp^3$]MCYST-LR, por outro (Tabela 3.20). A microcistina dominante foi a MCYST-LR.

Amostra CA - Albufeira do Carrapatelo

Através da CPI isolaram-se quatro microcistinas, embora só se tenha conseguido efectuar a identificação de uma delas, a MCYST-LR (Fig. 13A e Tabela 3.21).

Tabela 3.20 - Tempo de retenção (CDA), peso molecular e designação das fracções tóxicas isoladas a partir da amostra AG.

FRACÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)	PESO MOLECULAR (M+H)	TOXINA
15	4,1-4,9	995	LR
8	2,5	1038	RR
16	5,3	1009	HilR
15	2,5	981	[D-Asp^3]-LR
16	5,5	981	[Dha^7]-LR
15	2,5	1013	[L-MeSer^7]-LR
17	6,0	?	T1

Amostra ME - Rio Guadiana - Mértola

A análise desta amostra revelou a existência de quatro microcistinas, embora apenas se tenha identificado duas delas, MCYST-LR e MCYST-YR (Fig. 14A e Tabela 3.21). Esta identificação só foi possível, tal como em casos anteriores, com a identificação da composição aminoacídica e do peso molecular por FABMS, uma vez que ambas coeluíam em qualquer dos sistemas de cromatografia utilizados.

Amostra TO - Albufeira do Torrão

Esta amostra continha três microcistinas diferentes (Fig. 15A e tabela 3.21), mas em quantidades tão pequenas que não foi possível a sua identificação.

Tabela 3.21 - Tempo de retenção (CDA), peso molecular e designação das fracções tóxicas isoladas a partir das amostras CA, ME e TO.

AMOSTRA	FRACÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)	PESO MOLECULAR (M+H)	TOXINA
CA	13	3,4	?	T1
	16	4,8	995	LR
	19	6,0	?	T2
	22	9,7	?	T3
ME	5-6	4,7-4,8	995	LR
	5-6	4,7-4,8	1045	YR
	10	4,1	?	T1
	13	6,0	?	T2
TO	11	3,7	?	T1
	12	4,0	?	T2
	18	9,7	?	T3

Amostra CR - Albufeira de Crestuma

A análise deste material possibilitou a purificação de três microcistinas, sendo duas delas, MCYST-LR e [D-Asp^3]-LR (Fig. 16A e Tabela 3.22).

Amostra MI - Rio Minho - Monção

A análise deste material permitiu o isolamento de quatro microcistinas, embora só se tenha identificado a MCYST-LR (Fig. 17A e Tabela 3.22). As outras três não possuíam quantidade suficiente para a respectiva caracterização química.

Amostra VB - Açude de Vale das Bicas

Esta amostra permitiu o isolamento de duas microcistinas, MCYST-LR e MCYST-RR, sendo a primeira a dominante (Fig. 18A e Tabela 3.22).

Tabela 3.22 - Tempo de retenção (CDA), peso molecular e designação das fracções tóxicas isoladas a partir das amostras CR, MI e VB.

Amostra	Fracção	Tempo de retenção (min)	Peso molecular (M+H)	Toxina
CR	6-8	4,4	995	LR
	13	5,5	981	[D-Asp^3]-LR
	17	9,7	?	T1
MI	9	3,9	?	T1
	10	4,7	995	LR
	14	6,1	?	T2
	20	9,7	?	T3
VB	13	4,4	995	LR
	19	9,4	1038	RR

Amostra BM - Barrinha de Mira

Esta amostra continha duas microcistinas mas em quantidades pequenas, que não possibilitaram a sua identificação (Fig. 19A e Tabela 3.23).

Amostra M10 - Lagoa de Mira

Esta amostra continha duas toxinas, identificadas como MCYST-LR e [D-Asp^3] MCYST-LR (Fig. 20A e Tabela 3.23).

Amostra M11 - Lagoa de Mira

Esta amostra continha três microcistinas, das quais duas foram identificadas como LR e YR (Fig. 21A e Tabela 3.23) .

Amostra M12 - Lagoa de Mira

Esta amostra possuía também três microcistinas, tendo sido identificadas as duas referidas para a amostra anterior (Fig. 22A e Tabela 3.23).

Amostra M13 - Lagoa de Mira

Esta amostra continha duas microcistinas, que, por insuficiência de material, não foram identificadas (Fig. 23A e Tabela 3.23).

Tabela 3.23 - Tempo de retenção (CDA), peso molecular e designação das fracções tóxicas isoladas a partir das amostras BM, M10, M11, M12 e M13.

AMOSTRA	FRACÇÃO	TEMPO DE RETENÇÃO (MIN)	PESO MOLECULAR (M+H)	TOXINA
BM	9-10	4,8	?	T1
	14-15	8,4	?	T2
M10	5-6	4,4	995	LR
	7	5,4	981	[D-Asp^3]-LR
M11	7	5,4	?	T1
	12-13	4,4	995	LR
	12-13	4,4	1045	YR
M12	3	4,4	995	LR
	3	4,4	1045	YR
	9	8,6	?	T1
M13	12	4,5	?	T1
	14-15	8,3-8,4	?	T2

Na tabela 3.24 refere-se a quantidade de MCYST-LR, o total de microcistinas e o valor de DL_{50} para as estirpes de *M. aeruginosa* estudadas, e na tabela 3.25 esses mesmos valores referentes às florescências de cianobactérias.

Tabela 3.24 - Quantidade de MCYST-LR, total de microcistinas (MCYST TOTAL) e valor de toxicidade (DL_{50}) de cada estirpe tóxica de *M. aeruginosa* estudada.

ESTIRPE	MCYST-LR (μg/mg)	MCYST TOTAL (μg/mg)	DL_{50} (mg/kg)
IZANCYA1	6,0	11,3	15,0
IZANCYA2	4,7	5,0	7,5
IZANCYA3	6,7	7,3	45,0
IZANCYA5	2,7	3,3	15,0
IZANCYA7	2,1	2,1	75,0
IZANCYA25	2,6	5,9	75,0
IZANCYA30	3,8	7,2	15,0
IZANCYA31	3,2	3,2	45,0
IZANCYA33	4,9	4,9	45,0
IZANCYA34	4,3	4,7	45,0
IZANCYA44	5,8	5,8	30,0

Tabela 3.25 - Quantidade de MCYST-LR, total de microcistinas (MCYST TOTAL) e valor de toxicidade (DL_{50}) das florescências de cianobactérias estudadas.

AMOSTRA	MCYST-LR (μg/mg)	MCYST TOTAL (μg/mg)	DL_{50} (mg/kg)
AG	4,6	5,6	31,0
CA	2,2	3,6	125,0
ME	3,5	7,1	35,0
CR	4,9	4,9	33,0
TO	1,1	1,6	150,0
VB	0,8	1,0	300,0
MI	2,2	4,8	32,5
BM	2,3	4,6	125,0
M10	3,5	3,9	31,0
M11	2,4	3,3	100,0
M12	4,8	6,8	37,5
M13	1,5	1,6	400,0

A análise da composição aminoacídica das toxinas, seguida do estudo do seu peso molecular revelou que as amostras correspondentes às 11 estirpes e às 12 florescências produziram 9 toxinas diferentes que foram identificadas. Nas figuras 3.6A, 3.6B e 3.6C estão representados os

cromatogramas da análise de amino ácidos e nas figuras 24A a 31A, em anexo os espectros de massa das nove toxinas.

Através da análise dos cromatogramas obtidos com o detector de diodos e da análise dos resultados de FAB-MS foi possível quantificar a proporção das diferentes toxinas produzidas por cada estirpe. Os resultados estão na tabela 3.26.

Tabela 3.26 - Proporções das diferentes microcistinas isoladas a partir das estirpes de *M. aeruginosa*.

Estirpe IZANCYA Toxina	1	2	3	5	7	25	30	31	33	34	44
MCYST-LR	53,0	94,5	91,9	83,3	100,0	44,1	53,0	-	100,0	91,4	100,0
MCYST-LA	47,0	4,7	0,6	13,9	-	-	-	-	-	8,6	-
MCYST-[D-Asp^3]-LR	-	0,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCYST-AR	-		-	2,8	-	-	-	-	-	-	-
MCYST-YR	-	-	-	-	-	14,7	11,6	-	-	-	-
MCYST-RR	-	-	-	-	-	-	33,0	-	-	-	-
T1	-	-	7,4	-	-	5,9	2,4	100,0	-	-	-
T2	-	-	0,1	-	-	35,5	-	-	-	-	-
N° total de toxinas	2	3	4	3	1	4	4	1	1	2	1

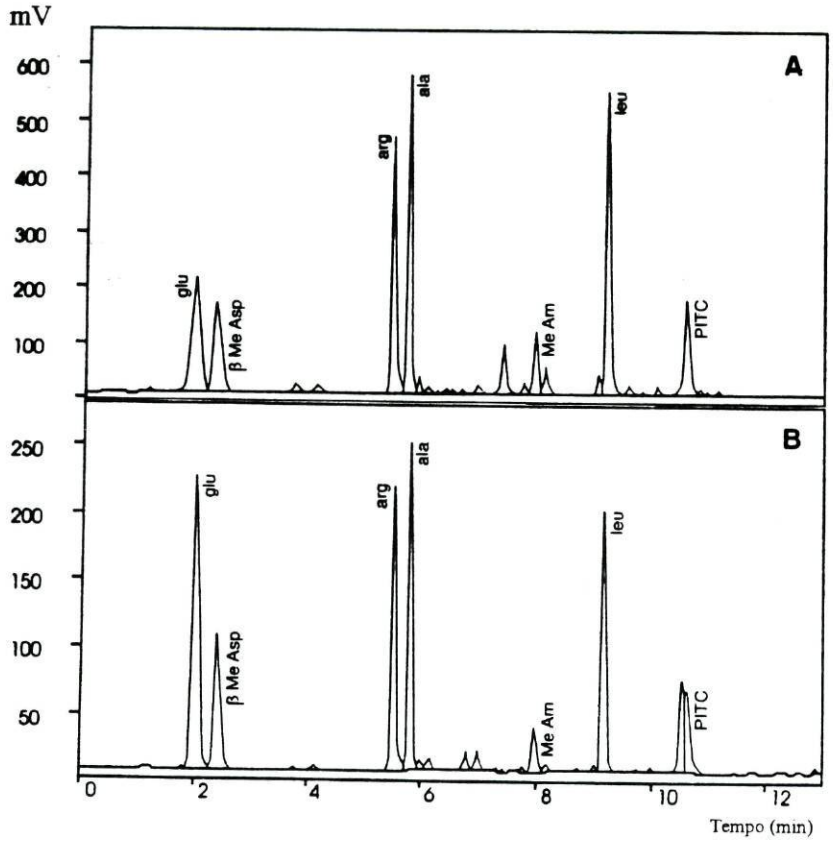


Figura 3.6A - **Resultados das análises de aminoácidos das toxinas isoladas a partir das estirpes de *Microcystis* e das florescências de cianobactérias (A** - MCYST-LR, [D-Asp^3]MCYST-LR e [L-MeSer^7] MCYST-LR e **B** - MCYST-HilR e [Dha^7]MCYST-LR).

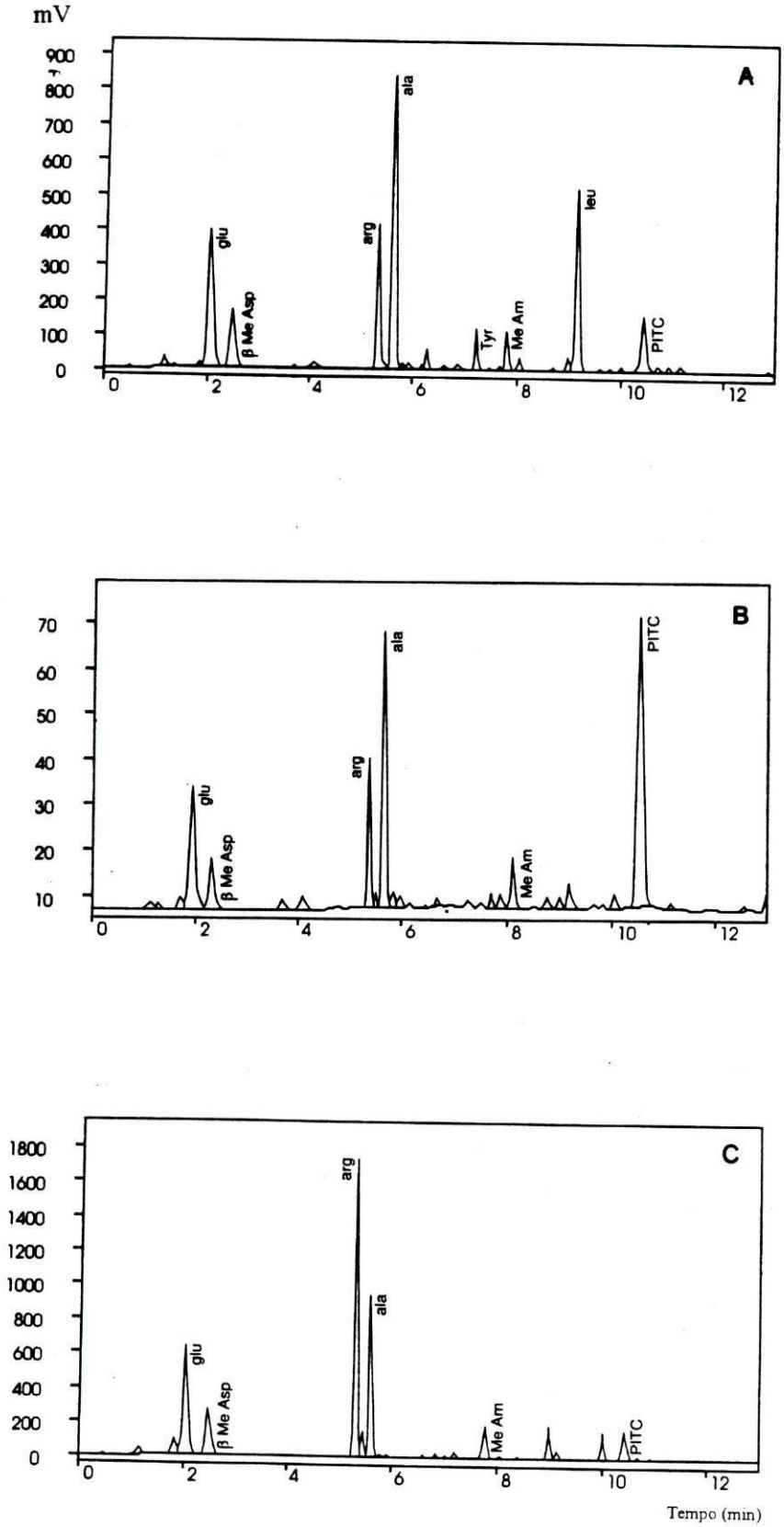


Figura 3.6B - Resultados das análises de aminoácidos das toxinas isoladas a partir das estirpes de *Microcystis* e das florescências de cianobactérias (**A** - MCYST-LR + MCYST-YR, **B** - MCYST-AR e **C** - MCYST-RR)

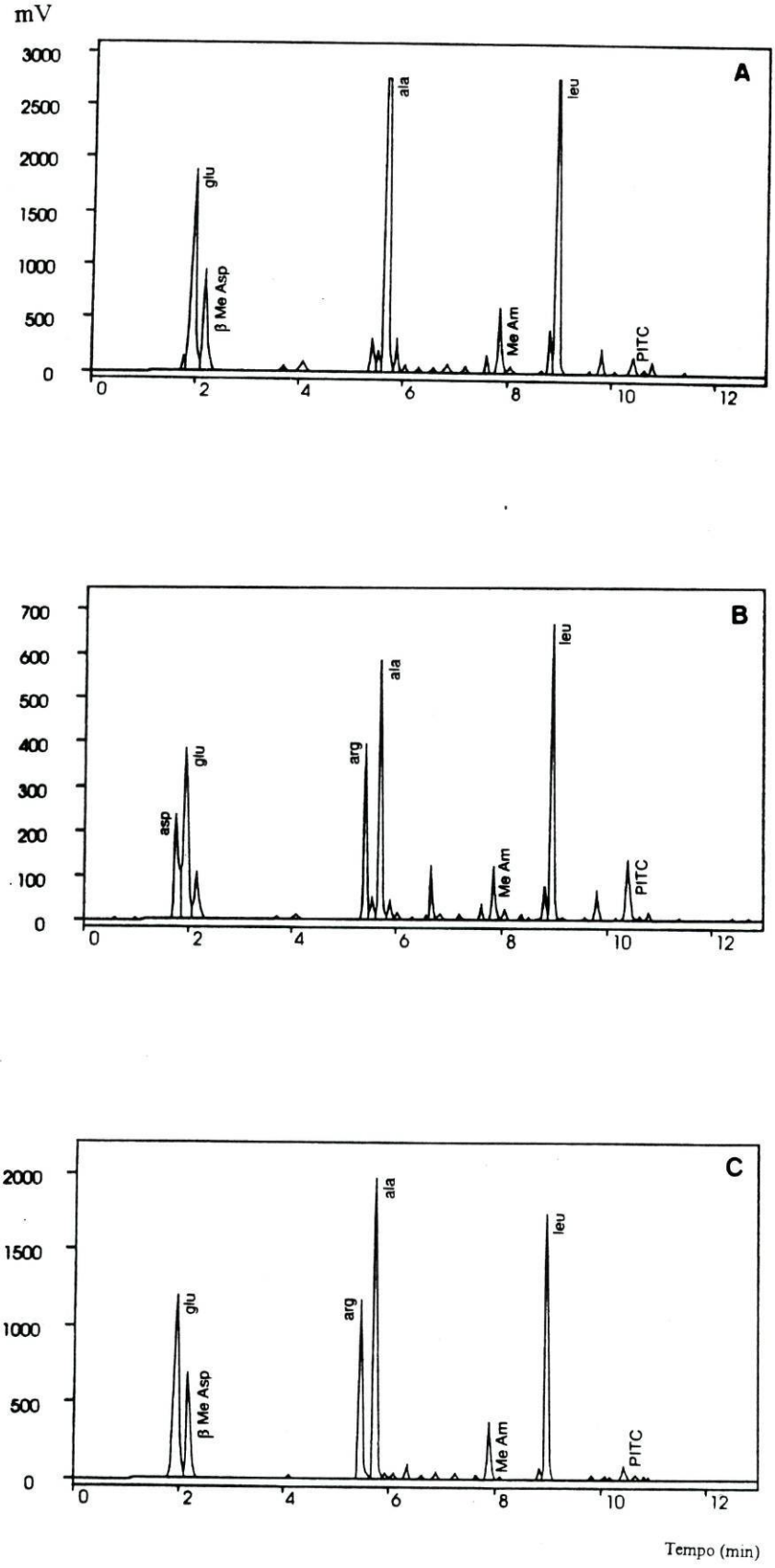


Figura 3.6C - Resultados da análises de aminoácidos das toxinas isoladas a partir das estirpes de *Microcystis* e das florescências de cianobactérias (**A** - MCYST-LA, **B** -[D-Asp3]MCYST-LR e **C** - MCYST-LR).

Na tabela 3.27 apresenta-se a percentagem de ocorrência das diferentes microcistinas extraídas das estirpes de *M. aeruginosa*. Na tabela 3.28 apresenta-se os mesmos valores para as florescências de cianobactérias

Tabela 3.27 - Percentagem de ocorrência das microcistinas isoladas e identificadas a partir das estirpes de *M. aeruginosa*.

TOXINA	OCORRÊNCIA (%)
MCYST-LR	100
MCYST-LA	50
MCYST-YR	20
MCYST-[D-Asp^3]-LR	10
MCYST-AR	10
MCYST-RR	10

Tabela 3.28 - Percentagem de ocorrência das microcistinas isoladas e identificadas a partir das florescências de cianobactérias.

TOXINA	OCORRÊNCIA (%)
MCYST-LR	100
MCYST-[D-Asp^3]-LR	33
MCYST-YR	33
MCYST-RR	22
MCYST-[Dha^7]-LR	11
MCYST-[L-MeSer^7]-LR	11
MCYST-HiLR	11

De salientar que, tal como no caso das estirpes de *M. aeruginosa*, a MCYST-LR é a dominante, surgindo em todas as amostras, com percentagens acima dos 45,5. Outro aspecto a realçar é o facto de ser esta a segunda descrição de MCYST-HilR, composta por isoleucina, em vez de leucina.

Enquanto que a maior parte das amostras possui apenas de 2 a 4 microcistinas diferentes, da amostra AG isolaram-se 7, entre as quais MCYST-LR foi a toxina dominante.

Na tabela 3.29 regista-se a frequência de ocorrência das diferentes microcistinas isoladas e identificadas nas amostras de florescências de cianobactérias.

Tabela 3.29 - Proporções das microcistinas isoladas a partir das florescências de cianobactérias (T1 a T3 representam microcistinas não identificadas).

Amostra / Toxina	AG	CA	ME	VB	TO	MI	CR	BM	M10	M11	M12	M13
MCYST-LR	64,2	61,1	48,8	83,0	-	45,5	99,8	-	88,6	73,1	70,9	-
MCYST-[Dha^7]-LR	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCYST-[L-MeSer^7]-LR	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCYST-HilR	2,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MCYST-RR	12,7	-	-	17,0	-	-	-	-	-	-	-	-
MCYST-[D-Asp^3]-LR	4,2	-	-	-	-	-	0,1	-	11,4	-	-	-
MCYST-YR	-	-	48,8	-	-	-	-	-	-	11,5	23,7	-
T1	1,8	33,9	1,5	-	68,8	30,9	0,1	50,0	-	15,4	5,4	90,0
T2	-	0,6	1,0	-	23,4	11,0	-	50,0	-	-	-	10,0
T3	-	4,4	-	-	7,8	12,6	-	-	-	-	-	-
N° Total de Toxinas	7	4	4	2	3	4	3	2	2	3	3	2

No que diz respeito à quantidade de microcistinas por amostra, os valores variaram entre 2,1 e 11,3 μg/mg nas estirpes de *M. aeruginosa* e entre 1,0 e 7,1 μg/mg nas florescências.

Na figura 3.7 representa-se a relação entre a quantidade total de microcistinas e de MCYST-LR e os valores respectivos de DL_{50} para as estirpes e na figura 3.8 para as florescências.

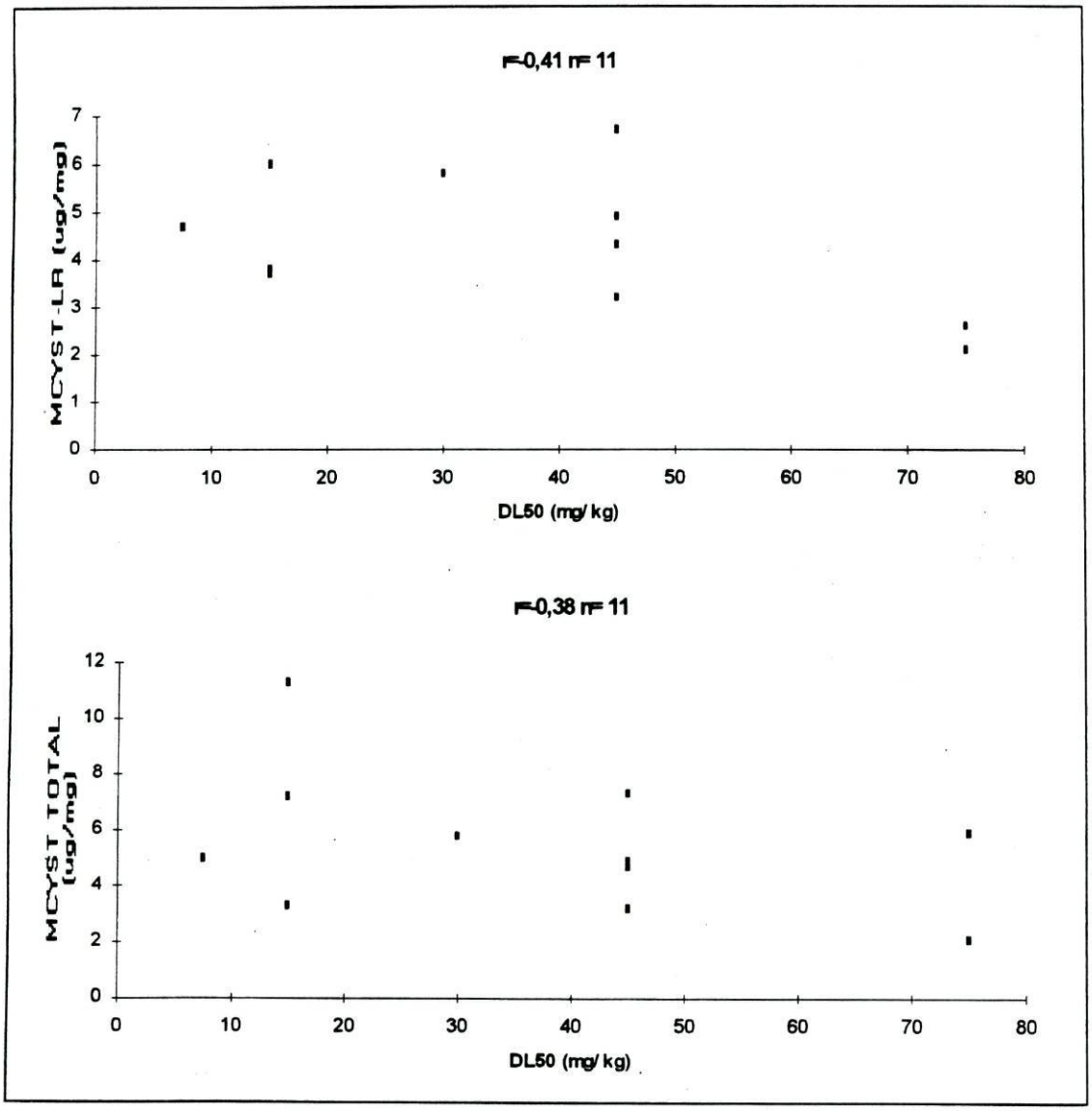


Figura 3.7- Relação entre concentração de MCYST-LR e concentração total de microcistinas MCYST TOTAL e os valores de DL_{50} para as estirpes de *M. aeruginosa*. (r - coeficiente de correlação, n - nº de amostras)

A análise das duas correlações indicadas nas figuras 3.7 e 3.8, revela que as correlações são mais significativas para as amostras das florescências. Nota-se ainda que não existem diferenças significativas entre as correlações obtidas com MCYSTTOTAL e MCYST-LR e as DL_{50} para as florescências, embora tal seja mais notório para as estirpes de *M. aeruginosa*.

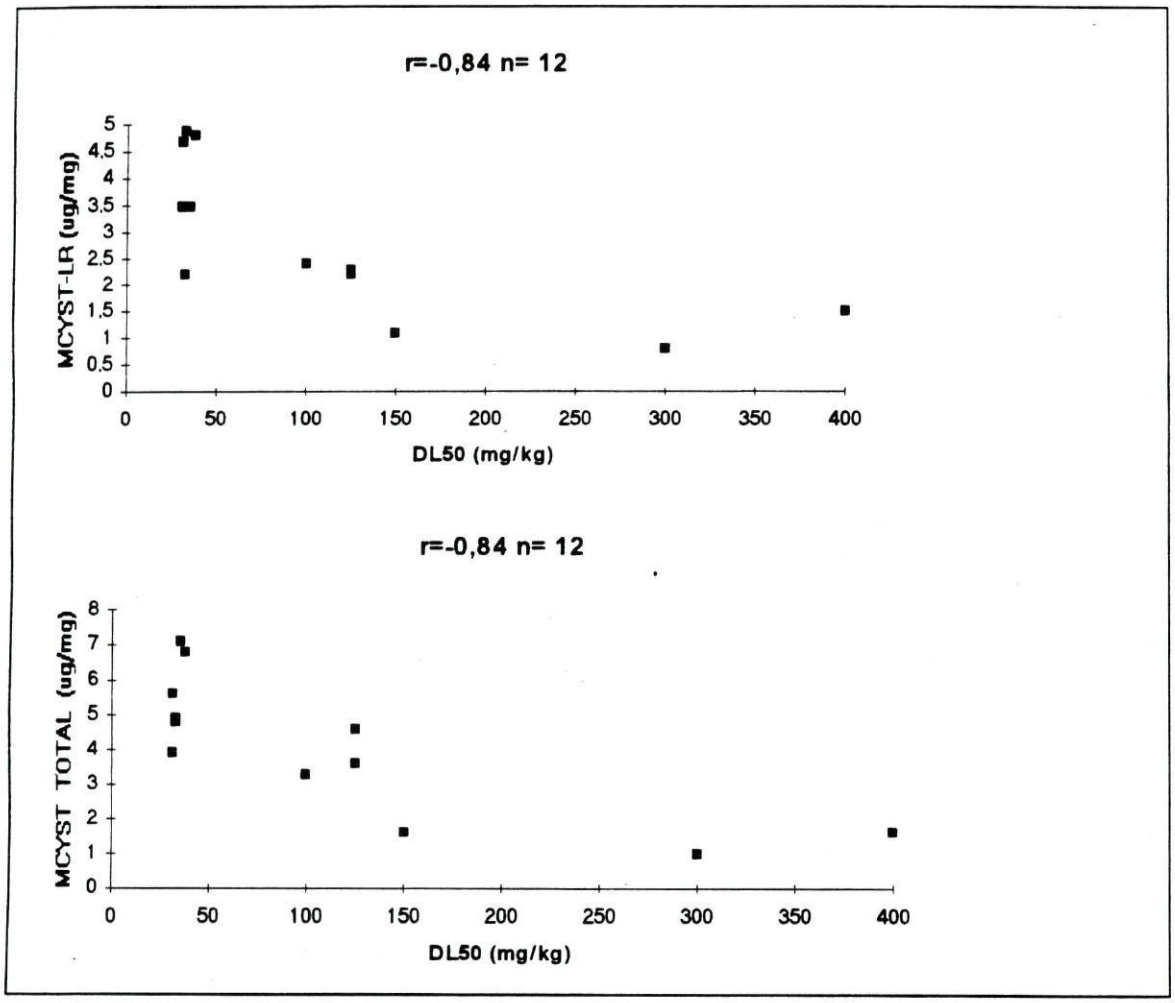


Figura 3.8 - Relação entre concentração de MCYST-LR e concentração total de microcistinas e os valores de DL_{50} para as florescências de cianobactérias (r - coeficiente de correlação, n - nº de amostras)

3.3. AVALIAÇÃO DA BIOACUMULAÇÃO E DA DEPURAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR *Mytilus galloprovincialis* LAMARCK

Durante o período de aclimatação dos animais a mortalidade foi muito reduzida (0,6%), sendo os valores também muito baixos durante as experiências de acumulação e de depuração (Tabela 3.30).

Durante a experiência de acumulação, os animais alimentados com *M. aeruginosa* apresentavam produção de pseudofezes poucos minutos após a administração do alimento. Tal aconteceu novamente aquando da alimentação com a mistura de microalgas marinhas nos animais controlo e na experiência de depuração. Cerca de uma a duas horas após a administração do alimento, a água, que inicialmente se apresentava turva, ficava novamente límpida.

Tabela 3.30 - Valores de mortalidade (%) obtidos no decorrer das experiências de acumulação e de depuração de MCYST-LR em *Mytilus galloprovincialis*.

TRATAMENTO	TAXA DE MORTALIDADE (%) ACUMULAÇÃO DIA 16	DEPURAÇÃO DIA 15
M. aeruginosa tóxica	0,45	6,33
Nitzschia + Tetraselmis	0,00	0,00
Sem alimento	0,00	0,00

Os exemplares de *Mytilus galloprovincialis* não apresentaram, durante as experiências, quaisquer sinais de stress, tais como encerramento das valvas, retracção ou ausência de produção do bisso ou outros.

Os valores relativos ao comprimento médio, peso com casca, peso fresco, peso seco, peso seco/comprimento e peso seco/comprimento/indivíduo de cada amostra de *Mytilus galloprovincialis* estão apresentados na tabela 3.31 para a experiência de acumulação e na tabela 3.32 para a experiência de depuração.

TABELA 3.31 - Número de indivíduos, comprimento e pesos das amostras de *M. galloprovinciallis* durante a experiência de bioacumulação das toxinas de *M. aeruginosa*.

AMOSTRA	COMPRIMENTO MÉDIO (cm)	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	PESO COM CASCA (g)	PESO FRESCO (g)	PESO SECO TOTAL (g)	PESO SECO/ COMPRIMENTO (g/cm)	PESO SECO/ COMPRIMENTO/ INDIVÍDUO (g/cm/ind)
M1	3,6	12	83,4	18,9	2,26	0,19	0,052
M2	3,6	20	123,3	32,7	3,98	0,19	0,055
M3	3,5	20	123,4	35,1	3,58	0,18	0,051
M4	3,4	20	98,5	26,7	2,96	0,15	0,044
M5	3,5	20	110,5	26,1	3,15	0,16	0,045
M6	3,3	20	102,6	25,3	3,06	0,15	0,046
M7	3,3	20	93,7	22,5	2,71	0,14	0,041
M8	3,4	20	100,8	34,1	3,27	0,16	0,048
M9	3,4	19	115,7	34,9	3,36	0,18	0,052

TABELA 3.32 - Número de indivíduos, comprimento e pesos das amostras de *M. galloprovinciallis* durante a experiência de depuração das toxinas de *M. aeruginosa*.

AMOSTRA	COMPRIMENTO MÉDIO (cm)	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	PESO COM CASCA (g)	PESO FRESCO (g)	PESO SECO TOTAL (g)	PESO SECO/ COMPRIMENTO (g/cm)	PESO SECO/ COMPRIMENTO/ INDIVÍDUO (g/cm/ind)
M9	3,4	19	115,7	34,9	3,36	0,18	0,052
M11	3,4	20	106,1	36,2	3,37	0,17	0,049
M12	3,4	20	100,3	22,1	2,71	0,14	0,040
M13	3,5	20	109,2	23,1	2,20	0,11	0,031
M14	3,5	20	109,5	25,6	2,94	0,15	0,042
M15	3,7	19	120,2	25,2	2,37	0,12	0,032
M16	3,7	25	146,6	28,4	3,33	0,13	0,035
M17	3,3	116	606,9	116,0	14,32	0,12	0,036
M18	3,4	36	196,9	39,4	5,13	0,14	0,041
M19	3,4	31	179,5	39,5	4,58	0,15	0,044

Na tabela 3.33 apresenta-se os mesmos parâmetros para a amostra M10, utilizada para o estudo da distribuição de MCYST-LR nos diferentes órgãos de *Mytilus galloprovincialis*.

TABELA 3.33 - Número de indivíduos, comprimento e pesos das amostras dos diferentes órgãos de *M. galloprovinciallis* durante a experiência de acumulação das toxinas de *M. aeruginosa* A- pé, B- músculos, C- brânquias, D- glândula digestiva+estômago, E - resto do animal).

AMOSTRA	COMPRIMENTO MÉDIO (cm)	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	PESO COM CASCA (g)	PESO FRESCO (g)	PESO SECO TOTAL (g)	PESO SECO/ COMPRIMENTO (g/cm)	PESO SECO/ COMPRIMENTO/ INDIVÍDUO (g/cm/ind)
M10	3,9	30	236,8	47,8	6,08	0,20	0,052
M10A				1,43	0,23		
M10B				6,99	1,33		
M10C				10,39	1,06		
M10D				5,88	0,97		
M10E				23,2	2,49		

A variação do peso seco/animal/comprimento foi estudada ao longo das duas experiências, de acumulação e de depuração, estando registada nas figuras 3.9 e 3.10. Na tabela 3.34 apresenta-se os valores médios de peso seco/ comprimento/indivíduo durante a acumulação e depuração com os dos indivíduos controlo (sem alimento, com microalgas marinhas, e população natural).

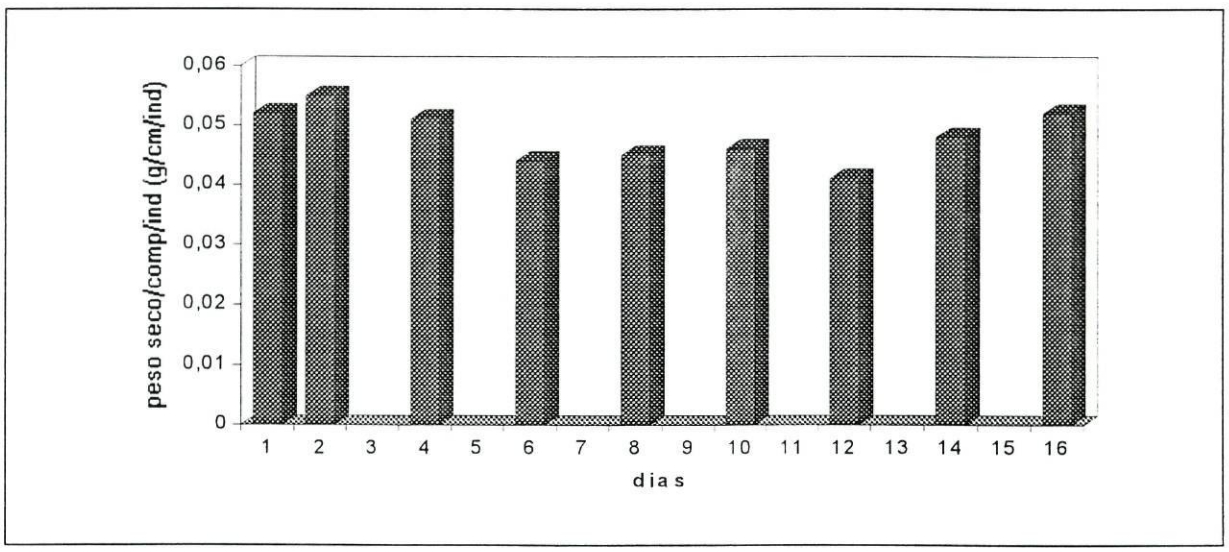


Figura 3.9 - Variação do peso seco/comprimento/indivíduo (g/cm/ind) de *Mytilus galloprovincialis* durante a experiência de acumulação de MCYST-LR.

Durante as dissecções foi possível observar que o aparelho digestivo dos exemplares de *Mytilus galloprovincialis* alimentados com *M. aeruginosa* se apresentava verde intenso.

detectando-se pequenos aglomerados de cianobactérias perfeitamente visíveis macroscopicamente.

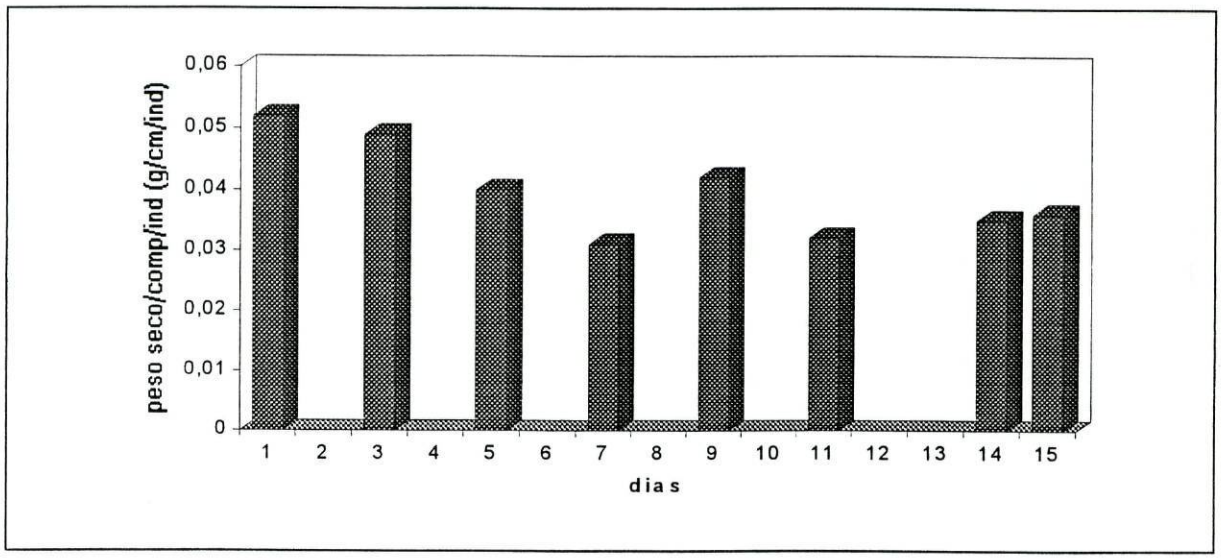


Figura 3.10 - Variação do peso seco/comprimento/indivíduo (g/cm/ind) de *Mytilus galloprovincialis* durante a experiência de depuração de MCYST-LR.

De registar que as diferenças entre os valores do peso seco/comprimento/indivíduo obtidas entre os exemplares de *Mytilus galloprovincialis* da experiência de acumulação e de depuração (tabelas 3.32 e 3.33) são significativas (teste t student, $p \leq 0,05$). Saliente-se ainda que os valores obtidos para este parâmetro na população natural são superiores aos de qualquer um dos tratamentos e que os valores para os dois grupos controlo, sem alimento e com microalgas marinhas são bastante semelhantes.

TABELA 3.34 - Valores médios de peso seco/comprimento/indivíduo (g/cm/ind) de *Mytilus galloprovincialis* durante as experiências de acumulação, depuração, controlo sem alimento, controlo com microalgas marinhas e população natural.

AMOSTRA	PESO SECO/ COMPRIMENTO/INDIVÍDUO (g/cm/ind)	Nº INDIVÍDUOS
Acumulação	0,053	171
Depuração	0,040	143
Controlo com microalgas marinhas	0,041	36
Controlo sem alimento	0,044	31
População natural	0,075	50

A regressão utilizada para o cálculo das concentrações de MCYST-LR extraídas de *M. aeruginosa* e de *Mytilus galloprovincialis* está representada na figura 3.11. A regressão foi feita entre valores da área do pico tóxico obtido na cromatografia (range 0,1) e a concentração real de MCYST-LR injectada (μg). A relação entre o valor de concentração de MCYST-LR e da área dos picos apresentou-se linear entre 1,5 e 8,0 μg MCYST-LR.

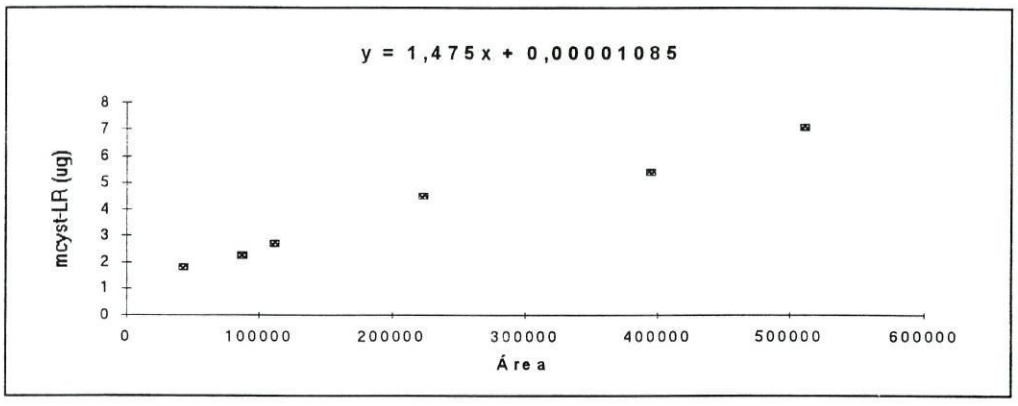


Figura 3.11 - Regressão entre a área de fracções de MCYST-LR injectadas no sistema de HPLC e a concentração da toxina (μg) (r = 0,98, n=6).

A quantidade de MCYST-LR administrada diariamente não foi sempre a mesma, apesar de o número total de células de *M. aeruginosa* fornecida se ter mantido constante (1×10^5 cél/ml). A quantidade média de MCYST-LR por célula foi de 28,32±13,67 μg/10^8 células, e a quantidade média administrada diariamente aos exemplares de *Mytilus galloprovincialis* foi de 153,00±73,79 μg. Os valores diários estão apresentados na figura 3.12 e tabela 3.35.

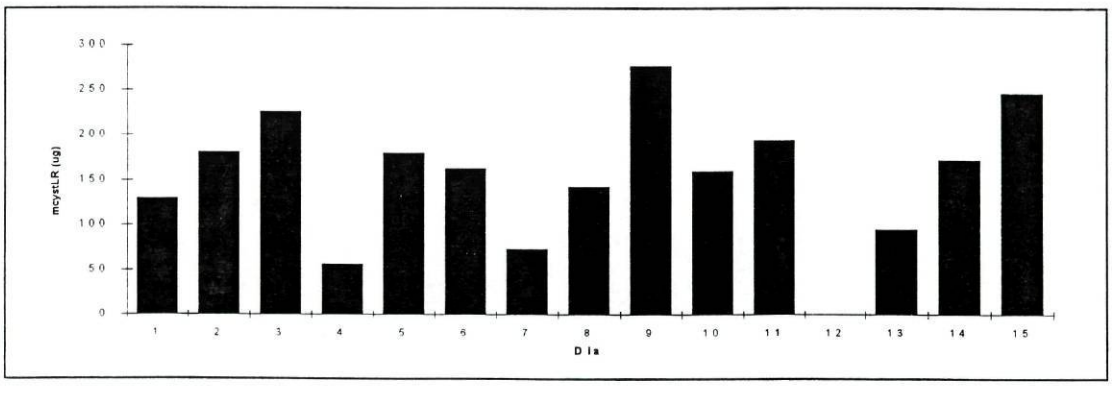


Figura 3.12 - Quantidade média de MCYST-LR (μg) administrada a *Mytilus galloprovincialis* durante a experiência de acumulação.

Tabela 3.35 - Quantidade média de MCYST-LR (μg/10^8 células) e quantidade administrada (μg) a *Mytilus galloprovincialis* durante a experiência de acumulação.

DIA DE CULTURA	MCYST-LR/10^8 CÉLULAS (μg)	MCYST-LR ADMINISTRADA (μg)
1	24,0	129,7
2	33,5	181,0
3	41,7	225,4
4	10,4	54,6
5	33,4	180,3
6	30,2	162,9
7	13,5	72,9
8	26,4	142,7
9	51,3	276,8
10	29,5	159,6
11	35,9	194,0
12	0,0	0,0
13	17,6	94,9
14	31,8	171,7
15	45,7	246,7

Nas figuras 3.13 e 3.14 apresenta-se os cromatogramas obtidos a partir dos extractos dos animais contaminados, durante as experiências de acumulação e de depuração. A toxina começou a ser detectada em *Mytilus galloprovincialis* a partir do dia 2 da experiência de acumulação (Fig. 14).

Na figura 3.15 e tabela 3.36 apresenta-se a variação dos valores de MCYST-LR acumulada por *Mytilus galloprovincialis* comparativamente aos valores máximos teoricamente acumuláveis. A acumulação processou-se de um modo bastante regular até ao dia 10, tendo decrescido ligeiramente do dia 10 para o dia 12. A partir deste dia até ao final da experiência, os níveis de MCYST-LR mantiveram-se bastante estáveis (fig. 3.15, tabela 3.36).

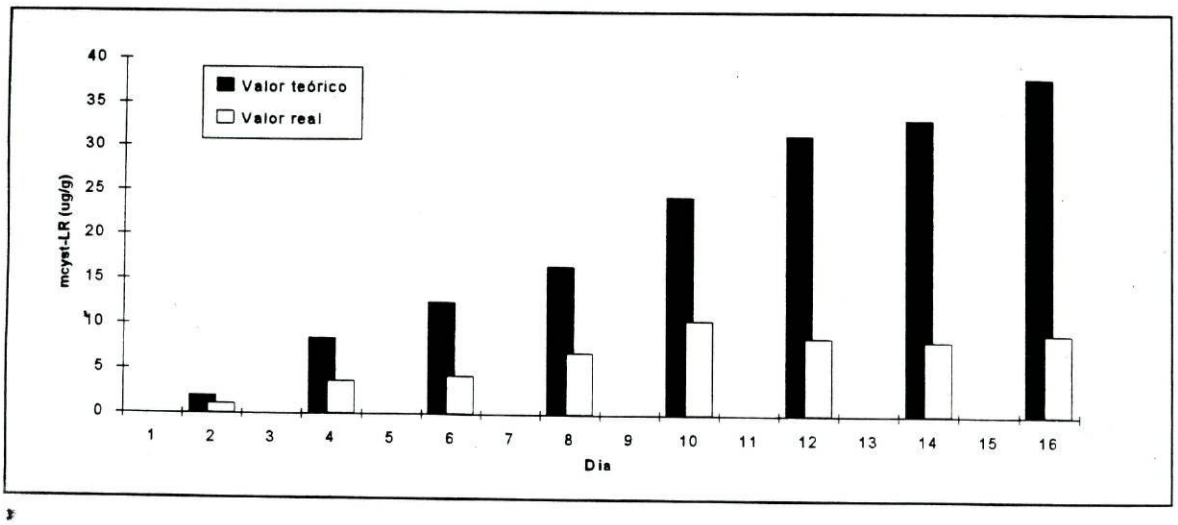


Figura 3.15- Variação dos valores de MCYST-LR (μg/g) acumulada por *M. galloprovincialis*, comparativamente ao valor máximo teórico acumulável.

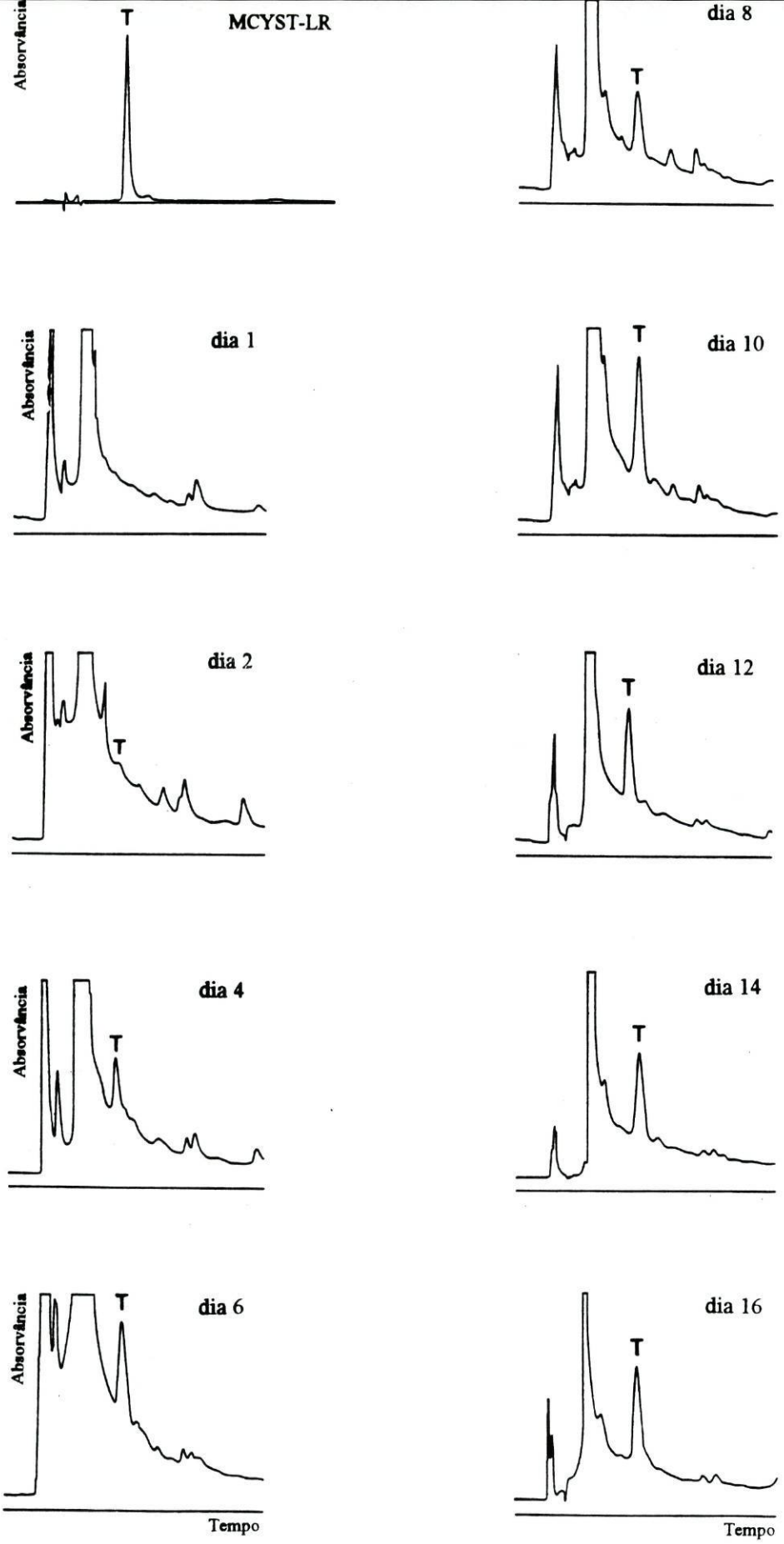


Figura 3.13 - Cromatogramas dos extractos de *M. galloprovincialis* durante a experiência de acumulação de MCYST-LR, e cromatograma de MCYST-LR pura; T - toxina (condições descritas em material e métodos).

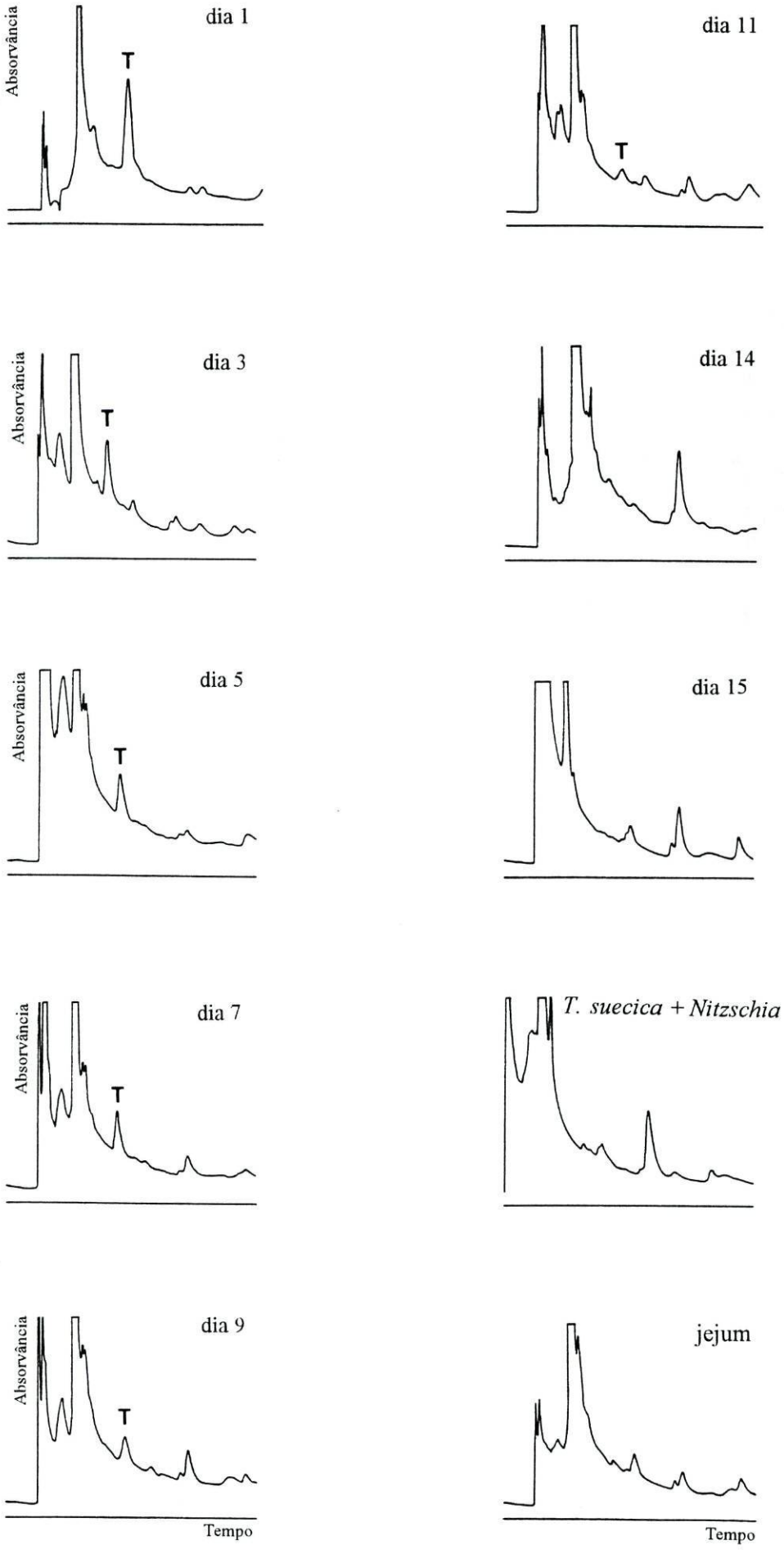


Figura 3.14 - Cromatogramas dos extractos de *M. galloprovincialis* durante a experiência de depuração de MCYST-LR; **T** - toxina (condições descritas em material e métodos).

A percentagem de toxina acumulada relativamente à que foi administrada variou entre 54,8% no dia 2 e 24,1% no dia 16. No dia 10 os exemplares de *M. galloprovincialis* acumularam 10,52 µg MCYST-LR/g peso seco.

A figura 3.16 e tabela 3.37 apresentam os valores relativos à variação da MCYST-LR durante a experiência de depuração. Quando os animais começaram a ser alimentados com a mistura de microalgas marinhas, verificou-se um decréscimo brusco de 50% da quantidade de toxina presente em *M. galloprovincialis*.

Tabela 3.36 - Valores reais e valores teóricos de MCYST-LR (µg/g) durante a experiência de acumulação.

DIA	MCYST-LR TEÓRICO (µg/g)	MCYST-LR REAL (µg/g)
1	0,00	0,00
2	1,97	1,08
4	8,44	3,69
6	12,39	4,30
8	16,54	6,93
10	24,32	10,52
12	31,28	8,65
14	33,26	8,34
16	37,92	9,15

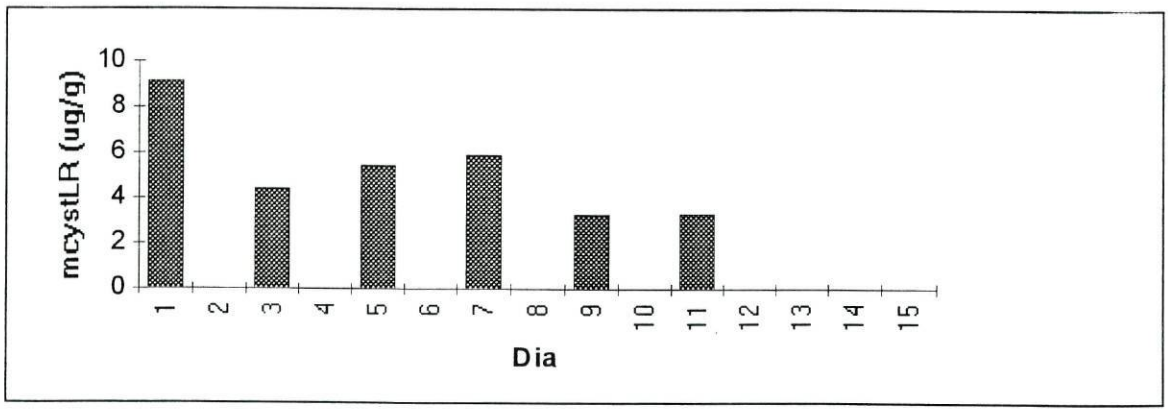


Figura 3.16 - Variação da quantidade de MCYST-LR (µg/g) em *M. galloprovincialis* durante a experiência de depuração.

Do dia 3 ao dia 7 houve um aumento inesperado da quantidade de toxina presente nos animais e a partir daí essa quantidade decresceu, tornando-se não detectável nos dias 14 e 15.

Tabela 3.37 - Valores de MCYST-LR (μg/g) em *M. galloprovincialis* relativos à experiência de depuração.

DIA	MCYST-LR (μg/g)
1	9,15
3	4,42
5	5,46
7	5,93
9	3,30
11	3,30
14	0,00
15	0,00

Tabela 3.38 - Peso seco (%) dos diferentes órgãos relativamente ao peso seco total, MCYST-LR acumulada nos diferentes órgãos (μg/g) e como percentagem de toxina por órgão de *M. galloprovincialis*.

ÓRGÃO	PESO SECO (%)	MCYST-LR (μG/G)	MCYST-LR (%)
PÉ	3,8	0,00	0,0
BRÂNQUIAS	21,9	0,29	1,0
MÚSCULOS	17,4	0,23	0,8
APARELHO DIGESTIVO	16,0	27,60	96,6
RESTO	40,9	0,46	1,6

Na tabela 3.38 apresentam-se os valores relativos à acumulação diferencial de MCYST-LR nos diferentes órgãos de *M. galloprovincialis*. Verificou-se que a maior parte da toxina se acumula no aparelho digestivo, enquanto que as brânquias, pé, músculos adutores e restantes órgãos acumulam menos de 4% da toxina total.

4. DISCUSSÃO

4.1. OCORRÊNCIA DE CIANOBACTÉRIAS EM ÁGUAS DOCES PORTUGUESAS. AVALIAÇÃO DA SUA TOXICIDADE. ISOLAMENTO E TOXICIDADE DE ESTIRPES DE *Microcystis aeruginosa*.

4.1.1. FLORESCÊNCIAS DE CIANOBACTÉRIAS. ESPÉCIES DOMINANTES E TOXICIDADE

Os trabalhos publicados até à data permitiam já avaliar o grau de eutrofização da maior parte das nossas massas de água doce, indicando que as cianobactérias eram abundantes nos rios Minho, Douro, Tejo e Guadiana (Oliveira, 1977; Branco, 1986a, 1986b; 1987a, 1987b; Cerqueira, 1987; Branco e Guimarães, 1988; Oliveira *et al.*, 1989; Silva, 1989; Galhano *et al.*, 1991; Andrade e Brito, 1993), em lagoas naturais do centro do país (Nauwerck, 1962; Vasconcelos, 1990b; Calado *et al.*, 1991; Vasconcelos e Barros, 1991; Barros *et al.*, 1993; Calado, 1993; Vasconcelos *et al.*, 1993; Barros, 1994), em albufeiras do Alentejo e Algarve (Oliveira, 1984a; 1984b; 1984c; Coutinho, 1990a; 1990b), bem como nalgumas lagoas dos Açores (Oliveira, 1989; Santos *et al.*, 1992; Rodrigues *et al.*, 1993; Vasconcelos *et al.*, 1994).

A densidade de cianobactérias totais, registada no presente estudo foi, nalguns casos, mais elevada que os valores referidos na literatura para as nossas massas de água. Convém, no entanto, salientar que algumas dessas amostras correspondiam a florescências concentradas nas margens, como foi o caso das amostras AG, M12, M13 e VB, obtidas respectivamente na albufeira da Aguieira, Lagoa de Mira e Açude de Vale das Bicas..

Em todas as massas de água estudadas foram encontradas cianobactérias, e apenas nas albufeiras de Vale do Gaio, de Odivelas, de Santa Clara e de Arade, foram obtidos valores baixos de percentagem das cianobactérias relativamente ao total da densidade fitoplanctónica. Estas albufeiras, excepto a de Vale do Gaio, não são consideradas eutróficas, embora em Santa Clara se tenha registado, noutros trabalhos (Oliveira, 1987), valores de densidade de cianobactérias superiores aos obtidos no presente estudo. Na maior parte das massas de água estudadas obtiveram-se valores de cianobactérias superiores a 80% da totalidade do fitoplâncton.

As primeiras referências à toxicidade de cianobactérias em águas doces portuguesas são, no entanto, recentes (Vasconcelos *et al.*, 1993; Amorim, 1994; Amorim *et al.*, 1994; Campos, 1994; Oliveira, 1994; Ferreira, 1995). Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que as cianobactérias tóxicas são comuns em águas doces portuguesas.

Os valores da percentagem de florescências tóxicas relativamente ao total de amostras analisadas - 60% - está de acordo com a maior parte dos valores referidos na literatura para outros países (Skulberg *et al.*, 1984; Pearson, 1990; Repavich *et al.*, 1990; Sivonen *et al.*, 1990a).

As espécies dominantes, quer nas florescências tóxicas quer nas não tóxicas são também as mais comummente referidas em estudos realizados noutros países. Tal como nas nossas

amostras, *Microcystis* é o género dominante em amostras de florescências na Grécia (Lanaras *et al.*, 1989) e no Japão (Watanabe *et al.*, 1986; Kaya e Watanabe, 1990; Shirai *et al.*, 1991). *Anabaena* e *Nodularia* são também, além dos géneros atrás referidos, bastante comuns nos países nórdicos (Sivonen *et al.*, 1990a; Sivonen *et al.*, em publicação) e na Austrália (Francis, 1878; Falconer *et al.*, 1992).

M. aeruginosa parece ser a espécie dominante em águas doces portuguesas, surgindo na maior parte dos registos bibliográficos sobre águas eutróficas em Portugal (Nauwerck, 1962; Oliveira, 1977; 1982b; 1984a, 1984c; Branco e Guimarães, 1988; Oliveira *et al.*, 1989; Silva, 1989; Coutinho, 1990a; Barros *et al.*, 1993; Calado, 1993; Vasconcelos *et al.*, 1993; Barros, 1994). Sob a designação de *M. aeruginosa* consideraram-se também as referências a *M. flos-aquae*, uma vez que a separação destas duas espécies é objecto de controvérsia. A utilização de uma característica morfológica das colónias, que é bastante variável, desaparecendo em culturas laboratoriais, não parece ser a mais adequada para a diferenciação.

M. wesenbergii surgiu em 20% das florescências, sendo co-dominante com *M. aeruginosa*, na florescência tóxica do rio Guadiana. Apesar de ser relativamente comum no presente estudo, tem sido pouco referida na literatura (Calado, 1993). É uma espécie muito comum em florescências tóxicas no Japão (Watanabe *et al.*, 1986).

An. flos-aquae surgiu em cerca de 35% das amostras colhidas, sendo, no entanto, a segunda espécie mais frequente nas amostras de florescências analisadas. Nas nossas águas é uma espécie comum quer em lagos naturais (Vasconcelos *et al.*, 1993), quer em albufeiras (Oliveira, 1982b; 1982c; 1984a, 1984b; Vasconcelos, 1990a; 1991).

An. Scheremetievi é uma espécie que surgiu com alguma frequência, nas amostras analisadas - 32% -, sendo dominante numa florescência na albufeira de Monte da Rocha, não apresentando, no entanto, toxicidade. Esta espécie, referida também em outras massas de água portuguesas (Nauwerck, 1962; Oliveira, 1982c; 1984a, 1984b, 1984c), não está descrita, até ao momento, como sendo produtora de toxinas.

An. spiroides não surgiu como dominante em nenhuma das florescências analisadas, embora tenha aparecido em 25% das amostras, mas com baixas densidades. Surge especialmente nas albufeiras do Alentejo (Oliveira, 1984a; 1984c; Coutinho, 1990a; 1990b), embora também possa ocorrer em locais do norte do país (Branco *et al.*, 1992).

Ap. flos-aquae surgiu em 25% das amostras de florescências, embora não tenha sido dominante em nenhuma florescência tóxica. É, no entanto, bastante referida em águas doces portuguesas, especialmente nas albufeiras do Alentejo (Oliveira, 1977; 1984a, 1984b, 1984c; Oliveira *et al.*, 1989; Silva, 1989; Coutinho, 1990a, 1990b) e nas lagoas dos Açores (Oliveira, 1989; Santos *et al.*, 1992; Rodrigues *et al.*, 1993; Vasconcelos *et al.*, 1993).

No que diz respeito à toxicidade - DL_{50} - das florescências estudadas, pode-se considerar que os valores são, em geral, mais elevados que os referidos por outros autores (Richard *et al.*, 1983; Watanabe *et al.*, 1986; Lanaras *et al.*, 1989).

O facto de apenas ter sido detectada hepatotoxicidade nas amostras analisadas poderá ser devido ao predomínio de espécies produtoras de hepatotoxinas. Mesmo nas florescências, muitas vezes dominadas por espécies frequentemente associadas à produção de neurotoxinas como *An. flos-aquae*, *An. spiroides ou Ap. flos-aquae*, só foi registada hepatotoxicidade. Embora *An. flos-aquae* possa produzir as neurotoxinas anatoxina-a e anatoxina-a(s) (Mahmood e Carmichael, 1987), pode também produzir microcistinas (Krishnamurthy *et al.*, 1986; Sivonen *et al.*, 1992a). Deste modo, as florescências tóxicas analisadas neste estudo, embora dominadas por esta espécie poderiam ser eventualmente constituídas maioritariamente por estirpes produtoras de microcistinas.

Analisando a situação das diferentes massas de água no que diz respeito à sua eutrofização, podemos salientar que, embora as albufeiras do Alentejo e Algarve sejam as massas de água mais eutróficas, os grandes rios ibéricos também parecem estar a evoluir nesse sentido.

O rio Minho, embora não possua barragens no troço internacional, tem as suas águas represadas em cinco barragens em território espanhol. É certamente nas respectivas albufeiras que as cianobactérias se desenvolvem durante o verão, sendo depois lançadas para jusante em grandes massas flutuantes, até que atingem o estuário. De facto, grandes densidades de cianobactérias foram inicialmente detectadas nos troços mais a montante (Monção, Valença), aumentando depois a sua densidade gradualmente para jusante, até ao estuário (Vasconcelos, dados não publicados). Valores obtidos em Outubro de 1989 e Maio de 1990 revelaram baixas densidades de cianobactérias em pontos do troço entre Melgaço e Valença, não atingindo 220 cél/ml (Cerqueira, 1991). As espécies de cianobactérias dominantes nessa altura foram *Ankistrodesmus acicularis, A. angustus, Merismopedia elegans* e *Oscillatoria limmosa* entre outras, todas elas não estando descritas como potenciais produtoras de toxinas.

A toxicidade das florescências no rio Minho variou bastante, registando-se ausência de toxicidade nas amostras de 1990 e 1991, sendo o valor de 1992 bastante elevado (DL_{50}=32,5 mg/kg). Tal variação pode ter sido devido, entre outros factores, ao facto de as amostras terem sido colhidas em diferentes locais do rio nos vários anos. Sabe-se que a toxicidade de uma florescência numa dada massa de água pode variar bastante quer com o tempo quer com o local de colheita (Carmichael e Gorham, 1981; Watanabe e Oishi, 1980; Lanaras *et al.*, 1989). Tal pode dever-se à influência que certos parâmetros ambientais, tais como a temperatura, a luz e os nutrientes exercem sobre a produção de toxinas (Van der Westhuizen e Eloff, 1985; Watanabe e Oishi, 1985; Codd e Poon, 1988; Sivonen, 1990; Lehtimäki *et al.*, 1994; Rapala *et al.*, 1994). Pode ainda ter-se dado o caso de as estirpes dominantes nas florescências colhidas em 1990 e 1991 não serem produtoras de toxinas.

Os dados obtidos até ao momento parecem indicar que a ocorrência de florescências de *Microcystis* no rio Minho é um fenómeno regular e bem localizado no tempo. Tal, poderá permitir uma adequada gestão daquela massa de água, no sentido de se evitar intoxicações humanas, uma vez que esta água é utilizada para consumo e recreio com contacto directo. Torna-

se ainda imperiosa a vigilância da qualidade dos moluscos colhidos no estuário do rio Minho, uma vez que as hepatotoxinas das cianobactérias podem ser acumuladas por moluscos, como foi já referido por Eriksson *et al.* (1989) e por Falconer *et al.* (1992), o que foi corroborado pelos resultados apresentados no presente trabalho.

O rio Tâmega (Albufeira do Torrão) apresentou uma florescência de toxicidade não muito elevada - 150 mg/kg -, embora, tal como foi dito para o caso do rio Minho, essa toxicidade possa variar muito ao longo do tempo. Este rio encontra-se eutrofizado desde Chaves (Cerqueira, 1991) e a albufeira do Torrão, embora recente, poderá contribuir para o agravamento desta situação se não for bem gerida. Tem-se verificado a produção de anoxia ao nível do fundo nesta albufeira (Branco *et al.*, 1991), o que poderá aumentar o nível de eutrofização através da libertação de grandes quantidades de fósforo para a coluna de água.

Em 1990 registou-se um aumento significativo na densidade de cianobactérias no rio Tâmega, de Abril a Setembro, atingindo-se valores cerca de 7000 vezes superiores neste último mês relativamente aos obtidos em Abril (Cerqueira, 1991). Registou-se uma florescência de *M. aeruginosa* e de espécies de *Anabaena* e *Oscillatoria*, com especial incidência no troço Chaves-Vidago, onde se atingiu um máximo de 1,5 x 10^6 cél/ml. Tal deveu-se a um período de seca prolongado que levou a um abaixamento do nível das águas e consequente estagnação. Nessa mesma altura, a região de Amarante, atingida pela albufeira do Torrão, apresentou valores de densidade de cianobactérias de 1,1 x 10^5 cél/ml (Cerqueira, 1991). Esta albufeira é considerada eutrófica, de acordo com os valores de TSI para a clorofila a (Branco *et al.*, 1992). O estado de eutrofização do rio Tâmega está assim claramente dependente das condições hidrológicas da sua bacia hidrográfica. Convém salientar o facto de que a sua água é utilizada para consumo.

O rio Douro apresenta-se eutrofizado em toda a sua extensão nacional, embora tal seja mais notório junto às barragens. A toxicidade das florescências neste rio variou bastante desde Junho a Setembro. O rio Douro apresentou um grau de eutrofização maior que o do Minho, além de que a ocorrência de florescências de cianobactérias não está tão localizada no tempo.

Têm-se encontrado densidades elevadas de cianobactérias ao longo do seu trajecto, quer na parte internacional (Branco, 1986a; Galhano *et al.*, 1991), quer no troço português (Branco, 1986a, 1986b; Branco e Guimarães, 1988; Branco, 1990).

A albufeira de Miranda do Douro é a que se situa mais a montante na parte internacional do rio Douro. É considerada eutrófica, tendo-se registado em 1989 e 1990, valores mínimos de profundidade de visão do disco de Secchi (DS) de 0,75 m, com anoxia no fundo (Branco *et al.*, 1991; Branco *et al.*, 1992). Uma situação semelhante é descrita para a albufeira do Picote, com valores mínimos de DS de 0,6 m e também anoxia no fundo. A albufeira de Bemposta apresentou em 1984 um valor máximo de cianobactérias de 2,5 x 10^4 cél/ml, com *M. aeruginosa*, *Anabaena* sp., *Aphanizomenon* sp. e *O. rubescens* como principais espécies (Branco, 1986a). Também é classificada como eutrófica, com valores de DS de 0,9 m em 1989 e 1990 (Branco *et al.*, 1991; Branco *et al.*, 1992). A albufeira do Pocinho apresentou níveis muito baixos de

oxigénio no fundo, e o DS atingiu um mínimo de 0,75 m, sendo também considerada como eutrófica (Branco *et al.*, 1992). Esta albufeira apresentou em Julho de 1990 uma florescência de *Merismopedia elegans* com 4,9 x 10^4 cél/ml (Branco *et al.*, 1991).

A albufeira de Crestuma, é a que se situa mais a jusante no rio Douro, foi construída em 1985, registando, dois anos após o seu primeiro enchimento, densidades elevadas - 2,7 x 10^4 cél/ml -de *M. aeruginosa* (Branco, 1987a). No ano seguinte, obtiveram-se valores máximos de cianobactérias de apenas 2,4 x 10^2 cél/ml, aumentando para 1,2 x 10^4 cél/ml em 1989 (Branco, 1990). Esta elevada densidade foi provocada essencialmente por uma florescência de *M. aeruginosa*, que se manteve de Setembro a Novembro, colapsando neste último mês provavelmente devido a alterações climáticas. Esta albufeira foi classificada como mesotrófica, apresentando geralmente uma percentagem de saturação de oxigénio até ao fundo da coluna de água de 50% e não ocorrendo estratificação térmica (Branco *et al.*, 1992).

A maior parte dos aglomerados habitacionais localizados nas margens do troço terminal do rio Douro utilizam água da albufeira de Crestuma-Lever para consumo, com especial ênfase para o Grande Porto, com cerca de 1.000.000 de consumidores. A captação é feita em profundidade, abaixo do sedimento, que actua assim como um filtro eficaz na retenção de bactérias, cianobactérias e algas.

As lagoas de Mira e de Quiaios representam ecossistemas dulciaquícolas naturais de grande importância especialmente por serem locais de nidificação e de invernia para centenas de aves aquáticas (Vasconcelos, 1990c). Por outro lado, são utilizadas como locais de lazer com contacto directo, especialmente durante a primavera e verão. Apenas a lagoa das Braças é utilizada como fonte de água para consumo. Das seis lagoas que compõem este conjunto, a lagoa e a barrinha de Mira e a lagoa das Braças são as mais eutrofizadas, registando-se florescências de cianobactérias desde os anos 60 (Nauwerck, 1962; Vasconcelos, 1990b; Vasconcelos e Barros, 1991; Calado, 1993; Barros, 1994).

Apesar de não terem sido registadas, no presente estudo, florescências tóxicas nas lagoas das Braças e da Vela, estas duas massas de água podem ser consideradas eutróficas, com base na abundância e diversidade de fitoplâncton, e, em especial, de cianobactérias (Nauwerck, 1962; Vasconcelos, 1990b; Barros *et al.*,1993; Calado, 1993; Barros, 1994). Nestas duas lagoas, as cianobactérias são o grupo dominante durante grande parte do ano, com *M. aeruginosa*, *Chroococcus turgidus*, *C. dispersus* e *Oscillatoria* spp. como principais espécies.

A lagoa das Braças pode apresentar elevadas densidades de cianobactérias, tendo-se atingindo 2,0 x10^4 cél/ml em Agosto de 1988 (Vasconcelos, 1990b) com *C. dispersus* e *M. aeruginosa* como principais espécies e 3,3 x10^5 cél/ml em Julho de 1992, com *M. aeruginosa* (Barros *et al.*, 1993). A existência de uma captação de água para a Figueira da Foz, e as alterações na pluviosidade fazem com que esta lagoa possa secar completamente durante o verão, levando a uma mais rápida degradação da qualidade da água.

A lagoa da Vela apresenta também uma dominância de cianobactérias no verão com densidades que atingiram 1,0 x10^4 cél/ml em Agosto de 1988 (Vasconcelos, 1990b), sendo *A. spiriliformis* e *Chroococcus* spp as principais espécies. Em 1993 as cianobactérias atingiram um máximo de 1,8 x 10^4 cél/ml com predomínio de *Chroococcus* spp, embora *M. aeruginosa* tenha sido também uma espécie comum (Barros, 1994).

A lagoa de Mira apresentou florescências dominadas por *M. aeruginosa* e *An. flos.aquae*, registando-se nos anos de 1991 e 1992 uma diminuição da toxicidade ao longo do tempo. Tal poderá indicar uma substituição de estirpes tóxicas por não tóxicas (Carmichael e Gorham, 1981), uma diminuição da produção de toxinas, por alteração das condições ambientais ou por envelhecimento das populações de cianobactérias e consequente libertação das toxinas para a água (Skulberg *et al.*, 1984; Van der Westhuizen e Eloff, 1985; Lehtimäki *et al.*, 1994; Rapala *et al.*, 1994).

A lagoa de Mira foi classificada como oligotrófica por Nauwerck (1962), embora tal tenha sido baseado em apenas uma amostra colhida no início da Primavera. No entanto, este autor descreveu 13 espécies de cianobactérias para esta lagoa, o que representa uma elevada diversidade. Só recentemente têm sido realizados estudos quantitativos, tendo-se obtido densidades elevadas durante os meses de verão, com florescências de *M. aeruginosa* e *An. flos-aquae* (Vasconcelos, 1990b; Vasconcelos e Barros, 1991). As cianobactérias parecem dominar geralmente a partir de Junho, mantendo-se com densidades elevadas até Novembro (Vasconcelos, 1990b; Barros *et al.*, 1993). As causas de eutrofização desta lagoa são essencialmente as escorrências de terrenos agrícolas, o lançamento de esgotos domésticos, e a pesca desportiva, através do uso descontrolado de engodos orgânicos para peixes.

A barrinha de Mira apresentou florescências dominadas por *M. aeruginosa*, *M. wesenbergii* e *An. flos-aquae*. Todas as amostras revelaram toxicidade variável e sem um padrão temporal definido. A elevada eutrofização desta lagoa conduziu à ocorrência de florescências desde inícios da Primavera. De facto, as cianobactérias parecem dominar o fitoplâncton desta lagoa praticamente durante todo o ano. Medidas que visam a melhoria da qualidade da água têm sido tomadas, nomeadamente através do esvaziamento total da lagoa e substituição por nova água. No entanto, têm sido esquecidos os sedimentos e os efluentes domésticos e agrícolas, bem como a pesca desportiva.

Na zona centro, a albufeira da Aguieira, encontra-se num estado de eutrofização avançado, especialmente no braço do rio Dão (Santa Comba Dão). As espécies de cianobactérias dominantes são *A. cylindrica*, *M. aeruginosa*, *G. lacustris*, *Merismopedia tenuissima* e *Raphidiopsis mediterranea* (Oliveira e Monteiro, 1992). Nas florescências analisadas no presente trabalho, *M. aeruginosa* foi a espécie dominante. Esta albufeira apresentou em 1992 valores máximos de cianobactérias de 5 x 10^5 cél/ml, tendo-se registado valores de cianobactérias de 1,2 x 10^5 cél/ml na água distribuída na rede pública de Santa Comba Dão, isto é, após tratamento (Oliveira e Monteiro, 1992).

A toxicidade registada nas duas amostras de florescências de cianobactérias analisadas foi elevada e manteve-se praticamente constante durante cerca de 3 semanas. O local de colheita destas amostras distava menos de 500 m do local de captação de água para Santa Comba Dão, a montante, e a igual distância do efluente da ETAR da mesma Vila, a jusante. É visível que o braço de Santa Comba Dão se apresenta mais eutrofizado que o resto da albufeira, registando-se valores de densidade de cianobactérias cerca de quatro vezes superiores aos obtidos junto à barragem (Oliveira e Monteiro, 1992).

Relativamente ao rio Guadiana, a amostra analisada apresentou *M. aeruginosa* e *M. wesenbergii* como espécies dominantes e uma toxicidade elevada. Foi no mesmo local em que foi colhida esta amostra que se registou em 1987 um episódio de intoxicação humana por consumo e contacto directo com água do rio Guadiana (Oliveira, 1991). Os sintomas registados nos indivíduos intoxicados, foram atribuídos a uma florescência de *Ap. flos-aquae*, embora não tenham sido realizados ensaios de toxicidade para confirmar tal hipótese. *M. aeruginosa* e *Pseudoanabaena catenata* foram encontradas com densidades elevadas em alguns pontos do rio Guadiana, nos meses de primavera, verão e outono de 1989 a 1991 (Andrade e Brito, 1993).

A florescência colhida em Mértola durante a realização deste trabalho estendia-se por todo o rio Guadiana até Serpa. Tal como no caso do rio Minho, a deslocação para jusante de toda esta massa de cianobactérias tóxicas, pode pôr em risco os consumidores de moluscos colhidos no estuário do Guadiana. É, assim, aconselhável efectuar uma vigilância da toxicidade dos moluscos bivalves comestíveis durante o período de verão, ou durante o período em que as cianobactérias forem dominantes e apresentarem toxicidade no rio Guadiana.

As albufeiras de Monte Novo e do Divor são utilizadas para armazenar água para consumo de localidades como Évora e Arraiolos. As florescências analisadas, foram dominadas por *M. aeruginosa* e *Anabaena* sp. e revelaram toxicidade apenas em Monte Novo, embora uma toxicidade relativamente baixa (DL_{50} = 700 mg/kg).

A albufeira do Divor é uma das albufeiras alentejanas melhor estudadas do ponto de vista fitoplanctónico, havendo registos de florescências de cianobactérias desde 1974 (Oliveira, 1984b). As espécies dominantes são *Ap. flos-aquae*, *M. aeruginosa* e *O. prolifica*, havendo episódios de mortandades de peixes, em cerca de 37% das florescências registadas (Oliveira, 1987). No entanto, não foram realizados ensaios de toxicidade, pelo que a morte dos peixes pode ter sido devido à desoxigenação da água, à produção de elevados níveis de amónia ou de outros produtos tóxicos resultantes da decomposição de proteínas (Ayles *et al.*, 1976; Jones *et al.*, 1982).

Na albufeira do Divor, fortemente eutrofizada devido ao lançamento de efluentes domésticos e agropecuários, e das lamas resultantes do tratamento da água na ETA (Oliveira, 1984b), o fósforo libertado do sedimento representa um papel essencial no aparecimento e manutenção das florescências de cianobactérias (Cabeçadas *et al.*, 1986). A sucessão de espécies

de cianobactérias nesta albufeira parece, no entanto, estar mais dependente das formas de azoto disponíveis (Oliveira, 1987).

A albufeira de Monte Novo registou em Junho e Julho de 1993 valores elevados de cianobactérias com um máximo de 1,7 $x10^4$ cél/ml, com *Ap. flos-aquae* e *M. aeruginosa* como espécies dominantes (Oliveira e Monteiro, 1993). Tal como no caso da albufeira da Aguieira, o tratamento na ETA não removia totalmente o fitoplâncton, encontrando-se valores máximos de cianobactérias de 5,8 x 10^2 cél/ml na água da rede pública (Oliveira e Monteiro, 1993).

O açude de Vale das Bicas é uma pequena albufeira utilizada para fins agrícolas, tendo-se registado uma florescência tóxica de *Nostoc* sp. e *M. aeruginosa*. *Nostoc* não é um género muito comum em florescências plantónicas embora possa produzir hepatotoxinas (Namikoshi *et al.*, 1990; Sivonen *et al.*,1990b).

A albufeira de Bravura é utilizada para rega e como fonte de abastecimento de água a Portimão, especialmente durante o período de verão. Apesar de ter sido classificada como oligotrófica durante 1972-75, com base na comunidade fitoplanctónica analisada (Oliveira, 1984a), parece ter evoluído no sentido da eutrofização. No trabalho de Oliveira (1984a) registaram-se espécies como *M. aeruginosa* e *Merismopedia punctata* e uma densidade total de cianobactérias de 67 cél/ml, o que é bastante inferior às 9340 cél/ml registadas no presente estudo. A florescência analisada nesta albufeira, foi dominada por *M. aeruginosa* e *An. spiroides*, e apesar de não apresentar uma densidade muito elevada, foi a que apresentou maior toxicidade, com uma DL_{50} de 20 mg/kg no presente estudo.

4.1.2. ESTIRPES DE *M. aeruginosa*

A toxicidade média das estirpes de *M. aeruginosa* isoladas a partir das massas de água doce portuguesas assemelha-se aos valores obtidos para esta espécie por outros autores (Oishi e Watanabe, 1986; Codd e Poon, 1988; Nakano *et al.*, 1989).

As dimensões médias das células das estirpes de *M. aeruginosa* variaram entre 3,2±0,4 e 13,6±1,3 μm, sendo, alguns dos valores, superiores aos referenciados por outros autores (Kato *et al.*, 1991; Komarék, 1991; Watanabe *et al.*, 1991). Os valores mais elevados devem-se essencialmente às estirpes isoladas a partir das albufeiras do Douro, que apresentam um valor médio do seu diâmetro celular significativamente superior ($p< 0,05$) ao das estirpes das lagoas. Não se registaram, contudo, diferenças significativas entre os valores médios dos diâmetros das estirpes tóxicas e não tóxicas. Kato *et al.* (1991) de acordo com as dimensões celulares definiram dois grupos de estirpes de *M. aeruginosa* que também possuíam diferente morfologia colonial. No entanto, estas estirpes não foram diferenciadas de acordo com o local de origem. A grande diversidade de dimensões das células de estirpes de *M. aeruginosa* pode associar-se a uma grande diversidade genética. De facto, enquanto que *M. wesenbergii* e *M. viridis* apresentam uma morfologia colonial estável, mesmo em cultura, sendo geneticamente monotípicas para algumas

morfologia colonial estável, mesmo em cultura, sendo geneticamente monotípicas para algumas aloenzimas, *M. aeruginosa* difere bastante destas espécies. É uma espécie altamente polimórfica, nomeadamente nas enzimas desidrogenase do isocitrato, desidrogenase da 6-fosfogluconato, isomerase do uosefosfato e fosfoglucomutase (Kato *et al.*, 1991).

As diferenças encontradas nas dimensões celulares médias entre estirpes de albufeiras e de lagoas são, neste momento, dificeis de explicar. Será necessário isolar um maior número de estirpes e realizar estudos a nível molecular que permitam encontrar diferenças genéticas significativas, bem como estudos laboratoriais que permitam identificar diferenças fisiológicas.

A análise dos resultados dos bioensaios com as estirpes de *M. aeruginosa* e com as florescências tóxicas permite distinguir os valores obtidos em ambas as situações. De facto, verificou-se uma amplitude entre 25 e mais de 250 minutos relativamente aos tempos de sobrevivência de murganhos injectados com doses letais de extractos de cianobactérias. No entanto, os valores médios do tempo de sobrevivência são significativamente mais baixos para as estirpes que para a florescências ($p< 0,001$). Tal poderá estar dependente do facto de as estirpes apresentarem, de um modo geral, maior toxicidade. Por outro lado, a biomassa das florescências não é unicamente composta por cianobactérias, podendo incluir algas e detritos. As diferenças registadas nos tempos de sobrevivência podem ser as razões para as diferenças observadas na variação da percentagem do peso do figado relativamente ao peso total dos murganhos. A maior toxicidade implica uma morte mais rápida, o que conduz a uma menor afluência e acumulação de sangue no figado.

Falconer *et al.* (1981) mostraram que, em murganhos injectados intraperitonealmente com extractos de *M. aeruginosa* tóxica, ocorria um aumento gradual do peso do figado ao longo do tempo. Ao fim de 15 minutos o valor era de 5,6%, e de 7,0% ao fim de 45 minutos, enquanto que nos animais controlo esse valor era de 4,3 %. Estes valores eram acompanhados por aumentos similares dos níveis de aspartato aminotransferase no soro, o que demontrava ruptura celular. Resultados semelhantes foram obtidos por Runnegar e Falconer (1982) que, após 46-60 minutos, verificaram um aumento de cerca de 63% do peso do figado em animais injectados com *M. aeruginosa*. Estes autores, utilizando hepatócitos isolados de ratos, mostraram que a percentagem de células deformadas era proporcional à concentração de toxina no meio de cultura, ocorrendo deformação em 99±0,1% das células para uma concentração de toxina de 0,1 μg/ml. As alterações eram visíveis dentro de 5 minutos após administração das células (Runnegar e Falconer, 1982).

O presente estudo mostra claramente que as cianobactérias tóxicas podem ser uma fonte de risco para a saúde pública em águas doces portuguesas destinadas a consumo e a recreio. A existência de elevada hepatotoxicidade nas florescências de cianobactérias analisadas é um factor a considerar aquando do tratamento dessas águas para consumo. O consumo de água com elevados níveis de hepatotoxinas pode induzir alterações agudas ou crónicas (Bourke *et al.*, 1983;

Falconer *et al.*, 1983; Falconer, 1989). A produção de tumores hepáticos parece também ser induzida pelo consumo de hepatotoxinas (Yu, 1989; 1994; Carmichael, 1994).

Um outro aspecto a considerar é o facto de os tratamentos vulgarmente efectuados nas ETA's não serem eficazes na remoção total do fitoplâncton (Oliveira e Monteiro, 1992; 1993). Além disso, as toxinas não são removidas nesses mesmos tratamentos, necessitando de se utilizar carvão activado ou ozono para eficazmente eliminar esse risco (Falconer *et al.*, 1983b; Keijola *et al.*, 1988; Falconer *et al.*, 1989).

O estudo da situação de eutrofização das massas de água, conjuntamente com um programa de vigilância da água bruta desde a sua captação até à rede de distribuição ao domicílio, devem ser implementados, nos locais de maior risco.

4.2. EXTRACÇÃO, ISOLAMENTO, PURIFICAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E PESO MOLECULAR DE MICROCISTINAS

4.2.1. ESTIRPES DE *M. aeruginosa*

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir, no que diz respeito às estirpes isoladas a partir de 8 ecossistemas aquáticos diferentes, lagos naturais e albufeiras do norte e centro do país, que a microcistina mais comum foi a MCYST-LR. Esta microcistina foi isolada em todas as estirpes nas quais foi dominante, considerando aquelas cujas toxinas foram identificadas. Seguem-se, por ordem decrescente de importância, a MCYST-LA que ocorreu em metade das estirpes, seguindo-se MCYST-[D-Asp^3]-LR, MCYST-YR, MCYST-AR e MCYST-RR.

Embora as estirpes de *M. aeruginosa* analisadas no presente estudo tenham capacidade de produzir até 4 microcistinas diferentes, *Microcystis* pode produzir até oito toxinas diferentes. No entanto, uma delas representa geralmente mais de 50% do conteúdo total em microcistinas de uma estirpe (Luukkainen et al., 1994). Como algumas destas microcistinas menores constituem uma percentagem muito pequena do total, poderão não ser detectadas quando utilizamos quantidades pequenas de material liofilizado para a extracção e análise. Algumas das amostras que usamos pesavam menos de um grama, e talvez por isso se tenha isolado poucas microcistinas em algumas estirpes.

No presente trabalho, MCYST-LR foi a microcistina dominante em todas as estirpes cujas toxinas foram identificadas, embora estas representem apenas locais do norte e centro do País.

De salientar ainda que esta é o isolamento de MCYST-AR, corresponde à 2ª referência a esta toxina, já que se sabe ter ocorrido numa florescência natural de *Microcystis* spp. nos Estados Unidos da América em Homer lake, Illinois (Namikoshi *et al.*, 1992a). A estirpe

IZANCYA5 é assim a primeira estirpe isolada a produzir esta microcistina que possui uma DL_{50} de 250 μg/kg (Namikoshi *et al.*, 1992a), e apresenta como aminoácidos variáveis a alanina e a arginina.

A MCYST-RR possui uma DL_{50} de 600 μg/kg (Watanabe *et al.*, 1988), sendo das hepatotoxinas menos tóxicas. Possui duas moléculas de arginina como aminoácidos variáveis. A MCYST-YR tem um DL_{50} de 70 μg/kg (Watanabe et al., 1988) e a MCYST-LA uma DL_{50} de 50 μg/kg (Botes *et al.*, 1982), sendo de toxicidade semelhante à MCYST-LR. A [D-Asp^3] MCYST-LR tem uma toxicidade igual à da sua forma metilada (Krishnamurthy *et al.*, 1986).

A percentagem de MCYST-LR relativamente ao total das microcistinas foi superior a 50%, excepto no caso da estirpe IZANCYA25 em que representou apenas 44,1%. Outro facto a salientar é a ocorrência de MCYST-LA em 50% das estirpes analisadas cujas toxinas foram identificadas. Além disso, todas estas estirpes foram isoladas das lagoas e só em uma das estirpes destes ecossistemas - IZANCYA7 - não foi detectada MCYST-LA. Por outro lado, MCYST-YR, que surgiu em 20% das estirpes, ocorreu apenas nas estirpes das albufeiras.

As diferenças entre as estirpes das lagoas e das albufeiras parecem não se confinar a diferenças morfológicas e merísticas, podendo também ser eventualmente genéticas. Estas diferenças poderão ser o resultado de uma selecção natural, mas apenas um estudo mais alargado em número de amostras e em técnicas envolvidas poderá confirmar ou negar esta hipótese. O uso de modernos métodos biológicos como electroforese e focagem isoleléctrica poderá conduzir à obtenção de mais dados que permitam diferenciar as estirpes e estudar a sua origem. No entanto, a análise de parâmetros físicos e químicos da água, bem como de alguns factores biológicos, poderão também contribuir para o estudo destas diferenças e da sua manutenção.

As concentrações de microcistinas nas estirpes de *M. aeruginosa* liofilizadas, que variaram entre 2,1 e 11,3 μg/mg, são elevadas, embora comparáveis com alguns valores obtidos na literatura (Watanabe et al., 1989b; Kaya e Watanabe, 1990).

4.2.2. FLORESCÊNCIAS DE CIANOBACTÉRIAS

No que diz respeito às microcistinas isoladas a partir das florescências, verifica-se que as amostras continham de duas a sete microcistinas diferentes. No entanto, não se registou uma correlação significativa entre a biomassa utilizada para a extracção e o número total de diferentes microcistinas isoladas. Da extracção de 23,7 g da florescência da albufeira do Carrapatelo, resultaram quatro microcistinas, enquanto que o mesmo número de toxinas foi isolada a partir da amostra do Minho com cerca de 10 vezes menos biomassa. A única excepção a esta tendência foi a amostra colhida na albufeira da Aguieira, tendo-se isolado sete microcistinas de 27,0 g de material liofilizado. Namikoshi *et al.* (1992b) isolaram apenas duas microcistinas de 200,0 g de uma florescência com *M. aeruginosa* e *Ap. flos-aquae*, enquanto que em outro estudo isolaram

12 toxinas de 240,0 g de uma florescência de *Microcystis* spp. (Namiskohi *et al.*, 1992a). O número de toxinas numa amostra de florescência natural de cianobactérias estará certamente dependente da existência de diferentes estirpes de cianobactérias produtoras de diferentes toxinas.

Da análise das microcistinas presentes nas florescências registou-se que MCYST-LR é novamente dominante, ocorrendo em todas as amostras cujas microcistinas foram identificadas. A sua proporção relativamente ao total de microcistinas variou entre 45,5% e 99,8%. MCYST-YR, MCYST-RR e [D-Asp^3]MCYST-LR co-ocorreram em algumas das amostras. A florescência da albufeira da Aguieira continha ainda três outras microcistinas, MCYST-HilR, [Dha^7]MCYST-LR e [L-MeSer^7]MCYST-LR.

Destas toxinas, [Dha^7]MCYST-LR foi já descrita para o Japão (Harada *et al.*, 1991a), Finlândia (Sivonen *et al.*, 1992d), Rússia (Sivonen *et al.*, 1992b) e EUA (Rinehart *et al.*, 1994). Foi isolada de estirpes de *Microcystis*, *Anabaena* e *Oscillatoria* e de florescências naturais, tendo uma DL_{50} de 250 μg/kg (Namikoshi *et al.*, 1992c).

MCYST-HilR difere de MCYST-LR apenas num aminoácido, possuindo isoleucina em vez de leucina. Foi descrita anteriormente apenas numa florescência de Homer lake, Illinois, possuindo uma DL_{50} de 100 μg/kg (Namikoshi *et al.*, 1994).

[L-MeSer^7]MCYST-LR tem *N*-metilserina em vez de dehidroalanina, possuindo uma DL_{50} de 150 μg/kg. Também foi apenas descrita para a florescência de Homer lake, Illinois (Namikoshi *et al.*, 1992a).

Nas florescências analisadas neste trabalho, e um pouco ao contrário do que acontecia com as estirpes isoladas de *Microcystis*, não parece ocorrer uma dominância tão nítida de apenas uma microcistina. Tal poderá ser devido à coexistência de várias estirpes de cianobactérias que podem produzir diferentes microcistinas como toxinas principais.

Um aspecto a salientar é o facto de todas as microcistinas isoladas da florescência da albufeira da Aguieira terem sido também detectadas na florescência de Homer lake, Illinois (Namikoshi *et al.*, 1992a, Namikoshi *et al.*, 1994). De facto, duas das microcistinas menos comuns até agora descritas, MCYST-HilR e [L-MeSer^7]MCYST-LR foram descritas apenas para a florescência de Illinois. Embora não existam muitos estudos sistemáticos que nos permitam afirmar que existem tendências geográficas na distribuição das microcistinas, tal parece ser sugerido pelos dados, uma vez que Portugal e Illinois estão localizados a latitudes semelhantes, entre 37° e 42° N.

A amostra colhida no açude de Vale das Bicas, composta por uma florescência dominada por *Nostoc* sp. (96%), continha um perfil de microcistinas muito semelhante ao registado em florescências de *Microcystis*, com MCYST-LR e MCYST-RR. Existem poucos registos sobre toxinas de *Nostoc*, sabendo-se, no entanto, que este género produz microcistinas com variações no aminoácido Adda. As hepatotoxinas isoladas da estirpe de *Nostoc* sp. 152 continham, entre outras variações, ácido 9-acetoxi-3-amino-2,6,8-trimetil-10-fenil-4,6-

decadienoico em vez do derivativo 9-metoxil encontrado nas microcistinas mais comuns (Sivonen *et al.*, 1990b, Namikoshi *et al.*, 1990).

A MCYST-YR, codominante com a MCYST-LR nas florescências de cianobactérias nas lagoas de Mira e Quiaios, não surgiu nas estirpes de *M. aeruginosa* isoladas destas mesmas lagoas, sendo neste caso codominante a MCYST-LA. Tal diferença pode ser devida ao facto de as estirpes terem sido isoladas em 1991, enquanto que as florescências analisadas foram de 1992, e por, isso, poderiam dominar estirpes diferentes. Por outro lado, enquanto que as estirpes estudadas são de *M. aeruginosa*, as florescências tóxicas foram dominadas por *An. flos-aquae*, que também pode produzir MCYST-YR.

Embora não existam muitos estudos sistemáticos sobre a distribuição das microcistinas em águas naturais, a MCYST-LR é a forma mais citada na literatura (Botes *et al.*, 1985; Carmichael, 1988; Carmichael *et al.*, 1988; Watanabe *et al.*, 1988; Krishnamurthy *et al.*, 1989; Sivonen *et al.*, 1992c; 1992d; Azevedo *et al.*, 1994; Luukkainen *et al.*, 1994). Este facto poderá estar relacionado com a circunstância de ser um dos poucos padrões acessíveis comercialmente e de ter sido a primeira microcistina a ser descrita e sobre a qual existem mais trabalhos laboratoriais.

Os estudos sistemáticos sobre a distribuição de microcistinas em água doces até agora efectuados são relativos à Finlândia e ao Japão. No primeiro caso verifica-se que as toxinas mais comuns são a MCYST-LR, a MCYST-RR e variantes desmetiladas destas formas (Sivonen *et al.*, em publicação). A desmetilação pode ocorrer ao nível dos aminoácidos 3, 6 e/ou 7 (Kiviranta *et al.*, 1992; Namikoshi *et al.*, 1992b; Namikoshi 1992c; 1992d; Sivonen *et al.*, 1992b; 1992d; Luukkainen *et al.*, 1993; Luukkainen *et al.*, 1994). A ocorrência destas formas desmetiladas de microcistinas é também comum noutros países do norte da Europa tais como a Noruega (Meriluoto et al.,1989; Luukkainen et al., 1994) e a Rússia (Sivonen et al., 1992c) bem como o Canadá (Krishnamurthy et al., 1989; Harada et al., 1991b).

No Japão, as principais microcistinas são a MCYST-LR, MCYST-RR e MCYST-RR (Kusumi *et al.*, 1987; Watanabe *et al.*, 1988; Ooi *et al.*, 1989; Kaya & Watanabe, 1990; Shirai *et al.*, 1991), ocorrendo algumas formas desmetiladas com importância muito menor (Harada *et al.*, 1990; Harada *et al.*, 1991a; Shirai *et al.*, 1991).

Nas tabelas 4.1. a 4.3. apresenta-se dados relativos à distribuição geográfica das microcistinas descritas até ao momento.

Os valores de concentração total de microcistinas obtidos para as florecências de cianobactérias variaram entre 1,0 e 7,1 μg/mg. Tais valores são superiores aos comummente encontrados em outras referências (Watanabe *et al.*, 1989; Kaya e Watanabe, 1990).

No que diz respeito à concentração de microcistinas nas estirpes e nas amostras das florescências verifica-se que os valores encontrados são elevados. Embora os valores obtidos em laboratório para as estirpes reflictam condições ideais de crescimento, verifica-se que os valores reais obtidos em situações naturais, são muito próximos daqueles, o que faz com os utilizadores

das massas de água contaminadas possam correr o risco de contactar, ou mesmo consumir, grandes quantidades de toxinas.

Tabela 4.1.- Microcistinas identificadas em amostras de cianobactérias (estirpes isoladas ou florescências) em todo o mundo. (Modificações que ocorrem nos aminoácidos 2 e/ou 6) * Presente trabalho.

Toxina / País	Finlândia	Japão	EUA	África do Sul	Canadá	China	Reino Unido	Noruega	Brasil	Austrália	Portugal *
MCYST-LR	X	X	X	X	X	X	X	X	X		X
MCYST-RR	X	X	X			X					X
MCYST-YR	X	X	X	X				X			X
MCYST-LA			X	X							X
MCYST-YA				X							
MCYST-YM(O)										X	
MCYST-FR			X	X							
MCYST-LAba				X							
MCYST-LY			X								
MCYST-HtyR					X						
MCYST-AR			X								X
MCYST-M(O)R			X								
MCYST-WR			X								
MCYST-HilR			X								X
MCYST-(H4)YR			X								
MCYST-LF									X		

Tabela 4.2. - Microcistinas identificadas em amostras de cianobactérias (estirpes isoladas ou florescências) em todo o mundo. (Modificações -desmetilações- que ocorrem nos aminoácidos 3 e/ou 7) * Presente trabalho

toxina / País	Finlândia	Japão	EUA	África do Sul	Canadá	Noruega	Rússia	Portugal *
(Dha7)MCYST-LR	X	X	X			X	X	X
(Dha7)MCYST-YR	X						X	
(D-Asp3, Dha7)-MCYST-LR	X					X	X	
(Dha7)-MCYST-RR	X	X					X	
(D-Asp3, Dha7)-MCYST-RR	X					X	X	
(D-Asp3)-MCYST-RR	X					X		
(D-Asp3)-MCYST-YR	X							
(Dha7)-MCYST-FR	X							
(D-Asp3)-MCYST-LR	X	X	X		X	X		X
(D-Asp3)-MCYST-HtyR					X			
(Dha7)-MCYST-HtyR	X							
(Dha7)-MCYST-HphR	X							
(Dasp3, Dha7)-MCYST-HtyR	X							

Tabela 4.3. - Microcistinas identificadas em amostras de cianobactérias (estirpes isoladas ou florescências) em todo o mundo. (Modificações que ocorrem nos aminoácidos 1,3,5 e/ou 7) * Presente trabalho

Pais / toxina	Finlândia	Japão	EUA	Noruega	Brasil	Portugal *
(L-ser7)-MCYST-RR	X					
(D-Glu-OC2H3(CH3)OH6)-MCYST-LR			X			
(D-Glu-OCH36)-MCYST-LR				X	X	
(D-Asp3, D-Glu-OCH36)-MCYST-LR				X		
(L-MeSer7)-MCYST-LR			X			X
(L-Ser7)-MCYST-LR	X					
(L-Ser7)-MCYST-HtyR	X					
(L-MeLan7)-MCYST-LR			X			
(D-Asp3, MeSer7)-MCYST-RR	X					
((6Z)-Adda5)-MCYST-LR		X	X			
((6Z)-Adda5)-MCYST-RR		X				
(DMAdda5)-MCYST-LR	X		X			
(ADMAdda5)-MCYST-LR	X					
(ADMAdda5)-MCYST-LHar	X					
(D-Asp3, ADMAdda5)-MCYST-LR	X					
(D-Asp3, ADMAdda5)-MCYST-LHar	X					
(ADMAdda5, MeSer7)-MCYST-LR	X					
(D-Ser1, ADMAdda5)-MCYST-LR	X					

4.3. AVALIAÇÃO DA BIOACUMULAÇÃO E DA DEPURAÇÃO DE MICROCISTINA-LR POR *MYTILUS GALLOPROVINCIALIS* LAMARCK

A mortalidade dos mexilhões foi bastante baixa durante a experiência de acumulação - 0,45% - embora tenha aumentado um pouco durante a depuração - 6,33%. Os animais não reagiram imediatamente às toxinas, embora alguns pareçam ser irreversivelmente afectados por elas, acabando por morrer.

Falconer *et al.* (1992) não referem dados sobre mortalidade em populações de *M. edulis* durante a ocorrência de florescência tóxicas de *N. spumigena*. Por outro lado, Eriksson *et al.* (1989) referem que os mexilhões-de-água-doce intoxicados com *Oscillatoria* não parecem ter sido afectados pelas toxinas durante uma experiência de 12 dias. No entanto, nada é referido sobre a sobrevivência desses moluscos após o final da experiência. Experiências similares efectuadas com moluscos e dinoflagelados tóxicos demonstram que a mortalidade dos moluscos depende do tempo após a exposição às toxinas (Lesser & Shummway, 1993), da espécie de dinoflagelado (Luckenbach *et al.*, 1993), da idade dos bivalves, bem como da história dos bivalves antes da exposição. Shummway & Cucci (1987) referem que populações de bivalves de áreas sujeitas regularmente a marés vermelhas tóxicas podem adquirir resistência à presença das

células tóxicas. Outros parâmetros que revelam alterações fisiológicas tais como o consumo de oxigénio, podem apresentar o mesmo padrão de variação, revelando que as exposições de curta duração não afectam estes mecanismos de uma forma significativa.

As diferenças relativas ao peso seco/ind/cm entre os diferentes tratamentos são notórias, especialmente entre a população natural e os indivíduos utilizados na experiência. O facto de se ter alimentado os animais apenas uma vez por dia e com densidades elevadas de fitoplâncton originou uma menor ingestão de matéria orgânica e, consequentemente, o balanço energia ingerida/energia utilizada foi negativo, levando a um decréscimo do peso seco individual. A maior mortalidade registada durante a fase de depuração foi acompanhada pelo menor valor de peso seco individual dos organismos durante esta fase.

De facto, a MCYST-LR teve efeitos negativos sobre os mexilhões, uma vez que levou a uma maior mortalidade e a um valor menor de peso seco individual, quando comparados com os mesmos valores dos indivíduos em jejum. Durante o jejum, os mexilhões utilizam as reservas de energia sob a forma de hidratos de carbono e lípidos, e só mais tarde as proteínas (Bayne, 1973).

O comportamento dos animais durante a experiência de acumulação foi normal. Os animais filtraram as cianobactérias a uma velocidade relativamente rápida, produzindo pseudofezes cerca de 10 a 20 minutos após a administração do alimento. Schulte (1975) e Bricelj *et al.* (1990) referem que a produção de pseudofezes ocorre geralmente para densidades celulares superiores a 4×10^4 células/ml, registando ainda um decréscimo das taxas de filtração. A produção de pseudofezes pode ser extremamente rápida, tendo-se observado que para densidades de $6{,}8 \times 10^4$ cel/min os mexilhões podem demorar apenas 1 minuto a expelir as primeiras pseudofezes. Valores limite para a produção de pseudofezes por outros autores, obtidos com células fitoplanctónicas de dimensões semelhantes (3-10 μm) às de *Microcystis* e indicados por outros autores (Loosanoff & Engle, 1947; Davids, 1964; Stickney, 1964; Winter, 1969), variam entre 3 e 45×10^4 cel/ml.

As elevadas densidades fitoplanctónicas que levam à produção de pseudofezes são também responsáveis pela diminuição das taxas de filtração. Tal fenómeno implica uma menor possibilidade de acumulação de microcistinas relativamente a situações em que a densidade fitoplanctónica é menor. A quantidade de toxina produzida por uma célula depende de factores ambientais tais como a concentração de nutrientes, a intensidade e duração da luz e a temperatura (van der Westhuizen & Eloff, 1985; Watanabe & Oishi, 1985; Sivonen, 1990), pelo que a concentração das toxinas nas células deve variar numa cultura "batch". Esta foi, provavelmente, a razão pela qual a concentração de toxina variou nas culturas usadas para a experiência de acumulação. No entanto, tal acontece também em ambientes naturais. Neste trabalho (cap. 2) verificou-se haver diferenças de toxicidade em amostras colhidas na lagoa de Mira durante Junho de 1992. Também Carmichael & Gorham (1981) referem que a toxicidade pode variar espacialmente num dado lago ao longo de um mesmo dia. Por isso, a situação apresentada neste trabalho, não se afastará muito do que pode ocorrer em ambientes naturais.

A flutuação dos valores de MCYST-LR acumulada pelos mexilhões não segue de perto as concentrações teóricas máximas, calculadas com base na quantidade diária de MCYST-LR administrada dividida pelo número de mexilhões presentes em cada tanque. Estes valores representam, o máximo possível de toxina presente nos animais. No entanto, devemos considerar que nem toda a toxina fornecida é acumulada, uma vez que parte pode ser rejeitada nas fezes e pseudofezes, outra parte pode ficar ligada irreversivelmente às fosfatases proteicas e outra parte pode ser metabolizada. A fracção que é medida corresponde aquela que não está firmemente ligada às fosfatases proteicas ou que está presente no aparelho digestivo dos mexilhões. MacKintosh *et al.* (1990) revelaram que MCYST-LR é um potente inibidor das fosfatases proteicas 1 e 2A de células eucarióticas, mostrando que a ligação entre a MCYST-LR e PP1 e PP2A é muito forte. Honkanen *et al.* (1990) também sugeriram que há uma interacção muito forte entre a MCYST-LR e a subunidade catalítica da MCYST-LR. Estes factos parecem representar um problema quando se pretende quantificar MCYST-LR em tecidos animais. O decréscimo da concentração de MCYST-LR nos mexilhões após o dia 10 pode estar ligado ao facto de a quantidade de toxina fornecida após esse período ser muito menor do que a ministrada no dia anterior. Houve um ligeiro acréscimo no dia final desta experiência resultando provavelmente do fornecimento de uma dose maior de MCYST-LR dada no dia anterior. Os mexilhões parecem responder muito rapidamente a alterações na concentração de MCYST-LR nas células de *Microcystis*. A acumulação rápida de toxinas por mexilhões é também referida por Bricelj *et al.* (1990) em experiências em que utilizaram *M. edulis* e o dinoflagelado tóxico *Alexandrium fundyense*. Estes autores mostraram que em menos de 1 hora os mexilhões podem incorporar cerca de 80 µg STXeq /100 g mexilhão, o que é superior ao limite máximo de toxina permitido para consumo humano.

O decréscimo da percentagem de toxina acumulada relativamente à administrada ao longo do tempo pode ser devido a diversos factores. Parte desta diminuição prende-se com o facto de que o valor teórico não toma em linha de conta a toxina perdida nas fezes e pseudofezes, que são produzidas regularmente pelos mexilhões. Esta percentagem aumentou um pouco no dia 10, quando a quantidade de MCYST-LR presente na mesma quantidade de células de *Microcystis* foi mais elevada que a média. Se os mexilhões filtrarem a mesma quantidade de células que nos outros dias, provavelmente acumularão mais toxina. Bardouil *et al.* (1993) estudando o efeito de dietas algais tóxicas em ostras verificaram que 13 a 40% das algas colocadas à disposição das ostras são expelidas como pseudofezes, sendo o resto ingerido, embora a taxa de produção das pseudofezes seja dependente da concentração algal no meio.

O ponto de saturação é de 11 µg MCYST-LR/g para as condições desta experiência. Lindholm *et al.* (1989) mostraram que *Anodonta* exposta a água rica em *Oscillatoria* proveniente do lago Östra acumularam 30 µg/g após uma semana de exposição. Eriksson *et al.* (1989) apresentam valores superiores para a acumulação de uma hepatotoxina de *Oscillatoria* em *Anodonta*, mas devemos ter em conta que estes moluscos são maiores e que os mecanismos de

fornecimento de alimento eram diferentes, uma vez que as cianobactérias eram fornecidas continuamente mas com densidades mais baixas do que no presente trabalho.

Nesta experiência, o objectivo era modelar uma situação que pode ocorrer nos estuários sujeitos a marés. Nestes caso, os mexilhões podem estar expostos a altas densidades de cianobactérias durante curtos períodos diários, quando a água nas marés altas atinge os leitos de mexilhões. Os níveis de toxinas registados nos mexilhões nesta experiência são semelhantes aos obtidos por Marcaillot-Le Baut *et al.* (1993) usando *M. edulis* expostos a populações naturais de *Dinophysis* spp., produtores de ácido ocadaico.

Durante o período de depuração, é interessante salientar a flutuação da quantidade de toxina nos mexilhões ao longo do tempo. O decréscimo de 50% ao fim do 2º dia, depois de serem alimentados com a mistura de microalgas marinhas, parece ser devido ao facto de os mexilhões terem esvaziado o seu aparelho digestivo de células de *Microcystis* que ainda aí poderiam restar. Assim, o resto das toxinas estaria presente nos mexilhões mas não ligada às fosfatases proteicas, pelo que extraível. Nos dias seguintes houve um aumento inesperado da concentração de MCYST-LR nos mexilhões. A toxina não poderia ter vindo da água, uma vez que esta era mudada dia sim dia não. Uma explicação possível é que, durante o período de depuração, alguma da MCYST-LR que estava ligada às fosfatases proteicas foi libertada.

Após o dia 7 a toxina mensurável decresceu, deixando de ser detectada após o dia 13. O mesmo tipo de padrão foi encontrado por Jamel Al-Layl *et al.* (1988) usando *A. cygnea* e uma estirpe de *Anabaena flos-aquae*, que produzia neuro e hepatotoxinas simultaneamente. Não é razoável admitir que, durante os 11 dias, a toxina estivesse presente em células de *Microcystis* no aparelho digestivo. A taxa de depuração dos mexilhões depende do tipo de substância, da sua concentração no animal e da temperatura. De Vooys (1987) refere que, para o caso de areia, cerca de 50% desta é depurada em menos de uma hora, restando apenas 1% ao fim de 24 horas. A depuração de compostos hidrofílicos por moluscos é bastante mais fácil do que a de produtos hidrofóbicos. Com certos compostos hidrofóbicos, tais como hidrocarbonetos pode atingir-se uma redução de 50% do conteúdo acumulado em 2-3 dias (Fossato & Canzonier, 1976), enquanto que para organofosfatos como o triclorfon (0,0-dimetil-(1-hidroxi-2,2,2-tricloroetil)fosfonato) são necessários, pelo menos, 4-7 dias (Mattson *et al.*, 1988).

O ácido domoico, causador da ASP sendo hidrofílico é rapidamente depurado de mexilhões (Wright *et al.*, 1989). Novaczek *et al.* (1992) mostraram que mexilhões contendo doses de 50 μg ác. domoico/g mexilhão depuram 50% da toxina em 24 horas. Tal resultado é consistente com o obtido neste trabalho. Estes investigadores mostraram que a maior parte do ácido domoico se alojava no lúmen intestinal e no hepatopâncreas, embora não seja de descurar a hipótese de que algum ácido domoico penetre no lúmen celular. Geralmente a cinética da desintoxicação de toxinas pelos moluscos envolve duas fases, uma inicial em que há uma rápida depuração, seguindo-se uma fase mais lenta (Marsden, 1993).

Os resultados do presente trabalho indicam um mecanismo de depuração com três estádios e que é ligeiramente diferente do referido para o ácido domoico. O primeiro corresponde à limpeza do tubo digestivo e de parte do hepatopâncreas, reduzindo o conteúdo em MCYST-LR em 50%. O segundo estádio corresponderá à libertação de uma parte da MCYST-LR, que se encontrava ligada firmemente a fosfatases proteicas, levando a um ligeiro aumento na quantidade mensurável da toxina. O terceiro estádio corresponde à libertação progressiva de MCYST-LR que poderia subsistir intracelularmente. O mecanismo de depuração proposto está resumido na figura 4.1.

De salientar que a taxa de depuração varia com a temperatura, com o tamanho dos moluscos e com a salinidade (Novaczek *et al.*, 1992). Outras toxinas como as saxitoxinas e neosaxitoxinas responsáveis pela PSP requerem muito mais tempo para serem completamente depuradas pelos mexilhões, pelo menos mais de 10 dias (Shumway, 1990). Esta taxa de depuração é ainda dependente da época do ano (Prakash *et al.*, 1971) e da temperatura (Madenwald, 1985).

A degradação de toxinas de cianobactérias por organismos eucarióticos não é ainda conhecida mas sabe-se que estas toxinas podem ser degradadas por mecanismos químicos ou biológicos. Kiviranta *et al.* (1991) isolaram uma estirpe da bactéria *Pseudomonas*, que degrada anatoxina-a. Tsuji *et al.* (1994) revelaram que MCYST-LR se decompõe pouco por exposição à luz do sol, mas adicionando pigmenos cianobacterianos, essa decomposição é acelerada. As taxas de decomposição e de isomerização dependem da concentração de pigmentos.

A desinfecção de bivalves de modo a eliminar bactérias patogénicas tem vindo a ser efectuada com ultravioletas, embora tal só seja possível no caso de as bactérias se encontrarem na água, sendo a desinfecção efectuada antes do contacto dos bivalves com esta (Brown & Russo, 1979). Os ultravioletas não são eficazes na destruição das microcistinas, pelo menos com as doses normalmente usadas na desinfecção da água. O tempo de contacto e a intensidade de irradiação teriam que ser muito elevados, o que se tornaria economicamente pouco rentável (Rositano & Nicholson, 1994).

No caso de animais já contaminados, tem sido proposta a utilização de ozono como forma de depurar bivalves com, por exemplo, toxinas fitoplanctónicas (Blogoslawski, 1988). Sabendo-se que esta técnica é também utilizada para tratar águas contaminadas com toxinas de cianobactérias (Keijola *et al.*, 1988; Rositano & Nicholson, 1994) é de pensar que poderá ser um método a usar no caso de contaminação de moluscos por microcistinas.

A distribuição das toxinas nos diferentes órgãos dos mexilhões é semelhante à observada quando os bivalves acumulam as toxinas de dinoflagelados. Marcaillor-Le Baut *et al.* (1993) referem que o ácido ocadaico se acumula principalmente na glândula digestiva. Bricelj *et al.* (1990) afirmam que 96% da toxina de *Alexandrium fundyense* - PSP se acumula nos órgãos do aparelho digestivo.

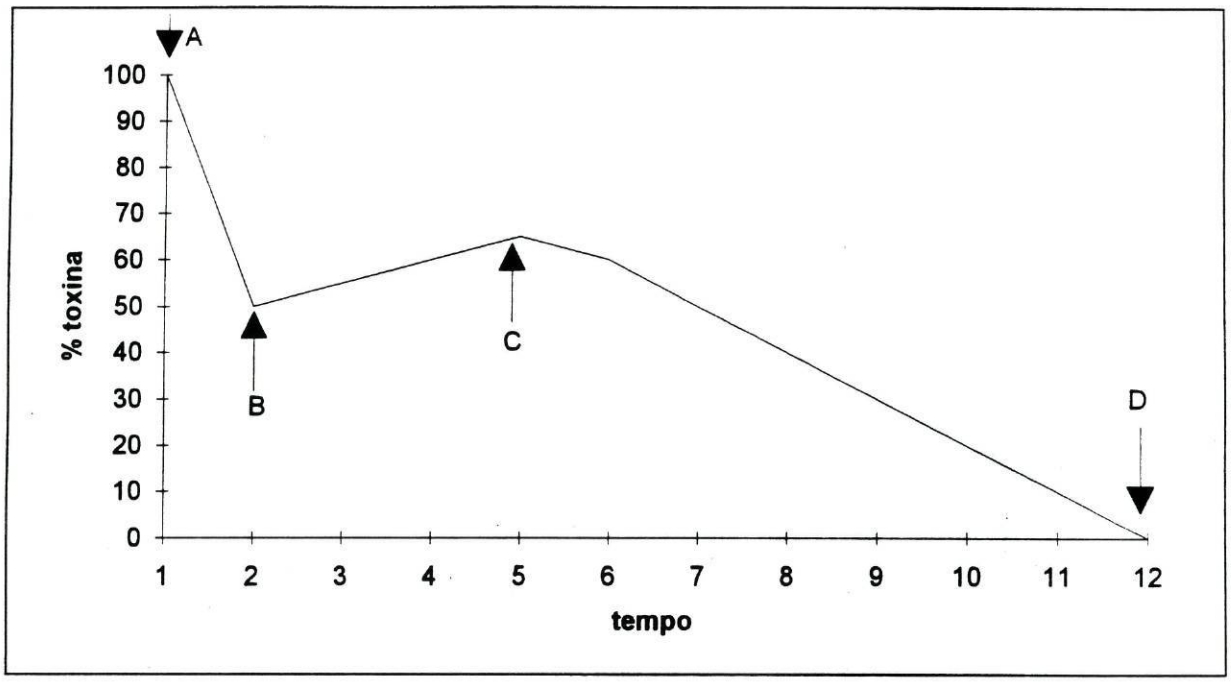


Figura 4.1 - Mecanismo de depuração de MCYST-LR por *Mytilus*. (AB - fase 1, BC - fase 2, CD - fase 3, ver texto para explicação dos símbolos).

Os resultados apresentados revelam que há possibilidade de acumulação de toxinas de cianobactérias por mexilhões. Estas experiências podem ser consideradas como representando uma situação normal, utilizando densidades de cianobactérias que ocorrem naturalmente e uma dose diária. Em alguns locais, esta poderá não representar a melhor situação.

No entanto, a saúde humana pode ser afectada quando ocorrem florescências tóxicas próximas de leitos de mexilhões. Carmichael & Falconer (1993) recomendam que o limite superior para toxinas de cianobactérias em água de consumo deverá ser 1 μg/l, de modo a poder-se consumir água sem risco. Este valor foi obtido a partir de experiências com doses administradas a murganhos (Falconer *et al.*, 1989) e de ensaios de toxicidade subcrónica em porcos (Falconer *et al.*, 1994). Embora estes valores devam ser usados em situações crónicas, é fácil verificar que podem ser facilmente atingidos durante uma refeição de mexilhões contaminados com doses de MCYST-LR reveladas neste trabalho. Uma refeição de mexilhões contaminados com os níveis de MCYST-LR apresentados neste trabalho, pode representar uma ingestão de cerca de 250 μg/ indivíduo, considerando a ingestão de 625 g de mexilhões (peso total fresco) por pessoa contendo 10,5 μg de MCYST-LR/g de mexilhão (peso seco). É, por isso, recomendado que o consumo de mexilhões durante florescências de cianobactérias deverá ser evitado, estabelecendo-se um período de depuração de acordo com o máximo de toxinas acumuladas pelos mexilhões e com a intensidade e persistência das florescências.

O comportamento de ostras e outros bivalves pode ser semelhante mas a sua situação será agravada pelo facto de que geralmente não emergem durante a maré baixa, podendo assim filtrar quantidades muito maiores de cianobactérias tóxicas e, por isso, acumular mais toxinas.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados no presente estudo vieram, por um lado, confirmar a eutrofização de algumas das nossas massas de água, e, por outro, alertar para situações de eutrofização em locais que não estavam ainda bem documentados ou para evoluções no sentido de uma maior eutrofização.

A ocorrência de hepatotoxicidade em cerca de 60% das florescências de cianobactérias analisadas neste estudo, coloca-nos perante o problema da possibilidade de intoxicações humanas por consumo ou contacto com estas massas de água. Tal é especialmente importante se tivermos em conta que estas hepatotoxinas, sendo inibidoras das fosfatases proteicas 1 e 2A (Mackintosh *et al.*, 1990), são potentes promotores de tumores (Nishiwaki-Matsushima *et al.*, 1992).

Embora exista um programa nacional de monitorização da qualidade da água, da responsabilidade das Direcções Regionais do Ambiente e Recursos Naturais -DRARN's e do Instituto da Água -INAG, os parâmetros biológicos de avaliação da eutrofização não são, geralmente, quantificados.

O Decreto-Lei 74/90 - Lei da Água- também ignora os aspectos biológicos na avaliação da qualidade da água, para qualquer fim, indicando apenas, que as águas destinadas ao consumo humano "... não devem conter algas ... ", não sendo indicados os métodos aconselhados para esta avaliação, tal como é feito para os parâmetros físicos, químicos e microbiológicos.

Outro aspecto importante a salientar é o facto de as estações de tratamento de águas - ETA's, estarem muitas vezes mal dimensionadas e mal desenhadas e com equipamento inadequado, não tendo em conta a qualidade da água bruta. Os tratamentos a efectuar são, na maior parte das vezes, inadequados ao tipo de água, sendo seguidos modelos universais, sem se efectuar a vigilância conveniente. Novamente a qualidade biológica da água não é avaliada durante os diferentes processos de tratamento das águas brutas, nem o comportamento destas águas é seguido ao longo das redes de abastecimento público.

As toxinas das cianobactérias são altamente resistentes à temperatura e à maior parte dos agentes químicos utilizados usualmente nas ETA's. Podem ser destruídas por fotólise na presença de pigmentos (Tsuji *et al.*, 1994) ou por doses elevadas de cloro ou de cloramina (Nicholson *et al.*, 1994; Rositano e Nicholson, 1994). No entanto, estes últimos autores não quantificaram a formação de compostos halogenados, resultantes da cloragem da matéria orgânica, e que podem ser cancerígenos. A estabilidade das microcistinas foi recentemente descrita por Jones *et al.* (1995), salientando que a toxicidade de massas de cianobactérias secas nas margens de lagos pode manter-se estável até pelo menos 9 meses. Tal pode contribuir para um enriquecimento da água em toxinas em alturas de maior pluviosidade, quando o nível da água sobe e atinge essas massas secas. Nesta fase, as microcistinas são rapidamente dissolvidas na água (Jones *et al.*, 1995).

Com os dados existentes até ao momento, é possível classificar a maior parte das massas de água utilizadas para consumo e/ou recreio quanto à eutrofização e ao risco de ocorrência de florescências tóxicas de cianobactérias. Tal como é corrente em outros países, e tendo em conta a elevada percentagem de florescências tóxicas em Portugal, deve considerar-se tóxica qualquer florescência detectada.

Os passos a seguir no sentido de se evitarem intoxicações humanas poderão ser adaptadas do programa de vigilância utilizado na Austrália (Tabela 5.1) (Carmichael e Falconer, 1993).

A quantificação das cianobactérias deverá fazer-se preferencialmente através de contagem e identificação das células ao microscópio óptico, embora a avaliação da quantidade de clorofila a em amostras de água, possa ser utilizada em laboratórios com menos recursos, ou como rastreio inicial.

Tabela 5.1 - Proposta de programa de vigilância de cianobactérias em águas doces superficiais, baseado no programa actualmente em vigor na Austrália (Carmichael e Falconer, 1993).

FASE	DETECÇÃO (Nº CIANOBACTÉRIAS/ML)	ACÇÃO A DESENVOLVER
Fase 1	500-2000	Quantificar cianobactérias Detectar espumas e alteração de sabores e odores
Fase 2	2000-15000	Quantificar cianobactérias Avaliar a presença de espécies potencialmente tóxicas Detectar toxicidade por bioensaios
Fase 3	>15000	Quantificar cianobactérias Detectar toxicidade por bioensaios Quantificar toxinas por HPLC Avaliar a eficácia das ETA's

A avaliação da densidade de cianobactérias deverá ser feita especialmente durante a primavera e verão, em locais de risco, ou sempre que a água mostre alterações significativas da cor.

Notando-se que, em amostragens consecutivas, há uma tendência para um aumento da densidade das cianobactérias e que esses valores se situam entre 500 a 2000 cél/ml, dever-se-á proceder a um aumento da frequência das amostragens.

A escolha dos locais de colheita das amostras é muito importante. Sempre que possível, as amostras deverão representar a coluna de água, obtendo-se tal através de uma colheita de subamostras estratificadas verticalmente, com auxílio de garrafas próprias, podendo após a colheita destas obter-se uma amostra compósita, por mistura das subamostras - amostra integrada. Esta metodologia permite reduzir significativamente os custos das análises e possibilita a análise de amostras de vários locais, mas promove uma perda de informação. O conhecimento da densidade das cianobactérias nos vários estratos da coluna da água possibilita uma melhor

gestão desta, fornecendo dados importantes para a decisão de escolher a melhor profundidade para a sua captação.

Assim, sugere-se que, para a avaliação da densidade sejam recolhidas amostras a diferentes profundidades, de preferência às mesmas das dos poços de captação de água, utilizando-se uma amostra integrada para a avaliação da toxicidade.

No caso de as cianobactérias atingirem densidades entre 2000 a 15000 cél/ml dever-se-á proceder à detecção da toxicidade através de bioensaios com murganhos. Estes bioensaios são os que permitem a obtenção de resultados mais rápidos, identificam o tipo de toxina em questão e dão uma ideia da toxicidade através da análise dos tempos de sobrevivência dos animais. As cianobactérias podem ser ensaiadas directamente após um processo de congelação/ descongelação ou após liofilização e posterior solubilização em solução salina a 0,9% de NaCl. No caso de se pretender avaliar a toxicidade da água, de forma a verificar se as toxinas se encontram dissolvidas nesta, os ensaios podem ser feitos directamente com a água, caso as densidades de cianobactérias sejam elevadas, ou por concentração da água por liofilização, ebulição, ou por processos químicos utilizando cartuchos com ODS, como descrito atrás.

Se as cianobactérias se apresentarem, na água bruta, em densidades superiores a 15000 cél/ml, dever-se-á, além de continuar a monitorização da densidade de cianobactérias e da toxicidade por bioensaios, avaliar simultaneamente a eficácia da ETA, e quantificar as toxinas existentes nos diferentes pontos do sistema de abastecimento de água, por HPLC.

Nesta altura, é essencial uma vigilância de todas as fases de tratamento na ETA, através da análise da densidade de cianobactérias e da concentração das suas toxinas. Por outro lado, o comportamento da água na rede de abastecimento não deverá ser descurada, vigiando-se a qualidade da água em pontos chave, que poderão ser, consoante o tipo de redes, reservatórios intermédios, derivações, tubagens que corram a céu aberto, locais de maior tempo de residência da água, entre outros. Dadas as grandes diferenças que parecem existir entre os diferentes sistemas de abastecimento público de água, cada situação deve ser cuidadosamente estudada, de forma a poder-se decidir, de um modo mais eficaz, a localização dos pontos de vigilância da água.

Em caso de toxicidade, deverá ser suspendido o abastecimento de água a partir daquela fonte, devendo, por isso, existir para cada sistema, uma fonte alternativa para casos de emergência. O abastecimento só deverá ser retomado caso a toxicidade tenha desaparecido na água bruta, ou caso se prove que o sistema de tratamento da água é eficaz na retenção das cianobactérias e das suas toxinas. Para tal, o carvão activado ou o ozono, são meios eficazes para remoção ou destruição das toxinas (Falconer *et al.*, 1989; Himberg *et al.*, 1989; Keijola *et al.*, 1989; Donati *et al.*, 1993), se aplicados correctamente, juntamente com um bom sistema de filtragem. Estas técnicas, têm ainda a vantagem de remover odores e sabores produzidos por cianobactérias e fungos tais como a geosmina e o 2-metilisoborneol (Chudyk *et al.*, 1979; Simpson e McLeod, 1991). Além disso, também removem trihalometanos eventualmente

formados pela cloragem de matéria orgânica. Uma vez que este tipo de tratamento é oneroso, não poderá estar disponível a 100% durante todo o ano. No entanto, deve ser usado sempre que ocorram situações que possam colocar em risco a saúde pública. A sua utilização deve ser seguida de uma vigilância eficaz que certifique que o tratamento está a ser realizado correctamente e os resultados são consistentes com o esperado (Vasconcelos e Araújo, 1994).

Trabalhos recentes indicam que o valor máximo admissível para a concentração de microcistinas em águas de consumo deverá ser de 1 µg/l (Carmichael e Falconer, 1993). Tal valor foi obtido a partir de ensaios crónicos orais realizados com suínos, verificando-se não existir alterações significativas em animais que consumiram estas doses durante períodos prolongados de tempo (Falconer *et al.*, 1994). Embora seja difícil estabelecer, com segurança, limites para substâncias cujos efeitos ao nível da saúde humana não são ainda completamente conhecidos, o valor acima referido poderá ser usado como um valor guia.

Os resultados do presente estudo apontam para a MCYST-LR como a microcistina dominante em águas doces portuguesas. Esta toxina parece ser também a mais comum noutros países, mas convém não esquecer que outras toxinas, como a MCYST-RR, MCYST-YR, MCYST-LA também ocorreram com frequências significativas. De uma forma geral, os programas de quantificação de microcistinas em águas doces podem fazer-se utilizando HPLC, com MCYST-LR como padrão. Neste momento, além desta toxina, existem disponíveis no mercado MCYST-YR e MCYST-RR (Sigma), pelo que também podem ser usadas como padrões. No entanto, para maior segurança, dever-se-á utilizar, sempre que possível, um sistema de HPLC com um detector de Díodos, em vez de um detector de UV normal, uma vez que este permite quantificar todas as microcistinas, mesmo variantes não descritas, através da forma típica do seu espectro de absorção em UV (Flett e Nicholson, 1991; Fawel *et al.*, 1994).

O desenvolvimento de técnicas mais sensíveis como a ELISA (Brooks e Codd, 1988; Chu *et al.*, 1990a, 1990b), ou ensaios de inibição das fosfatases proteicas (Sin e Mudge, 1993; An e Carmichael, 1994; Jones e Orr, 1994; Lambert *et al.*, 1994) parecem mostrar-se promissoras, de futuro, uma vez que permitem determinar quantidades muito pequenas de toxinas em amostras de água ou de cianobactérias, bem como em organismos que possam acumular essas toxinas. Por outro lado, outras técnicas vulgarmente utilizadas em toxicologia aquática como o ensaio de inibição de bactérias luminescentes (Lawton *et al.*, 1990) e bioensaios com invertebrados (Kiviranta *et al.*, 1992b), não parecem substituir, com vantagem, os bioensaios com murganhos na avaliação da toxicidade de cianobactérias apesar das questões de bioética associadas ao uso de animais.

Uma vez que os moluscos, e, em especial os mexilhões, podem acumular quantidades significativas de microcistinas, em condições semelhantes às que ocorrem em alguns dos nossos estuários, torna-se necessário efectuar uma vigilância sanitária durante a ocorrência de cianobactérias. Tal parece especialmente importante nos estuários dos rios Minho e Guadiana, pois, além de nestes rios se desenvolverem cianobactérias tóxicas, existem bancos de moluscos

que poderão acumular as suas toxinas. Como foi referido num dos capítulos anteriores, as situações mais graves ocorrerão quando as densidades de cianobactérias não forem muito elevadas, dados os riscos inerentes aos efeitos crónicos. Por isso, o alerta visual para a ocorrência de florescências nestes locais, não deverá ser suficiente, devendo-se efectuar uma vigilância relativa à quantidade de cianobactérias, o que poderá ser realizado aquando das amostragens da da Rede de Qualidade da Água -RQA.

O conhecimento das situações acima descritas por parte das autoridades sanitárias, bem como por técnicos das áreas do ambiente e agricultura, será imprescindível, no sentido de, por um lado, se tentar reduzir a eutrofização e, por outro, se evitar intoxicações animais e humanas.

A inclusão de parâmetros biológicos e em especial a quantificação de cianobactérias, na legislação relativa à qualidade da água, é essencial, no sentido de uma avaliação correcta da qualidade da água.

6. CONCLUSÕES

- Durante o presente estudo colheram-se 30 amostras de florescências de cianobactérias correspondendo a 18 locais diferentes, entre lagoas naturais, rios e albufeiras. Estas amostras foram recolhidas entre 1989 e 1992, com especial incidência nos meses de Maio a Novembro. Tal correspondeu à época de maior densidade destes organismos.

- As densidades de cianobactérias encontradas nas massas de água analisadas no presente estudo variaram entre 5 x 10^2 cél/ml e 6,9 x 10^7 cél/ml. Na maior parte das amostras, as cianobactérias constituíram mais de 80% da densidade total de fitoplâncton.

- No total, identificaram-se 28 espécies de cianobactérias pertencentes a 13 géneros diferentes. A espécie dominante nas amostras de água analisadas foi *M. aeruginosa*, seguindo-se por ordem decrescente *An. Scheremetievi, An. flos-aquae, An. spiroides, Ap. flos-aquae* e *M. wesenbergii*. A espécie dominante nas florescências foi *M. aeruginosa*, que ocorreu em 100% das amostras, embora *An. flos-aquae* tenha dominado em sete amostras. *M. wesenbergii, An. Scheremetievi, An. flos-aquae* e *Nostoc* sp. foram espécies principais em uma florescência cada.

- Das florescências analisadas, 60% revelaram toxicidade, não se registando nenhuma florescência neurotóxica. Os valores de toxicidade, medidos em termos de DL_{50} i.p. face a murganhos, variaram entre 20 mg/kg e 400 mg/kg.

- A toxicidade das cianobactérias variou bastante numa mesma massa de água ao longo do tempo. No rio Minho, das florescências analisadas em três anos consecutivos, apenas a do último ano apresentou toxicidade. Na lagoa de Mira a variação foi mais drástica, registando-se uma diminuição da toxicidade de cerca de 10 vezes em apenas 6 dias.

- Os valores da toxicidade das estirpes de *M. aeruginosa* isoladas a partir das lagoas de Mira e Quiaios e das albufeiras do Douro foi semelhante à obtida por outros autores em outros pontos do globo para esta espécie, variando a DL_{50} entre 7,5 e 75 mg/kg.

- Parece existir uma diferença significativa ($p< 0,05$) entre as estirpes de *M. aeruginosa* isoladas das lagoas e as das albufeiras, com base nas dimensões celulares médias. Estas diferenças são também evidentes no que diz respeito aos perfis de toxinas, com as estirpes das lagoas a produzirem preferencialmente MCYST-LA e as das albufeiras MCYST-YR. Todas elas produzem, no entanto, MCYST-LR como toxina principal.

- Registaram-se diferenças significativas nos tempos de sobrevivência ($p<0,001$) e na percentagem de peso do fígado relativamente ao total corporal ($p < 0,05$), em murganhos injectados com estirpes de *M. aeruginosa* ou com florescências naturais de cianobactérias. Tais diferenças poderão dever-se à maior quantidade de microcistinas nas estirpes, que, levando a uma morte mais rápida, provocam uma menor afluência de sangue ao fígado.

- O isolamento e purificação de microcistinas a partir de estirpes de *M. aeruginosa* e de florescências naturais de cianobactérias, conduziu à descrição de 2 a 4 toxinas diferentes nas estirpes e 2 a 7 nas florescências.

- Purificou-se e identificou-se um total de nove microcistinas diferentes nas amostras de estirpes e florescências.Tais toxinas foram MCYST-LR, MCYST-RR, MCYST-LA, MCYST-AR, MCYST-YR, MCYST-HilR, [D-Asp^3]MCYST-LR, [Dha^7]MCYST-LR e [L-MeSer^7] MCYST-LR. Destas, MCYST-AR surgiu apenas nas estirpes e MCYST-HilR, [Dha^7]MCYST-LR e [L-MeSer^7]MCYST-LR apenas nas florescências.

- Nas estirpes de *M. aeruginosa* pareceu existir uma tendência para MCYST-LR ser a toxina principal, com percentagens geralmente superiores a 50%. Nas florescências esta tendência não foi tão nítida, podendo resultar da coexistência de várias estirpes produtoras de microcistinas diferentes como toxinas principais.

- MCYST-LR ocorreu como dominante em todas as estirpes e em todas as florescências em cujas toxinas foram identificadas, pelo que pode sugerir-se ser a microcistina mais comum em águas doces portuguesas. No entanto, os planos de vigilância da qualidade das águas referentes a estes parâmetros deverão preferencialmente utilizar metodologias que detectem todas as variantes das microcistinas. Tal é possível, recorrendo-se a HPLC com detector de Díodos.

- A quantidade total de MCYST nas estirpes de *M. aeruginosa* e nas florescências analisadas foi bastante elevada, o que poderá acarretar riscos para a saúde humana, tendo em conta que quase todas as massas de água analisadas são usadas para consumo e/ou recreio.

- Apesar de os moluscos serem geralmente considerados resistentes às toxinas produzidas pelo fitoplâncton, neste trabalho observou-se que, mexilhões expostos a cianobactérias hepatotóxicas apresentam alguma mortalidade, embora retardada, com 0,45% após 15 dias de exposição e 6,33% duas semanas após este período. A diminuição progressiva da biomassa individual foi também um sinal de toxicidade.

- Os mexilhões acumularam MCYST-LR quando alimentados com uma estirpe tóxica de *M. aeruginosa,* em densidades semelhantes às que ocorrem em alguns dos nossos estuários. No entanto, a rápida formação de pseudofezes revelou que a ingestão de cianobactérias não foi optimizada, pelo que os valores de acumulação estão subestimados.

- A acumulação de MCYST-LR foi muito rápida, detectando-se esta toxina dois dias após a primeira administração, nos animais. A quantidade máxima de MCYST-LR detectada nos mexilhões foi de 10,5 μg/g de peso seco, ao fim do 10º dia.

- A MCYST-LR acumumlou-se preferencialmente no hepatopâncreas (96,5%), registando os outros órgãos concentrações muito baixas.

- A depuração de MCYST-LR pelos mexilhões, completou-se ao fim do 11º dia, nas condições dos ensaios. Registou-se um decréscimo de cerca de 50% do conteúdo em toxina ao fim do 2º dia, o que parece representar o esvaziamento do tubo digestivo. Notou-se uma evolução inesperada a partir o 3º dia, com uma ligeira subida do conteúdo em MCYST-LR até ao dia 7. Tal poderá ser devido à libertação de MCYST-LR, que estando anteriormente ligada às fosfatases proteicas, não seria extraível pelas técnicas utilizadas.

- A possibilidade de acumulação de MCYST-LR por moluscos deve ser encarada como um risco real, devendo-se efectuar uma vigilância sanitária nos moluscos dos estuários dos rios eutrofizados, sujeitos a florescências de cianobactérias.

- Em face de todos estes resultados, sugere-se a necessidade de um programa de vigilância de cianobactérias e das suas toxinas em massas de água eutrofizadas, não só da água bruta, como em todas as fases do tratamento nas ETAs e em pontos selecionados das redes de distribuição de água.

- A utilização de sistemas de tratamento de água com carvão activado e/ou ozono parecem ser, neste momento, as únicas formas eficazes de evitar situações de perigo para a saúde humana. Estudos epidemiológicos, utilizando marcadores de alterações hepáticas deverão acompanhar os estudos de monitorização de toxinas em águas superificiais, de modo a que os efeitos na saúde humana sejam mais facilmente identificados.

- A utilização de técnicas de quantificação de toxinas de cianobactérias que apresentem maior sensibilidade que os bioensaios com murganhos ou HPLC, devem ser implementadas, de forma a se poder detectar níveis muito baixos de toxicidade em águas e organismos e que sejam susceptíveis de causar problemas crónicos humanos.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Accomando R., Viarengo A., Bordone R., Taningher M., Canesi L. e Orunesu M., 1989. A rapid method for detecting DNA srtand breaks in *Mytilus galloprovincialis* Lam. Induced by genotoxic chemicals. Int. J. Biochem 23:227-229

Ade P., Banchelli Soldaini M.G., Castelli M.G., Chiesara E., Clementi F., Fanelli R., Funari E., Ignesti G., Marabini A., Orunesu M., Palmero S., Pirisino R, Ramundo Orlando A., Rizzi R., Silano V., Viarengo A. e Vitozzi L., 1984. Biochemical and morphological comparison of microsomal preparations from rat, quail, trout, mussel and water flea. Ecotoxicol. Environ. Saf. 8:423-446

Amorim A., 1994. Isolamento de clones de cianobactérias. Cultura e ensaios de toxicidade. Relatório da Bolsa BJI 954, Projecto PEAM/C/CNT/38/91

Amorim A., Vasconcelos V. e Soares A.M.V.M., 1994. Evolução da toxicidade de cianobactérias isoladas a partir das lagoas das Braças, Vela e Mira ao longo de um ano. Actas da 4ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente. Vol III:154-158

An J.-S. e Carmichael W.W., 1994. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins. Toxicon 32:1495-1507

Andrade M.I e Brito M.F., 1993. Rio Guadiana. Evolução da qualidade biológica. Boletim UCA 1:101-113

* Arieli B., Shahak Y., Taglicht D, Hanska G. e Padan E., 1994. Purification and characterization of sulfide-quinone reductase, a novel enzyme driving anoxygenic photosynthesis in *Oscillatoria limnetica*. J. Biol. Chem., 269:5705-5711

Azevedo S.M.F.O., Evans W.R., Carmichael W.W. e Namikoshi M. (1994): First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. - J. app. Phycol. 6: 261-265

Ayles G.B., Lark J.G.I., Barica J. e Kling H., 1976. Seasonal mortality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) planted in small eutrophic lakes of central Canada. J. Fish. Res. Board Can. 33:647-655

Bardoiul M., Bohec M., Cormerais M., Bougrier S. e Lassus P., 1993. Experimental study of the effects of a toxic microalgal diet on feeding of the oyster *Cassostrea gigas* Thunberg. J. Shellfish Research 12(2): 417-422

Barica J., 1975. Summerkill risk in prairie ponds and possibilities of its prediction. J. Fish. Res. Board Can. 32:1283-1288

Barica J., 1978. Collapses of *Aphanizomenon flos-aquae* blooms resulting in massive fish kills in eutrophic lakes. Verh. Internat. Verein. Limnol. 20: 208-213

Barros P.,1994. Implicações ecotoxicológicas de cianobactérias em cladóceros. Tese de Mestrado. Univ. Coimbra. 88 pp

Barros P., Silveira S., Ribeiro R., Gonçalves F., Vasconcelos V. e Soares A.M.V.M., 1993. Estrutura populacional fitoplanctónica nas lagoas das Braças, Vela e Mira (região Centro-Litoral). Resultados preliminares. Boletim UCA 1:1-8

Bayne B., 1973. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation. Netherlands Journal of Sea Research 7:399-410

Beasley V.R.; Cook W.O., Dahlem A.M., Hooser S.B., Lovell R.A. e Valentine W.M., 1989. Algae intoxication in livestock and water fowl. Clin. Toxicol. 5:345-361

Berg K., Skulberg O.M. e Skulberg R., 1987. Effects of decaying toxic blue-green algae on water quality - a laboratory study. Arch. Hydrobiol. 108:549-563

Beveridge M.C.M., Baird D.J., Rahmatullah S.M., Lawton L.A., Beattie K.A. e Codd G.A., 1993. Grazing rates on toxic and non-toxic strains of cyanobacteria by *Hypophthalmichthys molitrix* and *Oreochromis niloticus*. J. Fish Biology 43:901-907

Blogoslawski W.J., 1988. Ozone depuration by bivalves containing PSP: pitfalls and possibilities. Journal shellfish Research 7:702-705

Boren H., Grimvall A. e Savenhed R., 1982. Modified stripping technique for the analysis of trace organics in water. J. Chromatogr. 252: 139-146

Bossenmaier E.F., Olson T.A., Rueger M.E. e Marshall N.H., 1954. Some field and alboratory aspects of duck sickness at White water lake, Manitoba. Nineteenth North American Wildlife Conference: 163-175

Botes D.P., Krueger H. e Viljoen C.C., 1982. Isolation and characterization of four toxins from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Toxicon 20:945-954

Botes D.P., Wessels P.L., Kruger H., Runnegar M.T.C., Santikarn S., Smith R.J., Barna J.C.J. e Williams D.H. 1985: Structural studies on cyanogynosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from *Microcystis aeruginosa*. - J. Chem. Soc Perkin Trans. I:2747-2748

Bourke A.T.C., Hawes R.B., Nielson A. e Stallman N.D., 1983. An outbreak of hepatoenterites (the Palm Island mystery disease) possibly caused by algal intoxication. Toxicon Suppl. 3:45-48

Branco R., 1986a. Fitoplancton. In "Estudo da qualidade da água da albufeira da Bemposta. Factores bióticos". Relatório Final. IZAN. Porto:20-101

Branco R., 1986b. Estudo do fitoplancton nas albufeiras da Valeira, Régua e do Carrapatelo. Relatório. IZAN, Porto: 25 pp

Branco R., 1987a. Caracterização ecológica da albufeira de Crestuma-Lever. Comunidade fitoplanctónica. Relatório Final. IZAN, Porto: 62 pp

Branco R., 1987b. Influência do esvaziamento da albufeira de Carrapatelo na albufeira de Crestuma-Lever. Relatório. IZAN, Porto: 24 pp.

Branco R., 1990. Plancton. In " Albufeira de Crestuma-Lever: comunidade aquatica. Primeira Central de ciclo combinado a gás natural. Estudo de Impacte ambiental. Estado de referência" Relatório. IZAN, Porto: 2-34

Branco R. e Guimarães M.C., 1988. Características limnológicas estivais de dois lagos de barragem do rio Douro - Valeira e Régua. Actas Col. Luso-Esp. Ecol. Bacias Hidrogr. e Rec. Zoológicos:35-45

Branco R., Guimarães C. e Coelho M., 1991. Avaliação da qualidade da água nas albufeiras da bacia hidrográfica do rio Douro. In "Avaliação da qualidade da água através de parâmetros biológicos em rios do norte de Portugal". Relatório final. IZAN, Porto: 1-42

Branco R., Guimarães C. e Coelho M., 1992. Avaliação da qualidade da água de albufeiras do norte do país através de parâmetros biológicos. Actas da 3ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente, vol. I: 151-160

Bricelj V.M., Lee J.H., Cembella A.D.e Anderson ,D.M. 1990. Uptake kinetics of Paralytic Shellfish toxins from the dinoflagellate *Alexandrium fundyense* in the mussels *Mytilus edulis*. Marine Ecology Progress Series 63, 177-188

Brock T.D., 1973. Lower pH limit for the existence of blue-green algae: evolutionary and ecological implications. Science 197:480-489

Brooks W.P. e Codd G.A., 1986. Extraction and purification of toxic peptides from natural blooms and laboratory isolates of the toxic cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Lett. Appl. Microbiol. 3: 1-3

Brooks W.P. e Codd G.A., 1988. Immunoassay of hepatotoxic cultures and water blooms of cyanobacteria using *Microcystis aeruginosa* peptide toxin polyclonal antibodies. Environ. Technol. Letters 9:1343-1348

Brown C. e Russo D.J. , 1979. Ultraviolet light desinfection of shellfish hatchery sea water. I. Elimination of five pathogeneic bacteria. Aquaculture 17:17-23

Brunetti R., Fumagalli O., Valerio P e Gabriele M., 1992a. Genotoxic effects of anoxia on *Mytils galloprovincialis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 83:71-74

Brunetti R., Gabriele M., Valerio P. e Fumagalli O., 1992b. The micronucleus test: temporal pattern of baseline frequency in *Mytilus galloprovincialis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 83:75-78

Cabeçadas G., Brogueira M.J. e Jorgen W., 1986. A phytoplankton bloom in shallow Divor reservoir (Portugal). The importance of internal nutrient loading. Int. Revue ges. Hydrobiol. 71: 795-806

Calabrese A., 1984. Ecotoxicological testing using marine moluscs. In G. Persoone, E. Jaspers and C. Claus (eds.) Ecotoxicological testeing for the marine environment. State Univ. Ghent and Inst. Mar. Sci. Scient. Res., Bredene, Belgium. Vol. 2.: 455-477

Calado A.J., 1993. Algas da lagoa das Braças (Quiaios, Figueira da Foz) ao longo da transição primavera-verão de 1989 (diatomáceas excluídas). Boletim UCA 1:9-23

Calado A.J., Freitas A.M. e Veloso V.M., 1991. Algas da Pateira de Fermentelos numa situação de inverno. Rev. Biol. U. Aveiro, 4:55-71

Campbell D.L., Lawton L.A., Beattie K.A. e Codd G.A., 1994. Comparative assessment of the specificity of the brine shrimp and Microtox assays to hepatotoxic (microcystin-LR containing) cyanobacteria. Env. Toxicol. Water Quality: An Int. Journal 9:71-77

Campos M.T.R.M., 1994. Caracterização de clones de *Microcystis aeruginosa*. produção de toxinas e suas necessidades nutricionais. Relatório de Bolsa BJI . Projecto PEAM/C/CNT/38/91

Carmichael W.W., 1988. Toxins of freshwater algae. In "Handbook of Natural Toxins". Tu AT (Ed.). Vol. 3. Marcel Dekker, New York: 121-147

Carmichael W.W. 1992. Cyanobacteria secondary metabolites: the cyanotoxins. J. Applied Bacteriol. 72: 445-459

Carmichael, W.W., 1994. The toxins of cyanobacteria. Sci. American 270: 64-72

Carmichael W.W. e Falconer I.R.,1993. Diseases related to freshwater blue-green algal toxins, and control measures. In: Algal Toxins in Seafood and Drinking Water, edited by I.R. Falconer, Academic Press, London:187-209

Carmichael W.W. e Gorham P.R., 1981.The mosaic nature of toxic blooms of cyanobacteria. In "The Water environement: Algal Toxins and Health", W.W. Carmichael (ed.) Plennum Press, New York: 161-172

Carmichael W.W., He J.-W., Eschedor J., He Z.-R. e Yu M.-J., 1988. Partial structure determination of hepatotoxic peptides from *Microcystis aeruginosa* (cyanobacterium) collected in ponds of Central China. Toxicon, 26:1213-1217

Cerqueira M.M., 1987. Fitoplancton. In "Estudo do estado de referência do ecossistema fluvial da zona do Pego (Rio Tejo)". Relatório IZAN, Porto: 12-44

Cerqueira M.M., 1991. Caracterização das comunidades algais dos rios Minho, Âncora, Neiva e Tâmega. In " Avaliação da qualidade da água através de parâmetros biológicos em rios do norte de Portugal". Relatório final. IZAN, Porto: 43-70

Chu F.S., Huang X e Wei R.D., 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for microcystins in blue-green algal blooms. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73:451-456

Chu F.S., Huang X., Wei R.D. e Carmichael, W.W., 1989. Production and characterization of antibodies against microcystins. Appl. Environ. Microbiol. 55:1928-1933

Chudyk W.A., Snoeyink V.L., Beckmann D. e Temperly T.T., 1979. Activated carbon versus resin adsorption of 2-methylisoborneol and chloroform. J. Am. Wat. Wks Ass. 71:529

Codd G.A. e Poon G.K., 1988. Cyanobacterial toxins. In "Biochemistry of the algae and cyanobacteria" (Eds.) Rogers L.J. e Gallon J.R. Clarendon Press, Oxford:283-296

Cohen S.G. e Reif C.B., 1953. Cutaneous sensitization to blue-green algae. J. Allergy, 24:452-457

Cook W.O., Beasley V.R. e Lovell R.A., 1989. Consistent inhibition of peripheral cholinesterases by neurotoxins from the freshwater cyanobacterium *Anabaena flos-aquae:* studies of ducks, mice and a steer. Environ. Toxicol. Chem. 8:915-922

Coutinho M.T.P., 1990a. Estrutura e dinâmica do fitoplancton da albufeira de Montargil. Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas, 15:45-61

Coutinho M.T.P., 1990b. Dinâmica dos nutrientes na albufeira do Pego do Altar. Relação com a população planctónica. Relat. Téc. Cient. INIP, 27:18 pp

Coutinho M.T.P., 1990c. Dinoflagelados potencialmente tóxicos em três locais da costa portuguesa, Figueira da Foz, Peniche e Setúbal. Relat. Téc. Cient. INIP 29: ??

Davenport J., 1979. The isolation response of mussels (*Mytilus edulis* L.) exposed to falling sea-water concentrations. J. mar. biol. Ass. U.K. 59:123-132

Davenport J., 1981. The opening response of mussels (*Mytilus edulis*) exposed to rising sea-water concentrations. J.mar. biol. Ass. U.K. 61:667-678

Davids C., 1964. The influence of suspension of microorganisms of different concentrations on the pumping and retention of food by the mussel *Mytilus edulis*. Neth. J. Sea Res. 2:233-249

Davidson F.F., 1959. Poisoning of wild and domestic animals by a toxic waterbloom of *Nostoc rivulare* Kuetz. J. Amer. Water Works Assoc. 51(10):1277-1287

Davies I.M. e Pirie J.M., 1980. Evaluation of a "Mussel Watch" project for heavy metals in scottish coastal waters. Marine Biology 57:87-93

Devlin J.P., Edwards O.E., Gorham P.R, Hunter N.R., Pike R.K. e Stavric B., 1977. Anatoxin-a, a toxic alcaloid from *Anabaena flos-aquae* NRC-44-1. Can. J. Chem. 55: 1367-1371.

De Vooys C.G.N., 1979. Anaerobic metabolism in sublittoral living *Mytilus galloprovincialis* in the mediterranean. I. Partial adaptation of anaerobic energy metabolism. Neth. J. Sea Res. 13:192-202

De Vooys C.G.N., 1987. Elimination of sand in the blue mussel , *Mytilus edulis*. Neth. J. Sea Res. 21(1):75-78

Dillenberg H.O. e Dehnel M.K. 1960 - Toxic waterbloom in Saskatchewan, 1959. Can. M.A.J., 83:1151-1154,

Dillon J.C. e Phan P.A., 1993. *Spirulina* as source of proteins in human nutrition. In "Spiruline algue de vie". F. Doumence, H. Durand-Chastel e A. Toulement (Eds.). Bull. Institut Oceanographique Monaco. Numero Special 12:103-107

Dinsdale M.T. e Walsby A.E., 1972. The interrrelations of cell turgor pressure, gas vacuolation, and buoyancy in a blue-green alga. J. Exp. Bot. 23:561-570

Dixon D.R., 1983. Sister chromatid exchange and mutagens in the aquatic environment. Mar. Pollut. Bull. 14:282-284

Donati C, Drikas M., Hayes R. e Newcombe G., 1993. Microcystin-LR adsorption by powdered activated carbon. Water Res. 28:1735-1742

Dral A.D.G., 1967. The movements of the latero-frontal cilia and the mechanism of particle retention in the mussel *Mytilus edulis* L.. Neth. J. Sea Res. 3(3):391-422

Droop M.R., 1974. Heterotrophy of carbon . In: Algal Physiology and Biochemistry, ed. W.D.P. Stewart, Oxford, Blackwell, Scientific: 530-559

Durand-Chastel H., 1993. Spiruline, algue de vie. In "Spiruline algue de vie". F. Doumence, H. Durand-Chastel e A. Toulement (Eds.). Bull. Institut Oceanographique Monaco 12: 7-11

Edler, L.; Fernö S., Lind M.G., Lundberg R. e Nilsson P.O., 1985. Mortality of dogs associated with a bloom of the cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea. Ophelia 24(2):103-109

Eriksson J.E., Hägerstrand H. e Isomaa B., 1987. Cell selective cytotoxicity of peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Biochem. Biophys. Acta, 930:304-310

Eriksson J.E., Meriluoto J.A.O. e Lindholm T., 1989. Accumulation of a peptide toxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* in the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. Hydrobiologia, 183:211-216

Eriksson J.E., Meriluoto J.A.O., Jujari H.P., Jamel Al-Layl K. e Codd G.A., 1988a. Cellular effects of cyanobacterial peptide toxins. Toxicity Assessment, 3: 511-517

Eriksson J.E., Meriluoto J.A.O., Kujari H.P., Österlund K., Fagerlund K. e Hällbom L., 1988b. Preliminary characterization of a toxin isolated from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. Toxicon 26:161-166

Eriksson J.E., Toivola D., Meriluoto J.A.O., Karaki H., Han Y.-G e Hartshorne D., 1990. Hepatocyte deformation induced by cyanobacterial toxins reflects inhibition of protein phosphatases. Biochem. Biophys. Res. Comm., 173:1347-1353

Fabregas J., Abalde J., Herrero C., Cabezas B. e Veiga M., 1984. Growth of the marine alga *Tetraselmis suecica* in batch cultures with different salinities and nutrient concentrations. Aquaculture 42(3/4):207-215

Falconer I.R., 1989. Effects on human health of some toxic cyanobacteria (blue-green algae) in reservoirs, lakes and rivers. Toxicity Assessment 4:175-184

Falconer I.R., 1991. Tumor promotion and liver injury by oral consumption of cyanobacteria. Environ. Toxicol. Water Quality, 6:177-184

Falconer I.R., 1993. Measurements of toxins from blue-green algae in water and foodstuffs. In " Algal toxins in seafood and drinking water". I.R. Falconer (Ed.) , Academic Press, London: 177-186

Falconer I.R. e Buckley T.H. 1989. Tumor promotion by *Microcystis* sp. a blue-green alga occurring in water supplies. Med. J. Aust., 150:351

Falconer I.R., Beresford A.M. e Runnegar M.T.C. 1983a. - Evidence of liver damage by toxin from a bloom of the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Med. J. Aust., 1:511-514

Falconer I.R., Choice A. e Hosja W. 1992. Toxicity of edible mussels (*Mytilus edulis*) growing naturally in an estuary during a waterbloom of the blue-green alga *Nodularia spumigena*. Env. Toxicol. Water Quality: An International Journal, 7:119-123

Falconer I.R., Runnegar M.T.C. e Huynh V.L., 1983b. Effectiveness of activated carbon in the removal of algae toxins from potable water supplies: a pilot plant investigation. Tenth Federal Convention of the Australian Water and Wastewater Association 26:1-8

Falconer I.R., Jackson A.R.B., Langley J. e Runnegar M.T.C., 1981. Liver pathology in mice in poisoning by the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. Aust. J. Biol. Sci. 34:179-187

Falconer I.R., Burch M.D., Choice A., Coverdale O.R. e Steffensen D.A., 1994. Effect of oral *Microcystis* extract on growing pigs as a model for human injury and risk assessment. Environ. Toxicol. and Water Quality: 9(2), 131-139

Falconer I.R., Smith J.V., Jackson A.R.B., Jones A. e Runnegar M.T., 1988. Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to one year. J. Toxicol. Environ. Health 24, 291-305

Falconer I.R., Runnegar M.T.C., Buckley T., Huyn V.L. e Bradshaw P. 1989. Use of powdered and granular activated carbon to remove toxicity from drinking water containing cyanobacteria bloom. Amer. Waterworks Assoc. J., 18:102-105

FAO, 1970. Toxic effect of *Anabaena* bloom. FAO Aquaculture Bulletin 3:14

Fattorusso E., Ciminiello P., Constantin V., Magno S., Mangoni A., Milandri A., Poletti R., Pompei M. e Viviani R., 1992. Okadaic acid in mussels of Adriatic Sea. Marine Pollution Bulletin 24(5):234-237

Fawel J.K., James C.P. e James H.A., 1994. Toxin from blue-green algae: toxicological assessment of microcystin-LR and a method for its determination in water. Report number FR 0359/2DoE 3358/2. Foundation for Water Research. U.K. 46 pp

Ferreira F., 1995. Caracterização bioquímica de cianotoxinas produzidas por duas espécies de cianobactérias (*Microcystis aeruginosa* Kutz e *Aphanizomenon flos-aquae* L. Ralfs) provenientes da albufeira de Crestuma-Lever (Rio Douro). Dissertação de Mestrado em Ecologia Aplicada. Faculdade de Ciências do Porto.

Flett D.J. e Nicholson B.C., 1991. Toxic cyanobacteria in water supplies: analytical techniques. Report number 26. Urban Water Research Association of Australia. Melbourne 61 pp

Fossato V.U. e Canzonier W.J., 1976. Hydrocarbon uptake and loss by the mussel *Mytilius edulis*. Marine Biology 36:243-250

Fossato V.U. e Siviero E., 1974. Oil pollution monitoring in the lagoon of Venice using the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Marine Biology 25:1-6

Foster-Smith R.L., 1975. The role of mucus in the mechanism of feeding in three filter-feeding bivalves. Proc. malc. Soc. Lond. 41:571-588

Frade F., 1951. A propósito da barragem de Castelo do Bode. Boletim da Comissão de Fiscalização das águas de Lisboa 32: 95-101

Frade F., 1954. Albufeira de Castelo do Bode. A água e alguns dos seus micro-organismos. Boletim da Comissão de Fiscalização das águas de Lisboa 35: 129-137

Francis G., 1878. Poisonous australian lake. Nature (London), 18:11-12

Galhano M.H., Branco R. e Guimarães C, 1991. Avaliação do estado trófico da albufeira da Bemposta através da sua comunidade planctónica. Rev. Biol. U. Aveiro, 4:1-12

Gerwick W.H., Roberts M.A., Proteau P.J. e Chen J.-L. 1994. Screening cultured marine microalgae for cancer-type activity. J. Appl. Phycol. 6:143-149

Gibson C.E. e Smith R.V., 1982. Freshwater plankton . In "The Biology of Cyanobacteria". N.G. Carr e B.A. Whitton (eds.) Oxford, Blackwell Scientific.: 463-490

Goldberg E.D., 1975. The mussel watch - a first step in global marine monitoring. Mar. Pollut. Bull. 6:111pp

Gorham P.R. e Carmichael W.W. - 1988 Hazards of freshwater blue-greens (cyanobacteria). In " Algae and Human Affairs", eds. Lembi, C.A. & Waaland, J.R., Ch 16, Cambridge, Cambridge University Press: 403-431,

Gromov B.V., Vepritskly A.A., Titova N.N., Mamkayeva A. e Alexandrova O.V., 1991. Production of the antibiotic cyanobacterin LU-1 by *Nostoc linckia* CLAU 892 (cyanobacterium). J. Appl. Phycol. 3:55-59

Grant N.G. e Walsby A.E., 1977. The contribution of photosynthate to turgor pressure rise in the planktonic blue-green alga *Anabaena flos-aquae*. J. Exp. Bot. 28, 409-415

Grauer F.H. e Arnold H.L., 1961. Seaweed dermatitis. Arch. Dermatol. 84:720-730

Grillo J.F. e Gibson J., 1979. Regulation of phosphate accumulation in the unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. J. Bact. 140: 508-517

* Hall S. e Reichardt P.B., 1984. Cryptic paralytic shellfish toxins. In. Seafood Toxins. E. Ragelis (Ed.). ACS Symposium Series , Washington, D.C.: 113-123

Harada K.-I., Matsuura K., Suzuki M., Watanabe M.F., Oishi S., Dahlem A.M., Beasley V.R. e Carmichael W.W., 1990. Isolation and characterization of the minor components associated with microcystins LR and RR in the cyanobacteria (blue-green algae). Toxicon 28:55-64

Harada K.-I., Ogawa K., Kimura Y., Murata H., Suzuki M., Thorn P.M., Evans W.R. e Carmichael W.W., 1991a. Microcystins from *Anabaena flos-aquae* NRC 525-17. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 534-540

Harada K.I., Matsuura K., Suzuki M., Oka H., Watanabe M.F., Oishi S., Dahlme A.M., Beasley V.R. e Carmichael W.W., 1988. Analysis and purification of toxic peptides from cyanobacteria by reverse-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. 448:275-283

Harada K.-I., Ogawa K., Matsuura K., Nagai H., Murata H., Suzuki M., Itezono Y., Nakayama M., Shirai M. e Nakano M., 1991b. Isolation of two toxc heptapeptide microcystins from an axenic strain of *Microcystis aeruginosa* K-139. Toxicon 29:479-489

Harrison F.L. e Berger R., 1982. Effects fo copper on the latency of lysosomal hexosaminidase in the digestive cells of *Mytilus edulis*. Marine Biology 68:109-116

Hawkins P.R., Runnegar M.T.C., Jackson A.R.B. e Falconer I.R., 1985. Severe hepatotoxicity caused by the tropical cyanobacterium (blue-green alga) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya and Subba Rafu isolated from a domestic water supply reservoir. Appl. Environ. Microbiol. 50:1292-1295

Hayes K.P. e Burch M.D., 1989. Odorous compound associated with algal blooms in South Australian waters. Water Res. 23:115-121

Healey F.P., 1973. Characteristics of phosphorus deficiency in *Anabaena*. J. Phycol. 9: 383-394

Healey F.P. e Hendzelk L.C., 1972. Physiological changes during thr course of blooms of *Aphanizomenon flos-aquae*. J. Fish. Res. Board Can. 33: 36-41

Heise H.A., 1949. Symptoms of hay fever caused by algae. J. Allergy, 20:383-385

* Henley D.E., 1970. Odorous metabolite and other selected studies of cyanophyta. Ph.D. thesis. North Texas State University, Denton, Texas.

Himberg K., Keijola A.M., Hiisvirta L., Pyysalo H e Sivonen K., 1989. The effect of water treatment processes on the removal of hepatotoxins from *Microcystis* and *Oscillatoria* cyanobacteria species: a laboratory study. Water Res 23:979-

Honkanen R.E., Zwiller J., Moore R.E., Daily S.L., Khatra B.S., Dukelow M.e Boynton A.L., 1990. Characterization of microcystin-LR, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases. J. Biol. Chem. 265(32), 19401-19404

Horne A.J.; Sandusky J.C. e Carmiggelt C.J.N., 1979. Nitrogen fixation in Clear lake, California. 3. Repetitive synoptic sampling of the spring Aphanizomenon flos-aquae blooms. Limnol. Ocenaogr. 24(2):316-328

Istvánovics V., Pettersson K., Rodrigo M.A., Pierson D. Padisák J. e Colom W., 1993. *Gloeotrichia echinulata*, a colonial cyanobacterium with a unique phosphorus uptake and life strategy. J. Plankton Research 15:531-552

Izaguirre G., Hwang C.J., Krasner S.W. e McGuirre M.J., 1982. Geosmin and 2-methylisoborneol from cyanobacteria in three water supply systems. Appl. Environ. Microbiol. 43: 708-714

Jamel Al-Layl K., Poon G.K. e Codd G.A., 1988. Isolation and purification of peptide and alkaloid toxins from *Anabaena flos-aquae* using high performance thin layer chromatography. J. Microbiol. Methods 7, 251-258

Jones G.J. e Orr P.T., 1994. Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. Water Res. 28:871-876

Jones G.J., Falconer I.R e Wilkins R.M., 1995. Persistence of cyclic peptide toxins in dried *Microcystis aeruginosa* crusts from lake Mokoan, Australia. Env. Toxicol. Water Quality: An Int. Journal 10:19-24

Jones K.J., Ayles P., Bullock A.M., Roberts R.J. e Tett P., 1982. A red tide of *Gyrodinium aureolum* in sea lochs of the Firth of Clyde and associated mortality of pond-reared salmon. J. mar. Biol. Ass. U.K. 62:771-782

Jørgensen C.B., 1981a. Feeding and cleaning mechanisms in the suspension feeding bivalve *Mytilus edulis*. Marine Biology 65:159-163

Jørgensen C.B., 1981b. A hydromechanical principle for particle retention in *Mytilus edulis* and other ciliary suspension feeders. Marine Biology 61:277-282

Kao C.Y., 1993. Paralytic Shellfish Poisoning. In "Algal Toxins in Seafood and Drinking Water". I.R. Falconer (Ed.) Academic Press, London: 75-86

Kat M., 1979. The occurrence of *Prorocentrum* species and coincidental gastrointestinal illness of mussel consumers. In "Toxic dinoflagellate blooms", D. Taylor and H.H. Seliger (eds.), Elsevier, North-Holland, Amsterdam: 215-220

Kato T., Watanabe M.F. e Watanabe W., 1991. Allozyme divergence in *Microcystis* (Cyanophyceae) and its taxonomic inference. Algological Studies. 64:129-140

Kay R.A., 1991. Microalgae as food and supplement. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 30:555-573

Kaya K. e Watanabe M.M., 1990. Microcystin composition of an axenic clonal strain of *Microcystis viridis* and *Microcystis viridis*-containing waterblooms in Japanese freshwaters. J. appl. Phycol. 2:173-178

Keijola A.M., Himberg K., Esala, Sivonen K. e Hiisvirta L., 1988. Removal of cyanobacterial toxins in water treatment processes: laboratory and pilot scale experiments. Toxicity Assessment: an International Journal 3:643-656

Kenefick S.L., Hrudey S.E., Prepas E.E., Motkosky N. e Peterson H.G., 1992. Odorous substances and cyanobacterial toxins in prairie drinking water sources. Water Sci. Tech. 25: 147-154

Kfir R.E., Johannsen e Botes D.P., 1986. Monoclonal antibody specific for cyanoginosin-LA: preparation and characterization. Toxicon 24:543-552

Kiviranta J, Sivonen K. e Niemelä S.I., 1992b. Detection of toxicity of cyanobacteria by *Artemia salina* bioassay. Env. Toxicol. Water Quality: An Int. Journal 6:423-436

Kiviranta J., Sivonen K., Lahti K., Luukkainen R. and Niemelä S.I., 1991. Production and biodegradation of cyanobacterial toxins - a laboratory study. Arch. Hydrobiol. 121, 281-294

Kiviranta J., Namikoshi M., Sivonen K., Evans W.R., Carmichael W.W. e Rinehart K.L., 1992a. Structure determination and toxicity of a new microcystin from *Microcystis aeruginosa* strain 205. Toxicon 30: 1093-1098

Komárek J., 1991. A review of water-bloom forming *Microcystis* species, with regard to populations from Japan. - Algological Studies 64:115-127

Konopka A., 1984. Effect of light-nutrient interactions on buoyancy regulation by planktonic cyanobacteria. In "Current Perspectives in Microbial Ecology,", M.J. Klung and C.A. Reddy (eds.), Washington D.C., Am. Soc. Microbiol: 41-48

Kotai J., 1972. Instructions for preparation of modified nutrient solution Z8 for algae. Norwegian Institute for Water Research. B -11/69. Blindern. Oslo: 5

Krishnamurthy T., Carmichael W.W. e Sarver E., 1986. Toxic peptides from freshwater cyanobacteria (blue-green algae). I. Isolation, purification and characterization of peptides from *Microcystis aeruginosa* and *Anabena flos-aquae*. Toxicon 24:865-873

Krishnamurthy T., Szafraniec L., Hunt D.F., Shabanowitz J., Yates III Jr., Hauer C.R., Carmichael W.W., Skulberg O.M., Codd G.A. e Missler S., 1989. Structural characterization of toxic cyclic peptides from blue-green algae by tandem mass spectrometry. - Proc. natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:770-774

Kusumi T., Ooi T., Watanabe M.M., Takashi H. e Kakisawa H., 1987. Cyanoviridin RR, a toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis viridis*. Tetrahedrom Lett. 28:4695-4698

Lambert T.W., Boland M.P., Holmes C.F.B. e Hrudey S.E., 1994. Quantitation of the microcystin hepatotoxins in water at environmentally relevant concentrations with the protein phosphatase bioassay. Environ. Sci. Technol. 28:753-755

Lanaras T., Tsitsamis S., Chlichlia C. e Cook C.M., 1989. Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters. J. Appl. Phycol. 1:67-74

Lawton L.A., Campbell D.L., Beattie K.A. e Codd, G.A., 1990. Use of a rapid bioluminescence assay for detecting cyanobacterial microcystin toxicity. Letters in Applied Microbiology 11:205-207

Lesser M.P. e Shummway S.E., 1993. Effects of toxic dinoflagellates on clearance rates and survival in juvenile bivalve moluscs. J. Shellfish Research 12(2), 377-381

Leewangh P., Kappers F.I., Dekker M. e Koerselman W., 1983. Toxicity of cyanobacteria in Dutch lakes and reservoirs. Aquat. Toxicol. 4:63-72

Lehtimaki J., Sivonen K., Luukkainen R. e Niemelä S.I., 1994. The effects of incubation time, temperature, light, salinity and phosphorus on growth and hepatotoxin production by *Nodularia* strains. Arch. Hydrobiol. 130: 269-282

Lindholm T. e Meriluoto J.A.O., 1991. Recurrent depth maxima of the hepatotoxic cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. Can.J. Fish. Aquat. Sci. 48(8): 1629-1634

Lindholm T., Eriksson J.E. e Meriluoto J.A.O., 1989. Toxic cyanobacteria and water quality problems - Examples from a eutrophic lake on Åland, South West Finland. Water Res. 23(4): 481-486

Livingstone D.R. e Farrar S.V., 1984. Tissue and cellular distribution of enzyme activities of mixed-function oxygenase and benzo(a)pyrene metabolism in the common mussel *Mytilus edulis* L. Sci. Tot. Environ. 39:209-235

Loosanoff V.L. e Engle, 1947. Effect of different concentrations of microorganisms on the feeding of oysters. Fishery Bull. Fish Wildl. Serv. U. S. 51:31-57

Luckenbach M.W., Sellner K.G., Shumway S.E. e Greene K., 1993. Effects of two bloom-forming dinoflagellates, *Prorocentrum minimum* and *Gyrodinium uncatenum*, on the growth and survival of the eastern oyster, *Cassostrea virginica* (Gmelin 1797). J. Shellfish Research 12(2):411-415

Lund J.W.G., Kipling C. e LeCren E.D., 1958. The inverted microscope methods of estimating algal numbers and the statistical basis of estimation by counting. Hydrobiologia 11:143-170

Luu H.A., Chen D.Z.X., Magoon J., Worms J., Smith, J. e Holmes C.F.B., 1993. Quantification of diarrhetic shellfish toxins and identification of novel protein phosphatase inhibitors in marine phytoplankton and mussels. Toxicon, 31(1):75-83

Luukkainen R., Namikoshi M., Sivonen K., Rinehart K.L. e Niemelä S.I., 1994. Isolation and identification of 12 microcystins from four strains and two bloom samples of *Microcystis* spp.: structure of a new hepatotoxin. Toxicon 32:133-139

Luukkainen R., Sivonen K., Namikoshi M., Färdig M., Rinehart K.L. e Niemelä S.I., 1993. Isolation and identification of eight microcystins from thirteen *Oscillatoria agardhii* strains and structure of a new microcystin. Appl. Environ. Microbiol. 59:2204-2209

MacDonald D.W., 1960. Algal poisoning in beef cattle. Can. Vet. J. I(3):108-110

MacKintosh C., Beattie K.A., Klummp S., Cohen P e 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, 264(2):187-192

Madenwald N.D., 1985. Effect of water temperature on the loss of paralytic shellfish poison from the butter clam *Saxidomus giganteus*. In "Toxic dinoflagellates" Anderson, D.M., A. W. White & D.G. Baden (eds.) . Elsevier Science Publishing, New York, NY: 479-484

Mahmood N.A. e 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. e Pfahler D., 1988. Anticholinesterase poisonings in dogs from cyanobacterial (blue-green alga) bloom dominated by *Anabaena flos-aquae*. American Journal of Veterinary Research 49:500-503

Main D.C., Berry P.H., Peet R.L. e Robertson J.P., 1977. Sheep mortalities associated with the blue-green alga *Nodularia spumigena*. Aust. Vet. J., 53:578-581

Manahan S.E., 1993. Toxicological Chemistry. 2nd Edition. Lewis Publishers, Michigan: 449 pp

Manley A.R., 1983. The effects of copper on the behaviour, respiration, filtration and ventilation activity of *Mytilus edulis*. J. mar. biol. Ass. U.K. 63:205-222

Marcalliot-Le Baut C., Delmas D., Herbland A., Gentien P., Maestrini S.Y., Lassus P. e Masselin P., 1993. Cinétique de contamination de moules *Mytilus edulis* exposées à une population naturelle de Dinoflagellés *Dinophysis* spp. C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la Vie/Life Sciences 316: 1274-1276

Marsden I.D., 1993. Effects of algal blooms on shellfish biology amd metabolism. Proceedings of the workshop "Marine toxins and New Zealand shellfish", Royal Society of New Zealand, Miscellaneous Series 24: 23-27

Mardsen I.D. e Shummway S.E., 1993. The effect of a toxic dinoflagellate (*Alexandrium tamarense*) on the oxygen uptake of juvenile filter-feeding bivalve moluscs. Comp. Biochem. Physiol. 106A(4), 769-773

Martin J.F., Bennett L.W.e Graham W.H., 1988. Off-flavor in the channel catfish (*Ictalurus punctatus*) due to 2-methylisoborneol and its dehydratation products. Water Sci. Tech. 20: 99-105

Martin J.F., Izaguirre G. e Waterstrat P., 1991. A planktonic *Oscillatoria* species from Mississipi catfish ponds that produces the off-flavor compound 2-methylisoborneol. Water Research 25: 1447-1451

Matsumoto A. e Tsuchiya Y., 1988. Earthy-musty odor-producing cyanophytes isolated from five water areas in Tokyo. Water Sci. Technol. 20:117-123

Mattson N.S., Egidius E e Solbakken J.E., 1988. Uptake and elimination of (Methyl-^{14}C) trichlorofon in the blue mussel (*Mytilus edulis*) and european oyster (*Ostrea edulis*). Impact of Neguvon® disposal on molusc farming. Aquaculture 71:9-14

McGuirre M.J., Krasner S.W., Hwang C.J. e Izaguirre G., 1981. Closed-loop stripping analysis as a tool for solving taste and odor. J. Am. Water Works Assoc. 73: 530-537

Meriluoto J.A.O., Sandström A., Eriksson J.E., Remaud G., GreyCraig A., Chattopadhyaya J., 1989. Structure and toxicity of a peptide hepatotoxin from the cyanobacterium *Oscillatoria agardhii*. Toxicon 27:1021-1034

Mittal A., Agarwal M.K. e Shivpuri D.N. , 1979. Respiratory allergy to algae: clinical aspects. Annals of Allergy, 42:253-256

Moita M.T., 1992. Alguns aspectos sobre a ecologia do fitoplancton tóxico na costa portuguesa. Resumos do 2º Encontro de Planctonologistas Portugueses. Univ. Algarve, Faro.

Moore M.N., 1976. Cytochemical demonstration of latency of lysosomal hydrolases in digestive cells of the common mussel *Mytilus edulis* and changes induced by thermal stress. Cell Tissue Res. 175:279-287

Moore M.N., Lowe D.M., Livingstone D.R. e Dixon D.R., 1986. Molecular and cellular indices of pollutant effects and their use in environmental impact assessment. Wat. Sci. Tech. 18:223-232

Moriarty F., 1990. Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems. 2nd Edition. Academic Press LDT. London: 289 pp

Morris P.D., Taylor T.J. e Freeman J.I., 1991. Clinical and epidemiological features of neurotoxic shellfish poisoning in North Carolina. Am. J. Public Health 81, 471-474

Mulligan M.E., Jackman D.M. e Murphy S.T., 1994. Heterocyst-forming filamentous cyanobacteria encode proteins that resemble eucaryotic RNA-binding proteins of the RNP family. J. Mol. Biol. 235:1162-1170

Mundt S., Effmert U., Granitzka V., Novotny A.e Teuscher E., 1991. Immunosuppressive substances from blue-green algae. Agents and Actions, 32:117-118

Namikoshi M., Rinehart K.L., Sakai R., Sivonen K. e Carmichael W.W., 1990. Structures of three new cyclic heptapeptide hepatotoxins produced by the cyanobacterium (blue-green alga) *Nostoc* sp. strain 152. J. Org. Chem. 55: 6135-6139

Namikoshi M., Sivonen K., Evans W.R., Sun F., Carmichael W.W. e 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., Sun F., Carmichael W.W. e Rinehart K.L., 1992c. Isolation and structure 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. e Rinehart K.L., 1992d. Structure of three new homotyrosine-containing microcystins and a new homophenylalanine variant from *Anabaena* sp. strain 66. Chem. Res. Toxicol. 5:661-666

Namikoshi M., Rinehart K.L., Sakai R., Stotts R.R., Dahlem A.M., Beasley V.R., Carmichael W.W. e Evans W.R., 1992a. Identification of 12 hepatotoxins from a Homer lake bloom of the cyanobacteria *Microcystis aeruginosa, Microcystis viridis* and *Microcystis wesenbergii:* nine new microcystins. - J. org. Chem. 57:661-666

Namikoshi M., Choi B.W., Sakai R., Sun F., Rinehart K.L. Carmichael W.W., Evans W.R., Cruz P., Munro M.H.G. e Blunt J.W., 1994. New nodularins: a general method for structure assignement. J. Org. Chem. 59:2349-2357

Nakano M., Nakano Y., Saito-Taki T., Mori N., Kogima M., Ohtake A. e Shirai M., 1989. Toxicity of *Microcystis aeruginosa* K-139 strain. Microbiol. Immunol. 33:787-792

Nauwerck A., 1959. Beitrag zur kenntuis des phytoplanktons portugiesischer gewasser. Bol. Soc. Brot. XXXIII, 2ª Série: 223-231

Nauwerck A., 1962. Zur systematik und okologie portugiesischer planktonalgen. Bol. Soc. Brot. XV:7-56

Nichols J.M. e Adams D.G., 1982. Akinetes. In "The Biology of Cyanobacteria". N.G. Carr e B.A. Whitton (eds.), Oxford, Blackwell Scientific: 387-412

Nicholson B.C., Rositano J. e Burch M.D., 1994. Destruction of cyanobacteria peptide hepatotoxins by chlorine and chloramine. Water Res. 28: 1287-1303

Nishiwaki-Matsushima R., Ohta T., Nishiwaki S., Suganuma M., Kohyama K., Ishikawa T., Carmichael W.W.e Fujiki H., 1992. Liver cancer promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 118:420-424

Nolan C., Sabbioni E., Duke E. e Marafante E., 1984. Estimation of cadmium toxicity using cadmium -binding ligands in the edible mussel *Mytilus edulis*. In "Ecotoxicological testing for the marine environment", G. Persoone, E. Jaspers and C. Claus (eds.). State Univ. Ghent and Inst. Mar. Sci. Scient. Res., Bredene, Belgium. Vol. 2.: 417-430

Novaczek I., Madhyastha M.S., Ablett R.F., Donald A., Johnson G., , Nijjar M.S. e Sims D.E., 1992. Depuration of domoic acid from live blue mussels (*Mytilus edulis*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 49:312-318

Ohtani I., Moore R.E. e Runnegar M.T.C., 1992. Cylindrospermopsin: a potent hepatotoxin from the blue-green alga *Cylindrospermopsis raciborskii*. J. Am. Chem. Soc. 114:7942-7944

Oishi S. e Watanabe M.F., 1986. Acute toxicity of *Microcystis aeruginosa* and its cardiovascular effects. Environ. Res. 40:518-524

Oliveira M.R., 1977. Estudo limnológico das albufeiras de Belver e Fratel. Estudo do plancton. Relatório INIP, Lisboa: 20-67

Oliveira M.R., 1982a. Composição específica, densidade e dinâmica sazonal do fitoplancton das albufeiras de Bouçã, Cabril, Santa Luzia e Pracana. Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas, 8:5-25

Oliveira M.R., 1982b. Fitoplancton da albufeira de Idanha. Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas, 8:59-69

Oliveira M.R., 1984c. Contribuição para o conhecimento das comunidades fitoplanctónicas das albufeiras a sul do Tejo. Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas 11:3-27

Oliveira M.R., 1984b. Dinâmica sazonal do fitoplancton numa albufeira eutrofizada. "Blooms" e sucessão de espécies na albufeira de Divor. Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas 11:45-57

Oliveira M. R., 1984c. Estrutura da comunidade fitoplanctónica e dinâmica dos "blooms" na albufeira do Maranhão. Bol. Inst. Nac. Invest. Pescas 12:37-69

Oliveira M.R.S.L., 1987. Estrutura de comunidades fitoplanctónicas em albufeiras portuguesas. Dissertação para Investigador Auxiliar INIP Lisboa: 307 pp.

Oliveira M.R., 1989. Estrutura das comunidades de fitoplancton nas lagoas das Sete Cidades, Açores. Relat. Téc. Cient. INIP 8:27 pp

Oliveira M.R., 1991. Eutrofização do rio Guadiana. "Blooms" de Cyanophyceae e influência na ictiofauna. Relat. Téc. Cient. INIP, 42:24 pp

Oliveira M.R.L. e Caldas A.M.P., 1970. Contribuição para o estudo do fito e zooplancton do Rio Almonda. Estudos e Informação. Direcção-Geral dos Serviços Florestias e Aquícolas, 250:37 pp

Oliveira M.R.L. e Monteiro M.T., 1992. "Blooms" de Cyanophyceae na albufeira da Aguieira - efeitos na qualidade da água e no zooplancton. Relat. Téc. Cient. INIP, Lisboa 61: 57 pp

Oliveira M.R.L. e Monteiro M.T., 1993. Caracterização biológica do sistema de abastecimento de água a Évora. Relat. Téc. Cient. INIP Lisboa 68: 43 pp

Oliveira M.R., Monteiro M.T. e Coutinho M.T.P., 1989. Estudo da estrutura e dinâmica das comunidades planctónicas do rio Tejo, nos troços de Fratel, Barquinha e Valada. Relat. Téc. Cient. INIP 11:53 pp

Oliveira S.S., 1994. Cultura de estirpes de cianobactérias tóxicas. Avaliação da sua toxicidade e isolamento de toxinas. Relatório de Bolsa BJI. Projecto PBIC/CEN/1142/92. Faculdade de Ciências do Porto.

* Olsen G.J., 1990. Variation among the masses. Nature 345:20-21

Ooi T., Kusumi T., Kakisawa H. e Watanabe M.M. (1989) Structure of cyanoviridin RR, a toxin from the blue-green alga *Microcystis viridis*. *J. appl. Phycol.* 1, 31-38

* Oshima Y., Kotaki Y, Harada T. e Yasumoto T., 1984. Paralytic shellfish toxins in tropical waters. In "Seafood Toxins" E. Ragelis (Ed.), ACS Symposium Series, Washington, D.C.: 161-170

Paerl H.W., 1985. Nuisance algal blooms in lakes, rivers and coastal marine waters. In. Comparative Ecology of Freshwater and Coastal Marine Ecosystems, ed. S.W. Nixon, Porc. UNESCO Symp. Am Soc. Limnol. Oceanogr. Publ.

Paerl H.W., 1991. Growth and reproductive strategies of freshwater blue-green algae (Cyanobacteria). In "Growth and reproductive strategies of freshwater phytoplankton". Ed. C.D. Sandgren, Cambridge University Press, Cambridge: 261-315

Patterson G.M.L., Larsen L.K. e Moore R. E., 1994. Bioactive natural products from blue-green algae. J. Appl. Phycol. 6: 151-157

Perl M.D., Trish M., Bedard L., Kosatsky T., Hockim J.C., Todde C.D. e Remis R.S., 1990. An outbreak of toxic encephalopathy caused by eating mussels contaminated with domoic acid. New Eng. J. Med. 332: 1775-1780

Pearson M.J., 1990. Toxic blue-green algae. report of the National Rivers Authority. water Quality Series nº 2. Stanley L. Hunt. Peterborough, United Kingdom.pp

Persson P.-E., 1978. Muddy off-flavour in bream (*Abramis brama* L.) from the Porvoo area, Gulf of Finland. Verh. Internat. Verein. Limnol. 20:2098-2102

Persson P.-E., 1979. The source of muddy odor in bream (*Abramis brama*) from the Porvoo sea area (Gulf of Finland). J. Fish. Res. Board Can. 36:883-890

Persson P.-E., 1980. Sensory properties and analysis of two muddy odour compounds, geosmin and 2-methylisoborneol, in water and fish. Water Research 14:1113-1118

Persson P.-E., 1983. Off-flavours in aquatic ecosystems - an introduction. Water Sci. Tecnhol. 15: 1-11

Persson P.-E. e York R.K., 1978. Notes on muddy odour. I. Sensory properties and analysis of 2-methylisoborneol in water and in fish. Aqua Fennica 8:83-88

Phillips D.J.H., 1976a. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. Marine Biology 38:59-69

Philips D.J.H., 1976b. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. II. Relationship of metals in the mussel to those discharged by industry. Marine Biology 38:71-80

Philips M.J., Roberts R.J., Stewart J.A. e Codd G.A., 1985. The toxicity of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Diseases 8: 339-344

Plusquellec A., Beucher M. e Le Gal Y., 1983. Enumeration of the bacterial contamination of bivalves in monitoring the marine bacterial pollution. Marine Pollution Bulletin 14(7):260-263

Plusquellec A., Beucher M., Prieur D. e Le Gal Y., 1990. Contamination of the mussel *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758, by enteric bacteria. J. Shellfish Res. 9(1):95-101

Porter J. e Jost M., 1976. Physiological effects of the presence and absence of gas vacuoles in the blue-green alga Microcystis aeruginosa Kuetz. emend Elekin. Arch. Hydrobiol. 110:225-231

Póvoa dos Reis M., 1984. Contribuição para o conhecimento das Cyanophyta da Ria de Aveiro. Bol. Soc. Brot. Série 2, 57:261-264

Prakash A., Medcof J.C. e Tennant A.D., 1971. Paralytic Shellfish Poisoning in Eastern Canada. Bull. Fish. Res. Board Can. 117: 1-88

Råberg C.M.I., Bylund G. e Eriksson J.E., 1991. Histopathological effects of microcystin-LR, a cyclic peptide toxin from the cyanobacterium (blue-green alga) *Microcystis aeruginosa* on common carp (*Cyprinus carpio* L.) Aquatic Toxicology 20:131-146

Rao C.S.V.R., 1994. Antimicrobial activity of cyanobacteria. Indian J. Marine Sciences 23:55-56

Rapala J., Sivonen K., Luukkainen R. e Niemelä S.I., 1994. Anatoxin-a concentration in *Anabaena* and *Aphanizomenon* under different environmental conditions and comparision of growth by toxic and non-toxic *Anabaena*-strains - a laboratory study. J. Appl. Phycol. 5:581-591

Repavich W.W., Sonzogni W.C., Standridge J.H., Wedepoh R.E. e Meisner L.F., 1990. Cyanobacteria (blue-green algae) in Wisconsin waters: acute and chronic toxicity. Water Res. 24: 225-231

Reynolds C.S., 1972. Growth, gas vacuolation and bouyancy in a natural population of a blue-green alga. Freshwater Biol. 2:87-106

Reynolds C.S., 1980. Cattle deaths and blue-green alage: a possible instance from Cheshire, England. J. Inst. Water Eng. Sci. 34(1):74-76

Reynolds C.S. e Walsby A.E., 1975. Watre blooms. Biol. Rev. 50:437-481

Reynolds C.S., Tundisi J.G. e Hino K., 1983. Observations on a metalimnetic *Lyngbya* population in a stably stratified tropical lake (Lago Carioca, Eastern Brasil). Arch. Hydrobiol. 97(1): 7-17

Richard D.S., Beattie K.A. e Codd G.A., 1983. Toxicity of cyanobacterial blooms from scottish freshwaters. Env. Technol. Lett. 4:377-382

Rinehart K.L., Namikoshi M. e Choi B.W., 1994. Structure and byosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). J. Appl. Phycol. 6: 159-176

Rodger H.D., Turnbill T., Edwards C. e Codd G.A., 1994. Cyanobacterial (blue-green algal) bloom associated pathology in brown trout, *Salmo truta* L., in Loch Leven, Scotland. J. Fish Diseases 17:177-181

Rodrigues J.E.M., 1963. Contribuição para o conhecimento das algas de água doce de portugal. II. Bol. Soc. Broteriana XXXVII: 45-62

Rodrigues A.M.F., Santos M.C.R., Sobral P. e Santana F.J.P., 1993. Estudo da comunidade fitoplanctónica nas lagoas das Sete Cidades, Furnas e Fogo (Ilha de S. Miguel, Açores). Boletim UCA U.C.T.R.A. Algarve 1: 42-57

Roenneberg T. e Carpenter E.J., 1993. Daily rhythms of oxygen. Evolution in the cyanobacterium *Trichodesmium thiebautii* under natural and constant conditions. J. Interdiscipli. Cycle Res. 24: 232-233

Roesijadi G., Unger M.E. e Morris J.E., 1988. Immunochemical quantification of metallothioneins of a marine mollusc. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 45:1257-1263

Roesijadi G., Drum A.S., Thomas J.T. e Fellingham G.W., 1982. Enhanced mercury tolerance in marine mussels and relationship to low molecular weight, mercury-binding proteins. Mar. Pollut. Bull. 13:250-253

Rositano J. e Nicholson B.C., 1994. Water treatment techniques for the removal of cyanobacterial toxins from water. Technical Report. Australian Centre for Water Treatment and Water Quality Research. Salisbury, South Australia: 53 pp

Rother J.A. e Fay P., 1979. Blue-green algal growth and sporulation in response to stimulated surface bloom conditions. Br. Phycol. J. 14:59-68

Runnegar M.T.C. e Falconer I.R., 1982. The in vivo and in vitro biological effects of the peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. South Afr. J. Sci. 78:363-366

Sampaio J., 1933a. Apontamentos para o estudo das cianófitas portuguesas. Anais Fac. Ciências Porto. XVIII: 49-59

Sampaio J., 1933b. Subsídios para o estudo das cianófitas portuguesas. Anais Fac. Ciências Porto. XVIII: 142-153

Sampaio J., 1934. Subsídios para o estudo das cianófitas portuguesas. Anais Fac. Ciências Porto. XIX: 97-105

Sampaio J., 1936. Subsídios para o estudo das cianófitas portuguesas. Anais Fac. Ciências Porto. (3ª Série). XXII: 250-254

Sampaio J., 1938. Subsídios para o estudo das cianófitas portuguesas. (3ª Série). Anais Fac. Ciências Porto. XXIII:47-49

Sampaio J., 1940. Subsídios para o estudo das cianófitas portuguesas. (4ª Série). Anais Fac. Ciências Porto. XXV:163-171

Sampaio J., 1941a. Subsídios para o estudo das cianófitas portuguesas. (5ª Série). Anais Fac. Ciências Porto. XXVI: 50-64

Sampaio J., 1941b. Subsídios para o estudo das cianófitas portuguesas. (6ª Série). Anais Fac. Ciências Porto. XXVI: 102-116

Sampaio J., 1942. Subsídios para o estudo das cianófitas portuguesas. (7ª Série). Anais Fac. Ciências Porto. XXVII: 117-126

Sampaio J., 1947. Subsídios para o estudo das cianófitas portuguesas. (8ª Série). Anais Fac. Ciências Porto. XXXII: 182-216

Sampaio J., 1951. Subsídios para o estudo das cianófitas das águas termais portuguesas. Pub. Inst. Botânico "Dr. Gonçalo Sampaio", 2ª Série, 6:6 pp

Sampayo M.A.M., 1989. Red tides off the Portuguese coast. In "Red Tides: Biology, Environmental Science and Toxicology", Okaichi et al. (eds.). Elsevier Science Publishing, New York: 89-92

Sampayo M.A.M., 1992. Fitoplancton tóxico na costa portuguesa. Abstracts 2º Encontro de Planctonologistas Portugueses. Univ. Algarve, Faro.

Sampayo M.A.M., Alvito P., Franca S. e Sousa I., 1990. Dinophysis spp. Toxicity and relation to accompanying species. In "Toxic marine phytoplankton", Graneli E. et al. (eds.). Elsevier Science Publishing, New York: 215-220

Sandström, Glemarec C., Meriluoto J.A.O., Eriksson J.E. e Chattopadhyaya J., 1990. Structure of a hepatotoxic pentapeptide from the cyanobacterium *Nodularia spumigena*. Toxicon 28:535-540

Santos M.C.R., Rodrigues A.M.F., Sobral. P. e Santana F., 1992. A eutrofização de meios lacustres. Lagoa das Sete Cidades e Lagoa das Furnas. Actas da III Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente. Vol. I: 217-228

Santos M.F., 1973. Contribuição para o conhecimento das algas de água doce de Portugal. III. Bol. Soc. Brot. XLVII, 2ª Série:105-124

Santos M.F., 1976. Contribuição para o conhecimento das algas de água de água doce de Portugal. V. Bol. Soc. Brot. L, 2ª Série:169-230

Santos M.F., 1988. ACOI - the culture collection of algae of the Department of Botany university of Coimbra. Bol. Soc. Brot. Série 2, 61:267-277

Santos M.F. e Mesquita J.F., 1986. The culture collection of algae of the Department of Botany University of Coimbra. Bol. Soc. Brot. Série 2, 59:353-373

Saunders G.W., 1972. Potential heterotrophy in a natural population of *Oscillatoria agardhii* var. *isothrix* Skuja. Limnol. Oceanogr. 17: 704-711

Saunders B.M. e Martin L.S., 1993. Stress proteins as biomarkers of contaminant exposure in archived environemental samples. The Science of the Total Environment 139/140:459-470

* Schopf J. W. e Walter M.R., 1983. Archean microfossils: new evidence of ancient microbs. In ""Earth's Earliest Biosphere, its origin and evolution", Schopf, J.W. (ed.) . Princeton University Press, Princeton, N.Y.: 214-239

Schulte E.H., 1975. Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. Marine Biology 30:331-341

Schwimmer M. e Schwimmer D., 1967. Medical aspects of phycology. In " Algae, Man and the Environment",D.F. Jackson (ed.), Syracusa University Press, New York: 279-358

Shapiro J., 1984. Blue-green dominance in lakes: the role and management significance of pH and CO2. Int. Revue ges. Hydrobiol. 69(6):765-780

* Shimizu Y., Kobayashi M., Genenah A. e Ichihara N., 1984. Biosynthesis of paralytic shellfish toxins. In "Seafood Toxins" E. Ragelis (Ed.), ACS Symposium Series, Washington DC: 151-160

Shirai M., Ohtake A., Sano T., Matsumoto S., Sakamoto T., Sato A., Aida T., Harada K.-I., Shimada T., Suzuki M. e Nakano M., 1991. Toxicity and toxins of natural blooms and isolated strains of *Microcystis* spp. (cyanobacteria) and improved procedure for purification of cultures. - Appl. environ. Microbiol. 57:1241-1245

Shumway S.E., 1990. A review of the effects of algal blooms on shellfish and aquaculture. J. World Aquacult. Soc. 21(2):65-104

Shumway S.E. e Cucci T.R., 1987. The effects of the toxic dinoflagellate *Protogonyalax tamarensis* on the feeding and behaviour of bivalve moluscs. Aquat. Toxicol. 10: 9-27

Silva E., 1985. Ecological factors related to *Prorocentrum minimum* blooms in Óbidos lagoon (Portugal). In "Toxic Marine Phytoplankton". Anderson, D. et al. (eds.). Elsevier Science Publishing. New York:445-450

Silva M.M.C., 1989. About the phytoplankton community in a lotic section of river Tejo (Pego site). Pub. Inst. Zool. "Dr. A. Nobre" 215:15 pp

Simpson M.R. e McLeod B.N., 1991. Comparison of various powdered activated carbons for the removal of geosmin and 2-methylisoborneol in selected water conditions. Proc. Annual Conf. AWWA: 445

Sim A.T.R. e Mudge L.-M., 1993. Protein phosphatase activity in cyanobacteria: consequences for microcystin toxicity analisys. Toxicon 31:1179-1186

Sivonen K., 1990. Effects of light, temperature, nitrate, orthophosphate, and bacteria on growth of and hepatotoxin production by *Oscillatoria agardhii* strains. Appl. Environ. Microbiol. 56, 2658-2666

Sivonen K., Namikoshi M., Evans W.R., Carmichael W.W. e Rinehart K.L., 1992d. Two methyl ester derivatives of microcystin, cyclic heptapeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA 83/1. Toxicon 30:1465-1471

Sivonen K., Carmichael W.W., Namikoshi M., Rinehart K.L., Dahlem A.M. e Niemelä S.I., 1990b. Isolation and characterization of hepatotoxic microcystin homologs from the filamentous freshwater cyanobacterium *Nostoc* sp. strain 152. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2650-2657

Sivonen K., Namikoshi M., Evans W.R., Gromov B.V., Carmichael W.W. e Rinehart K.L., 1992c. 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., Lepistö L., Luomi T.H.e Räsänen L.A., 1990a. 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. e Rinehart K.L., 1992b. Two methyl ester derivatives of microcystins, cyclic hepatpeptide hepatotoxins, isolated from *Anabaena flos-aquae* strain CYA83/1. - Toxicon 30:1465-1471

Sivonen K., Namikoshi M., Evans W.R., Carmichael W.W., Sun F., Rouhiainen L., Luukkainen R. e Rinehart K.L., 1992a. Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus *Anabaena*. - Appl. envir. Microbiol. 58:2495-2500

Sivonen K., Namikoshi M., Luukkainen R., Färdig M., Rouhiainen L., Evans W.R., Carmichael W.W. Rinehart K.L. e Niemelä S.I. (in press): Variations of cyanobacterial hepatotoxins in Finland. - Ecovision World Monograph Series

Skjoldal H.R. e Barkati S., 1982. ATP content and adenylate energy charge of the mussel *Mytilus edulis* during the annual reproductive cycle in Lindåspollene, Western Norway. Marine Biology 70:1-6

Skulberg O.M., Codd G.A. e Carmichael W.W., 1984. Toxic blue-green algal blooms in Europe: a growing problem. Ambio 13: 244-47

Skulberg O.M., Carmichael W.W., Anderson R.A., Matsunaga S., Moore R.E. e Skulberg R., 1992. Investigations of a neurotoxic oscillatorialean strain (cyanophyceae) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. Environment Toxicology and Chemistry.11:321-329

Soong F.S., Maynard E., Kirke K. e Luke C., 1992. Illness associated with blue-green algae. Med. J. Aust. 156:67

Stickney A.P., 1964. Feeding and growth of juvenile soft-shell clams, *Mya arenaria*. Fishery Bull. Fish Wildl. Serv. U. S. 63:635-655

Sturesson U., 1984. In situ studies of copper and zinc enrichment in shell and soft tissue of *Mytilus edulis*. In "Ecotoxicological testing for the marine environment". G. Persoone, E. Jaspers and C. Claus (eds.) State Univ. Ghent and Inst. Mar. Sci. Scient. Res., Bredene, Belgium. Vol. 2.: 511-533

Subba Rao D.V.S., Quilliam M. A.e Pocklington R., 1988. Domoic acid - a neurotoxic amino acid produced by the marine diatom *Nitzschia pungens* in culture. Can. J. Fish Aquat. Sci. 45:2076-2079

* Sugita M. e Sugiura M., 1994. The existence of eukaryotic ribonucleoprotein consensus sequence-type RNA-binding proteins in a prokaryote, *Synechococcus* 6301. Nucleic Acids Res. 22:25-31

Tabachek J.-A e Yurkowski M., 1976. Isolation and identification of blue-green algae producing muddy odor metabolites, geosmin and 2-methylisoborneol in saline lakes in Manitoba. J. Fish. Res. Board Can. 33:25-35

Tammes P.M.L. e Dral A.D.G., 1955. Observations on the straining of suspensions by mussels. Arch. néerl. Zool. 11:87-112

Theiss W.C., Carmichael W.W., Wyman J., e Bruner R., 1988. Blood pressure and hepatocellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by *Microcystis aeruginosa* strain PCC-7820. Toxicon 26:603-613

Thompson R.S., 1984. Measurement of the inhibition of aminoacid uptake. A toxicity test procedure using mussels (*Mytilus edulis*). In "Ecotoxicological testing for the marine environment", G. Persoone, E. Jaspers and C. Claus (eds.). State Univ. Ghent and Inst. Mar. Sci. Scient. Res., Bredene, Belgium. Vol. 2.: 535-545

Tisdale E.S., 1933. The 1930-1931 drought and its effects upon public water supply. Amer. J. Public Health, 21:1203-1218

Toranzo A.E., Niteo F. e Barja J.L. , 1990. Mortality associated with a cyanobacterial bloom in farmed rainbow trout in Galicia (Northwest Spain). Bulletin of the European Association of Fish Pathologists 10:106-107

Tsuchiya Y., Watanabe M.F. e Watanabe M., 1992. Volatile organic sulfur compounds associated with blue-green algae from inland waters of Japan. Water Sci. Tech. 25: 123-130

Tsuji K., Nalto S. , Kondo F., Ishikawa N., Watanabe M.F., Suzuki M. e Harada K-I., 1994. Stability of microcystins from cyanobacteria: effect of light on decomposition and isomerization. Environ. Sci. Technol. 28: 173-177

Turner P.C., Gammie A.J., Hollinrake K. e Codd G.A.,1990. Pneumonia associated with contact with cyanobacteria. B.M.J. 300:1440-1441

* Ueno T., Ito H., Kotani H., Kimizuka F.e Nakagima K., 1993. Cloning and expression of the NspV restriction-modification genes of *Nostoc* sp. strain PCC 7524. Nucleic Acids Res. 21:3899

Utkilen H.C. e Frøshaug M., 1992. Geosmin production and excretion in a planktonic and benthic *Oscillatoria*. Water Sci. Tech. 25: 199-206

van der Westhuizen A.J. e 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 Liere L. e Walsby A.E., 1982. Interactions of cyanobacteria with light. In "The Biology of Cyanobacteria" N.G. Carr e B.A. Whitton (eds.), Oxford, Blackwell Scientific: 9-45

Vasconcelos V.M., 1990a. Plancton. In " Caracterização ecológica da albufeira do Azibo com vista à determinação das suas potencialidades no domínio dos recursos vivos." Relatório Final. IZAN, Porto: 40-89

Vasconcelos V.M.O., 1990b. Ecotoxicologia de Cianobactérias. Impacte dos seus "blooms" nas comunidades animais e sus aplicação na gestão da qualidade da água. Trabalho de Síntese apresentado para Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Porto:133 pp

Vasconcelos V.M., 1990c. A eutrofização das lagoas de Quiaios: causas, consequências e medidas de recuperação. Actas do 1º Simpósio sobre a protecção e revalorização da faixa costeira do Minho ao Liz.: 77-87

Vasconcelos V.M., 1991. Species composition and dynamics of the phytoplankton in a recently-commissioned reservoir (Azibo-Portugal). Arch. Hydrobiol., 121(1):67-78

Vasconcelos V.M., e Araújo F.O., 1994. Cianobactérias. Um risco para o ambiente e para a Saúde Pública. Ed. Direcção-Geral da Saúde e Instituto da Água. 24 pp.

Vasconcelos V.M. e Barros P., 1991. Cianobactérias tóxicas: factor de risco no aproveitamento dos recursos naturais das lagoas costeiras. Actas do Simpósio EUROCOAST. A zona Costeira e os problemas ambientais: 149-158

Vasconcelos V.M., Campos T., Amorim A. e Soares A.M.V.M., 1993. Toxicidade de estirpes de cianobactérias isoladas a partir das lagoas das Braças, Vela e Mira. Boletim UCA 1:193-201

Vasconcelos V.M., Oliveira S., Rodrigues A.M.F., Santos M.C., Dias M:A. e Peres I., 1994. Cianobactérias planctónicas na lagoa das Furnas (Açores). Toxicidade e impacte na Saúde Pública. Actas da 4ª Conferência Nacional sobre a Qualidade do Ambiente. Vol. III: 31-35

Viarengo A. e Canesi L., 1991. Mussels as biological indicators of pollution. Aquaculture 94:225-243

Vismann B., 1990. Field measurements of filtration ans respiration rates in *Mytilus edulis* L. an assessment of methods. Sarsia 75:213-216

Watanabe M.F. e Oishi S.1980. Toxicities of *Microcystis aeruginosa* collected from some lakes, reservoirs, ponds and moat in Tokyo and adjacent regions. Jap. J. Limnol. 41:5-9

Watanabe M.F. e Oishi S., 1985. Effects of environmental factors on toxicity of a cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under culture conditions. Applied Environ. Microbiol. 49(5): 1342-1344

Watanabe M.F., Oishi S., Watanabe Y. e Watanabe M., 1986. Strong probablity of lethal toxicity in the blue-green alga *Microcystis viridis* Lemmermann. J. Phycol. 22:552-556

Wanatabe M.F., Harada K.-I., Matsuura K., Watanabe M. e Suzuki M., 1989b. Heptapeptide toxin production during the culture of two *Microcystis* species (Cyanobacteria). J. Appl. Phycol. 1:161-165

Watanabe M.F., Watanabe M., Kato T., Harada K.-I. e Suzuki M., 1991. Composition of cyclic peptide toxins among strains of *Microcystis aeruginosa* (Blue-green algae, Cyanobacteria). - Bot. Mag. Tokyo 104:49-57

Watanabe M.F., Harada K.-I., Matsuura K., Oishi S., Watanabe Y. e Suzuki M., 1989a. Heptapeptide toxins contained in natural samples of *Microcystis* species. Toxicity Assessment: An International Journal 4:487-497

Watanabe M.F., Oishi S., Harada K.-I., Matsuura K., Kawai H. e Suzuki M. , 1988. Toxins contained in *Microcystis* species of cyanobacteria (blue-green algae). - Toxicon 26:1017-1025

White A.W. e Maranda L., 1978. Paralytic toxins in the dinoflagellate *Gonyaulax excavata* and in shellfish. J. Fish. Board Can. 35:397-402

Widdows J., 1973. The effects of temperature on the metabolism and activity of *Mytilus edulis*. Netherlands Journal of Sea Rsearch 7:387-398

Widdows J. e Donkin P., 1989. The application of combined tissue residue chemistry and physiological measurements of mussels (*Mytilus edulis*) for the assessment of environment pollution. Hydrobiologia 188/189: 455-461

Widdows J., Bakke T., Bayne B.L., Donkin P., Livingstone D.R., Lowe D.M., Moore M.N., Evans S.V.e Moore S.L., 1982. Responses of *Mytilus edulis* on exposure to the water-accommodated fraction of the North Sea oil. Mar. Biol. 67:15-31

Wijsman T.C.M., 1976. ATP content and mortality in *Mytilus edulis* from different habitats in relation to anaerobiosis. Netherlands Journal of Sea Research 10:140-148

Wilmotte A. e Golubic S., 1991. Morphological and genetic criteria in the taxonomy of Cyanophyta/Cyanobacteria. Algological Studies 64:1-24

Winter J. E., 1969. Über den Einfluß der Nahrungskonzentration und anderer Faktoren auf Filtrierleistung und Nahrungsausnutzung der Muscheln *Artica islandica* und *Modiolus modiolus*. Mar. Biol. 4:87-135

Witten J.L., Schaffer M.H., O'Shea M., Cook J.C., Hemling M.E. e Rinehart K.L. Jr., 1984. Structures of two cockroach neuropeptides by fast atom bobbardment mass spectrometry. Biochem. Biophys. Res. Commun. 124:350-358

Wright J.L.C., Boyd R.K., De Freitas A.S.W., Falk M., Foxall R.A., Jamieson W.D., Laycock M.V., McCulloch A.W., McInnes A.G., Odense P., Pathak V.P., Quilliam M.A., Ragan M.A., Sim P.G., Thibault P., Walter J.A., Gilgan M., Richard D.J.A. e Dewar D., 1989. Identification of domoic acid, a neuroexcitatory amino acid, in toxic mussels from eastern Prince Edward Island. Can. J. Chem. 67:481-490

Yoshizawa S., Matsushi R., Watanabe M.F., Harada K.-I, Ichihara A, Carmichael W.W. e Fujiki H., 1990. Inhibition of protein phosphatases by microcystins and nodularin associated with hepatotoxicity. J. of Cancer Research, 116: 606-614

Yu S.-Z., 1989. Drinking water and primary liver cancer. In " Primary Liver Cancer" T. Zhao-You, W. Meng-Chao & X. Sui-Shing (eds.). China Academic Publishers. Beijing: 30-37

Yu S.-Z., 1994. Blue-green algae and liver cancer. In "Toxic Cyanobacteria. Current Status of research and management. Procceedings of an International Workshop". D.A. Steffensen e B.C. Nicholson (eds.), Adelaide, Australia: 75-86

Zaroogian G.E., Gentile J.H., Heltshe J.F., Johnson M. e Ivanovici A.M., 1982. Application of adenine nucleotide measurements for the valuation of stress in *Mytilus edulis* and *Cassostrea virginica*. Comp. Biochem. Physiol. 71B:643-649

* Referências não consultadas directamente

8 - ANEXOS

TOXICOLOGIA DE CIANOBACTÉRIAS

Distribuição de cianobactérias tóxicas e suas toxinas em águas doces portuguesas. Bioacumulação em bivalves

RESUMO E CONCLUSÕES

As cianobactérias são organismos comuns em massas de água eutrofizadas, ocorrendo em maiores densidades - florescências ou "blooms" -durante o verão. A decomposição das florescências produz alterações drásticas nos ecossistemas aquáticos, nomeadamente a desoxigenação, a alteração das características organolépticas da água e a libertação de toxinas. Embora os registos sobre cianobactérias em Portugal datem do início do século, não existia, até à data, muita informação sobre a sua toxicidade e sobre as toxinas produzidas pelas espécies mais comuns.

Neste trabalho, pretendeu-se averiguar quais as principais espécies de cianobactérias tóxicas em Portugal, avaliar a sua toxicidade, identificar as toxinas envolvidas e quantificar a sua acumulação em mexilhões. A recolha de amostras foi efectuada em 36 locais diferentes, de 1989 a 1992, analisando-se quer florescências naturais quer estirpes de *Microcystis aeruginosa* isoladas a partir de algumas dessas amostras. As culturas das estirpes foram realizadas em meio Z8 e a biomassa obtida foi concentrada e liofilizada. A toxicidade das estirpes e das florescências foi avaliada por bioensaios com murganhos, tendo-se determinado a dose letal para 50% dos animais - DL_{50} - por injecção intraperitoneal de extractos de cianobactérias. O isolamento e purificação das toxinas foram realizados utilizando-se Cromatografia Líquida de Alta Pressão - HPLC . As toxinas purificadas foram analisadas posteriormente quanto à composição em aminoácidos por HPLC e quanto ao peso molecular por Espectrometria de Massa (FABMS). A avaliação da acumulação de microcistina-LR, a toxina mais comummente produzida por *M. aeruginosa*, bem como a sua depuração por mexilhões foi realizada em laboratório. A quantificação da toxina foi realizada por HPLC.

As principais conclusões obtidas foram as seguintes:

- Durante o presente estudo colheram-se 30 amostras de florescências de cianobactérias correspondendo a 18 locais diferentes, entre lagoas naturais, rios e albufeiras. Estas amostras foram recolhidas entre 1989 e 1992, com especial incidência nos meses de Maio a Novembro. Tal correspondeu à época de maior densidade destes organismos.

- As densidades de cianobactérias encontradas nas massas de água analisadas no presente estudo variaram entre 5 x 10^2 cél/ml e 6,9 x 10^7 cél/ml. Na maior parte das amostras, as cianobactérias constituíram mais de 80% da densidade total de fitoplâncton.

- No total, identificaram-se 28 espécies de cianobactérias pertencentes a 13 géneros diferentes. A espécie dominante nas amostras de água analisadas foi *M. aeruginosa*, seguindo-se por ordem decrescente *An. Scheremetievi*, *An. flos-aquae*, *An. spiroides*, *Ap. flos-aquae* e *M. wesenbergii*. A espécie dominante nas florescências foi *M. aeruginosa*, que ocorreu em 100% das amostras, embora *An. flos-aquae* tenha dominado em sete amostras. *M. wesenbergii*, *An. Scheremetievi*, *An. flos-aquae* e *Nostoc* sp. foram espécies principais em uma florescência cada

- Das florescências analisadas, 60% revelaram toxicidade, não se registando nenhuma florescência neurotóxica. Os valores de toxicidade, medidos em termos de DL_{50} i.p. face a murganhos, variaram entre 20 mg/kg e 400 mg/kg.

- A toxicidade das cianobactérias variou bastante numa mesma massa de água ao longo do tempo. No rio Minho, das florescências analisadas em três anos consecutivos, apenas a do último ano apresentou toxicidade. Na lagoa de Mira a variação foi mais drástica, registando-se uma diminuição da toxicidade de cerca de 10 vezes em apenas 6 dias.

- Os valores da toxicidade das estirpes de *M. aeruginosa* isoladas a partir das lagoas de Mira e Quiaios e das albufeiras do Douro foi semelhante à obtida por outros autores em outros pontos do globo para esta espécie, variando a DL_{50} entre 7,5 e 75 mg/kg.

- Parece existir uma diferença significativa ($p< 0,05$) entre as estirpes de *M. aeruginosa* isoladas das lagoas e as das albufeiras, com base nas dimensões celulares médias. Estas diferenças são também evidentes no que diz respeito aos perfis de toxinas, com as estirpes das lagoas a produzirem preferencialmente MCYST-LA e as das albufeiras MCYST-YR. Todas elas produzem, no entanto, MCYST-LR como toxina principal.

- Registaram-se diferenças significativas nos tempos de sobrevivência ($p<0,001$) e na percentagem de peso do fígado ($p< 0,05$) relativamente ao total corporal, em murganhos injectados com estirpes de *M. aeruginosa* ou com florescências naturais de cianobactérias. Tais diferenças poderão dever-se à maior quantidade de microcistinas nas estirpes, que, levando a uma morte mais rápida, provocam uma menor afluência de sangue ao fígado.

- O isolamento e purificação de microcistinas a partir de estirpes de *M. aeruginosa* e de florescências naturais de cianobactérias, conduziu à descrição de 2 a 4 toxinas diferentes nas estirpes e 2 a 7 nas florescências.

- Purificou-se e identificou-se um total de nove microcistinas diferentes nas amostras de estirpes e florescências.Tais toxinas foram MCYST-LR, MCYST-RR, MCYST-LA, MCYST-AR, MCYST-YR, MCYST-HilR, [D-Asp^3]MCYST-LR, [Dha^7]MCYST-LR e [L-MeSer^7] MCYST-LR. Destas, MCYST-AR surgiu apenas nas estirpes e MCYST-HilR, [Dha^7]MCYST-LR e [L-MeSer^7]MCYST-LR apenas nas florescências.

- Nas estirpes de *M. aeruginosa* pareceu existir uma tendência para MCYST-LR ser a toxina principal, com percentagens geralmente superiores a 50%. Nas florescências esta tendência não foi tão nítida, podendo resultar da coexistência de várias estirpes produtoras de microcistinas diferentes como toxinas principais.

- MCYST-LR ocorreu como dominante em todas as estirpes e em todas as florescências em cujas toxinas foram identificadas, pelo que pode sugerir-se ser a microcistina mais comum em águas doces portuguesas. No entanto, os planos de vigilância da qualidade das águas referentes a estes parâmetros deverão preferencialmente utilizar metodologias que detectem todas as variantes das microcistinas. Tal é possível, recorrendo-se a HPLC com detector de Díodos.

- A quantidade total de MCYST nas estirpes de *M. aeruginosa* e nas florescências analisadas foi bastante elevada, o que poderá representar um perigo para a saúde humana, tendo em conta que quase todas as massas de água analisadas são usadas para consumo e/ou recreio.

- Apesar de os moluscos serem geralmente considerados resistentes às toxinas produzidas pelo fitoplâncton, neste trabalho observou-se que, mexilhões expostos a cianobactérias hepatotóxicas apresentam alguma mortalidade, embora retardada, com 0,45% após 15 dias de exposição e 6,33% duas semanas após este período. A diminuição progressiva da biomassa individual foi também um sinal de toxicidade.

- Os mexilhões acumularam MCYST-LR quando alimentados com uma estirpe tóxica de *M. aeruginosa*, em densidades semelhantes às que ocorrem em alguns dos nossos estuários. No entanto, a rápida formação de pseudofezes revelou que a ingestão de cianobactérias não foi optimizada, pelo que os valores de acumulação estão subestimados.

- A acumulação de MCYST-LR foi muito rápida, detectando-se esta toxina dois dias após a primeira administração, nos animais. A quantidade máxima de MCYST-LR detectada nos mexilhões foi de 10,5 μg/g de peso seco, ao fim do 10º dia.

- A MCYST-LR acumumlou-se preferencialmente no hepatopâncreas (96,5%), registando os outros órgãos concentrações muito baixas.

- A depuração de MCYST-LR pelos mexilhões, completou-se ao fim do 11º dia, nas condições dos ensaios. Registou-se um decréscimo de cerca de 50% do conteúdo em toxina ao fim do 2º dia, o que parece representar o esvaziamento do tubo digestivo. Notou-se uma evolução inesperada a partir o 3º dia, com uma ligeira subida do conteúdo em MCYST-LR até ao dia 7. Tal poderá ser devido à libertação de MCYST-LR, que estando anteriormente ligada às fosfatases proteicas, não seria extraível pelas técnicas utilizadas.

- A possibilidade de acumulação de MCYST-LR por moluscos deve ser encarada como um perigo real, devendo-se efectuar uma vigilância sanitária nos moluscos dos estuários dos rios eutrofizados, sujeitos a florescências de cianobactérias.

Em face de todos estes resultados, sugere-se a necessidade de um programa de vigilância de cianobactérias e das suas toxinas em massas de água eutrofizadas, não só da água bruta, como em todas as fases do tratamento nas ETAs e em pontos selecionados das redes de distribuição de água.

- A utilização de sistemas de tratamento de água com carvão activado e/ou ozono parecem ser, neste momento, as únicas formas eficazes de evitar situações de perigo para a saúde humana. Estudos epidemiológicos, utilizando marcadores de alterações hepáticas deverão acompanhar os estudos de monitorização de toxinas em águas superificiais, de modo a que os efeitos na saúde humana sejam mais facilmente identificados.

- A utilização de técnicas de quantificação de toxinas de cianobactérias que apresentem maior sensibilidade que os bioensaios com murganhos ou HPLC, devem ser implementadas, de forma a se poder detectar níveis muito baixos de toxicidade em águas e organismos e que sejam susceptíveis de causar problemas crónicos humanos.

TOXICOLOGY OF CYANOBACTERIA

Distribution of toxic cyanobacteria and their toxins in portuguese freshwaters. Bioaccumulation in bivalves

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Cyanobacteria are common in eutrophic waters and higher densities - blooms - are found especially during summer. The decomposition of cyanobacteria blooms is responsible for drastic changes in aquatic ecosystems, namely the deoxigenation of water, production of off-flavours and release of toxins. The first reports on the occurence of cyanobacteria in Portuguese freshwaters are from the 30's although no data on toxicity was known till recently. In this work the occurrence of the main toxic cyanobacteria species is revealed. Data on their toxicity and on the identification of the main toxins are also given. The accumulation of microcystin in mussels is also reported.

Water samples were collected in 36 different sites from 1989 to 1992 and cyanobacteria blooms and strains isolated from these samples were analysed. Strains were isolated and cultured in Z8 medium and the biomass that was obtained was concentrated and freeze-dried. The toxicity of the blooms and of the *Microcystis aeruginosa* strains was analysed by mouse bioassay. The dose that caused 50% deaths - LD50 - was calculated by intraperitoneal injection of cyanobacteria extracts. The isolation and purification of the toxins was performed by High Performance Liquid Chromatography - HPLC. The amino acid composition of the toxins isolated and purified was done by HPLC and the molecular weight determined by Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry - FABMS. The accumulation of microcystin-LR, the most common toxin produced by *M. aeruginosa*, as also its depuration by mussels was performed in the laboratory. The quantification of the toxins was done by HPLC.

The main conclusions obtained from this work are:

- Cyanobacteria densities in Portuguese freshwaters found in this work varied from 5×10^2 cell/ml to 6.9×10^7 cell/ml. Cyanobacteria represented more than 80% of total phytoplankton density in most of the samples.

- The dominant cyanobacteria species was *Microcystis aeruginosa*, and with lower frequences *An. Scheremetievi*, *An. flos-aquae*, *An. spiroides*, *Ap. flos-aquae* and *M. wesenbergii*. In the

whole 28 cyanobacteria species were identified comprising 13 different genera and some not identified CHROOCCOCALES.

- Thirty blooms samples were collected from 18 different sites such as natural lakes, reservoirs and rivers. The samples were collected between 1989 and 1992 especially from May till November which was the bloom season.

- Sixty percent of the blooms were hepatotoxic to mice. No neurotoxic blooms were found. Bloom toxicity measured as i.p. mouse LD_{50} varied from 20 and 400 mg/kg.

- The dominant bloom species was *M. aeruginosa*, occurring in all the samples. Nevertheless, *An. flos-aquae* was dominant in seven samples. *M. wesenbergii, An. Scheremetievi, An. flos-aquae* and *Nostoc* sp. dominated one bloom sample each.

- The toxicity of cyanobacteria was found to vary a lot in a given ecosystem. In Minho river only the sample of the last year was found to be toxic. In Mira lake the changes in toxicity were more severe, being registered a 10 fold variation in 6 days only.

- The toxicity of the *M. aeruginosa* strains isolated from Quiaios lakes and Douro river reservoirs was similar to values obtained in literature for other countries. The LD_{50} varied from 7.5 to 75 mg/kg.

- There was a significant difference between the average cell dimensions of the *M. aeruginosa* strains isolated from the lakes and those of the reservoirs. These differences are also shown relative to toxin profiles of both groups of strains. In the lakes the strains produce MCYST-LR and MCYST-LA and in the reservoirs they produce MCYST-LR and MCYST-YR.

- There were significant differences in the survival time and on the percentage of the liver weight relative to the total weight, in mice injected with the strains of *M. aeruginosa* relative to those injected with bloom material. Those differences were probably due to the fact that strains have more toxin per g of weight causing a faster death and the consequence is that less blood is accumulated in the mousse liver.

- The extraction and purification of microcystins from the *M. aeruginosa* strains and from the blooms resulted in 2 to 4 different toxins isolated from the strains and 2 to 7 from the blooms.

- Nine different microcystins were identified: MCYST-LR, MCYST-RR, MCYST-LA, MCYST-AR, MCYST-YR, MCYST-HilR, [D-Asp^3]MCYST-LR, [Dha^7]MCYST-LR and [L-MeSer^7]

MCYST-LR. MCYST-AR occured only in one strain and MCYST-HilR, [Dha^7]MCYST-LR and [L-$MeSer^7$]MCYST-LR occurred only in the blooms.

- MCYST-LR was the dominant toxin although in the strains it tended to represent more than 50% of the total microcystin content. In the blooms this percentage was sometimes lower because several strains producing different microcystins as the dominant toxin may co-occurred.

- MCYST-LR being the dominant microcystin in Portuguese freshwaters could be used as the one to be taken into account when a monitoring programme is to be established. Nevertheless, other variants occur and because of this a more comprehensive methodology should be employed such as HPLC with Diode Array Detector.

- Total microcystin content in blooms and strains was high and this may be faced as a serious human health hazard because most of the studied sites are used as drinking or recreational waters.

- Moluscs are usually considered resistant to phytoplankton toxins. Nevertheless, in the work presented here mussels did show a low mortality during the study attaining 0.45% by the day 15 of the accumulation experiment increasing to 6.33% by the day 15 of the depuration period.Individual biomass also decreased slightly showing some toxic effects.

- Mussels accumulated MCYST-LR when fed a toxic *M. aeruginosa* strain, using cell densities similar to those observed in our estuaries. The high cell densites used led to the formation of pseudofaeces and by this the ingestion rates were not very high. The accumulation should be higher when lower cell densities are used.

- The accumulation of MCYST-LR was very fast, and the toxin was detected by the second day of the experiment. The maximum amount of MCYST-LR was found at day 10 with 10.5 μg/g dry weight.

- MCYST-LR accumulated mostly in the hepatopancreas (96.5%) and the other organs attained very low toxin contents.

- MCYST-LR total depuration occurred by day 11. There was a 50% decrease at day 2 resulting from the cleaning up of the digestive tract. Then a slight increase on the toxin content occurred from day 3 to day 7. This may be the result of the release of MCYST-LR from the protein phosphatases.

- The possibility of the accumulation of microcystins by moluscs should be faced as a real hazard. Monitoring programmes in mussels collected in estuaries of eutrophic rivers should be established.

- The results obtained during this work suggest the need for a monitoring program on the cyanobacteria and their toxins in eutrophic waters. This should be done in raw water as also in all the treatment phases and in selelcted sites of the water network system.

- The use of water treatment processes such as activated carbon and ozone seem to be the only effective measures in order to prevent human health hazard. Epidemiological studies using changes in hepatic enzyme activities should be performed along with the monitoring studies so as to better identify the effects of toxic cyanobacteria in human health.

- The use of more sensitive techniques for the quantification of cyanobacteria toxins, compared to mouse bioassay or HPLC should be developed and used so as to detect low toxin levels in water and organisms. These low amounts of toxins may be enough to cause human health problems.

Distribution de cianobactéries et ses toxines dans les eaux douces portugaises. Bioaccumulation en bivalves

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Les cyanobactéries sont des organismes communs dans les plans d'eau eutrophisées, qui se presentent avec des plus fort densités pendant l'été, en formant des fleurs d'eau -"blooms". La décomposition de ces fleurs d'eau provoque des alterations drastiques dans l'ecossystème aquatique nommément la désoxygenation, modification des charactéristiques organoleptiques de l'eau et libération de toxines.

Bien que on trouvent, au Portugal, des régistes sur cyanobactéries qui rémontent au début du siècle il n'y avait pas, cependant, à cette époque là, des informations sur sa toxicité ni sur les toxines produites par les espèces plus communes.

Dans ce travail nous avons comme objectives la recherche des principaux espèces de cyanobactéries toxiques existant au Portugal, la avaliation de sa toxicité, l'identification des toxines produites et une quantification de la bioaccumulation dans une espèce cible - la moule.

L'échantillonage à été effectué de 1989 à 1992, dans 36 différents localités, et on à analisé soit les fleurs d'eaux naturelles soit des souches de *Microcystis aeruginosa* isolées à partir de quelques échantillons. Les cultures de ces souches étaient réalisées dans un milieu de culture Z8 et la biomasse obtenu était finalement concentré et lyophilisé. La toxicité de ces souches, et aussi des fleurs d'eau, était évaluée par des épreuves sur des souris, en déterminant la quantité létale pour 50% des animaux -DL50-, après injection intrapéritonéal des extraits de cyanobactéries. L'isolement et purification des toxines était éffectuée par Cromatografie Liquide sous Haute Pression - HPLC. La composition en acides aminés de ces toxines était aussi analysé par HPLC et sont poids moléculaire par FABMS. L'évaluation de l'accumulation de microcystine-LR, qui c'est la toxine plus communément produite par la espèce *M. aeruginosa*, et sa dépuration par les moules, à été réalisée au Laboratoire en utilisant de suite le HPLC pour sa quantification.

Les principaux conclusions obtenues, sont les suivantes:

- Pendant cet étude 30 échantillons de fleurs d'eau ont été récueilli en 18 différents endroits correspondant à différents types de plans d'eau: rivières, lagunes et lacs de barrages. Ces échantillons étaient obtenues spécialement entre les mois de Mai à Novembre, de 1989 à 1992, ce qui correspond au période où on avait observé les plus forts densités de ces organismes.

-Les densités de cyanobactéries dans les différents plans d'eau analysées ont variée entre 5 x 10^2 cél/ml et 6.9 x 10^7 cél/ml. Dans la majorité des échantillons les cyanobactéries formaient plus de 80% de la densité totale du phytoplacton.

- On avait identifiée 28 espèces de cyanobactéries qui correspondent à 13 différents genres. La espèce dominant dans les échantillons d'eau analysées était *M. aeruginosa*, suivi par ordre décroissant d'abondance *An. Scheremetievi*, *An. flos-aquae*, *An. spiroides* et *M. wesenbergii*. Dans les fleurs d'eau la espèce dominant était aussi *M. aeruginosa*, presente en 100% des échantillons, si bien que *An. flos-aquae* à été la espèce la plus important dans 7 échantillons. Chacune des espèces *M. wesenbergii*, *An. Scheremetievi* et *Nostoc* sp. étaient les espèces principaux dans une fleur d'eau.

-60% des fleurs d'eau analysées étaient toxiques, mais on avaient pas detecté aucune fleur d'eau neurotoxique. Les valeurs de toxicité mésurées en termes de DL50 sur des souris ont varié entre 20 mg/kg et 400 mg/kg.

- La toxicité des cyanobactéries à montré des variations temporelles considérables dans le même plan d'eau. Sur le fleuve Minho des trois fleurs d'eau analysées pendant 3 annés consécutives seulement le dernier était toxique. Des variations plus drastiques étaient observés sur la lagune de Mira où on avait régistré une diminution de la toxicité de 10 fois en seulement 6 jours.

-Les valeurs de la toxicité des souches de *M. aeruginosa*, isolées à partir d'échantillons des lagunes de Mira et Quiaios et des lacs de barrages du fleuve Douro, sont pareilles a ceux indiqués par d'autres auteurs pour cette espèce, dans plusieurs endroits du monde, avec des valeurs de DL50 entre 7.5 et 75 mg/kg.

-Il semble avoir des différences significatives ($P<0.05$) entre les tailles célulaires moyennes des souches de *M. aeruginosa* isolées à partir des lagunes et des lacs de barrage. Ces différences sont aussi évident en ce qui concerne le profil des toxines puisque les deux types de souches, par surplus à la production de MCYST-LR comme toxine principale, produisent préférenciellement MCYST-LA si sont d'origine lagunaire et MCYST-YR si sont isolées des lacs de barrages.

- On avait régistré des différences significatives pour le temp de survivance ($P<0.001$) et la raison poids du fois/poids corporel ($P<0.05$), entre les souris injectés avec des souches de *M. aeruginosa*, où avec des fleurs d'eau naturelles de cyanobactéries. Ces différences peuvent résulter d'une mort plus rapide, causé par les plus fort quantités de microcystines dans les souches ce qui pourrait limiter l'arrivée du sang au fois.

- L'isolement et purification des microcystines à permis la description de 2 à 4 différents toxines dans les souches de *M. aeruginosa* et 2 à 7 dans les fleurs d'eau naturelles.

- Dans les échantillons des fleurs d'eau et dans les souches on avait isolée et purifié un totale de 9 différents toxines:MCYST-LR, MCYST-RR, MCYST-LA, MCYST-AR, MCYST-YR, MCYST-HilR, [D-Asp^3]MCYST-LR, [Dha^7]MCYST-LR e [L-MeSer^7]MCYST-LR. MCYST-AR était présente seulement dans les souches et MCYST-HilR, [Dha^7]MCYST-LR e [L-MeSer^7]MCYST-LR seulement dans les fleurs d'eau.

- Il semble avoir une tendence pour que MCYST-LR soit la toxine principal dans les souches de *M. aeruginosa*, avec des pourcentages supérieures à 50%. Dans les fleurs d'eau cette tendence est moin nette ce qui peut résulter de la coexistence de différents microcystines comme toxines principaux.

- MCYST-LR était la toxine dominante dans toutes les souches et fleurs d'eau où on avait trouvés des toxines, et semble donc être la microcystine la plus commune dans les eaux douces portugaises. Toutefois, les plans de vigilance de la qualité des eaux, en ce qui concerne ce type de paramètres, doivent utiliser des méthodologies de façon à permettre la detection de toutes les variants de microcystines. Ça sera possible avec l'utilization de HPLC avec detecteur de diodes.

- La quantité totale de MCYST dans les souches de *M. aeruginosa* et dans les fleurs d'eau analysées était trés élévée ce qui peut répresenter un danger pour la santé publique car toutes ces plans d'eau sont utilisés par l'homme pour la consommation où loisir.

- Si bien que on considère généralement les mollusques comme résistants aux toxines du phytoplacton, dans ce travail nous avons observé qu'il-y-avait quelque mortalité des moules exposés aux cyanobactéries hépatotoxiques. Cette mortalité était un peut rétardé, avec des valeurs de 0.45 % 15 jours après l'exposition aux toxines et 6.33 % après 15 jours en plus. Une diminution progressive de la biomasse individuel était aussi interpreté comme indication de toxicité.

- Après une alimentation avec une souche de *M. aeruginosa*, les moules on accumulé MCYST-LR d'une façon identique à ce qui on observe dans plusieurs de nos estuaires. Autrement, la formation très rapide de "pseudoexcréments" à révélé que l'ingestion des cyanobactéries n'était pas optimizé ce qui provoque une sous-estimation des valeurs d'accumulation.

- L'accumulation de MCYST-LR était très rapide et on avait detecté cette toxine 2 jours après la première administration. La quantité maximale de MCYST-LR detecté dans les moules était de 10.5 µg/g de poids sec, après 10 jours.

- On avait observé une accumulation de MCYST-LR sourtout dans l'hépatopancréas (96.5%), en existant des concentrations très faibles dans les autres organes analysées.

- La dépuration de MCYST-LR par les moules était complet au but du 11^{ième}jour dans les conditions des essais. On avait régistré une diminution de la quantité de toxine au deuxième jour de environ 50%, ce qui semble être une conséquence du videment du tube digestive. Du troisième au septième jour on avait observé une légère augmentation de la quantité de MCYST-LR. Ça peut être une conséquence d'une libération de MCYST-LR, antérieurement liée aux phosphatases protéiques et donc pas extractibles avec les techniques utilisées.

- La possibilité d'accumulation de MCYST-LR pour les mollusques doit être considéré comme un danger potentiel ce qui justifie une surveillance des animaux provenants d'estuaires des fleuves eutrophisées.

- En prenand en compte l'ensemble des résultats de ce travail, on sugère la nécéssité d'élaboration d'un programme de surveillance des cyanobactéries et ces toxines, dans les plans d'eau eutrophisées. Ça doit s'étendre aussi à toutes les étapes du traitement d'eaux aux ETAs et à quelques points du reseaux de distribution.

- Les systémes de traitement d'eau avec du charbon activée et/où ozone semblent être, pour le moment, les plus éfficaces pour éviter ce problème. On deverrai aussi faire des études épidemiologiques avec utilisation de marqueurs pour detection des altérations hépatiques, en ensemble avec une monitorization de la présence de toxines dans les plans d'eau. Ça permettra de rapporter plus facilement l'effects des toxines sur la santé humaine.

- L'utilisation des techniques plus sensibles de quantification des toxines, par rapport aux bioessais sur des souris où le HPLC, doivent être dévélopé de façon à permettre une detection de niveaux plus faibles de toxicité, sur les eaux et les organismes, qui peuvent être susceptibles de provoquer des problèmes croniques pour l'homme.

CROMATOGRAMAS (HPLC)

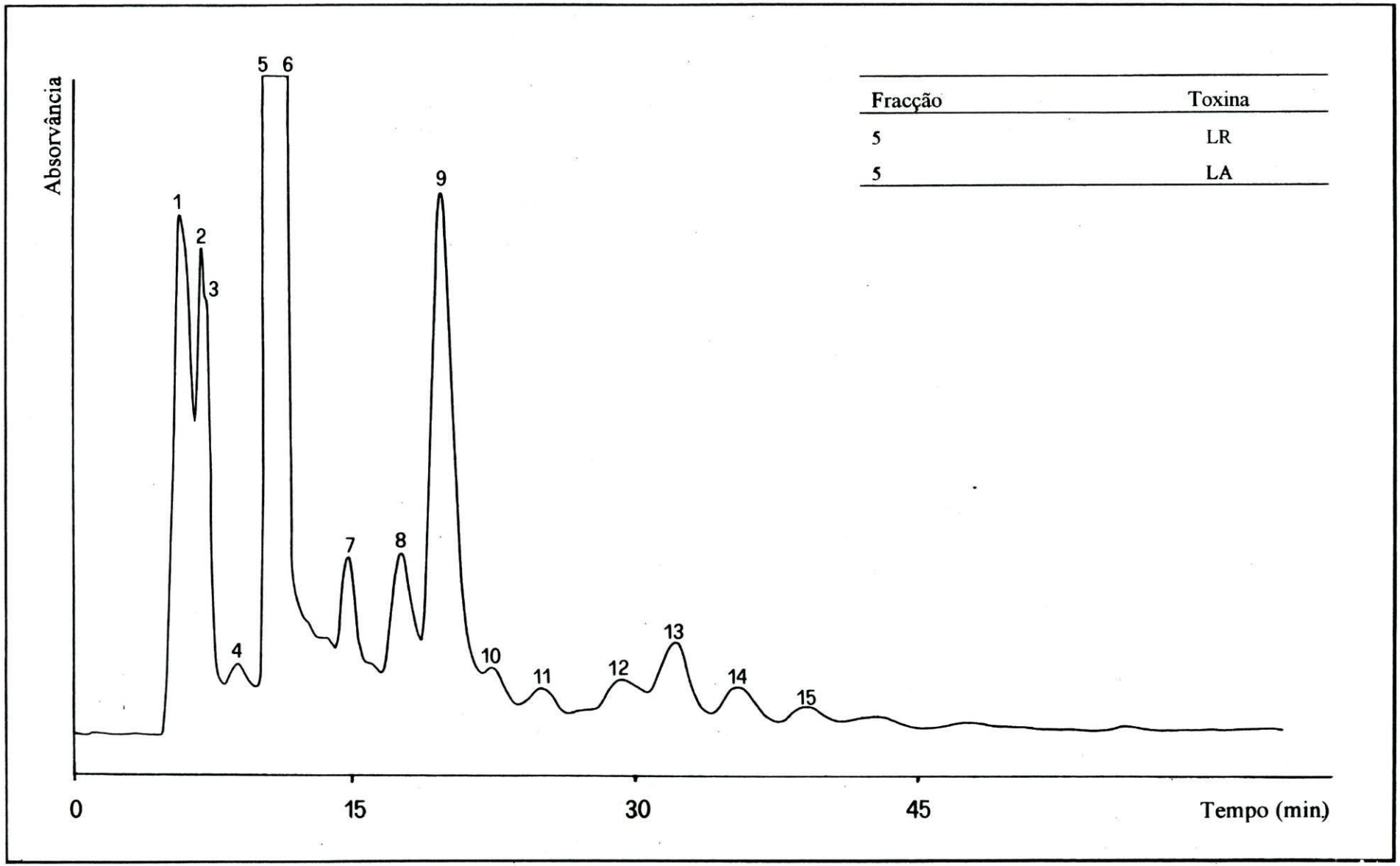


Figura 1A - Cromatograma de HPLC da estirpe IZANCYA1, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

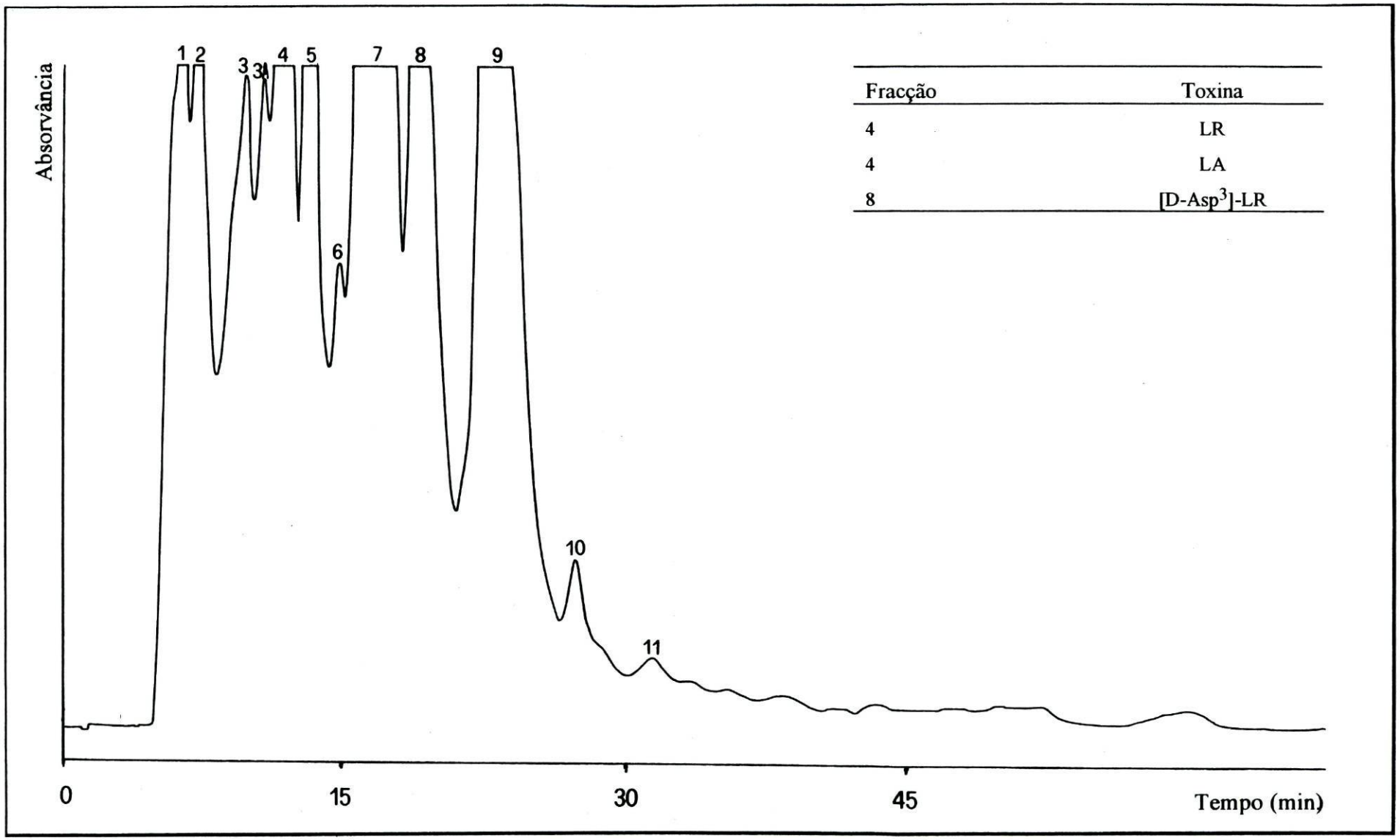
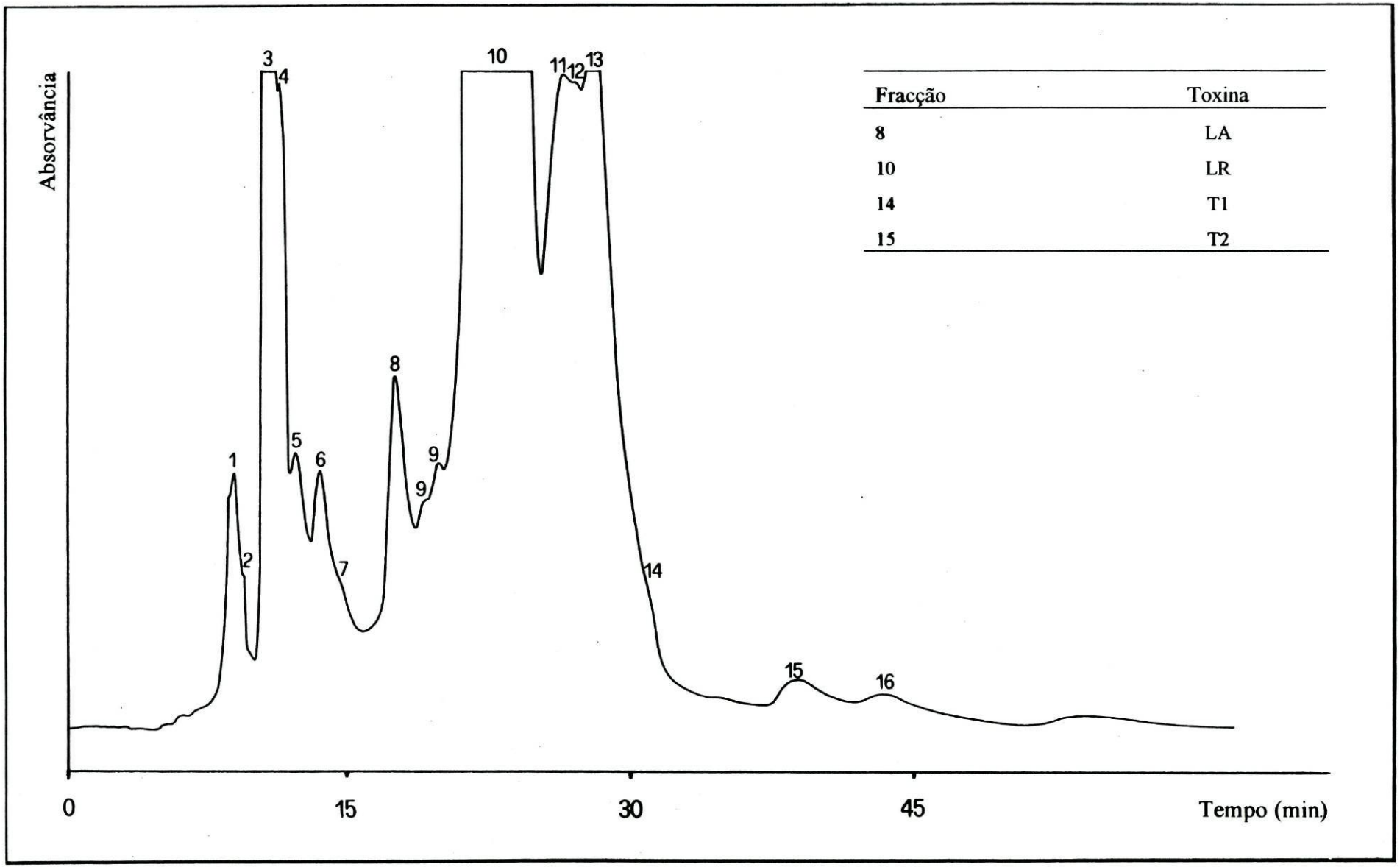


Figura 2A - Cromatograma de HPLC da estirpe IZANCYA2, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.



Fracção	Toxina
8	LA
10	LR
14	T1
15	T2

Figura 3A - Cromatograma de HPLC da estirpe IZANCYA3, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

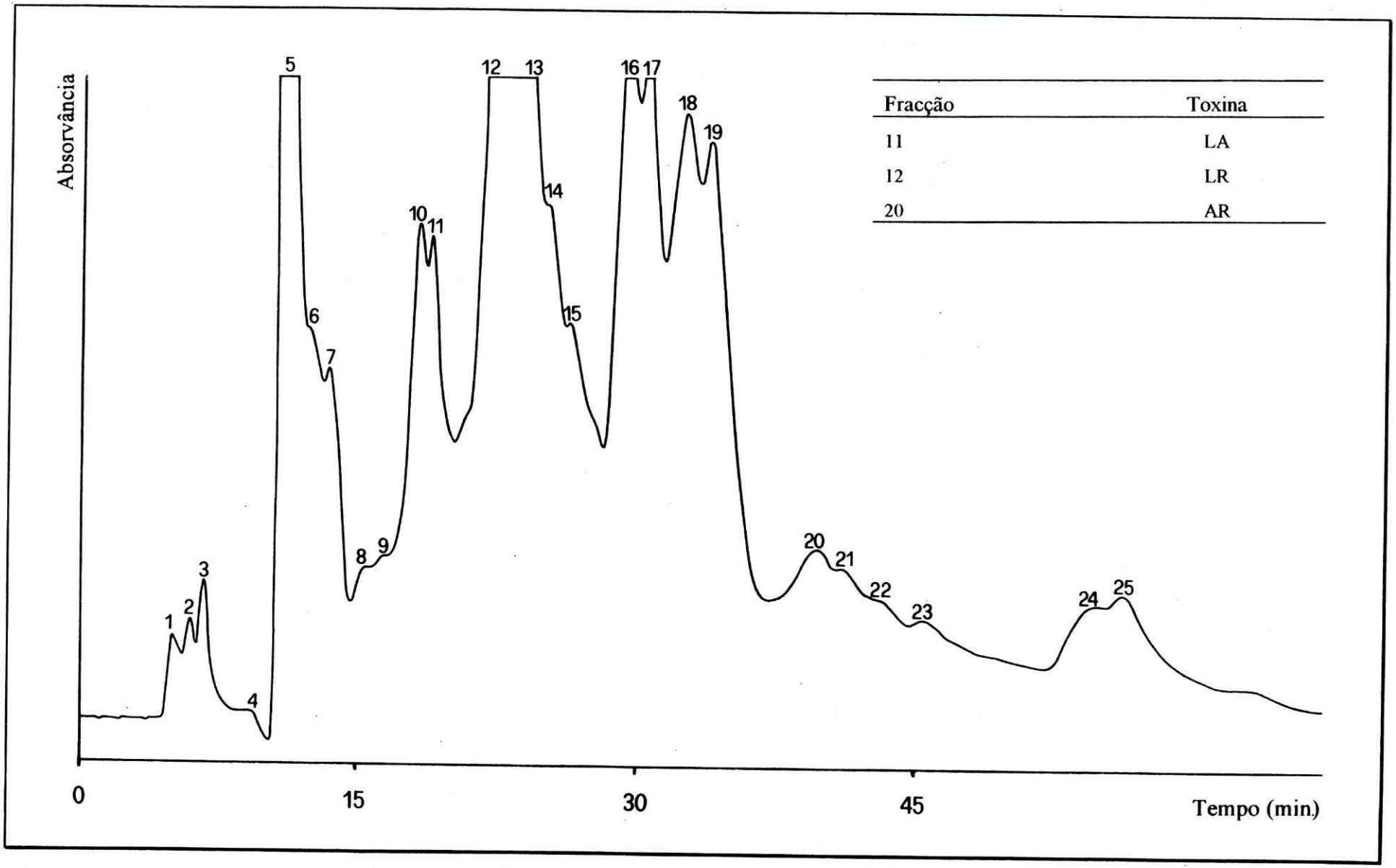


Figura 4A - Cromatograma de HPLC da estirpe IZANCYA5, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

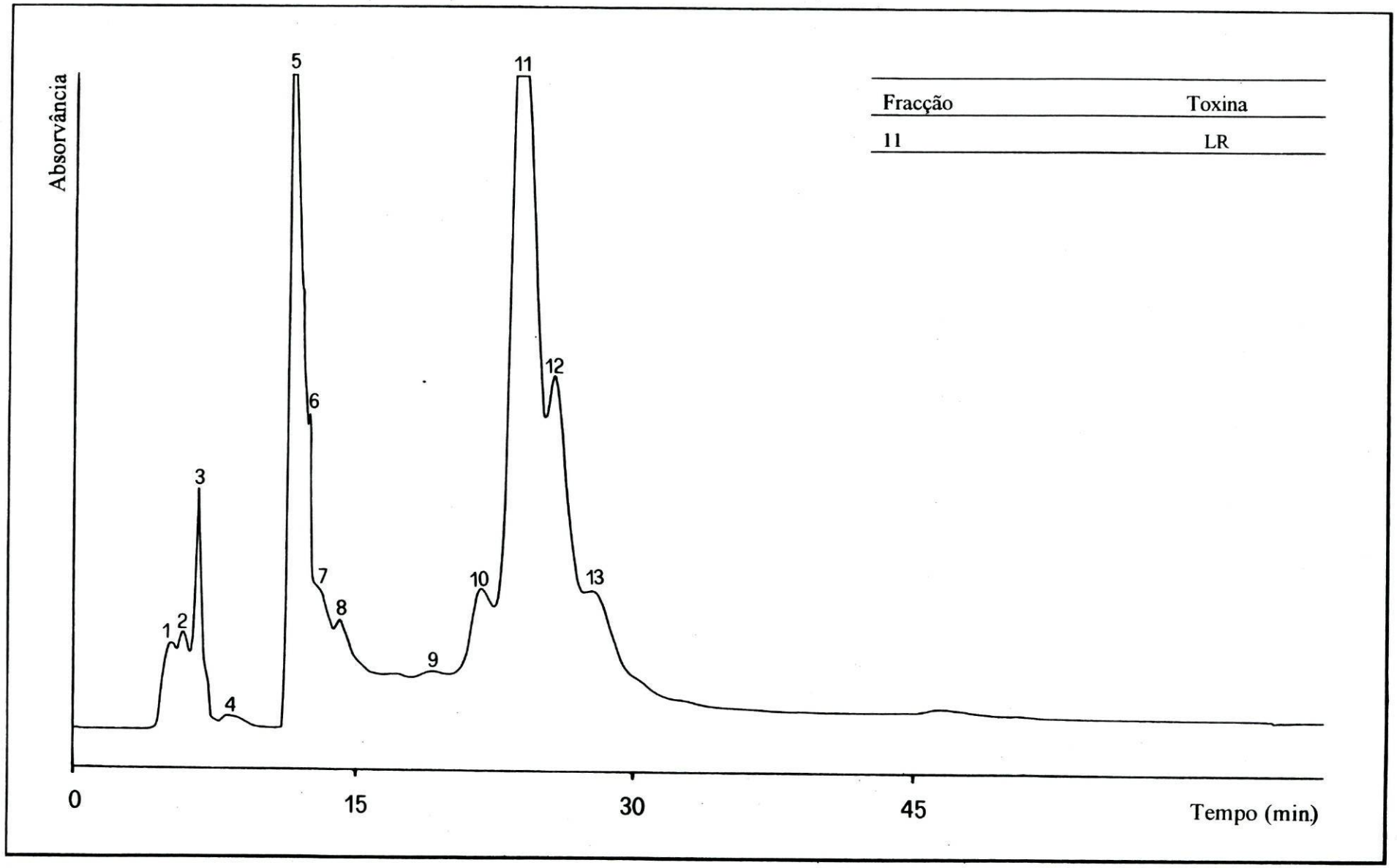


Figura 5A - Cromatograma de HPLC da estirpe IZANCYA7, obtido nascondições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

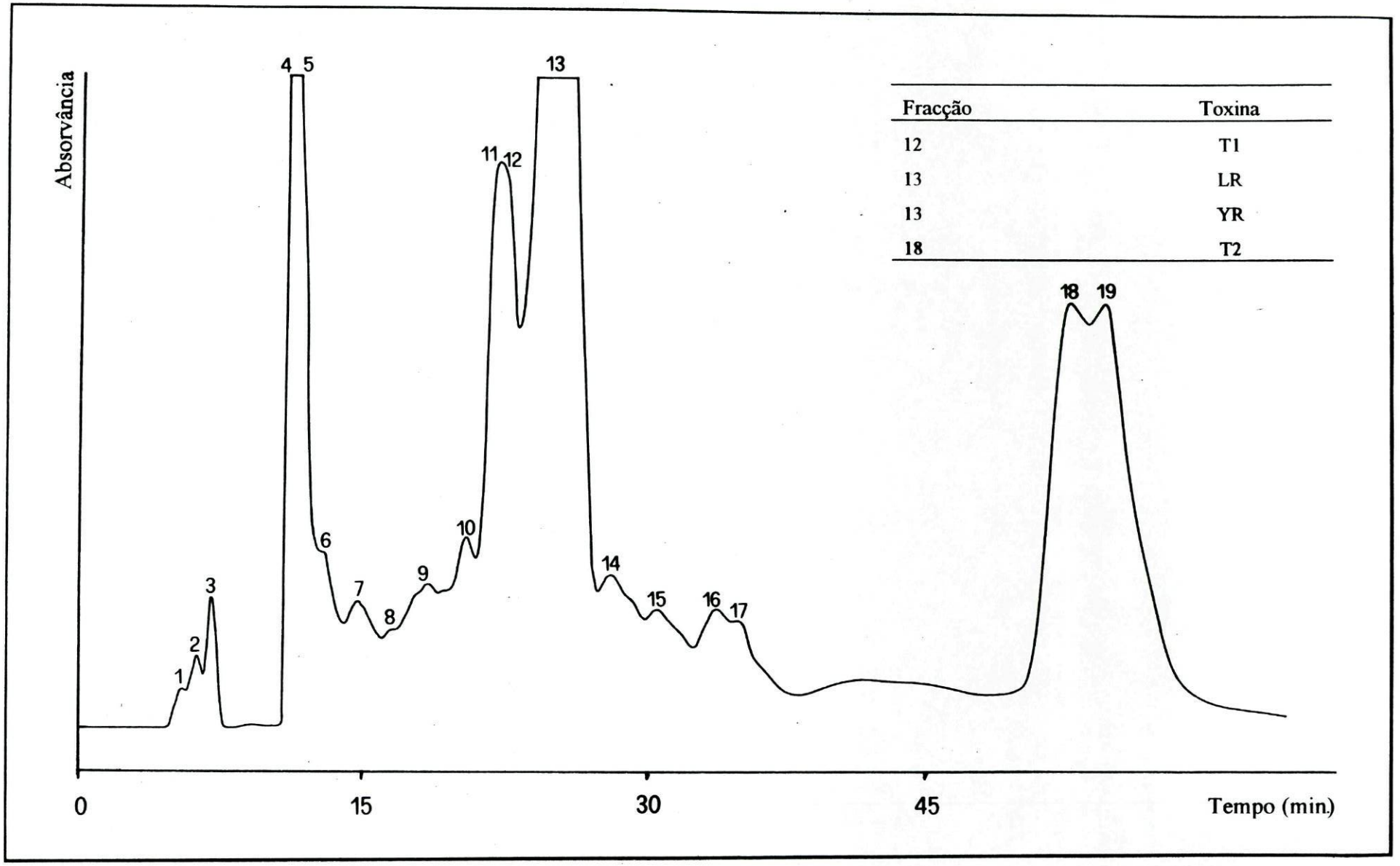


Figura 6A - Cromatograma de HPLC da estirpe IZANCYA25, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

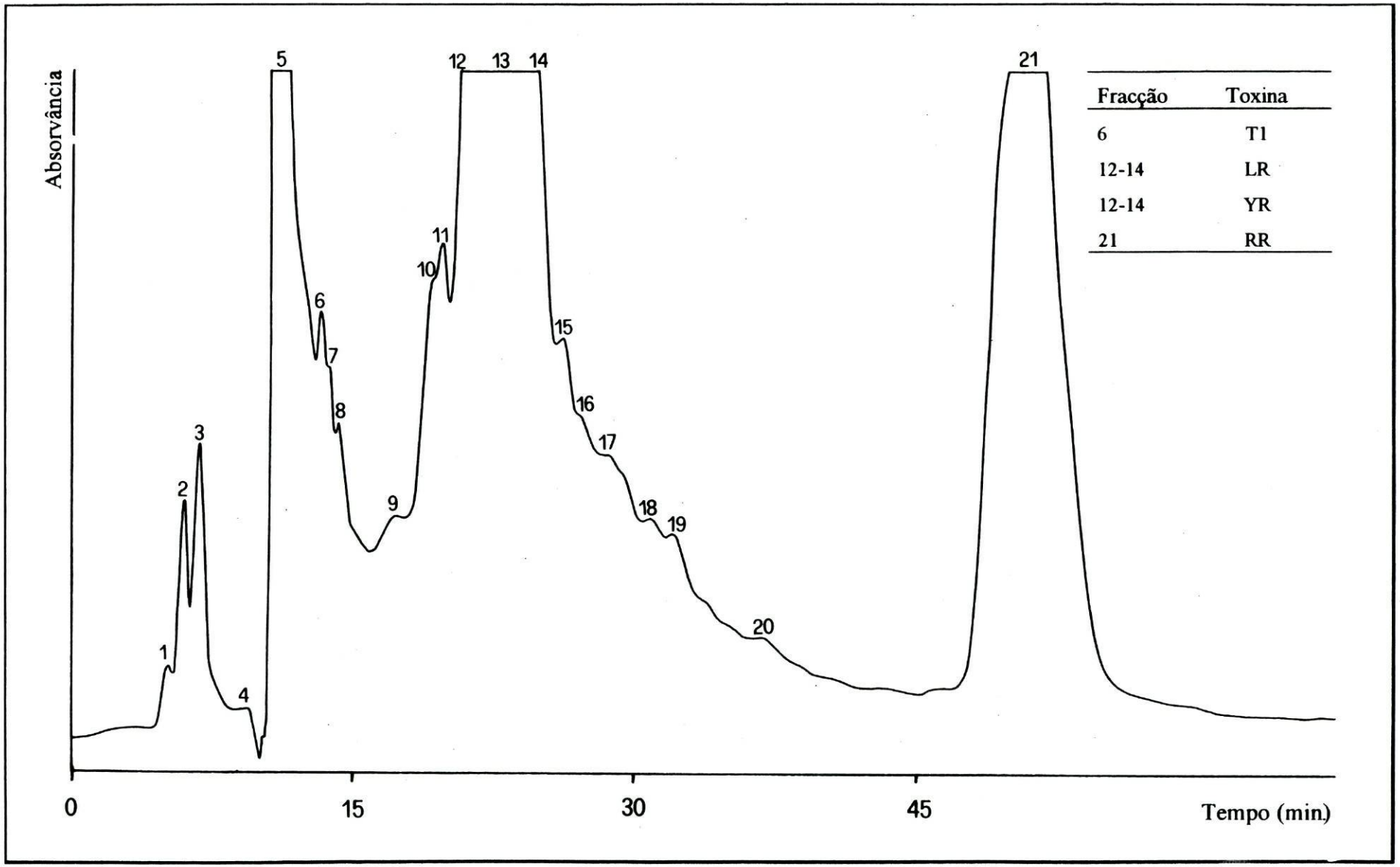


Figura 7A - Cromatograma de HPLC da estirpe IZANCYA30, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

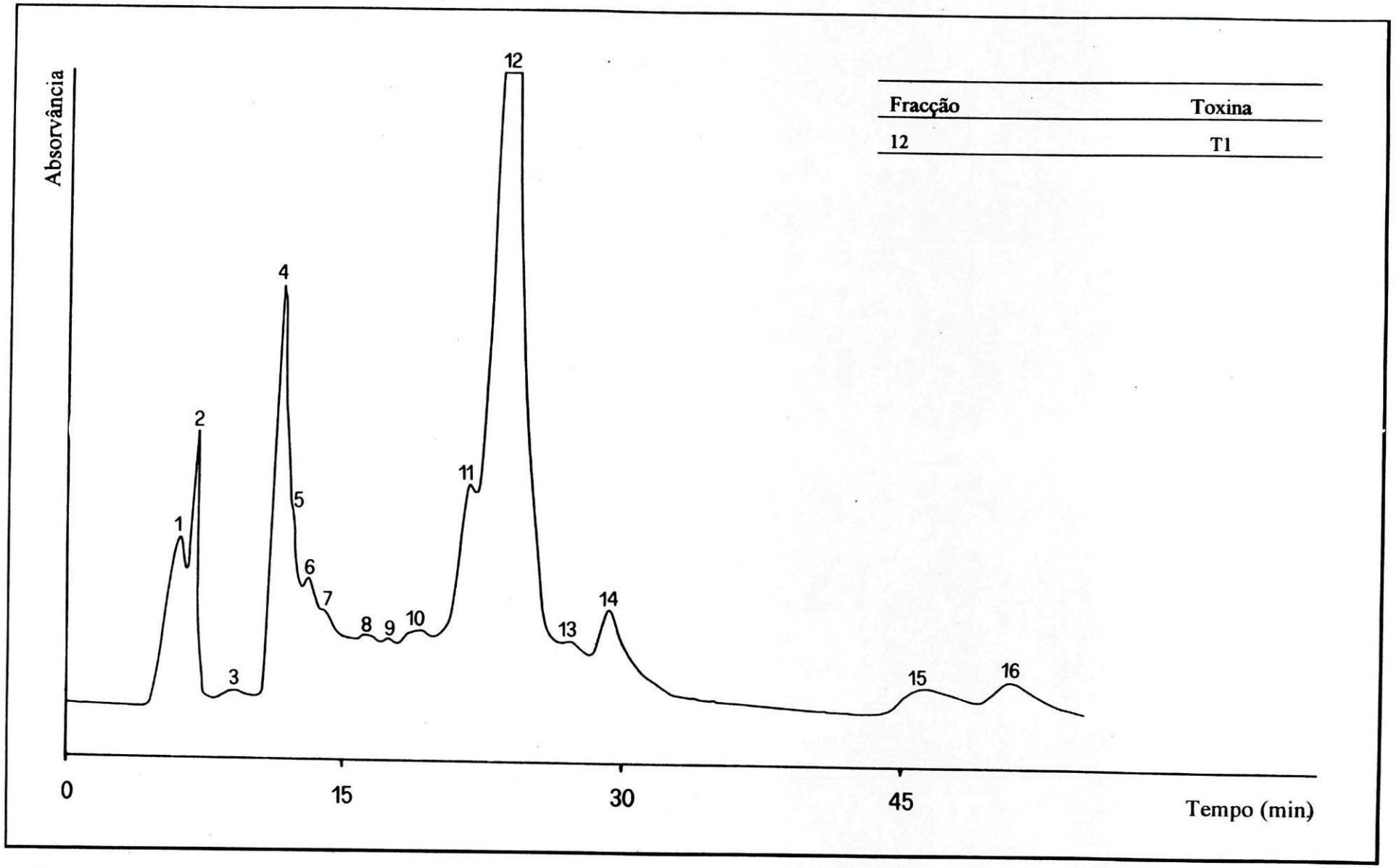


Figura 8A - Cromatograma de HPLC da estirpe IZANCYA31, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

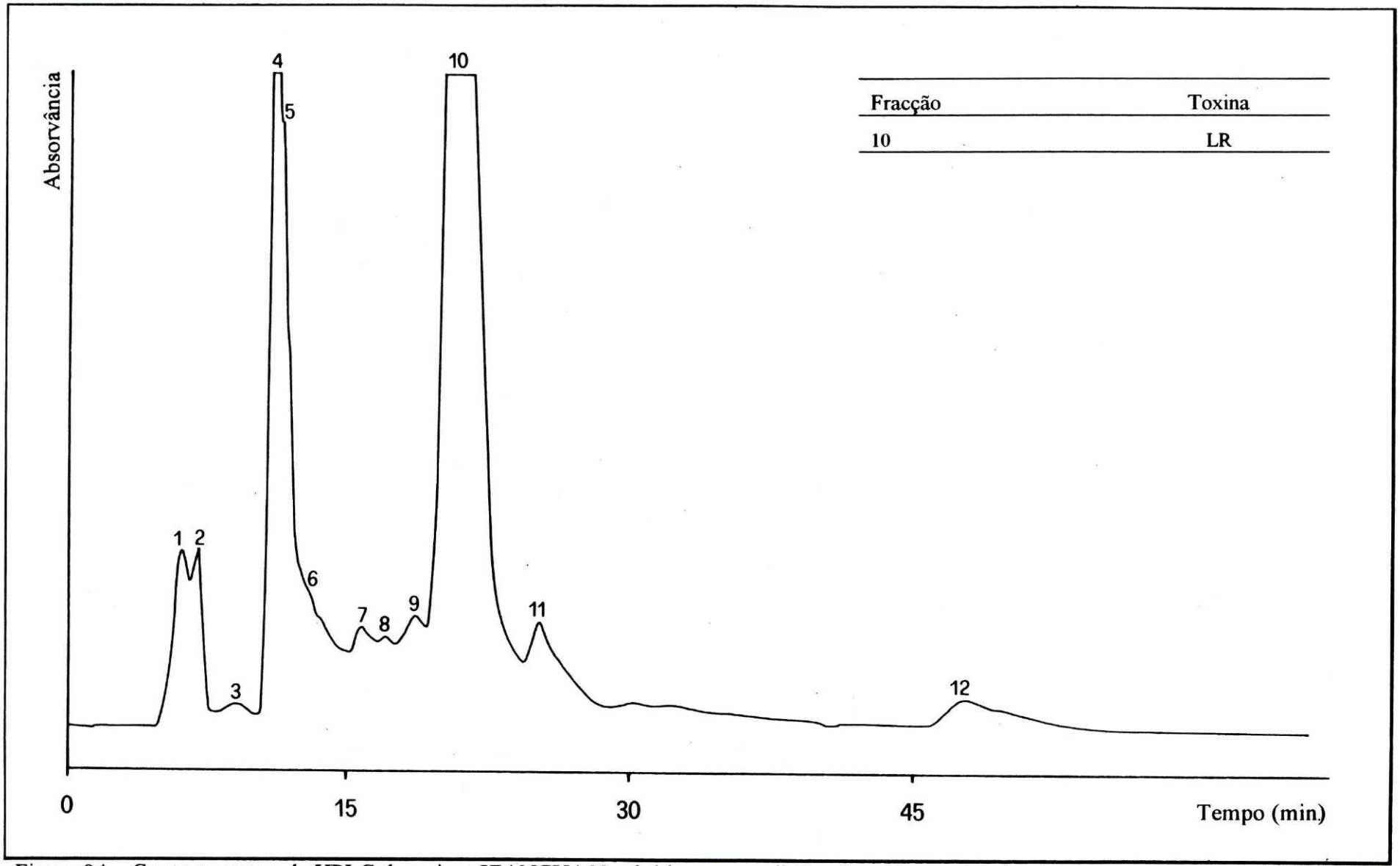


Figura 9A - Cromatograma de HPLC da estirpe IZANCYA33, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

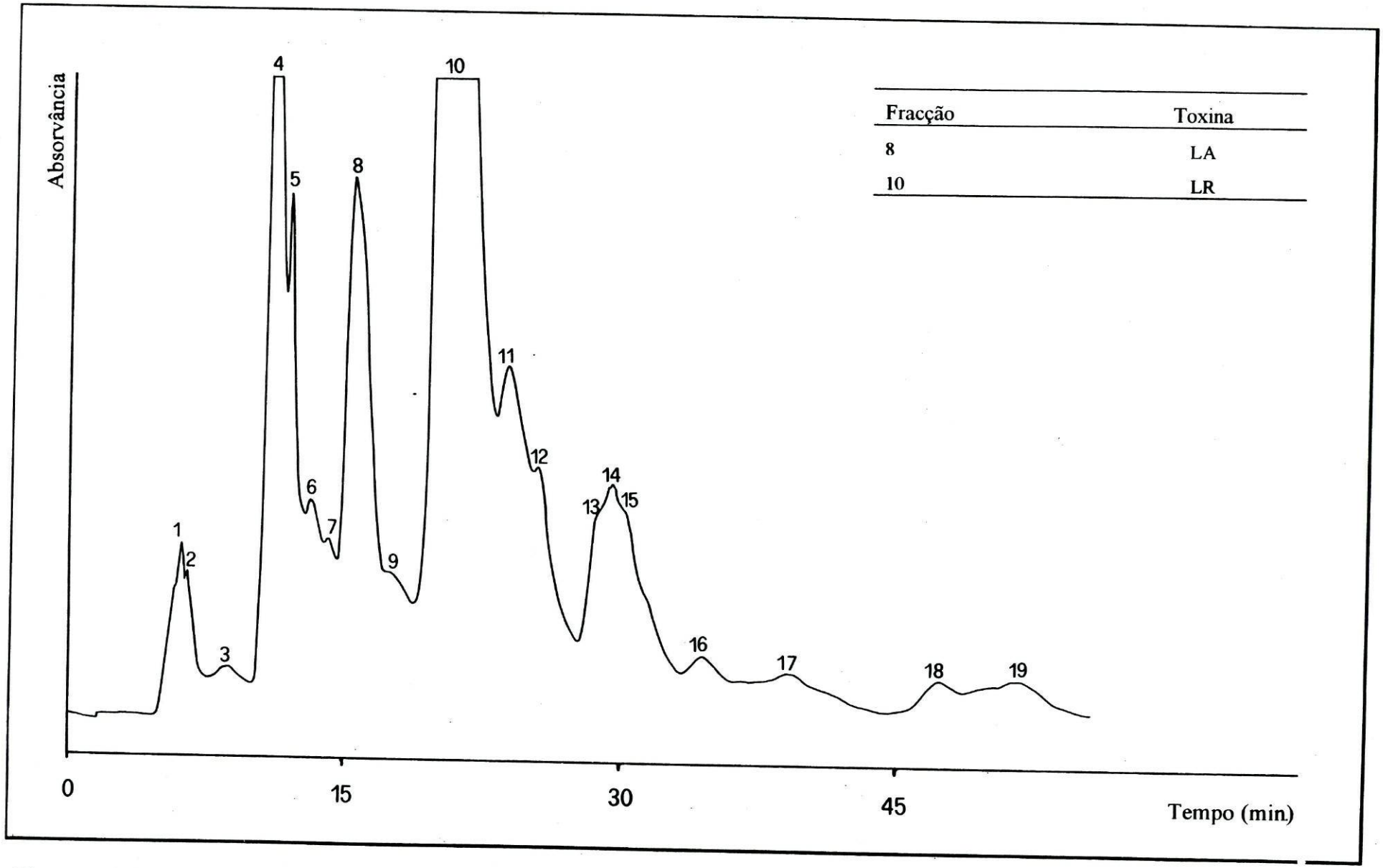


Figura 10A - Cromatograma de HPLC da estirpe IZANCYA34, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

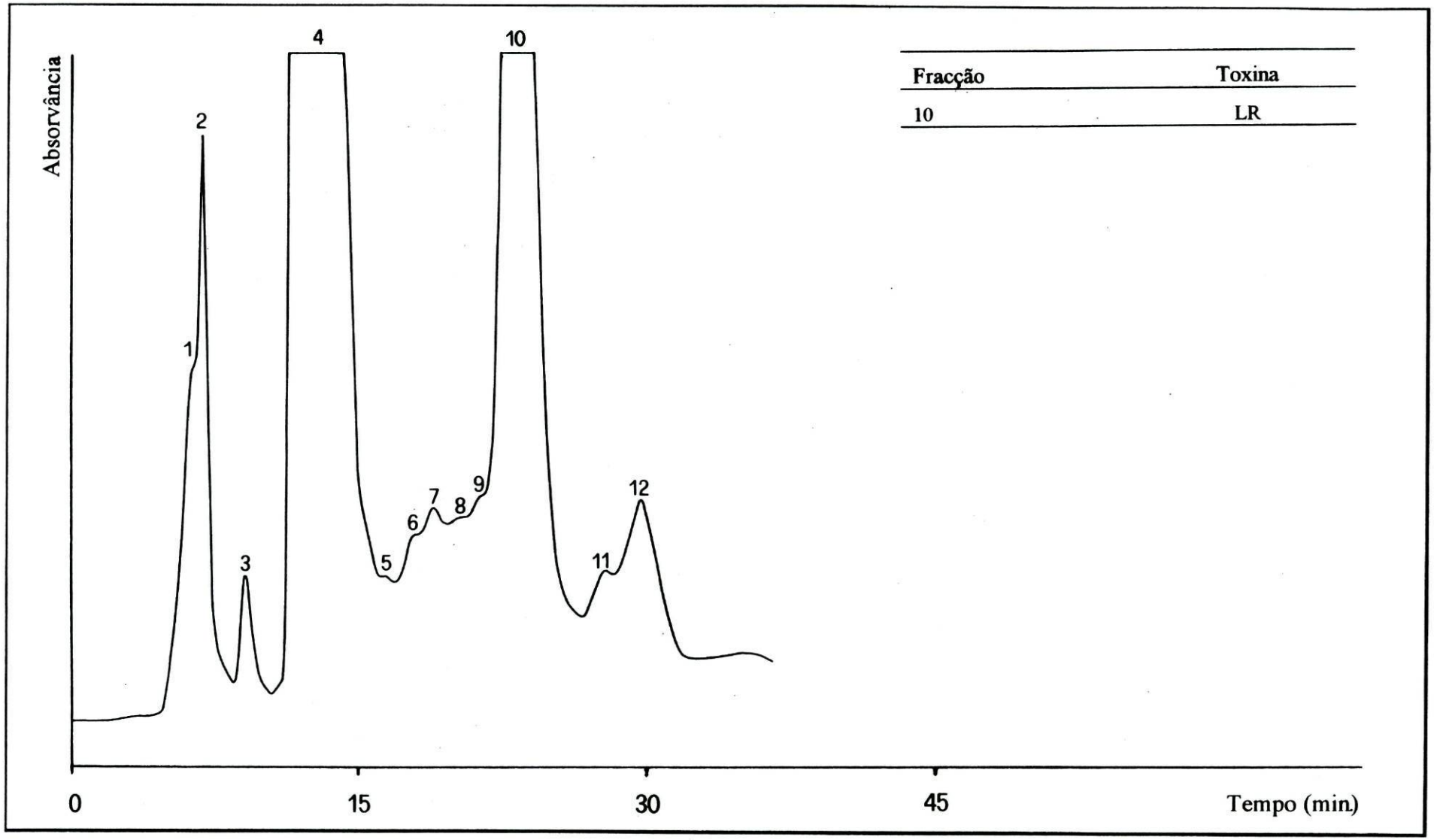
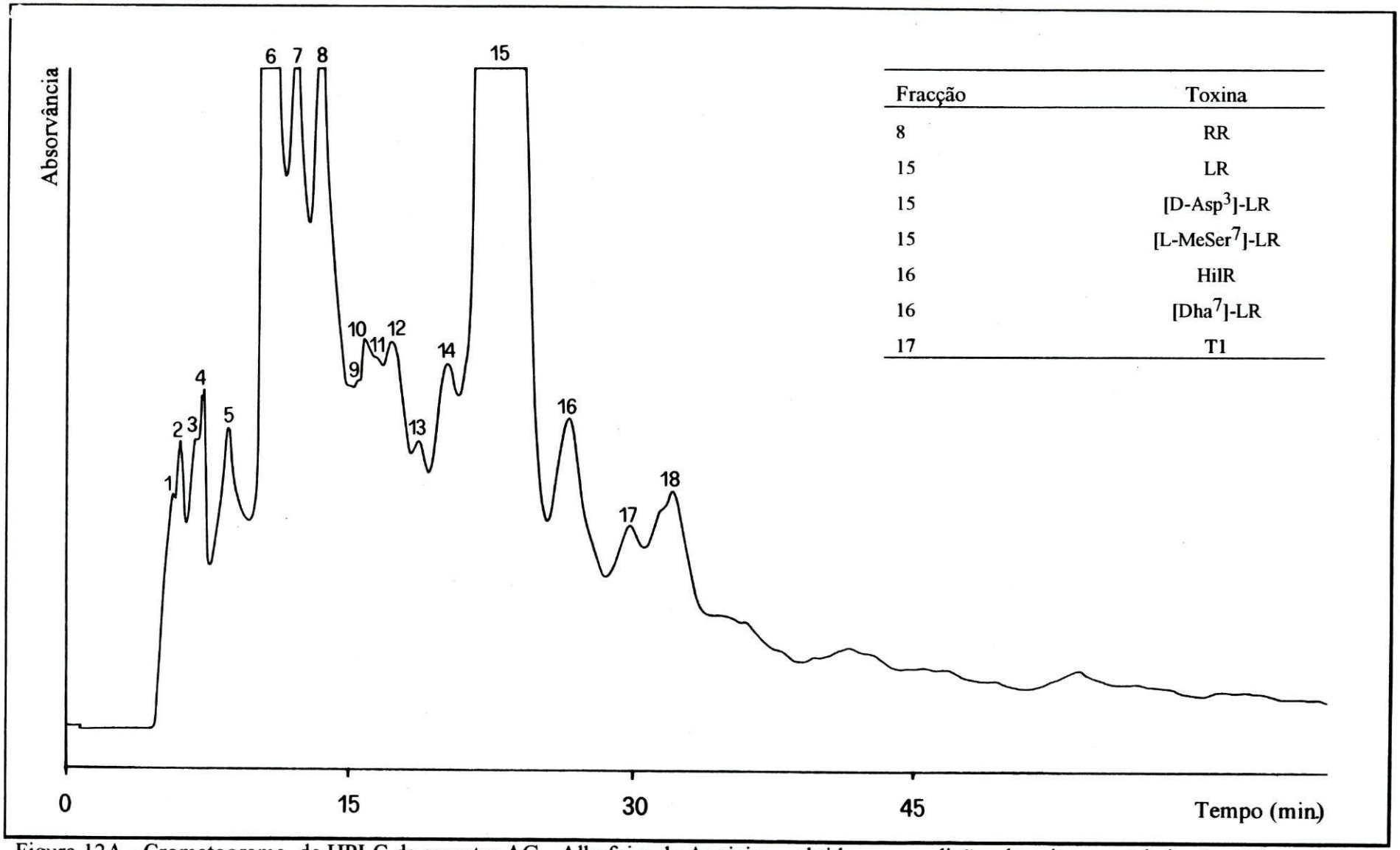


Figura 11A - Cromatograma de HPLC da estirpe IZANCYA44, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.



Fracção	Toxina
8	RR
15	LR
15	[D-Asp^3]-LR
15	[L-MeSer^7]-LR
16	HilR
16	[Dha^7]-LR
17	T1

Figura 12A - Cromatograma de HPLC da amostra AG - Albufeira da Aguieira -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

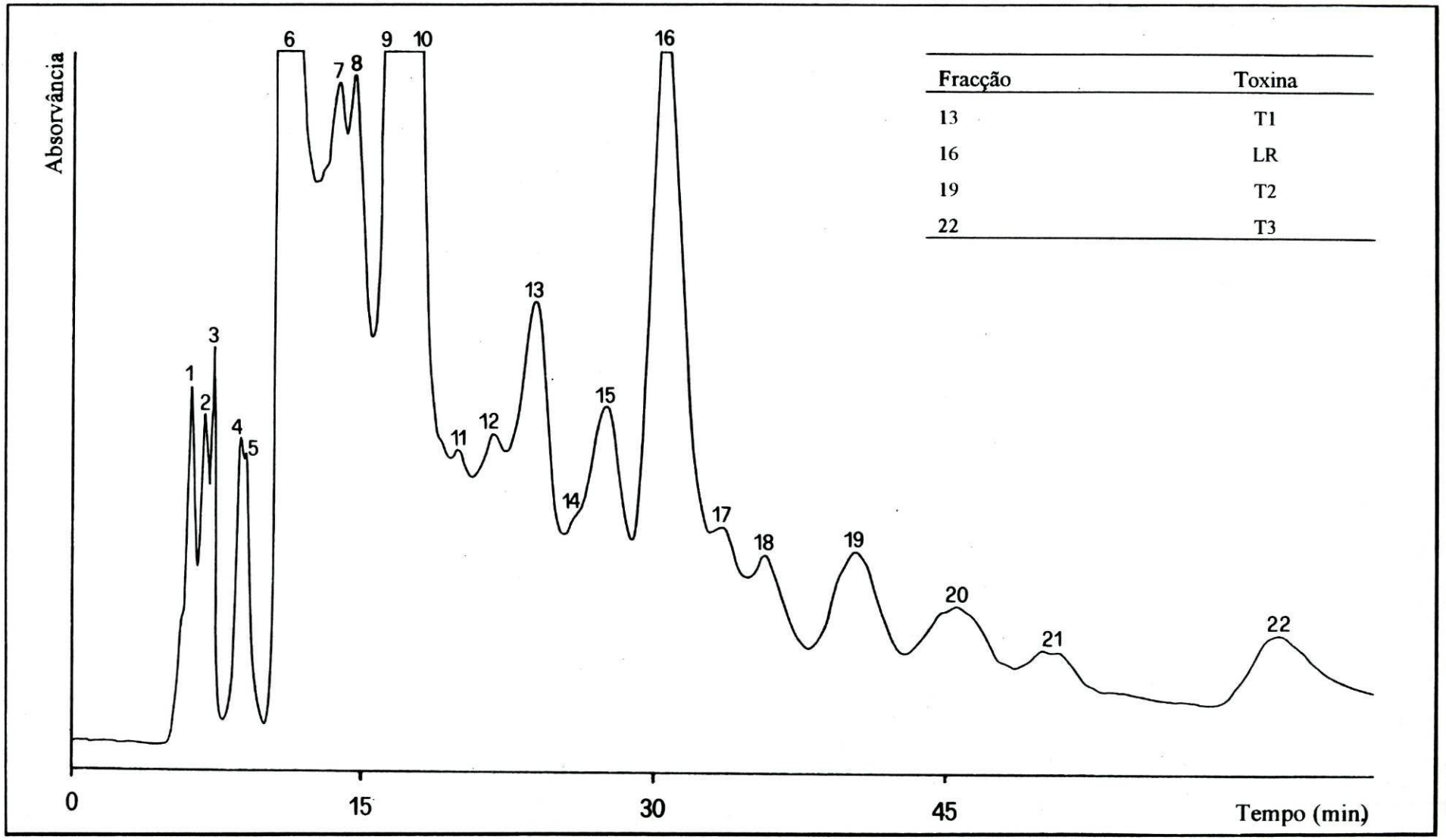


Figura 13A - Cromatograma de HPLC da amostra CA - Albufeira do Carrapatelo -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

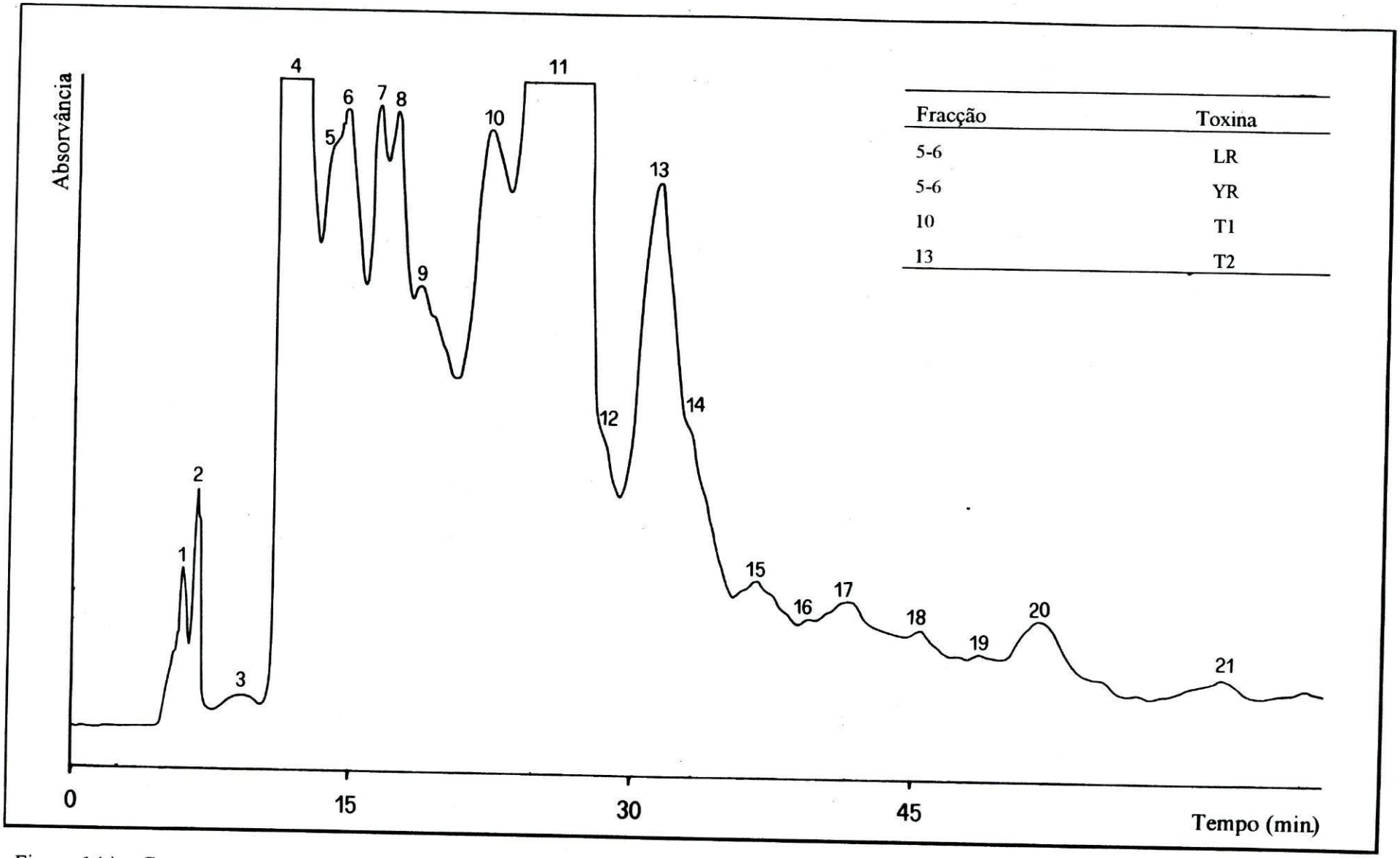


Figura 14A - Cromatograma de HPLC da amostra ME - Rio Guadiana, Mértola -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

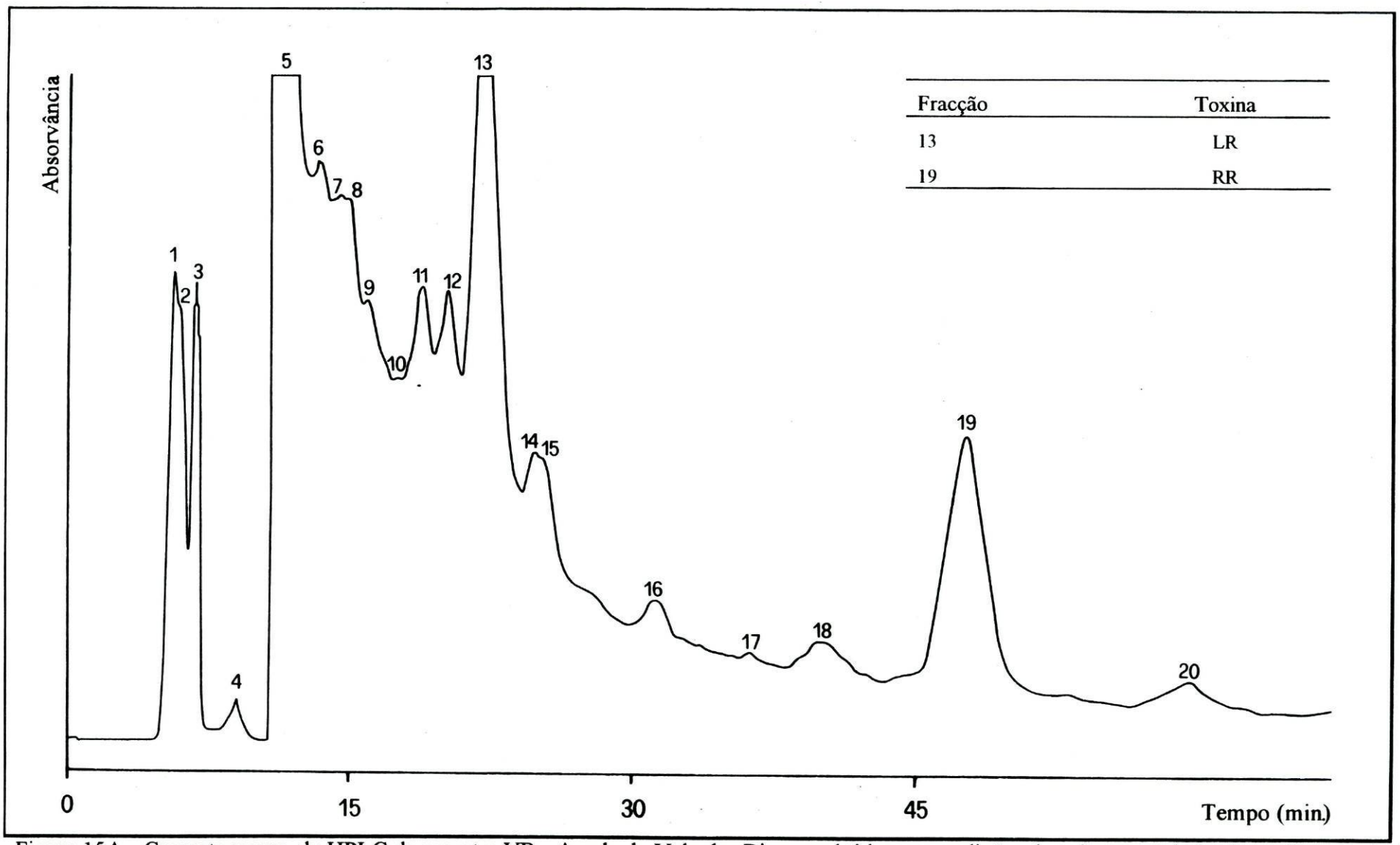


Figura 15A - Cromatograma de HPLC da amostra VB - Açude de Vale das Bicas -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

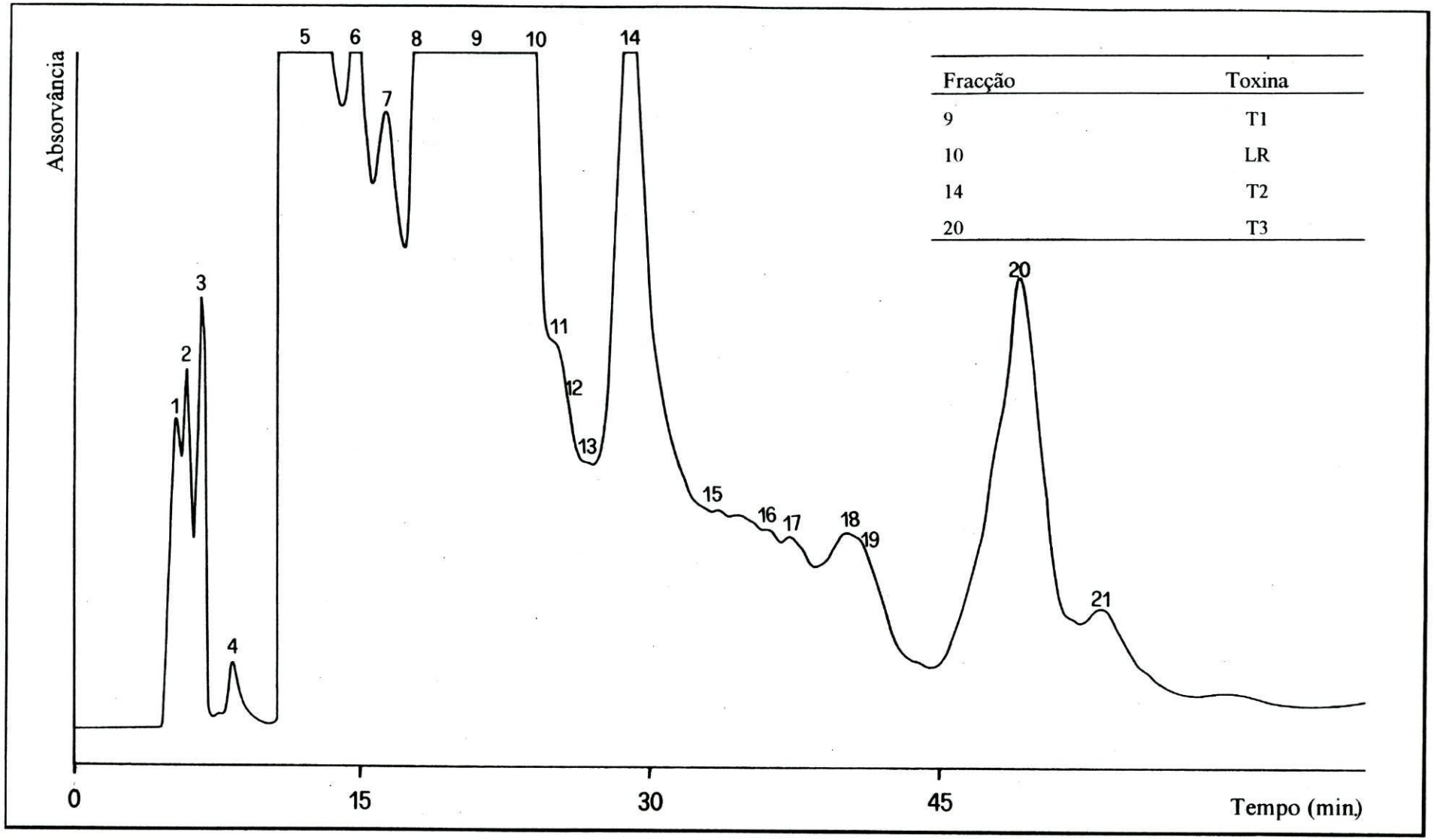


Figura 16A - Cromatograma de HPLC da amostra MI - Rio Minho -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

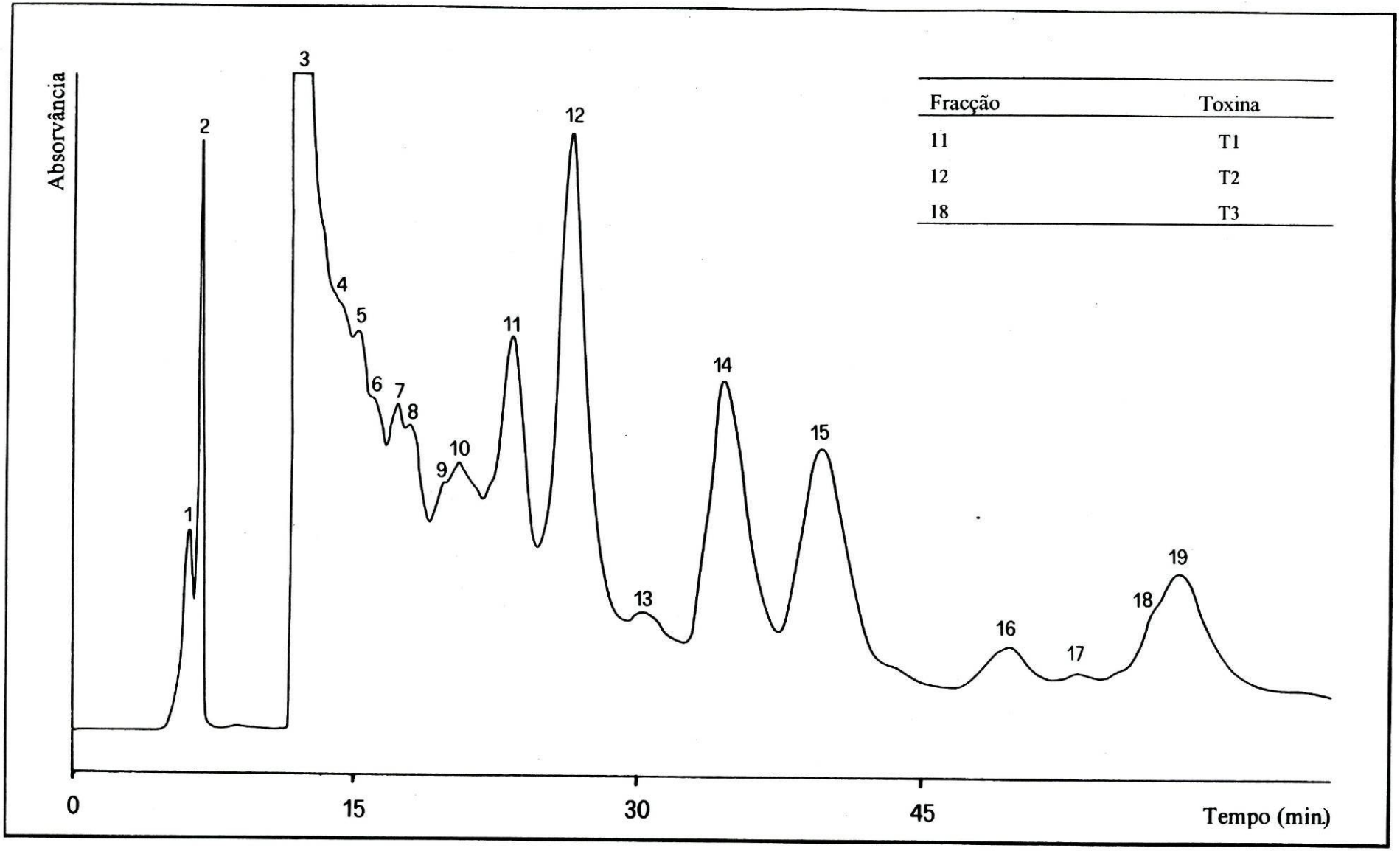
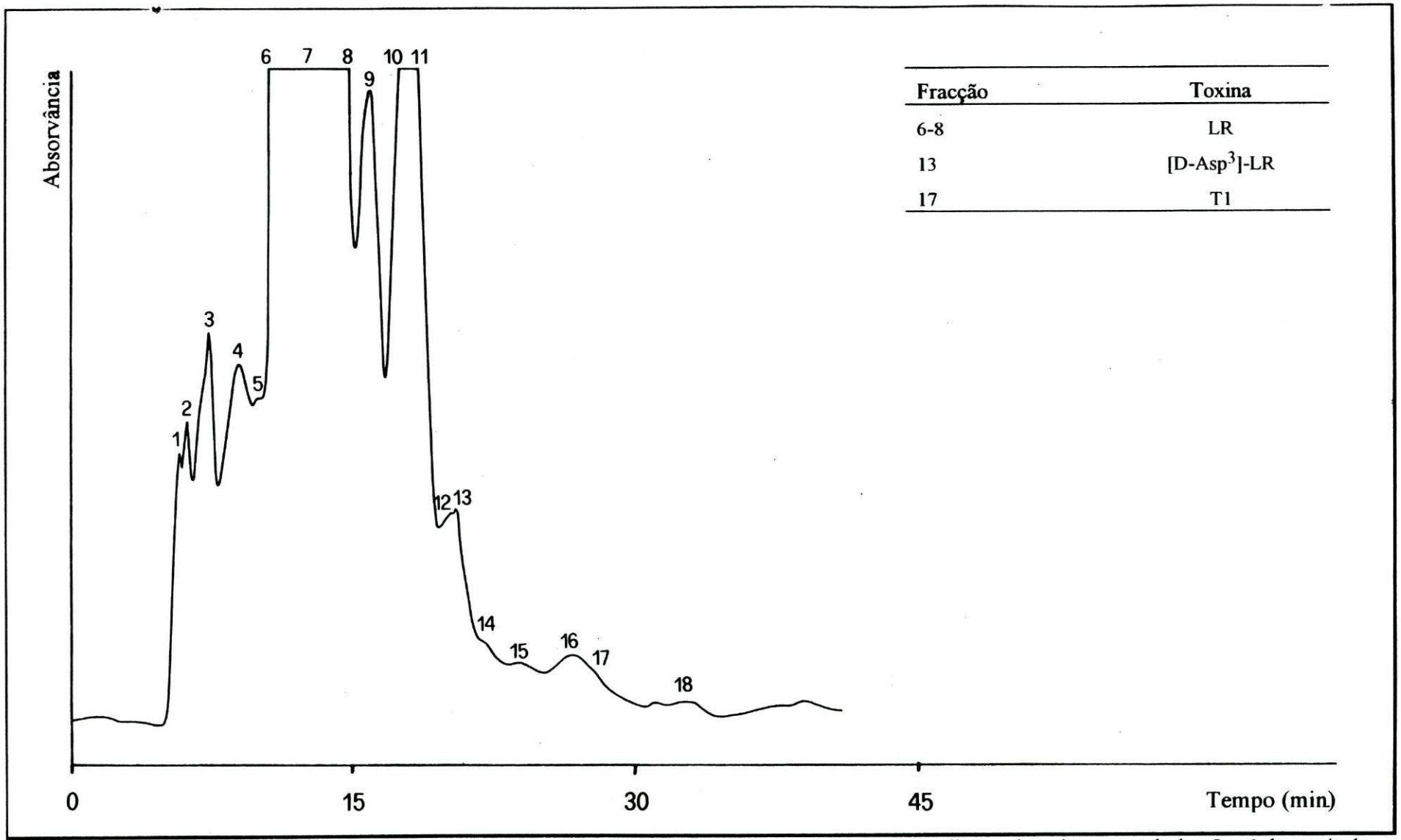


Figura 17A - Cromatograma de HPLC da amostra TO - Albufeira do Torrão -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.



Fracção	Toxina
6-8	LR
13	[D-Asp^3]-LR
17	T1

Figura 18A - Cromatograma de HPLC da amostra CR - Albufeira de Crestuma -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

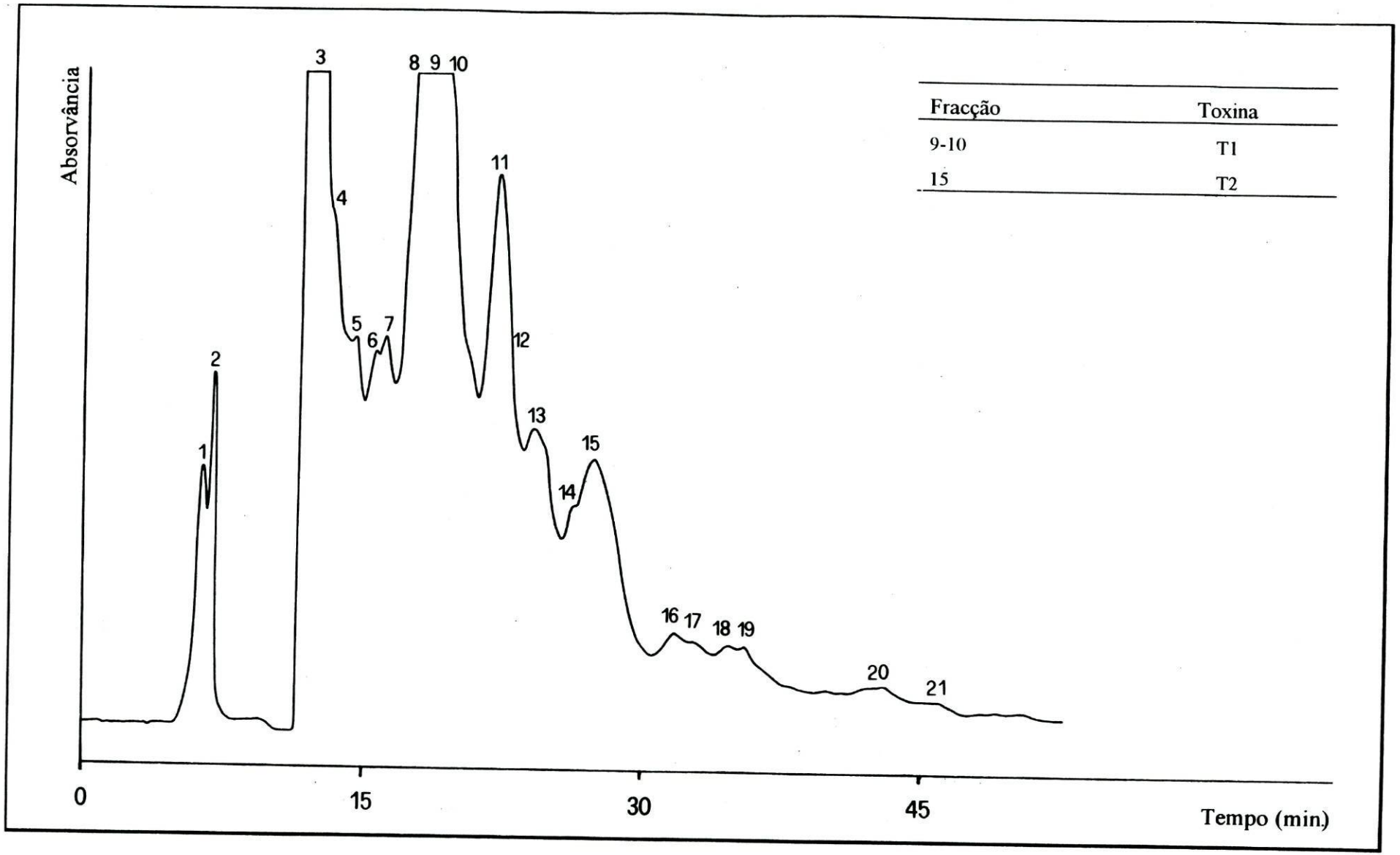


Figura 19A - Cromatograma de HPLC da amostra BM - Barrinha de Mira -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

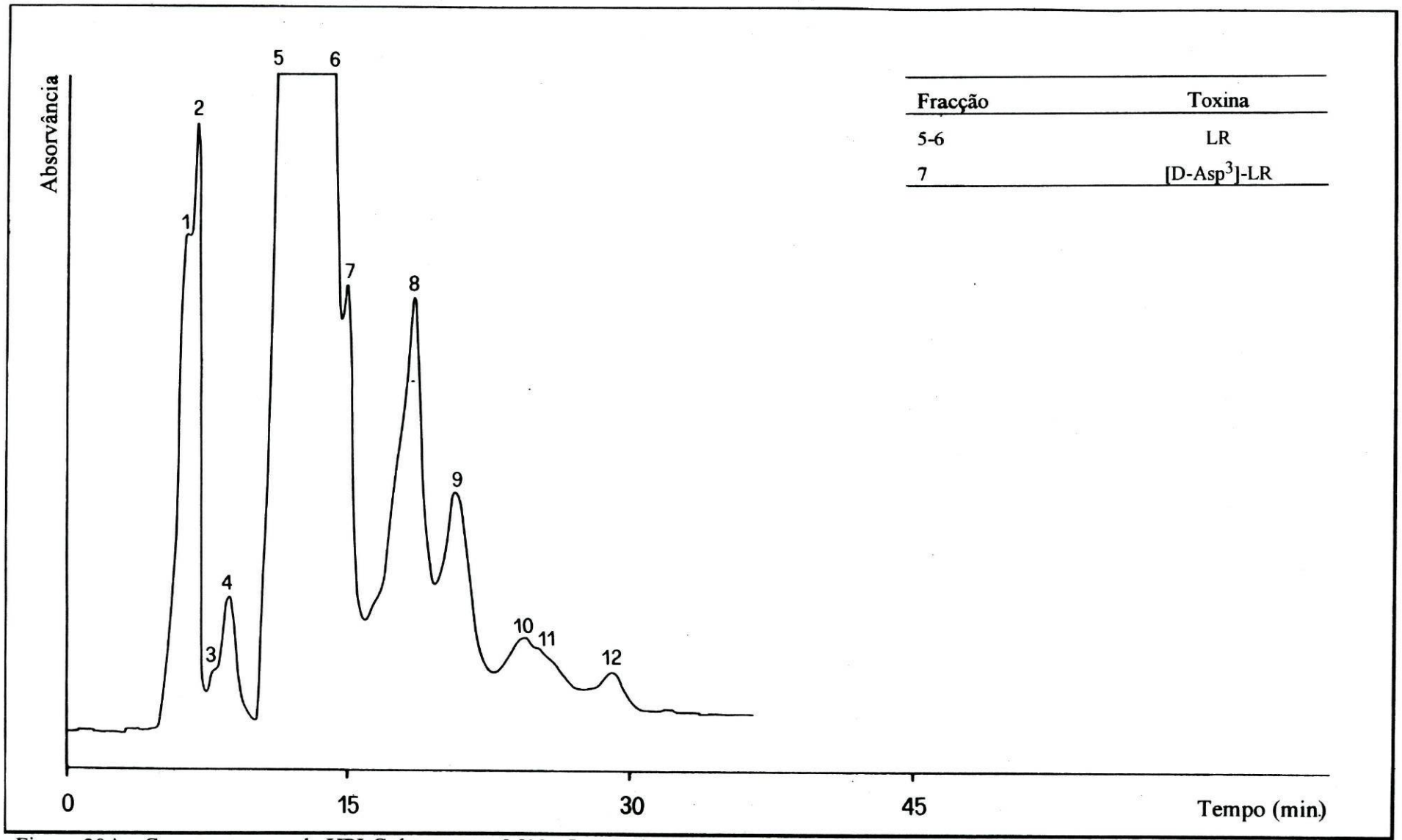
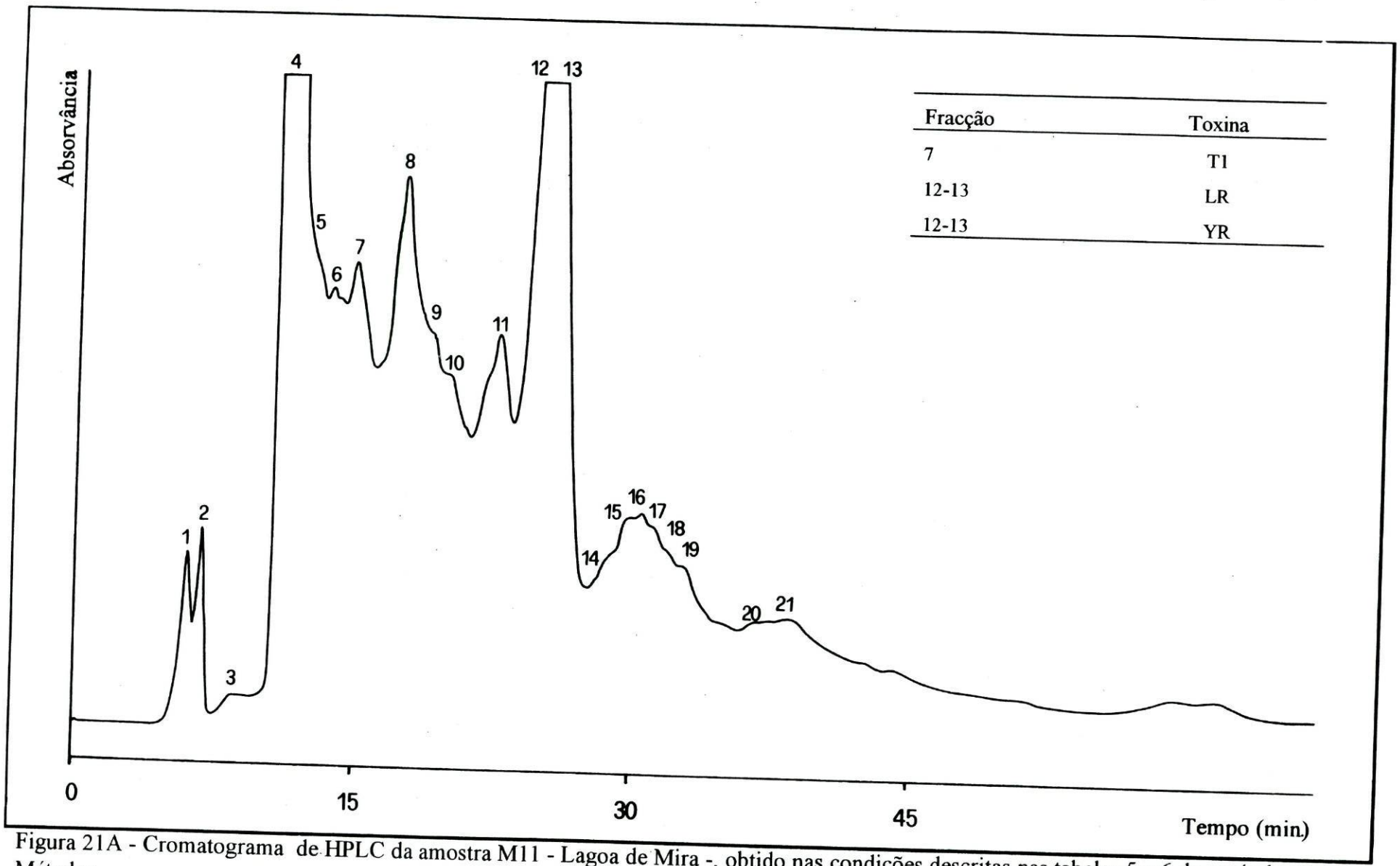
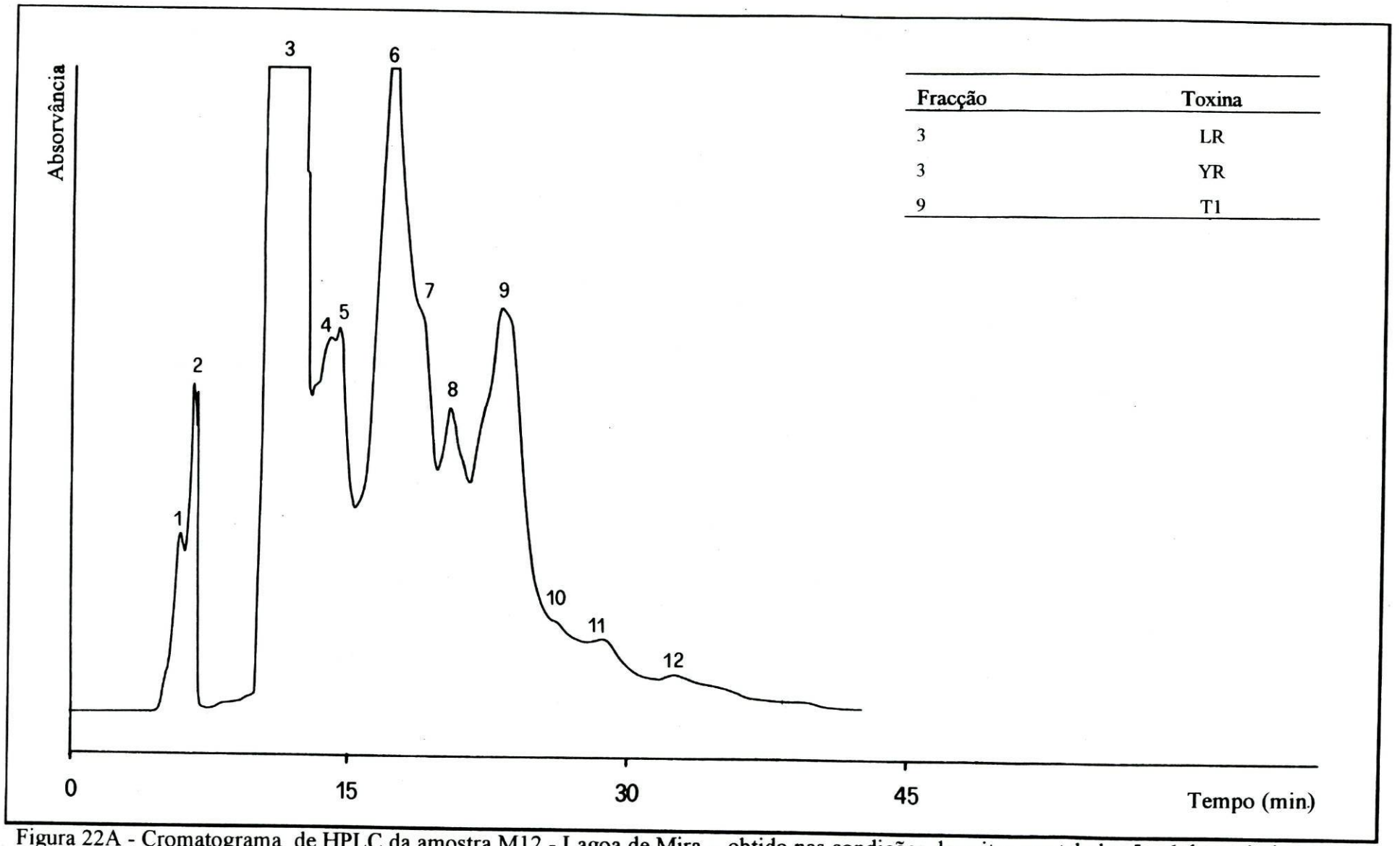


Figura 20A - Cromatograma de HPLC da amostra M10 - Lagoa de Mira -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.



Fracção	Toxina
7	T1
12-13	LR
12-13	YR

Figura 21A - Cromatograma de HPLC da amostra M11 - Lagoa de Mira -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.



Fracção	Toxina
3	LR
3	YR
9	T1

Figura 22A - Cromatograma de HPLC da amostra M12 - Lagoa de Mira -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

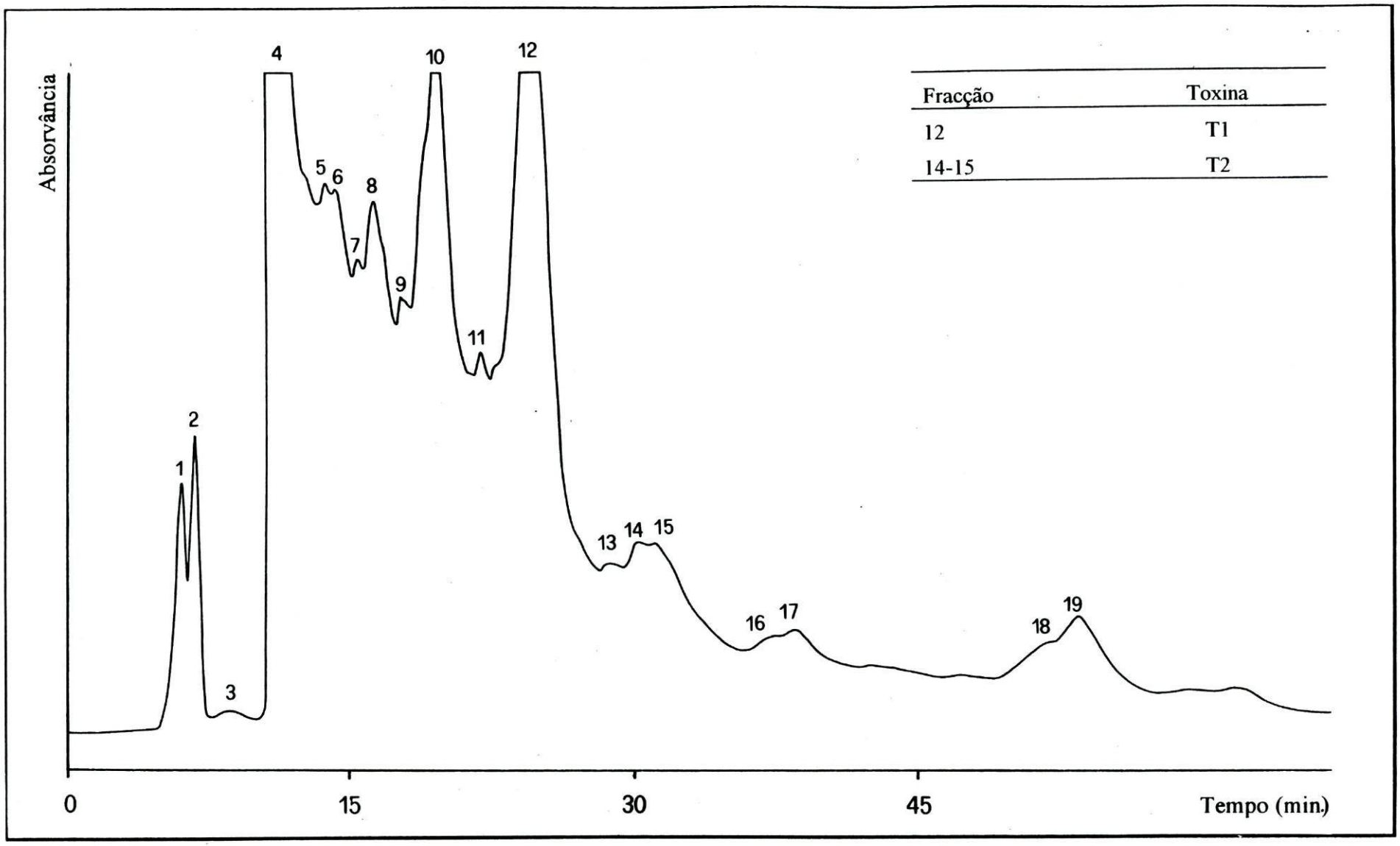


Figura 23A - Cromatograma de HPLC da amostra M13 - Lagoa de Mira -, obtido nas condições descritas nas tabelas 5 e 6 do capítulo Material e Métodos.

ESPECTROS DE MASSA (FABMS)

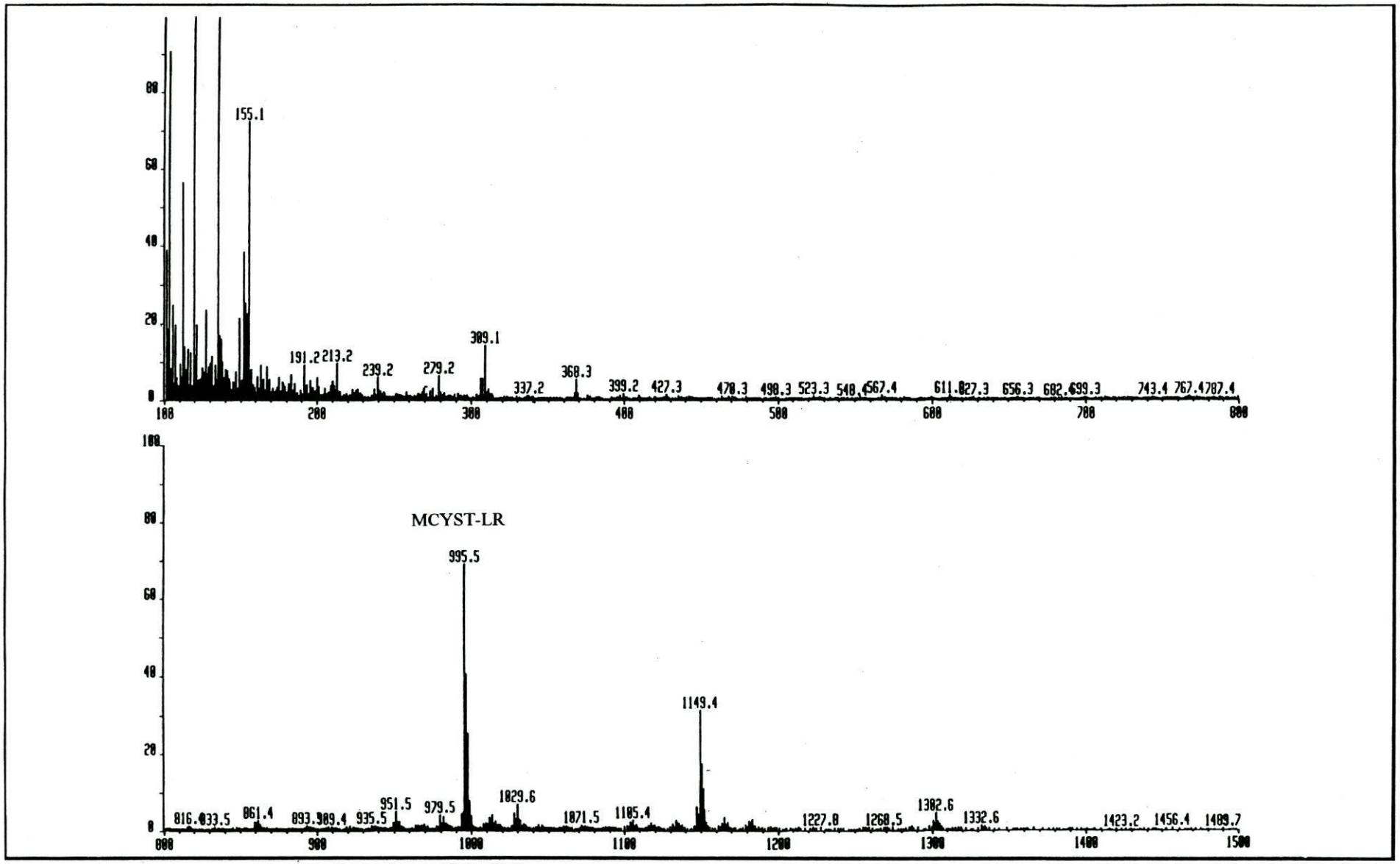


Figura 24A - Espectro de massa da MCYST-LR (*m/z*= 995), obtido segundo as condições descritas no capítulo 2.2.9 do Material e Métodos

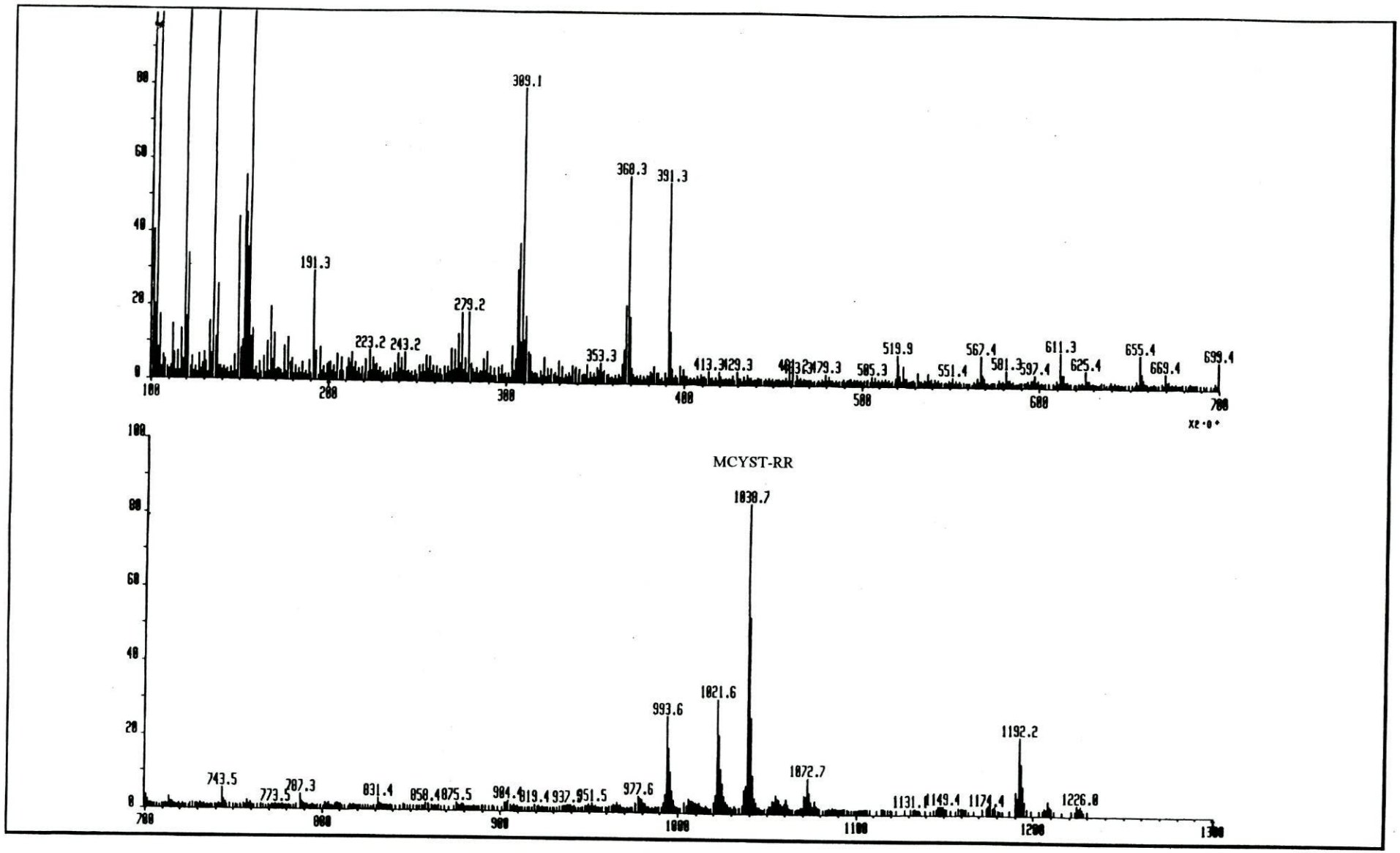


Figura 25A - Espectro de massa da MCYST-RR (*m/z*=1039), obtido segundo as condições descritas no capítulo 2.2.9 do Material e Métodos

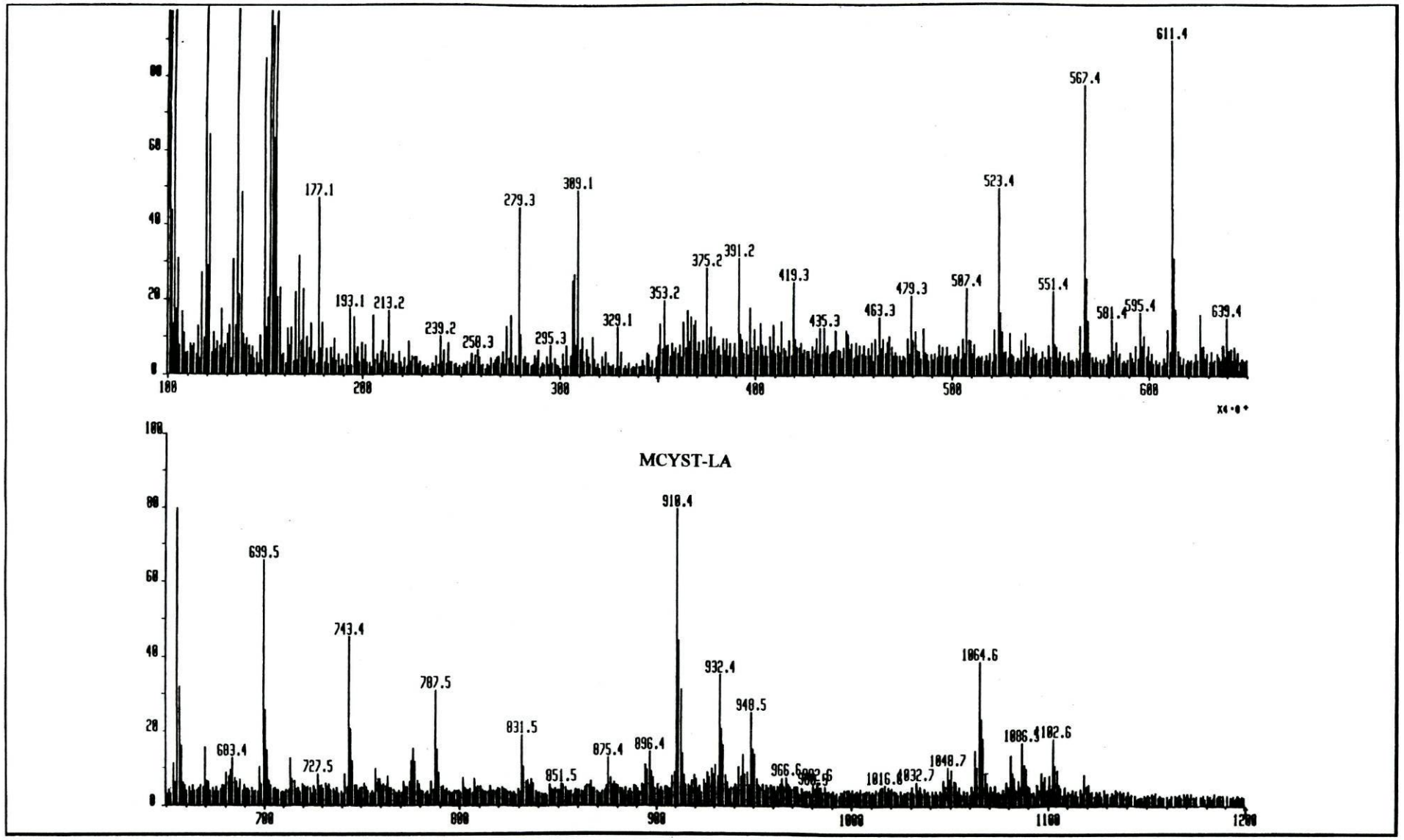


Figura 26A - Espectro de massa da MCYST-LA (*m/z*=910), obtido segundo as condições descritas no capítulo 2.2.9 do Material e Métodos

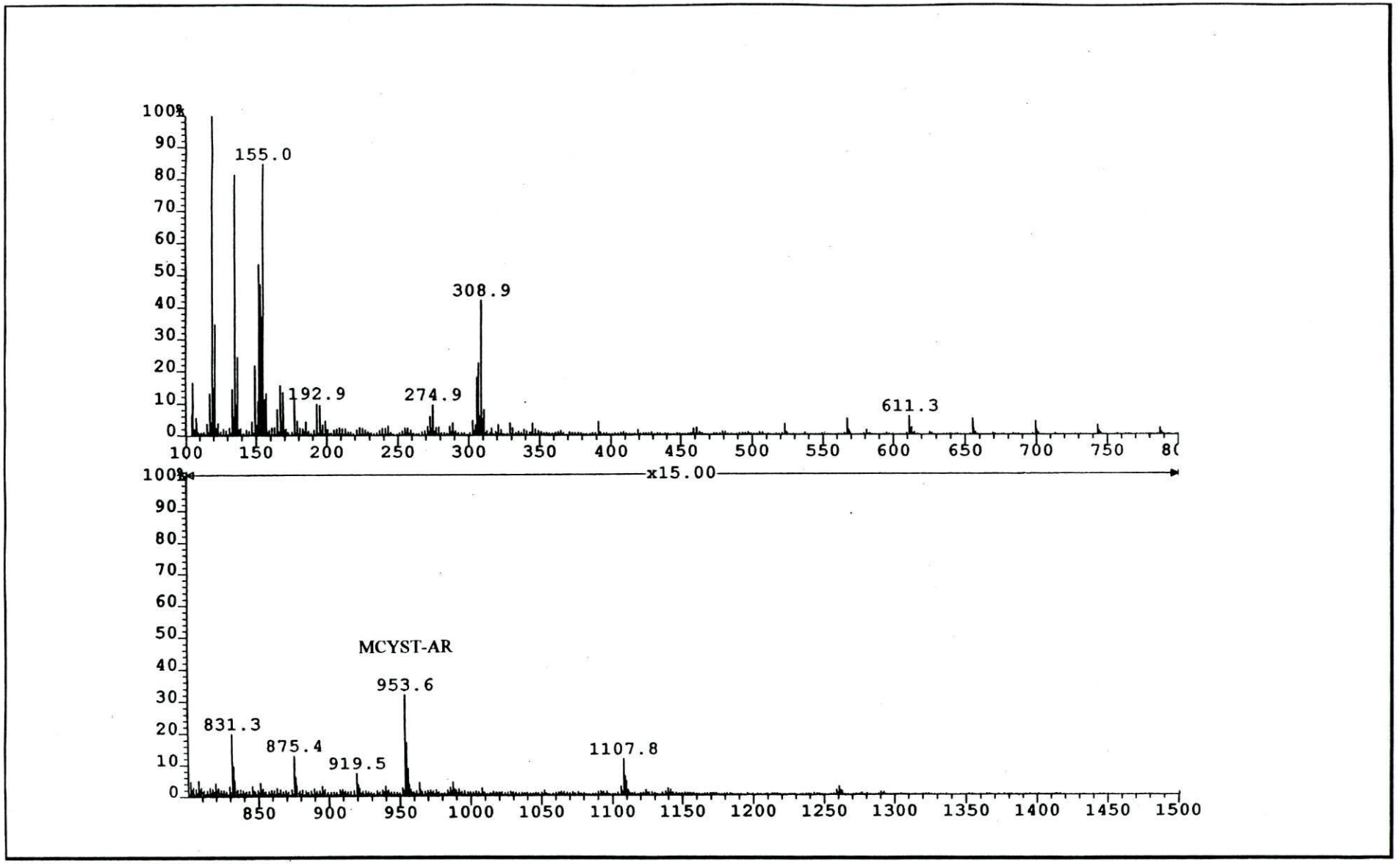


Figura 27A - Espectro de massa da MCYST-AR (*m/z*=954), obtido segundo as condições descritas no capítulo 2.2.9 do Material e Métodos

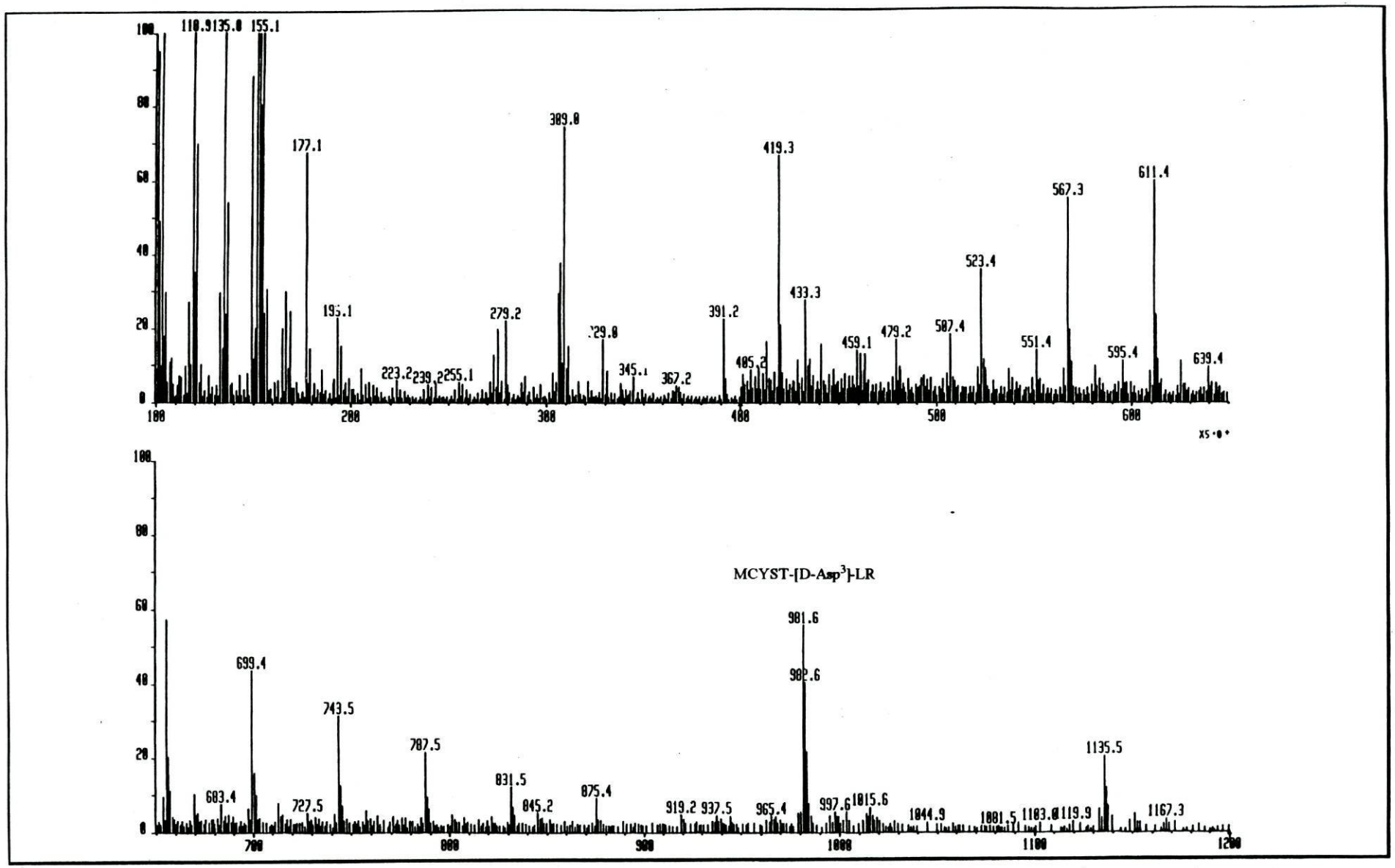


Figura 28A - Espectro de massa da [D-Asp^3]MCYST-LR (*m/z*=981), obtido segundo as condições descritas no capítulo 2.2.9 do Material e Métodos

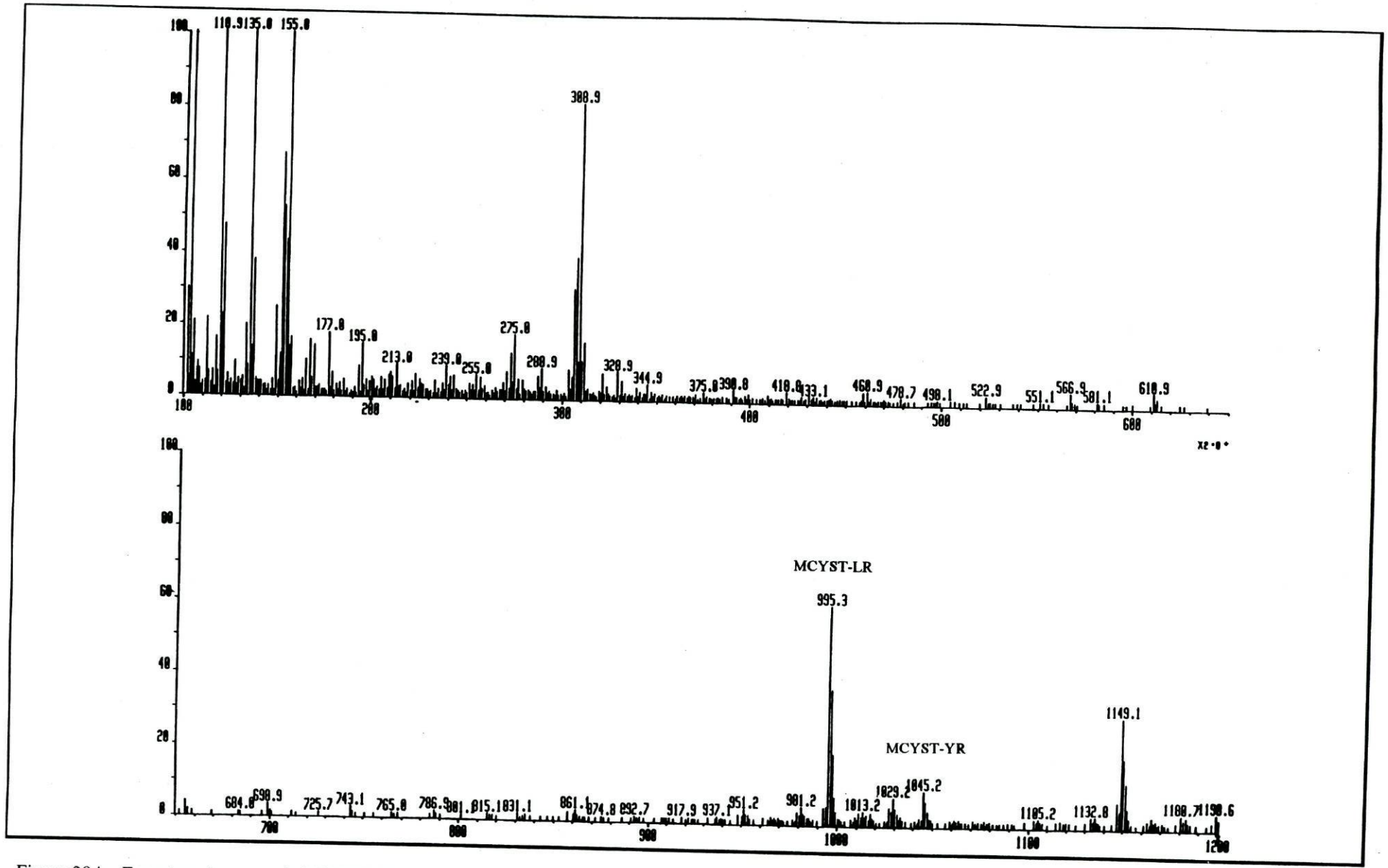


Figura 29A - Espectros de massa de MCYST-LR (*m/z*=995) e de MCYST-YR (*m/z*=1045) obtidos segundo as condições descritas no capítulo 2.2.9 do Material e Métodos

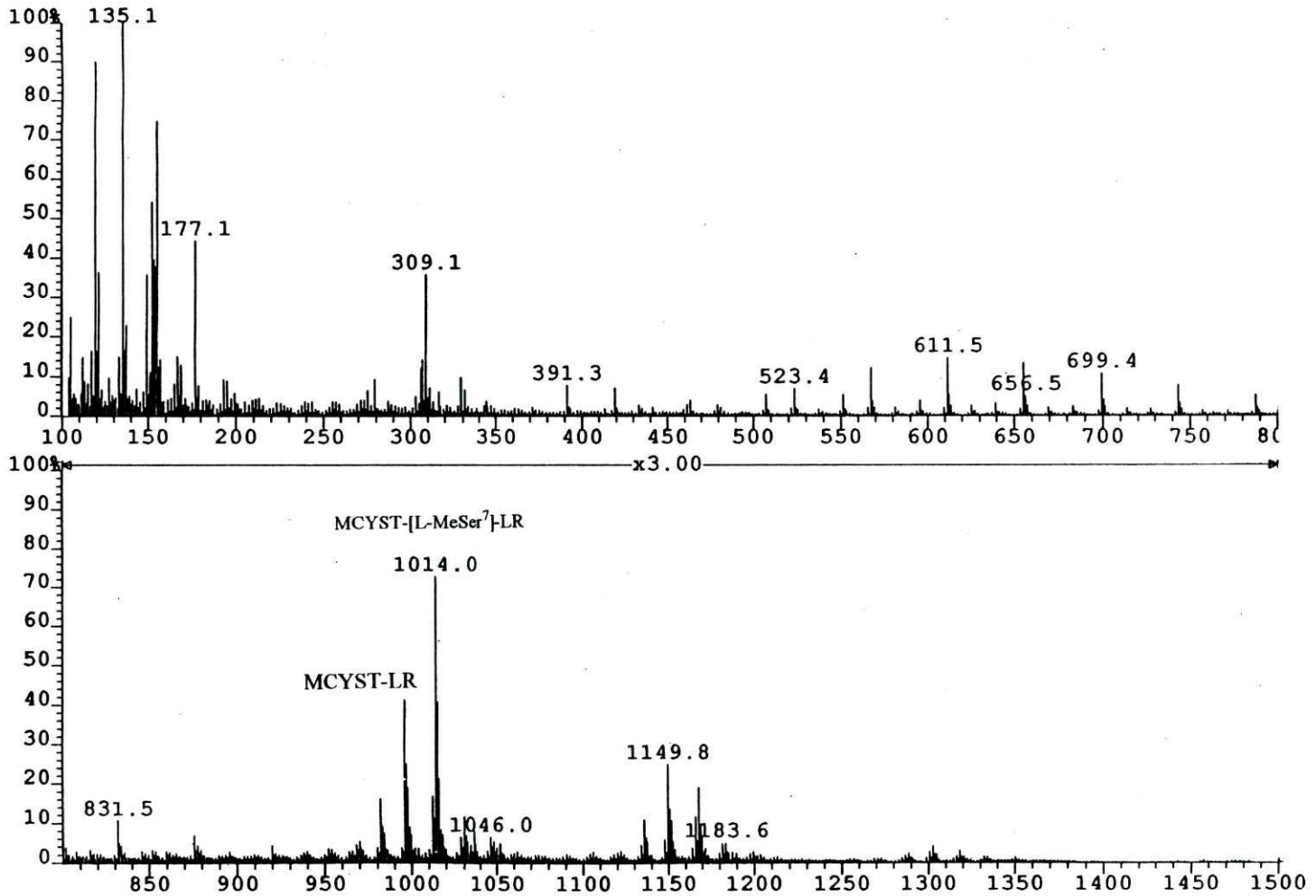


Figura 30A - Espectros de massa de MCYST-LR (*m/z*=995) e de [L-MeSer^7]MCYST-LR (*m/z*=1014) obtidos segundo as condições descritas no capítulo 2.2.9 do Material e Métodos

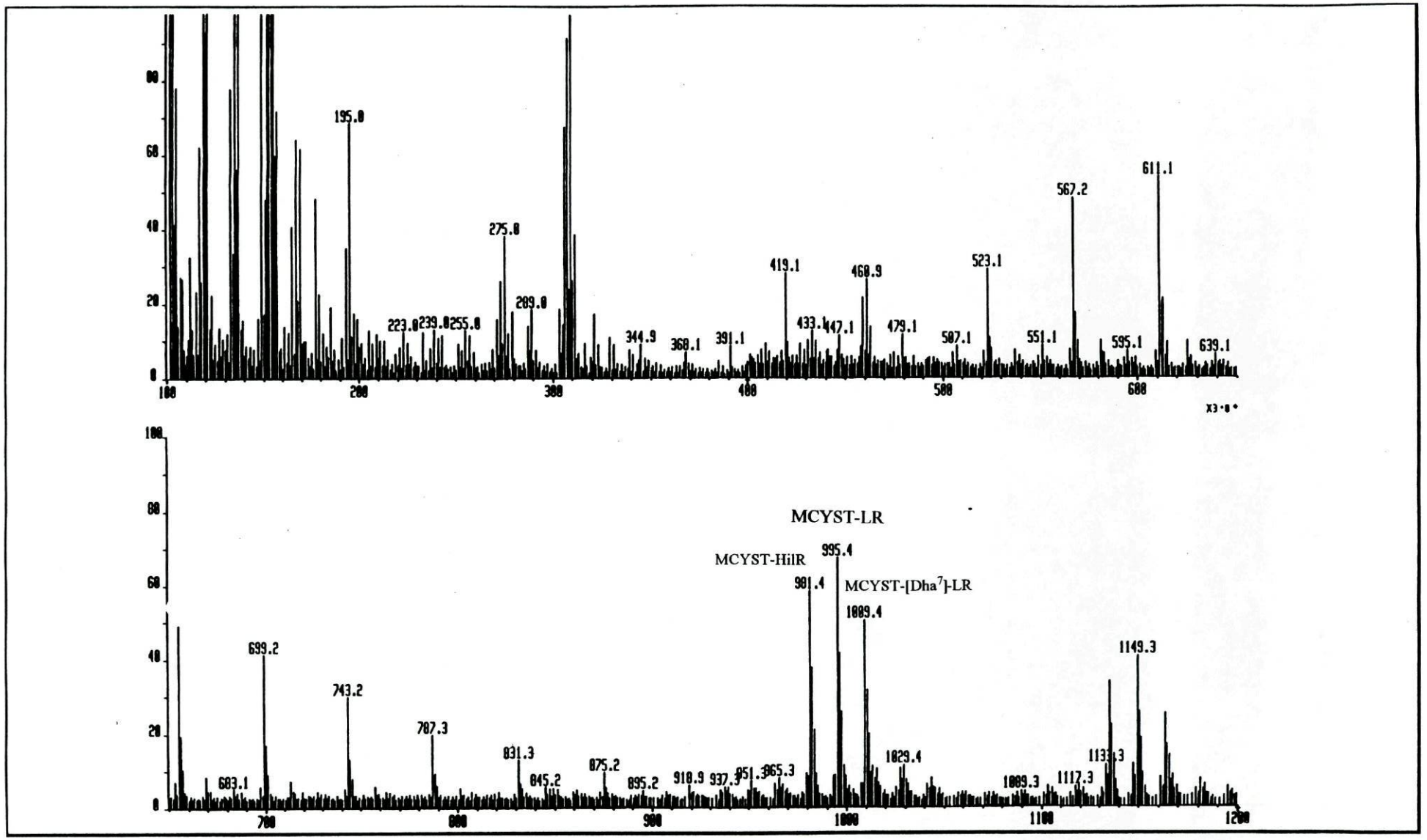


Figura 31A - Espectros de massa de [Dha^7]MCYST-LR (m/z=981), MCYST-LR (*m/z*=995) e de MCYST-HilR (*m/z*=1009) obtidos segundo as condições descritas no capítulo 2.2.9 do Material e Métodos