

CIANOBACTERIAS Y CIANOTOXINAS: ROL DE LAS MICROCISTINAS EN LA SALUD HUMANA Y ANIMAL Y SU DETECCIÓN EN MUESTRAS DE AGUA

PÉREZ DS, SORACI AL, TAPIA MO

Laboratorio de Toxicología, Departamento de Fisiopatología
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad
Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

RESUMEN: Las cianobacterias o algas azul verdosas poseen características tanto de algas como de bacterias. Ante condiciones favorables, tales como, aguas con altos contenidos de nutrientes o residuos químicos, entre otros, ocurre un fenómeno denominado "florecimiento o bloom algal", durante el cual se advierte la formación de espuma y se alcanza una densidad celular sumamente elevada. Las cianobacterias producen una gran cantidad de efectos adversos sobre el recurso hídrico y los ecosistemas acuáticos, aunque lo más interesante, y a lo que se referirá fundamentalmente está revisión bibliográfica, es su capacidad de generar toxinas que se liberan durante la finalización del bloom y la muerte celular. Las cianotoxinas son consideradas las toxinas más importantes de los cuerpos de agua, y la microcistina LR, una hepatotoxina de toxicidad muy elevada, es la más frecuentemente hallada. La hepatotoxicosis aguda y muerte inducida por microcistinas sobre un gran número de especies han generado estudios sobre su toxicidad. Los métodos de detección con los que contamos actualmente para estudiar la presencia de las toxinas en agua son numerosos, siendo la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) la metodología más comúnmente utilizada con este propósito. Se han establecido límites provisionales de consumo para dicha hepatotoxina, aunque la mayoría de los países carece de una legislación firme al respecto.

PALABRAS CLAVES: cianobacterias, florecimiento algal, toxicidad, hepatotoxinas, métodos de detección.

CYANOBACTERIA AND CYANOTOXINS: ROLE OF MICROCISTYNS ON HUMAN AND ANIMAL HEALTH AND THEIR DETECTION IN WATER SAMPLES

ABSTRACT: Cyanobacteria or blue-green algae have characteristics both of bacteria and algae. In the presence of favorable conditions and, generally, in waters with high contents of nutrients or chemical residues, a phenomenon called "harmful algal bloom" occurs. During this phenomenon, the formation of foam and an extremely high cellular density are observed. Cyanobacteria produce a great quantity of adverse effects on hydrologic resource and aquatic ecosystems, although more interestingly yet, and as we will mainly refer in this review, is their capacity for generating toxins that will be released when blooms ends and cells die. Cyanotoxins are considered the most important toxins in water bodies. Among them, microcystin LR, a highly toxic hepatotoxin, is the most common. The acute hepatotoxicosis and death induced by microcystins on a high number of species have generated several studies on their toxicity. The methods of detection available to study the presence of toxins in water are numerous; being the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) the most widely used methodology. Provisional limits of consume for the mentioned hepatotoxin are established. However, there is still a worldwide lack of firm legislations on the subject.

KEYWORDS: cyanobacteria, harmful algal bloom, toxicity, hepatotoxins, detection methods.

Fecha de recepción: 07/11/07

Fecha de aprobación: 17/03/08

Dirección para correspondencia: Denisa S. Pérez. Laboratorio de Toxicología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Campus Universitario, Tandil (7000), Buenos Aires, Argentina. Tel/Fax: +54-2293-439850. **E-mail:** denisa@vet.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Características generales de las cianobacterias: Son los organismos del fitoplancton más comúnmente identificados y se encuentran, principalmente, en cuerpos de agua con altos niveles tróficos (25). Se consideran una unión entre procariotas y eucariotas fotosintéticos con capacidad de sintetizar clorofila (19). Presentan características tanto de bacterias (pared celular de tipo procariota, ausencia de membrana nuclear y de orgánulos subcelulares) (23, 24, 25) como de algas (tamaño, maquinaria fotosintética) (19). Se las denomina **cianobacterias, algas verde azuladas, cianofíceas** (19, 23, 25) o **cianoprocarriotas** (24). Algunas son unicelulares, otras multicelulares y la mayoría filamentosas (23), haciéndose visibles al formar colonias (19). Son excelentes fuentes de vitaminas y proteínas (9), bio-fertilizantes (9, 23), fuentes de combustibles renovables, agentes de control de polución y agentes de biorremediación (9). Presentan particularidades que las hacen únicas entre las bacterias y entre las algas: **antigüedad evolutiva**, (25), **metabolismo aeróbico y carácter fotoautótrofo** (4, 14), **diversidad morfológica** (25) y **celular** (24, 25), **regulación de su posición en la columna de agua** (4, 24) y **facilidad de crecimiento** (4, 25, 26). La **producción de toxinas** (19) y fundamentalmente, la hepatotoxicidad causada por un tipo de cianotoxinas (microcistinas), es el motivo de esta revisión bibliográfica.

“Floraciones de agua” o “blooms algales”: Los agrupamientos masivos de cianobacterias se denominan “*floraciones de agua*” o “*blooms algales*” (26) y se describen como un aumento significativamente mayor que el promedio en la biomasa del fitoplancton (25). Ocurren generalmente a fines de verano (4), en periodos de horas a días (7). Pueden diferenciarse en espumas flotantes en la superficie y brotes masivos generales en toda el agua (4). Debido a la presencia del pigmento azul que les da nombre, frecuentemente se observan discoloraciones azules, las cuales son evidentes cuando las células comienzan a deteriorarse. Las floraciones pueden ser desarrolladas por diatomeas, algas verdes, dinoflagelados y cianobacterias (7). Generalmente, están relacionados con una o dos especies y se identifican por el tipo de fitoplancton dominante (25). Existen numerosas especies de cianobacterias que desarrollan floraciones en ambientes de agua dulce, salobre o marina (7), aunque las principales son *Anabaena circinalis* y *Microcystis aeruginosa*, ambas potencialmente tóxicas (11, 15). Su registro histórico es reciente y adquieren importancia por el impacto económico que representan (25). La presencia de cianobacterias tóxicas ha sido reportada al menos en 44 países (11). Desde hace mucho tiempo se tiene

conocimiento sobre su presencia, aunque solo se las asociaba con la muerte de animales domésticos (25). Recientemente, en Brasil, la muerte de 88 personas y el daño renal en 50 pacientes que requirieron hemodiálisis, se correlacionó con la presencia de cianotoxinas en el agua de consumo (11, 14, 23, 25, 27). Si bien en la República Argentina se han registrado varios accidentes tóxicos ocasionados por la presencia de cianobacterias, el primer registro fue en 1954, en la laguna de San Miguel del Monte con la muerte masiva de peces en concordancia con un florecimiento algal (10). En nuestro país han sido enumerados los ambientes de aguas continentales con riesgo de intoxicación por cianobacterias, aunque la ocurrencia de especies cianotóxicas en agua de red no ha sido ampliamente estudiada (11). En la Fig.1 se encuentran resumidos los factores involucrados en la producción de toxinas y las causas y consecuencias de las floraciones.

Cianotoxinas y otros compuestos cianobacterianos: Las cianotoxinas son consideradas los compuestos más tóxicos y preocupantes en las masas de agua, tanto por su elevada distribución como por su alta toxicidad. Son metabolitos secundarios (24) que se generan y acumulan durante la producción de fotopigmentos. Ante condiciones ambientales desfavorables las cianobacterias mueren y liberan sus contenidos al medio (26). La naturaleza química de las toxinas puede ser muy diversa: péptidos cíclicos, alcaloides y lipopolisacáridos, aunque normalmente se clasifican por los efectos que producen: **Toxinas Irritantes** (19), **Citotoxinas** (*Cilindrospermopsina*) (19, 24), **Dermatotoxinas** (*Aplisiatoxina* y *Lyngbyatoxina*) (26), **Neurotoxinas** (*anatoxina-a*, *anatoxina-a (s)* y *saxitoxina*) (19) y **Hepatotoxinas** (*microcistinas* y *nodularinas*) (16, 22, 26). Las cianobacterias son capaces de generar dos compuestos volátiles, la *geosmina* y el *metilisorborneol*, los cuales suelen contribuir a importantes cambios en las características organolépticas del agua e incluso de los organismos acuáticos. Asimismo, una serie de sustancias suelen acompañar la descomposición de las cianobacterias. Pueden ser metabolitos producidos por ellas o productos de su degradación. Entre éstos se encuentran: *trihalometanos*, *benzeno*, *tolueno*, *etilbenzeno* y *xilenos* (11).

Vías de exposición: Los peligros para la salud surgen principalmente de dos vías de exposición: **a) Contacto directo** con partes expuestas del cuerpo (oidos, ojos, boca, garganta) o áreas cubiertas por el traje de baño (acumulan algas y fomentan rompimiento celular y liberación de contenidos). **b) Ingestión accidental** al tragar o inhalar agua (riesgo de intoxicación) (19). El consumo de suplementos dietarios al-

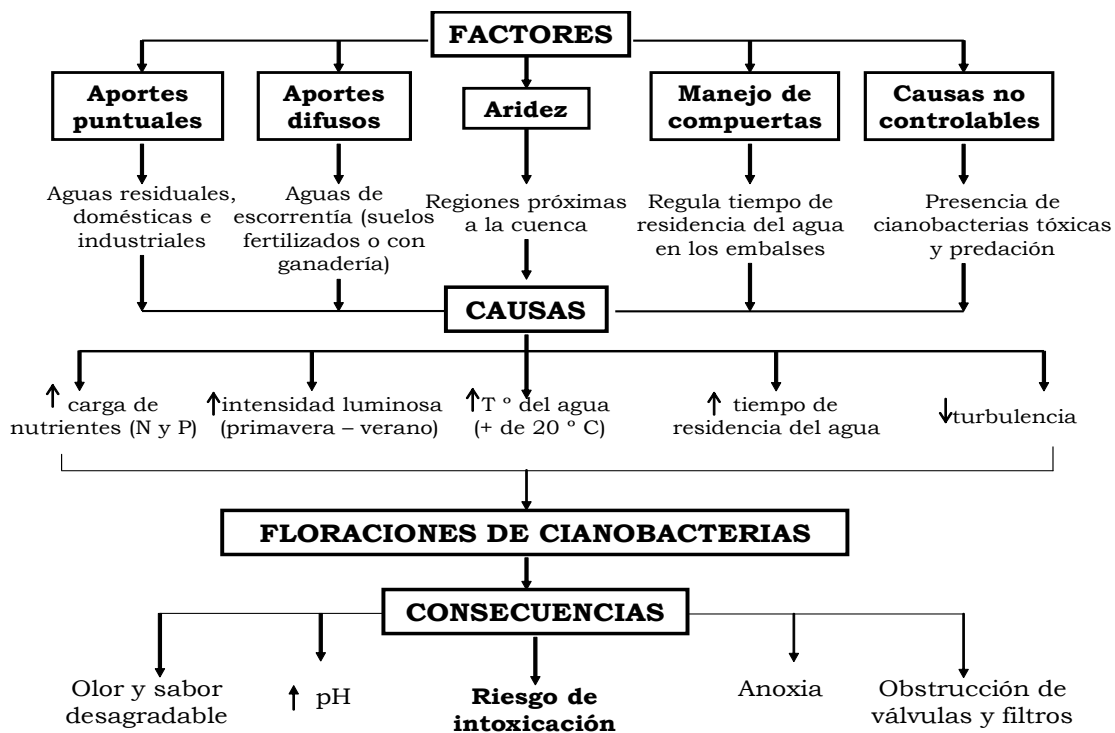


Figura 1: Diagrama simplificado de los factores que determinan las causas de las floraciones de cianobacterias y los efectos de éstas sobre los sistemas acuáticos y su biota.

Figure 1: Simplified diagram of the factors that determine the causes of the harmful algal blooms and their effects on the aquatic systems and their biota.

gales contaminados con toxinas también es un riesgo (14).

Vigilancia y medidas de control:

Medidas a corto plazo: Informar sobre el riesgo producido por cianobacterias y brindar información adicional sobre otros parámetros de calidad del agua. Incluir información sobre el grado de contacto con el agua en deportes acuáticos. Advertir que las actividades recreativas estarán restringidas solo temporal y localmente, y que el agua puede tener una calidad aceptable en un lugar cercano como por ejemplo, el mismo lago.

Medidas a largo plazo: Restaurar la calidad del agua a niveles ideales de transparencia mayores a 2 m (lectura del disco de Secchi) y eliminar los florecimientos de cianobacterias. Esto se logra al mantener las concentraciones de fósforo por debajo de 0,01 µg/l ya que a estas concentraciones, es poco probable que ocurran densidades cianobacterianas que presenten un riesgo moderado a alto para la salud (19).

MICROCISTINAS (MC)

Estructura química: Son heptapéptidos cíclicos no ribosomales (16) con particularidades solo halladas en las hepatotoxinas cianobacterianas (20). Su estructura general es la de un

ciclo compuesto: **(1)** D-alanina, **(2)** aminoácido variable, **(3)** ácido metilaspártico (-Me-Asp), **(4)** aminoácido variable, **(5)** cadena lateral de aminoácidos específica (Adda), **(6)** Ácido D-glutámico y **(7)** N-metildehidroalanina (Mdha) (4, 22). La Fig. 2 muestra la estructura química de las MC. Actualmente hay identificadas más de 80 MC (16). Las variaciones más frecuentes son las que se producen por sustituciones de L-aminoácidos en las posiciones 2 (X) y 4 (Y) (14, 18, 27) y por desmetilaciones de los aminoácidos en posición 3 y/o 7, aunque se han observado variaciones en cada aminoácido. Los L aminoácidos, Adda y el D-glu libre, juegan un papel muy importante en la hepatotoxicidad. Los aminoácidos en las posiciones X e Y, se indican con un sufijo de dos letras, por ejemplo MC-LR contiene leucina (L) en posición 2 y arginina (R) en posición 4. En la posición X los L-aminoácidos más comunes son leucina (L), arginina (R) y tirosina (Y). En la posición Y, el aminoácido más común es la arginina (18). Las más habituales son la MC-LR, MC-RR y MC-YR (26). En aguas medioambientales las MC son neutras o aniónicas y relativamente polares, aunque contienen algunas partes más hidrofóbicas (18, 20). Según los aminoácidos existentes en las posiciones X e Y se pueden clasificar en 3 grupos de toxicidad: **Toxicidad Elevada** (MC-LR > MC-LA > MC-YR), **Toxicidad**

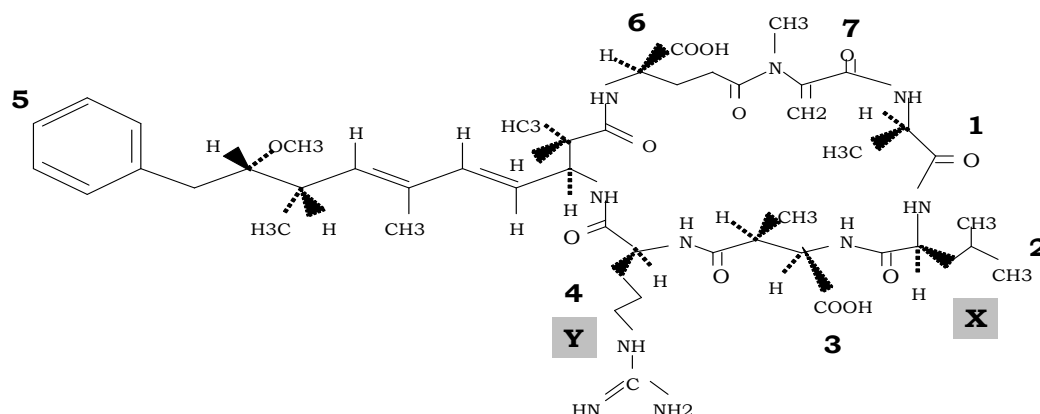


Figura 2. Estructura química de las MC.
Figure 2. Chemical structure of MC.

Moderada (MC-WR, MC desmetiladas en MdhA y (-Me-Asp)) y **Toxicidad Baja** (MC-LY < MC-RR < MC-M (O) R) (18).

Estabilidad, degradación y remoción:

Son extremadamente estables (hidrólisis enzimática, pH extremos, 300° C) (4, 14) y no son destruidas por los oxidantes comunes (26). Para evaluar la pérdida de toxicidad en la naturaleza deben tenerse en cuenta los siguientes factores: *dilución* (resultados contradictorios), *absorción* (baja, aumenta a pH bajo), *descomposición térmica con ayuda del pH* (resisten 10 semanas a 40 °C y pH 10) (22), *fotólisis* (genera productos no tóxicos) (4, 22) y *degradación biológica* (4, 22, 25). Para su remoción en el tratamiento de aguas, se debe eliminar la estratificación, minimizar la incorporación de nutrientes (4, 21), reducir los tiempos de residencia (21), optar por aguas profundas (menor probabilidad de encontrar cianobacterias) y no utilizar alguicidas (sulfato de cobre) ya que provocan muerte celular y liberación de toxinas (4) (aunque algunos autores recomiendan aplicarlos y restringir el uso del agua (3, 21) por aproximadamente 5 días) (3). Para degradar completamente las microcistinas se requiere un tratamiento a reflujo con ácido 6 N hidroxilórico y Ácido Trifluoroacético (11). Los sistemas de potabilización del agua que funcionan en las plantas potabilizadoras no son los adecuados para retener cianotoxinas (13). Los procesos que más comúnmente se combinan para eliminarlas son: *Coagulación-filtración*, *oxidación con cloro*, *ozonización*, *adsorción con carbón activado* (25) y ósmosis inversa. El tratamiento con ozono aplicado simultáneamente con la luz

ultravioleta (UV) implica un proceso de oxidación cuya efectividad en el tratamiento de aguas resulta interesante (13).

Mecanismo de hepatotoxicidad:

Las principales células “blanco” de las MC son *hepatocitos* y *macrófagos* (3, 18, 19), aunque también se han observado efectos adversos en intestino (12). La vía principal de acceso a las células es el conducto de ácido biliar, que se encuentra en células hepáticas y epitelio intestinal, (3, 18, 19), lo cual explicaría la especificidad hepática (18). La permeabilidad de otras membranas celulares a las MC es aún controversial (19). Aparentemente ingresarían, preferentemente desde el ileon, reflejando la actividad de los abundantes transportadores de bilis en esta localización (3, 18). Algunos inhibidores de los transportadores pueden antagonizar los efectos tóxicos de las MC, siendo la rifampina el más efectivo (14). Son primariamente hepatotóxicas en mamíferos y peces (18) e inducen alteraciones de los microfilamentos de actina, primero en la periferia y luego cerca del centro de la célula. Como resultado de la pérdida de soporte celular, los hepatocitos se redondean (3, 12) causando destrucción de los sinusoides hepáticos con la consecuente hemorragia intrahepática letal en horas y/o insuficiencia hepática (en horas o días) (3). Su mecanismo de toxicidad puede describirse en dos niveles:

A) Inhibición de fosfatasa de proteínas:

A nivel subcelular son inhibidores específicos de las fosfatasas tipo 1 (PP1) y tipo 2 (PP2A) (8, 18), las cuales regulan multitud de procesos biológicos. Esta inhibición altera el equilibrio enzimático, observándose un aumento de fosfoproteínas que

activa la cascada de las caspasas y desencadena el proceso de apoptosis (con cambios morfológicos asociados en el hepatocito y consecuente muerte celular). También ocurre una reorganización del citoesqueleto, debido a que afecta la organización de los microtúbulos, filamentos intermedios y microfilamentos (18).

B) Estimulación del metabolismo del Ácido Araquidónico: El mecanismo de liberación de metabolitos del ácido araquidónico por las MC aún no se conoce totalmente, aunque se sabe que lo estimulan por la vía de la ciclooxigenasa. Ocurre síntesis y liberación de prostaciclina (6-ceto F1 α) y tromboxano B2 (TXB2), aunque no se produce liberación de prostaglandina F2 α o E2. El TXB2 deriva del TXA2, el cual es inestable y uno de los más fuertes mediadores de la agregación plaquetaria. La 6-ceto F1 α deriva de la prostaglandina I2 y actúa como inhibidora de dicha agregación. En macrófagos alveolares inducen la liberación de prostaglandina F2 α , PGE2, y TXB2, sugiriéndose que estos macrófagos sintetizan y liberan mediadores químicos en respuesta a la exposición a las MC (18).

Especies susceptibles: Humanos, bovinos, ovinos, cerdos, perros, peces, anfibios, aves acuáticas, murciélagos, cebras, rinocerontes y aparentemente los equinos son susceptibles a la ingestión oral de MC (3). Los monogástricos son menos sensibles que los rumiantes (29). Los roedores de laboratorio son más resistentes a dosis orales, sin embargo, luego de administraciones parenterales (IP) son altamente susceptibles por

lo que se los ha utilizado en bioensayos (3).

Toxicidad: Son en general extremadamente tóxicas por exposición aguda. La DL50 por vía IP de MC LR oscila entre 25 y 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ratones). El promedio es de 50 a 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La DL50 por vía oral es mucho mayor (5000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (18). Tras la ingestión de MC pueden presentarse tres tipos de toxicidad:

a) Toxicidad Aguda: Causan hepatotoxicosis aguda (3). En la Fig.3 se describen los signos clínicos, los datos obtenidos en la patología clínica y la terapia a emplear. La intoxicación subaguda, con concomitantes cambios reparativos y degenerativos en el hígado, puede ser más difícil de determinar (29).

“Insertar Figura 3”

b) Toxicidad Crónica: Por la poca disponibilidad y el alto costo de las toxinas los estudios de toxicidad subcrónicos y crónicos en mamíferos son muy escasos (18). Se ha observado que la toxicidad de las MC es acumulativa (19). En animales de experimentación ocurre daño hepático crónico tras una administración oral continuada (18). En ratones expuestos a dosis subletales y subcrónicas se observa alteración del tejido hepático, alteraciones en el metabolismo lipídico (1, 27) y liberación de radicales libres (1). Luego de finalizada la exposición, se observa recuperación del daño celular y tisular (1, 27).

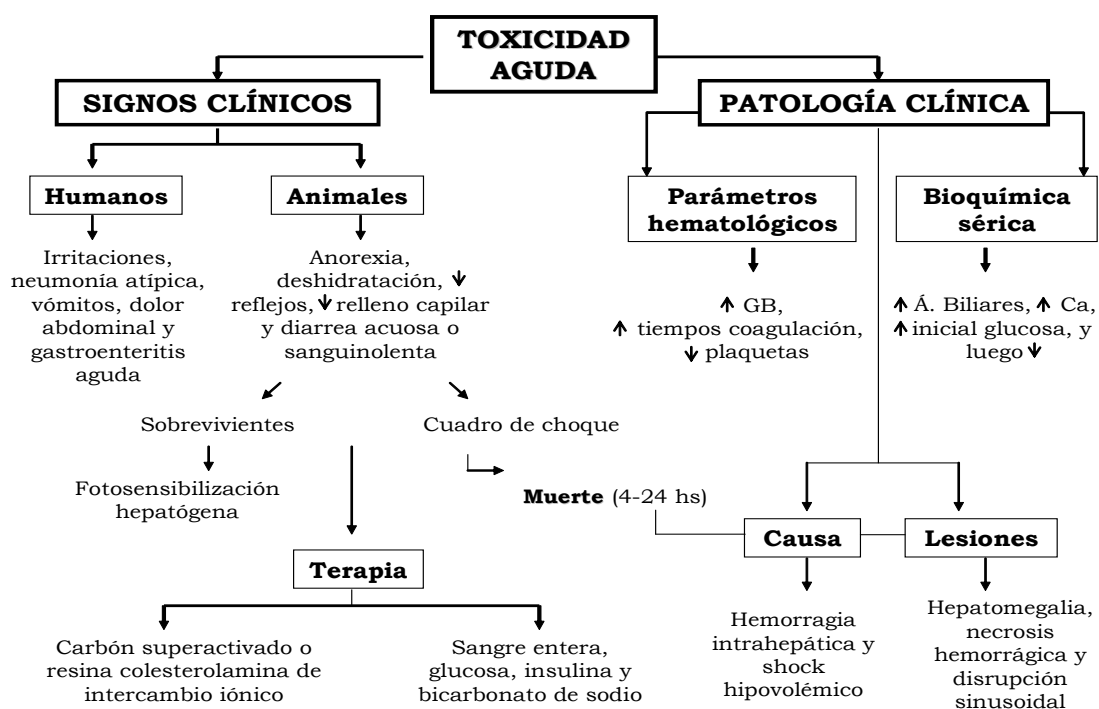


Figura 3. Signos, patología y terapia de la toxicidad aguda.

Figure 3. Signs, pathology and therapy of the acute toxicity.

Recientemente, algunos estudios han indicado que las MC también se acumulan en las gónadas y se han observado una variedad de efectos tóxicos sobre el tracto reproductivo de ratones (8). En peces, la exposición crónica condujo a alteraciones iónicas y a una disminución del crecimiento (18). Los bovinos no expuestos letalmente pueden tener una rápida recuperación. También se ha descrito una disminución de la lactación (3). En humanos, debido a la falta de síntomas aparentes durante la exposición moderada a aguas recreativas, las personas no son conscientes del riesgo y pueden continuar la exposición e incrementar así el riesgo de daño hepático crónico (19).

c) Mutagenesis, carcinogenesis y teratogenesis: La interferencia de las MC en la estructura y mitosis celular permite explicar la actividad generadora de tumores (19). Se ha confirmado su rol como promotoras de cáncer primario de hígado (PLC) (1, 18). Extractos de MC LR muestran una fuerte mutagenicidad en el Ensayo de Ames. En cultivo primario de hepatocitos de rata inducen daños en el ADN. En médula ósea de ratón se evidencia aumento de los eritrocitos policromáticos micronucleados (18). Son muy escasos los estudios sobre los posibles efectos genotóxicos. Debido a que las MC atraviesan la barrera placentaria se ha observado en ratones y animales acuáticos toxicidad tanto materna (disminución de peso corporal y daño hepático) como embrionaria y fetal (muerte embrionaria, malformaciones y retardo en el crecimiento) (5). En humanos se ha encontrado relación entre la exposición crónica por consumo de agua con MC en el primer trimestre de embarazo y un aumento de defectos congénitos (18).

Detección de microcistinas en agua:

Toma de muestra: Se realiza generalmente luego del bloom algal, durante el verano tardío y el otoño temprano. Los puntos de muestreo deben ser representativos de todo el cuerpo de agua, muestreando áreas en que puedan afectar a hombres y/o ganado. Para analizar MC libres en agua la recolección debe realizarse con una botella de vidrio color caramelo (con luz UV se isomerizan) y para analizar el contenido de MC en las algas debe utilizarse una malla de plancton. **Extracción y purificación:** Generalmente se realiza un paso de filtración. Para determinar la concentración total de MC, la muestra se somete a ultrasonido, liofilización o congelación-descongelación para romper el alga y obtener las toxinas libres. Se ha reportado que la mezcla de metanol-agua 50:50 (v/v) es efectiva para extraer MC desde células algales obteniendo más de un 90 % de recuperación (22). También puede utilizarse metanol acuoso acidificado (17), metanol o agua puros y

ácido acético diluido. El pH es también un factor importante. La mayor recuperación de MC RR se encontró a pH 10. Para extraer las MC disueltas en el agua el método más comúnmente usado es la extracción de fase sólida (SPE) ya que permite realizar simultáneamente extracción y clean-up. Varios materiales y solventes han sido testeados para este propósito, siendo el octadecyl silica (C18) y metanol (o mezclas acuosas con metanol) la combinación más usada (22). Además de los cartuchos SPE, los inmunoabsorbentes y polímeros impresos molecularmente (HIP's) han sido recientemente desarrollados para aumentar la selectividad de la extracción y clean-up de aguas conteniendo MC (22, 17).

Métodos de detección: Se cuenta con Métodos biológicos y Análisis Físico-Químicos:

Métodos Biológicos (Bioensayos): **a)** Ensayo en ratones: Debido a su elevado costo, a su sensibilidad y reproducibilidad limitadas (22), a los pocos laboratorios aprobados y a limitaciones éticas para su aplicación, este método no es adecuado para grandes programas de selección o monitoreo (19, 24). **b)** Bioensayos en organismos acuáticos: Se utilizan los géneros *Daphnia* o *Artemia*, dependiendo del medio de origen de la muestra. También se han desarrollado ensayos en peces y ranas (26). **c)** Ensayos alternativos: Los cultivos de hepatocitos de rata presentan una buena correlación con el ensayo de ratón. Los tests con fibroblastos (V79 de hamster) para MC generan falsos positivos y falsos negativos que enmascaran los resultados (26). **d)** Ensayos enzimáticos: Inhibición de la fosfatasa. Utiliza los procesos biológicos afectados por las toxinas para desarrollar ensayos in vitro de gran sensibilidad. Existe una buena correlación lineal entre los resultados obtenidos por HPLC y los obtenidos por el método de PP2A (26). **e)** Técnicas inmunológicas: Se han desarrollado anticuerpos monoclonales y kits de ELISA para MC las cuales visualizan los efectos mediante una reacción de peroxidasa. Son rápidos, sensibles, específicos y de procedimiento sencillo, con un nivel de detección de microgramos (4). El ELISA puede ser usado como un ensayo de screening (22). Mediante esta metodología se han detectado falsos positivos para MC LR (26). **f)** Técnicas genéticas: Determinadas secuencias de material genético (rRNA y DNA) permiten diferenciar géneros e incluso cepas tóxicas dentro de una misma especie. Pueden identificarse mediante RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, Rif-Lip), y sintetizarse en grandes concentraciones usando técnicas de PCR. Permiten desarrollar sistemas de monitoreo y detección a largo plazo y por lo tanto alertar de una futura proliferación cianobacteriana (26). **g)** Ensayos con bacterias luminiscentes: (Microtox). Inicialmente promisorios debido a su respuesta a extractos de cianobacterias, sin

embargo se ha demostrado que las respuestas no se deben a las hepatotoxinas presentes (4).

Análisis Físico-Químicos:

a) Cuantificación de la biomasa: Se utilizan técnicas convencionales como clorofila "a", recuento microscópico, peso seco, carbono orgánico particulado, o ATP/carbono orgánico. También es posible estimar las concentraciones de otros pigmentos fotosintéticos que, al encontrarse solo en cianobacterias, sirven como indicadores de su presencia en el medio (26).

b) Electroforesis capilar: No es un método comúnmente usado para el análisis de MC ya que requiere pre-concentración de la muestra para lograr el límite de detección deseado (22). A diferencia del HPLC no tiene aún el alcance necesario para hacer monitoreos rutinarios de agua (4). Variantes de electroforesis capilar micelar son utilizadas también para detectar el ácido okadaico de cianobacterias (26).

c) HPLC: Es el método más común para la determinación de MC. Generalmente se utiliza la separación líquida combinada con detector UV o espectrometría de masa (MS) (22). Al usar **HPLC UV** debe tenerse en cuenta que la mayoría de las MC absorben un máximo de 238 nm. Aquellas que poseen aminoácidos aromáticos, (MC LW) absorben una cantidad máxima de luz de 222 nm (4). El detector UV presenta desventajas sobre el MS, ya que no es suficientemente sensitivo y selectivo. Muchas interferencias neutrales se absorben a la misma región UV que las MC y muchas MC (aproximadamente 60) tienen un espectro UV muy similar (20). Puede utilizarse también un detector PDA (Photo-diode array) que no solo responde ante la absorción UV sino al espectro típico de las toxinas, permitiendo distinguir entre espectros UV relacionados cercanamente. Los límites de detección de este método son inferiores a 1 µg/l (4). No es una técnica específica por lo cual es necesario confirmar la presencia de MC mediante técnicas accesorias (26).

LC MS se utiliza luego de la separación HPLC y provee una mejor solución al problema de identificación de los distintos tipos de MC ya que provee información estructural debido a que cada una produce iones característicos en su espectro de masa (2). Presenta un límite de detección de aproximadamente 0,02 µg/l de MC individuales (4). Su sensibilidad y selectividad pueden mejorarse usando *SIM* (*Selected Ion Monitoring*), *SRM* (*Selected Reaction Monitoring*). Algunos autores aumentan su selectividad usando *MS² + ESI* (*Electrospray Tandem Mass Spectrometry*), *LC-ion trap* y *IT-MS + ESI*. Usando triple cuadrupolos (*MS² + ESI*) se identificaron las variantes dimetiladas y didimetiladas. Con el uso de *LC-MS (+ESI)* el espectro de masa de los iones (M+H)⁺ revela dos tipos distintos de patrones de fragmentación, con diferencias entre los productos que contienen arginina (MC LR, RR e YR) y MC LA que no tiene residuo de arginina

(22). En el análisis de MC en agua también puede aplicarse un **láser de matriz asistida (MALDI-TOF-MS: desorption/ionization, time of flight, mass spectrometry)** (2, 22). En los blooms de *Planktothrix*, las variantes dimetiladas de MC son dominantes y este puede ser un buen soporte al HPLC para la identificación (22).

d) GC: (Gas Chromatography). Es un método basado en la oxidación de MC produciendo ácido 3-metoxi-2 metil-fenilbutanoico (4, 14). Con ella es posible alcanzar un límite de detección de 0,43 ng, según la concentración del tóxico (4).

Legislación, niveles de riesgo y niveles de seguridad: En 1998, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció el nivel máximo aceptable para el consumo diario de MC LR en 1 µg/l (6, 26) y este valor es también la concentración máxima aceptable para prevenir la inducción de tumores (25). Es un valor provisional de referencia (debido a la poca información disponible) (4, 6, 16), que comprende tanto las MC intra como extracelulares (4). Algunos autores proponen un valor de 0,01 µg/l en casos de exposición crónica, por la posible correlación entre cáncer primario de hígado y presencia de MC en agua (18). Otro estudio considera 0,5 µg/l para MC LR, o 1 µg/l del total de MC en agua potable (25). Tanto el Codex Alimentarius como el Código Alimentario Argentino, no hacen mención alguna sobre las MC y sus valores admisibles en agua potable (4). Uno de los pocos países que tiene legislación concreta respecto a las cianotoxinas en aguas de consumo es España, pero no recomienda ninguna metodología ni establece las variantes de MC a medir, lo que dificulta su cumplimiento. No existe legislación en cuanto a las aguas de recreo, sin embargo la OMS sugiere prohibir el acceso a la zona recreativa en presencia de más de 20000 células de cianobacterias potencialmente tóxicas por ml de agua (24). Los límites australianos, país que se dedica intensivamente al estudio de problemas con cianobacterias (4), y cuyas pérdidas económicas debidas a blooms algales se encuentran entre los 180 a 240 millones de dolares anuales (28), determinan un máximo admitido de 1,3 µg/l. Esta diferencia con el valor establecido por la OMS se debe a que el peso corporal estándar es de 60 kg para la OMS y de 70 kg para Australia (4). Un valor guía único no es apropiado. Deben definirse una serie de valores guía asociados con la severidad y probabilidad elevada de los efectos sobre la salud en tres niveles de riesgo [**probabilidad leve o baja:** 20000 células cianobacterianas/ml, 10 µg de clorofila "a" (19) o 4 µg/l de MC (19, 30), **moderada:** 100000 células cianobacterianas/ml, 50 µg/l de clorofila "a" (19) o 20 µg/l de MC (19, 30) y **elevada:** 1000000 células cianobacterianas/ml o 2 µg/l de MC (19)]. Debe tenerse en cuenta

que *Planktothrix agardhii* alcanza densidades de 250 µg/l de clorofila "a", o incluso mayores, sin formación de espuma. Además debe considerarse que el riesgo para la salud aumenta cuando la persona expuesta es especialmente susceptible, por ejemplo, debido a una hepatitis B crónica (19), lesiones renales o alcoholismo (18). En cuanto a los niveles de seguridad para MC LR, el NOAEL (Nivel sin efectos adversos observados) es de 40 µg/kg/día (12), el LOAEL (Nivel de efectos adversos bajo) se determinó en 0,067 µg/kg/día y la IDT (Ingesta diaria tolerable) es de 0,04 µg/kg/día tanto en agua (18) como en leche (20).

Conclusiones: La ocurrencia de florecimientos cianobacterianos es un serio problema medioambiental, no solo por los graves efectos que ocasionan sobre el recurso hídrico y el ecosistema, sino fundamentalmente, porque éstas producen de forma habitual toxinas que pueden tener efectos nocivos sobre la salud de personas y animales expuestos. Es sabido que el aumento de la eutrofización de los ambientes acuáticos eleva las chances de que ocurra un bloom, pero poco se conoce actualmente sobre las condiciones que promueven la producción de toxinas. De las cianotoxinas generadas en el metabolismo algal, las hepatotoxinas son las más abundantes y habituales, y las MC las más comunes de este grupo. Los métodos de detección para dichas toxinas varían desde el bioensayo, que solo permite advertir la presencia de la toxina, hasta los más sofisticados equipos de HPLC, con límites de detección inferiores a 0,02 µg/l y capaces de caracterizar las estructuras de los productos de degradación en muestras medioambientales. El valor de 1 µg/l de MC LR establecido por la OMS es un valor provisional de referencia, pero un valor guía único no es apropiado. Debido a que las cianotoxinas se consideran la fuente de riesgo más importante asociada al agua de consumo y recreacional, la solución del problema requiere acciones integradas en tres aspectos fundamentales: investigación, soluciones técnicas y gestión adecuada del recurso hídrico.

BIBLIOGRAFÍA

1. Andrinolo D. Primeras evidencias de recuperación de hígados afectados por hepatotoxinas producidas por cianobacterias presentes en el Río de la Plata. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 2006; Supl. 3, p. 149.
2. Barco M, Rivera J, Caixach J. Analysis of cyanobacterial hepatotoxins in water samples by microbore reversed-phase liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2002; 959: 103-111.
3. Beasley VR, Cook WO, Dahlem AM, Hooser SB, Randall AL, Valentine WM. Algae intoxication in livestock and waterfowl. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 1989 5(2): 345-361.
4. Braga NB. Tóxicos de origen cianobacteriano. Disponible en: <http://www.zoetnocampo.com/Documentos/ciano/cianobacterias.htm>
5. Bu YZ, Li XY, Zhang BJ, Chung IK, Lee JA. Microcystins cause embryonic toxicity in mice. *Toxicol*, 2006; 48: 966-972.
6. Burch MD. Chapter 36: Effective doses, guidelines & regulations. *Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine & Biology*, H. Kenneth Hudnell (ed.), 2007; p. 819-841.
7. De León L. Floraciones de cianobacterias en aguas continentales del Uruguay: Causas y Consecuencias. *Perfil Ambiental del Uruguay*, 2002; p. 28-37.
8. Ding XSh, Li XY, Duan HY, Chung IK, Lee JA. Toxic effects of Microcystis cell extracts on the reproductive system of male mice. *Toxicol*, 2006; 48: 973-979.
9. El-Bestawy EA, El-Salam AZA, Hansy AER. Potential use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 2007; 59: 180-192.
10. Etchenique RO, Giannuzzi L, Ferrari LA, González DA. Estudio sobre la calidad de agua de red en Bahía Blanca, Argentina. *13° Congreso Argentino de Saneamiento y Medio Ambiente*, 2003; p 1-18.
11. Etchenique RO. Cianobacterias. Algas causantes de toxicidad. *Mesa Redonda-Agua. Congreso de Zoonosis*, La Plata, Argentina, 2006.
12. Falconer IR. Chapter 27: Health effects associated with controlled exposures to cyanobacterial toxins. *Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine & Biology*, H. Kenneth Hudnell (ed.), 2007; p. 593-598.
13. Giannuzzi L. Estrategias tecnológicas para la remoción de Cianobacterias y Cianotoxinas. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 2006; Supl. 3, p. 151.
14. Gilroy DJ, Kauffman KW, Hall RA, Huang X, Chu FS. Assessing Potential Health Risks from Microcystin Toxins in Blue-Green Algae Dietary Supplements. *Environmental Health Perspectives*, 2000; Vol. 108, N°5: 435-439.
15. Guerrero JM. Monitoreo de Cianobacterias potencialmente toxigénicas en el embalse Paso de las Piedras y en la zona costera del Río de la Plata (Prov. De Buenos Aires). *Mesa Redonda-Agua. Congreso de Zoonosis*, La Plata, Argentina, 2006.
16. Jungblut AD, Hoeger SJ, Mountfort D, Hitzfeld BC, Dietrich DR, Neilan, BA. Characterization of microcystin production in an Antarctic cyanobacterial mat community. *Toxicol*, 2006; 47: 271-278.
17. Meriluoto JAO, Spoof LEM. Chapter 21: Cyanotoxins: sampling, sample processing and toxin uptake. *Proceedings of the Interagency, International Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine & Biology*, H. Kenneth Hudnell (ed.), 2007; p. 467-483.
18. Moreno I, Repetto G, Cameán A: Interés toxicológico de las microcistinas, *Rev. Toxicol*, 2003; 20:

159-165.

19. Organización Mundial de la Salud (OMS), Capítulo 7: Algas y cianobacterias en aguas dulces. *Guías para ambientes seguros en aguas recreativas. Volumen 1: Aguas costeras y aguas dulces*, 1998; Ginebra, CH.

20. Orr PT, Jones GJ, Hunter RA, Berger K, De Paoli DA, Orr, ChLA. Ingestion of toxic *Microcystis aeruginosa* by dairy cattle and the implications for microcystin contamination of milk, *Toxicon*, 2001; 39: 1847-1854.

21. Paerl HW. Nutrient and other environmental controls of harmful cyanobacterial blooms along the freshwater-marine continuum. Manuscript prepared for the *EPA ISOC CyanoHab meeting* held in 2005; Raleigh, NC.

22. Pérez S, Aga DS. Recent advances in the sample preparation liquid chromatography tandem mass spectrometric analysis and environmental fate of microcystins in water. *Trends in Analytical Chemistry*, 2005; Vol. 24, No. 7: 658-670.

23. Prosperi CH. Cyanobacteria in human affairs. *Interciencia*, 2000; p. 303-306.

24. Quesada Corral A, Carrasco D, Cirés S. Cianobacterias en aguas de consumo y de recreo: Un problema de todos, *Ponencia en Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX)*, 2006.

25. Roset J, Aguayo S, Muñoz MJ: Detección de cianobacterias y sus toxinas. Una revisión, *Rev. Toxicol*, 2001; 18: 65-71.

26. Ramírez García P, Martínez Romero E, Martínez Salgado MD, Eslava Campos, CA. Cianobacterias, microorganismos del fitoplancton y su relación con la salud humana, *Instituto Nacional de Ecología*, 2004; p. 1-18.

27. Sedan D, Telese L, Giannuzzi L, Andrinolo D, Aura C. Recuperación del daño hepático producido por intoxicaciones subcrónicas con la cianotoxina microcystina LR, un inhibidor de PP2A. Disponible en: www.cori.unicamp.br/jornadas/completos/UNLP/Sedan-Telese.pdf

28. Steffensen DA. Chapter 37: Economic cost of cyanobacterial blooms. *Proceedings of the Interagency, Internacional Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine & Biology*, H. Kenneth Hudnell (ed.), 2007; p. 843-853.

29. Stewart I, Seawright AA, Shaw GR. Chapter 28: Cyanobacterial poisoning in livestock, wild animals and birds - an overview. *Proceedings of the Interagency, Internacional Symposium on Cyanobacterial Harmful Algal Blooms. Advances in Experimental Medicine & Biology*, H. Kenneth Hudnell (ed.), 2007; p. 599-623.

30. Stone D. Cyanobacteria and their toxins. Disponible en: www.oregon.gov/DHS/ph/envtox/docs/algaetoxins.pdf